

FLAVIANA SALES CONCEIÇÃO

**EFEITO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SEGUIDA DA MOAGEM EM
MOINHO DE BOLAS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS
E FÍSICO-QUÍMICAS DO AMIDO DE MANDIOQUINHA-SALSA**

São José do Rio Preto

2012

FLAVIANA SALES CONCEIÇÃO

EFEITO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SEGUIDA DA MOAGEM EM
MOINHO DE BOLAS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS
E FÍSICO-QUÍMICAS DO AMIDO DE MANDIOQUINHA-SALSA
(*ARRACACIA XANTHORRIZA*)

Texto apresentado ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus São José do Rio Preto, para a defesa de Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos: área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos.

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

São José do Rio Preto

2012

Conceição, Flaviana Sales

Efeito da hidrólise enzimática seguida da moagem em moinho de bolas sobre as características estruturais e físico-químicas do amido de mandioquinha-salsa/ Flaviana Sales
Conceição – São José do Rio Preto: [s.n], 2012.

Orientador : Célia Maria Landi Franco

Dissertação (Mestrado) – Universidade estadual Paulista , Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Amido – Modificado. 3. Amido- características físico-químicas. 4. Amido mandioquinha-salsa. 5. Hidrólise enzimática. 6. Amido – Moagem. I. Franco, Célia Maria Landi. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título

CDU – 664.2

FLAVIANA SALES CONCEIÇÃO

**EFEITO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SEGUIDA DA MOAGEM EM
MOINHO DE BOLAS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FÍSICO-
QUÍMICAS DO AMIDO DE MANDIOQUINHA-SALSA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

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

Professor Assistente Doutor

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Thais de Souza Rocha

Professor Doutor

Universidade de Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof. Dr. Ana Carolina Conti e Silva

Professor Assistente Doutor

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 02 de Agosto de 2012

Dedico

A minha filha Maria Vitória, aos meus pais, João e Beverlei que não mediram esforços para que eu estivesse aqui, ao Márcio meu esposo pelo apoio, afeto, carinho, paciência e amor. Obrigada

Agradecimentos

À Deus por me dar força para a realização deste trabalho.

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

Ao meu esposo Márcio pelo carinho, amor e dedicação em todos os momentos, te amo.

Às colegas do Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos, Denise, Thaís, Marina, Larissa, Jaqueline, Súelen, Verena, Rafaela e Florença, pela ajuda e amizade.

Ao prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi.

À minha filha que desde tão pequena dentro de mim me dá forças para superar as minhas dificuldades e mostrar que sou muito forte.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia de Alimentos, Alana, Ginaldo, Jesuíno, Luiz, Newton e Tânia.

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro à pesquisa.

*“ Tu te tornas eternamente responsável por
aquilo que cativas”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO GERAL	18
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 O AMIDO	19
3.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO AMIDO	21
3.3 AMIDO MODIFICADO.....	22
3.3.1 <i>Amido Modificado por Enzima</i>	23
3.3.1.1 <i>Ação da enzima α-amilase</i>	25
3.3.1.2 <i>Ação da enzima amiloglucosidase</i>	25
3.3.1.2 <i>Efeito da ação sinérgica da α-amilase e a amiloglucosidase</i>	26
3.4.1 <i>Amido Modificado Fisicamente</i>	27
3.5 <i>MANDIOQUINHA-SALSA</i>	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL	31
4.2 MÉTODOS.....	31
4.2.1 <i>Isolamento dos Amidos</i>	31
4.2.2 <i>Composição Química</i>	31
4.2.3 <i>Hidrólise enzimática do amido</i>	32
4.2.3.1 <i>Atividade da enzima α-amilase bacteriana</i>	32
4.2.3.2 <i>Atividade da enzima amiloglucosidase fúngica</i>	32
4.2.3.3 <i>Hidrólise enzimática</i>	33
4.2.4 <i>Modificação física</i>	33
4.2.5 <i>Forma e distribuição do tamanho dos grânulos de amido</i>	34
4.2.6 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	34
4.2.7 <i>Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina</i>	34
4.2.7.1 <i>Desramificação dos amidos</i>	34
4.2.7.2 <i>Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)</i>	35

4.2.8 Distribuição do tamanho molecular dos amidos.....	36
4.2.9 Afinidade com iodo e teor aparente de amilose	37
4.2.10 Difração de raios-X.....	37
4.2.11 Propriedades térmicas	37
4.2.12 Propriedades de pasta	38
4.2.13 Poder de inchamento e solubilidade	39
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 ISOLAMENTO DOS AMIDOS.....	40
5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AMIDO NATIVO	40
5.3 MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	41
5.4 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DOS GRÂNULOS DE AMIDOS NATIVO E MODIFICADOS.....	43
5.5 FORMA DOS GRÂNULOS DE AMIDOS NATIVO E MODIFICADOS.....	46
5.6 DISTRIBUIÇÃO DO COMPRIMENTO DAS CADEIAS LATERAIS DA AMILOPECTINA.....	49
5.7 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO MOLECULAR DOS AMIDOS.....	51
5.8 AFINIDADE COM IODO E TEOR DE AMILOSE	53
5.9 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X E CRISTALINIDADE RELATIVA	55
5.10 PROPRIEDADES TÉRMICAS DOS AMIDOS NATIVOS E MODIFICADOS	57
5.11 PROPRIEDADES DE PASTA.....	60
5.12 PODER DE INCHAMENTO (PI) E SOLUBILIDADE (SS).....	62
6 CONCLUSÃO	65
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estrutura química das cadeias de amido.(a) amilose, (b) amilopectina. Adaptado de Muralikrishna e Nirmala (2005). 19
- Figura 2 Representação esquemática das cadeias A e B da amilopectina. Adaptado de Tester; Karkalas, Qi (2004) 20
- Figura 3 Representação esquemática da estrutura do grânulo de amido. Adaptado de Gallant, Bouchet e Baldwin (1997). 21
- Figura 4 Porcentagem de açúcar redutor produzido em função do tempo durante a hidrólise enzimática do amido de mandioquinha-salsa, em diferentes condições: A: 40 SKB/g de amido de α -amilase bacteriana e 10 U/g de amido de amiloglicosidase fúngica por 36 h; B) 20 SKB/g de amido de α -amilase e 5U/g de amido de amiloglicosidase fúngica por 12 h e C) 5 U/g de amido de amiloglicosidase fúngica por 12 h..... 42
- Figura 5 Micrografias dos grânulos de amido de mandioquinha-salsa observados em microscópio óptico sob luz normal: (a) nativo; (b) moído 1h; (c) moído 2h; (d) hidrolisado com α -amilase e amiloglicosidase; (e) hidrolisado com α -amilase e amiloglicosidase e moído por 1h; (f) hidrolisado com α -amilase e amiloglicosidase e moído por 2h. 47
- Figura 6 Micrografias dos grânulos dos amido observados em microscópio eletrônico de varredura: (a) nativo; (b) moído 1h; (c) moído 2h; (d) hidrolisado com α -amilase e amiloglicosidase; (e) hidrolisado com α -amilase e amiloglicosidase e moído por 1h; (f) hidrolisado com α -amilase e amiloglicosidase e moído por 2h 48
- Figura 7 Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativo, moídos e hidrolisados e moídos.. 49
- Figura 8 Perfil de eluição dos componentes dos amidos de mandioquinha-salsa (a) nativo; (b) moído por 2 h; (c) Hidrolisado com α -amilase e amiloglicosidase e e (d) Hidrolisado com α -amilase e amiloglicosidase e moído por 2 h. 53
- Figura 9 Difractogramas de raios-X dos amidos: A- MSN: nativo; MS1h: nativo moído 1h; MS2h: nativo moído 2h; B- MSH: hidrolisado; MSH1h: hidrolisado e moído 1h; MSH2h: hidrolisado e moído 2h. 55
- Figura 10 Perfil endotérmico dos amidos nativos e modificados, determinados por DSC. 58
- Figura 11 Perfil viscoamolográfico do (a) amido nativo(■); submetido a moagem por 1 h (▲); submetido a moagem por 2 h (*); hidrolisado (X).; 60

Figura 12	Poder de inchamento da mandiоquina-salsa em função da temperatura dos amidos de mandiоquina-salsa: ♦ nativo; ■ moїdo 1 hora; ▲ moїdo 2 horas	63
Figura 13	Souabilidade em função da temperatura dos amidos de mandiоquina-salsa ♦ nativo; ■ moїdo 1 hora; ▲ moїdo 2 horas.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição Química ¹ de amido de mandioca-salsa (% em relação à matéria seca).....	40
Tabela 2 - Porcentagem de hidrólise, por diferença de peso dos amidos hidrolisados.	43
Tabela 3 - Diâmetro menor e maior, diâmetro médio e distribuição dos grânulos de amido de mandioca-salsa nativos, hidrolisados e/ou moídos por 1 e 2 h.	44
Tabela 4 - Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos e modificados.....	50
Tabela 5 - Afinidade por iodob e teores de amilose aparente dos amidos nativo e modificados..	54
Tabela 6 - Cristalinidade relativa dos amidos de mandioca-salsa nativo e modificados..	57
Tabela 7 - Propriedades térmicas dos amidos nativo e modificados.....	59
Tabela 8 - Propriedades de Pasta dos amidos nativo e modificados.	61

RESUMO

Amidos modificados são utilizados pela indústria de alimentos por apresentarem melhor comportamento que amidos nativos. Modificações visando a redução do diâmetro granular para a obtenção de grânulos de tamanho similar aos da molécula de gordura tem sido de grande interesse, pois este amido modificado pode ser usado como substituto de gordura em diversas formulações. Para isso, o pré-tratamento enzimático pode ser usado para fragilizar a estrutura granular do amido e facilitar um posterior tratamento físico como a moagem, obtendo grânulos com menor diâmetro. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da hidrólise enzimática seguida de moagem em moinho de bolas sobre as características estruturais e físico-químicas do amido de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). Amido isolado de raízes de mandioca-salsa foi hidrolisado com α -amilase bacteriana e/ou amiloglucosidase fúngica, a 37 °C, em três diferentes condições: A: 40 SKB/g de α -amilase e 10 U/g amiloglucosidase por 36 h; B: 20 SKB/g de α -amilase e 5 U/g amiloglucosidase por 12 h; C: 5 U/g amiloglucosidase por 12 h. Após hidrólise os mesmos foram moídos por 1 e 2 h. Os amidos nativos e modificados foram analisados quanto à distribuição de tamanho de grânulos. Houve redução do diâmetro dos grânulos para todos os amidos tratados, mas a condição de hidrólise B foi a escolhida para a continuidade dos experimentos, por ter apresentado uma distribuição de tamanho de grânulos após moagem mais homogênea. Os amidos nativos e hidrolisados com 20 SKB/g de α -amilase e 5 U/g amiloglucosidase por 12 h foram analisados quanto a forma dos grânulos, distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina, distribuição do tamanho molecular dos componentes do amido, teor de amilose, difração de raios-X, propriedades de pasta e térmicas, poder de inchamento e solubilidade. Os grânulos de amido nativo, analisados em microscópios óptico e eletrônico de varredura, mostraram formatos circulares com depressões e irregularidades. A moagem provocou fissuras na superfície granular e formação de aglomerados. Os resultados de distribuição do tamanho molecular dos componentes do amido e distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina indicaram que além do rompimento das pontes de hidrogênio pela moagem, pode ter ocorrido também o rompimento das ligações glicosídicas α -(1-6) nas áreas mais amorfas dos grânulos. O padrão cristalino tipo B, obtido por difractometria de raios-X, não mudou, mas a cristalinidade relativa diminuiu para os amidos modificados. O amido hidrolisado e moído por 2 h apresentou a maior redução na sua cristalinidade relativa (~ 30 %). A moagem causou ligeiro aumento no teor de amilose do

amido principalmente após pré-tratamento enzimático. As temperaturas de gelatinização aumentaram e a entalpia reduziu com o aumento do tempo de moagem, principalmente após o pré-tratamento enzimático. Os resultados sugerem que o tratamento enzimático debilitou a estrutura granular facilitando o rompimento das pontes de hidrogênio pela moagem, o que tornou o tratamento físico mais eficiente.

Palavras chave: amido; mandioquinha-salsa; hidrólise enzimática; moagem.

ABSTRACT

Modified starches are used by food industry because they have better performance than native starches. Modifications in order to reduce granular diameter to obtain granules of similar size to those of fat molecules has been of great interest, for this modified starch can be used as a fat substitute in various formulations. For this purpose, an enzymatic pretreatment can be used to weaken the granular structure of starch and facilitate a subsequent physical treatment such as grinding. The objective of this study was to investigate the effect of enzymatic hydrolysis followed by milling in a ball mill on the structural and physicochemical characteristics of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) starch. Starch isolated from roots of Peruvian Carrot was hydrolyzed with bacterial α -amylase and fungal amyloglucosidase at 37 °C in three different conditions: A: 40 SKB/g of α -amylase and 10 U/g amyloglucosidase for 36 h; B: 20 SKB/g of α -amylase and 5 U/g amyloglucosidase for 12 h; C: 5 U/g amyloglucosidase for 12 h. After hydrolysis, the starches were ball milled for 1 and 2 h. The native and modified starches were analyzed for granular size distribution. There was reduction of the granular diameter for all modified starches, but the B condition of hydrolysis was chosen to continue the experiments because the starches modified in this condition displayed a more homogeneous granular size distribution after milling. The native and hydrolyzed with 20 SKB / g of α -amylase and 5 U / g amyloglucosidase for 12 h starches were analyzed for granule shape, distribution of branch chain length of amylopectin, molecular size distribution of the starch components, apparent amylose content, X-ray diffraction, thermal and pasting properties, swelling power and solubility. The native starch granules, analyzed in optical microscope and scanning electron microscope, showed circular shapes with depressions and irregularities. The ball milling caused fissures on granular surface and agglomerate formation. The results of molecular size distribution of the starch components, and distribution of branch chain length of amylopectin indicated that besides hydrogen bonds broken by ball milling, the α -(1-6) linkages present mainly in amorphous areas of granules can also have been broken by milling. The crystalline pattern B-type, obtained by X-ray diffractometry, has not changed, but the relative crystallinity decreased for all modified starches. The hydrolyzed and 2 h milled starch displayed the highest reduction in the relative crystallinity (~ 30 %). Milling caused slight increase in the amylose, mainly after enzymatic pretreatment. The gelatinization temperatures increased, and enthalpy reduced with increasing milling time, mainly after the enzymatic pretreatment. The results suggest that enzymatic pretreatment makes the granular

structure weaker facilitating the breaking of hydrogen bonds by ball milling what become the physical treatment more efficient.

Keywords: starch; peruvian carrot; enzymatic hydrolysis; ball milling.

1 INTRODUÇÃO

O amido é o principal responsável pelas propriedades tecnológicas de grande parte dos produtos processados, uma vez que contribui para diversas propriedades de textura em alimentos, possuindo aplicações industriais como espessante, estabilizante de colóides, agente gelificante e de volume, adesivo, retentor de água, dentre outros (SINGH et al., 2003).

Este polímero é uma substância de reserva para a maioria das plantas superiores e pode ser utilizada na sua forma nativa ou modificada. Modificações químicas, físicas e enzimáticas dão origem a amidos com propriedades específicas (APLEVICZ; DEMIATE, 2007; ZAVAREZE et al., 2009).

O tamanho e a forma dos grânulos de amido estão entre os fatores de importância na determinação de usos potenciais também nas indústrias alimentícias, devido à influência dessas características sobre as propriedades de processamento de alimentos em pó (LEONEL; GARCIA; REIS, 2004).

O mercado vem preferindo amidos com grânulos de menor diâmetro para muitas aplicações industriais. Embora existam amidos que apresentem grânulos com diâmetro bem pequeno, eles são difíceis de isolar, devido aos custos envolvidos na sua produção, o que os tornam menos viáveis economicamente.

Na literatura, vários métodos têm sido citados (SANGUAPONG et al.; 2003; WU MIAO, 2007; CAVALLINI; FRANCO, 2010), os quais utilizam a combinação da modificação enzimática ou ácida do amido com algum tratamento físico com a finalidade de reduzir o diâmetro médio dos grânulos de amido. Assim, pequenas partículas de amido têm sido obtidas por combinação de hidrólise enzimática e atrito mecânico (SANGUAPONG et al., 2003). Durante a hidrólise, os grânulos tornam-se mais frágeis e quando submetidos à moagem se quebram produzindo partículas de menor diâmetro (JANE, 1992; CASTRO, 2000).

Sanguanpong et al. (2003) estudaram a modificação enzimática do amido de mandioca, seguida de moagem em moinho de bolas, e revelaram que o dano mecânico provoca uma transformação na estrutura dos grânulos, de ordenada para desordenada (amorfa) por meio da quebra das ligações intermoleculares. Segundo esses autores, as fraturas observadas em algumas partes quebradas dos grânulos de amido eram paralelas ao eixo de crescimento das cadeias de amilopectina, e os grânulos quebrados em pequenos fragmentos contribuíram com a região amorfa.

Na moagem em moinho de bolas, a ação mecânica sobre o amido nativo ou submetido a um pré-tratamento causa um aumento das áreas amorfas com consequente redução da área cristalina devido à quebra das pontes de hidrogênio no interior do grânulo (CAVALLINI; FRANCO, 2010). Este processo resulta em mudanças gradativas na estrutura molecular, estrutura cristalina, solubilidade em água, características térmicas e morfológicas dos amidos através da força mecânica produzida pelo atrito das bolas com os grânulos de amido (HUANG et al., 2007).

O amido de mandioca-salsa apresenta grânulos de formato circulares e irregulares, além de grânulos frágeis e quebradiços. Segundo Rocha et al. (2011), este é um amido de fácil cozimento, apresentando baixa temperatura de gelatinização e alta viscosidade de pico, baixa tendência a retrogradação e sinérese, o que contribui para sua alta digestibilidade.

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da hidrólise enzimática seguida da moagem em moinho de bolas do amido de mandioca-salsa em suas propriedades estruturais e físico-químicas.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da hidrólise enzimática com α -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica seguida da moagem em moinho de bolas sobre as características estruturais e físico-químicas do amido de mandioquinha-salsa.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar o amido nativo de mandioquinha-salsa.
- Estudar o efeito da enzima α -amilase e amiloglucosidase em diferentes condições de hidrólise sobre as características morfológicas e estruturais e físico-químicas do amido de mandioquinha-salsa.
- Estudar o efeito da hidrólise seguida da moagem em moinho de bola sobre as características morfológicas e estruturais e físico-químicas do amido de mandioquinha-salsa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O AMIDO

O amido é um carboidrato de reserva das plantas superiores e oferece de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. Está presente nas folhas verdes das plantas, raízes, tubérculos, grãos de cereais, sementes, castanhas e frutas sendo sintetizado nos amiloplastos na forma de grânulos com tamanhos que variam de 1 a 100 μm e em diversos formatos (WHISTLER, BeMILLER, 1997; MUKERJEA; SLOCUM; ROBYT, 2007).

Este polímero é composto de dois polissacarídeos, a amilose de estrutura linear e a amilopectina de estrutura ramificada. A amilose (Figura 1a) é relativamente pequena em sua massa molecular (10^1 - 10^2 Kg/mol) e apresenta poucas ramificações, enquanto a amilopectina (Figura 2.1b) apresenta de 5 a 6 % de ramificações e alta massa molecular (10^4 - 10^6 Kg/mol) (YOO; JANE, 2002). Essas moléculas se interagem através de pontes de hidrogênio, pois estão associadas paralelamente, resultando no aparecimento de regiões cristalinas ou amorfas (FRANCO et al., 2001).

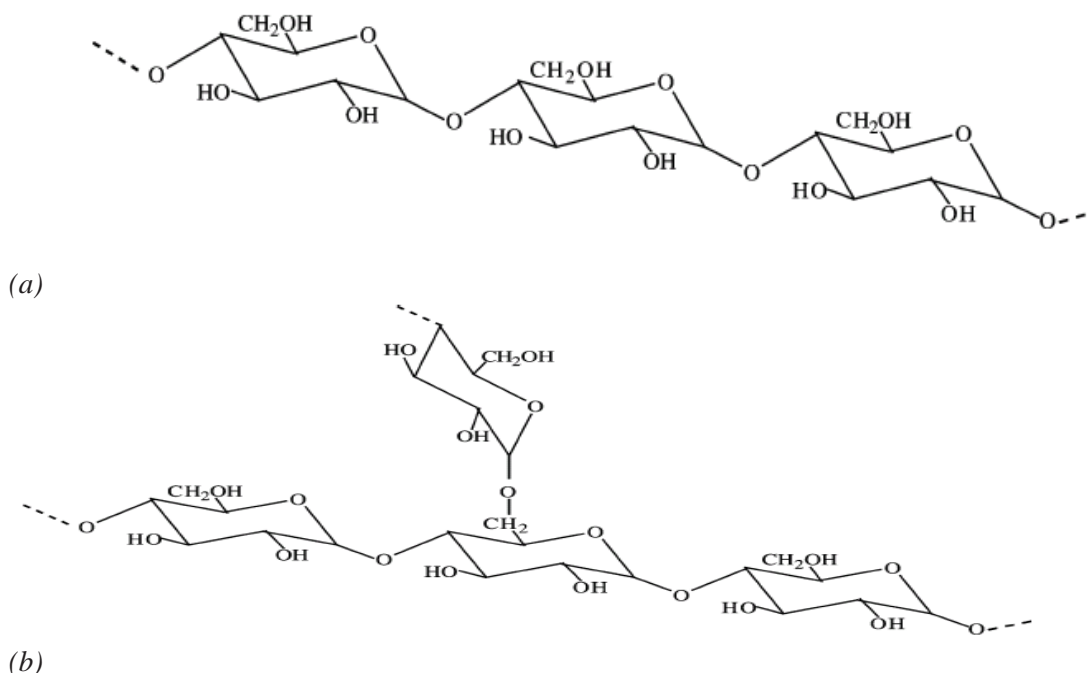


Figura 1 Estrutura química das cadeias de amido.(a) amilose, (b) amilopectina. Adaptado de Muralikrishna e Nirmala (2005).

Os grânulos de amido são estruturas semicristalinas compostas dessas macromoléculas arranjadas na direção radial, associadas paralelamente formando pontes de hidrogênio, que resulta no aparecimento de regiões cristalinas e amorfas. Quando vistos sob luz polarizada os grânulos apresentam uma típica cruz de Malta devido a sua birrefringência resultante do alto grau de organização molecular (FRANCO et al., 2001).

As regiões cristalinas, nos grânulos de amido, consistem de duplas hélices fortemente empacotadas, formadas pelas ramificações da amilopectina, enquanto que a região amorfa, menos ordenada, contém os pontos de ramificação das cadeias laterais da amilopectina e possivelmente alguma amilose (BUELON et al., 1998).

Vários modelos têm sido propostos para a estrutura da amilopectina. No modelo *cluster*, proposto por French (1973) e Robin et al. (1974), as cadeias de amilopectina estão organizadas e são denominadas cadeias A e B. As cadeias A, mais externas, tem comprimento de 60 Å e DP ~ 15. Já as cadeias B podem se estender por dois ou mais “clusters” sendo que cada cadeia B, pode carregar duas ou três cadeias B ou A. A associação destas cadeias A e B na forma de cachos (*cluster*), formam a fração do grânulo resistente à hidrólise ácida. Neste modelo, a maioria das ligações α (1→6) estariam localizadas nas áreas intercrystalinas (amorfas) entre os *clusters* (Figura 2.2).

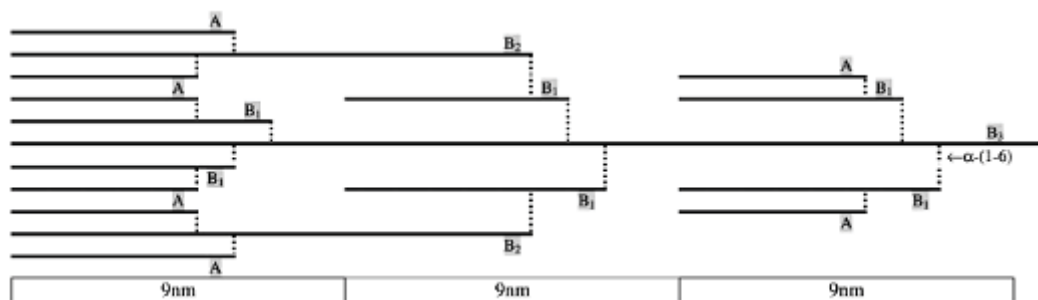


Figura 2 Representação esquemática das cadeias da amilopectina A e B, no modelo de *cluster*. Adaptado de Tester; Karkalas, Qi (2004).

Gallant, Bouchet e Baldwin (1997) sugeriram que as camadas cristalinas e amorfas da amilopectina são organizadas dentro de estruturas maiores esféricas denominadas bloquetes, com diâmetros que variam entre 20 a 500 nm, conforme sua origem botânica (Figura 2.3). Assim, a amilopectina estaria localizada no grânulo em regiões cristalinas e semicristalinas e, nesta última, os bloquetes seriam menores, e a cristalinidade da amilopectina seria reduzida, principalmente devido a seu maior envolvimento com a amilose.

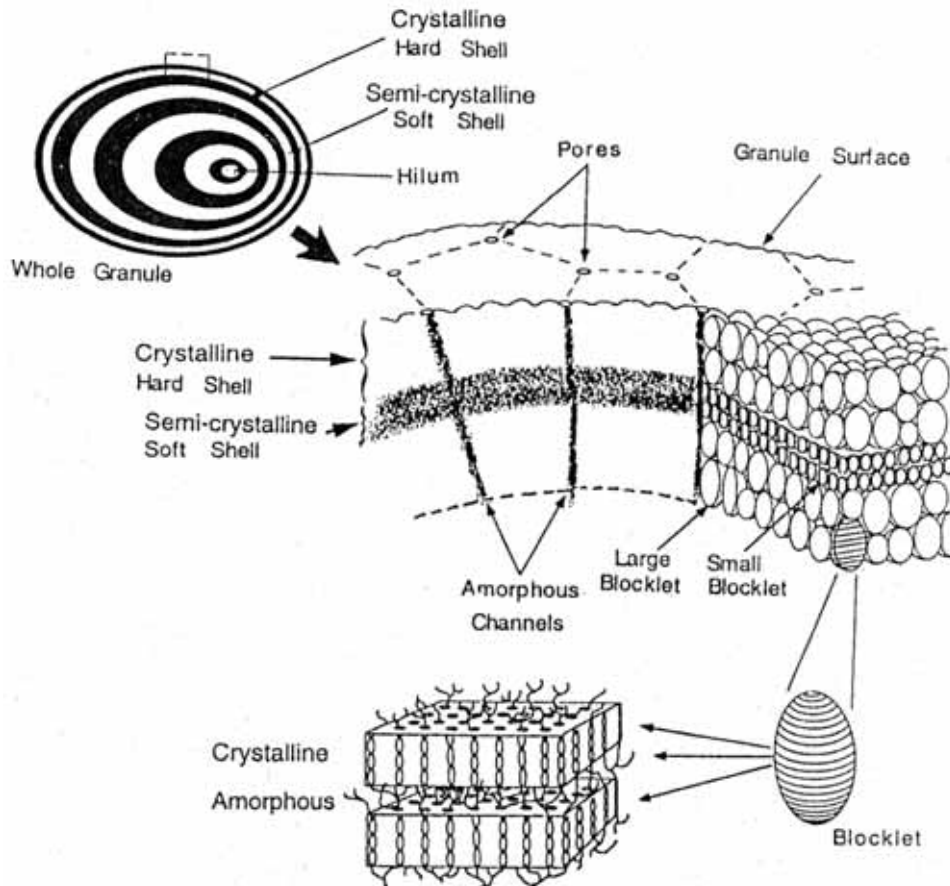


Figura 3 Representação esquemática da estrutura do grânulo de amido. Adaptado de Gallant, Bouchet e Baldwin (1997).

A exata localização da amilose no grânulo tem sido motivo de muitos estudos e três hipóteses mais prováveis tem sido levantadas, de acordo com Jane (2006). A amilose estaria concentrada nas regiões periféricas do grânulo onde estariam fortemente associadas às moléculas de amilopectina, e nas outras duas hipóteses a amilose estaria localizada tangencialmente a orientação radial da amilopectina o que diminuiria as interações helicoidais entre a amilose e amilopectina (BULÉON et al., 1998).

3.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO AMIDO

Quando a suspensão de amido em água é aquecida, inicia-se um processo de modificação denominado gelatinização. À medida que o aquecimento prossegue, os grânulos hidratam e incham absorvendo mais água. Inicialmente a água penetra nas áreas amorfas onde as pontes de hidrogênio são mais fracas e mais facilmente rompidas, e a estrutura granular se altera irreversivelmente. Se houver água suficiente, ocorre a perda da birrefringência e da

ordem cristalina do grânulo que acabam por se romper com conseqüente lixiviação da amilose (BILIADERIS, 1991; THOMAS E ATWELL, 1999; HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003).

A gelatinização e as propriedades de inchamento do amido são controladas parcialmente pela estrutura molecular da amilopectina, proporção de amilose/amilopectina, teor de fósforo e razão entre as regiões cristalinas e amorfas. A intensidade da perfeição cristalina é refletida na temperatura de gelatinização (TESTER, 1997; SINGH et al., 2003).

A reassociação das moléculas gelatinizadas promove uma reordenação da estrutura do amido, devido a uma tendência de tais moléculas se unirem por pontes de hidrogênio, gerando partículas de maior tamanho que, por serem mais pesadas, precipitam. Sob certas condições, o amido gelatinizado sofre dextrinização e hidrólises parciais, porém em seguida, sofre polimerizações, tornando-se insolúvel em água fria e resistente à ação das amilases. Este fenômeno é freqüente em pastas de amido envelhecidas e é denominado por retrogradação (ATWELL et al., 1988).

De acordo com Singh et al., (2003) o conteúdo de amilose é um dos fatores que influencia a retrogradação do amido. Quanto maior o conteúdo de amilose maior a tendência a retrogradação. Outros fatores como a fonte botânica do amido, concentração, condições de aquecimento e resfriamento, pH e presença de solutos como lipídeos e açúcares também são determinantes nesse processo (LAJOLO; MENEZES, 2006).

Estas mudanças que ocorrem durante a gelatinização e retrogradação (propriedades de pasta) são medidas principalmente por dois equipamentos como Viscoamilógrafo Brabender e o RVA (Rápido Viscoanalisador) (FRANCO et al., 2001).

Além das propriedades de pasta, as propriedades térmicas, mensuradas em Calorímetro Exploratório de Varredura, fornecem informações sobre as transformações que ocorrem dentro do grânulo de amido durante o aquecimento e resfriamento na presença de água, como temperaturas de gelatinização, retrogradação e cristalização (YU; CHRISTIE, 2001) e ainda detecta o fluxo de calor, medindo a quebra das pontes de hidrogênio que estabilizam as duplas hélices (TESTER, 1997).

3.3 AMIDO MODIFICADO

Na indústria de alimentos o amido possui as mais variadas aplicações. Além da forma nativa, o amido pode sofrer modificações que o molda de acordo com as características

tecnológicas, para conferir a funcionalidade desejável no desenvolvimento de novos produtos (CIACCO; CRUZ, 1982). Contudo, são inúmeras as razões para que o amido granular seja modificado como: diminuir a tendência de retrogradação, aumentar a estabilidade frente ao aquecimento e atrito mecânico, aumentar a estabilidade das pastas frente ao resfriamento e congelamento, aumentar transparência e adesividade, melhorar textura das pastas ou géis e a formação de filmes, adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante (BeMILLER, 1997; BORTOLO, 1998).

Os amidos podem ser modificados por via química, física ou enzimática. As modificações químicas são as mais utilizadas devido a sua versatilidade, permitindo a obtenção de amidos com propriedades físico-químicas diferenciadas (DEMIATE, 2003). Os amidos modificados por processo físico possuem a vantagem de não serem limitados pela legislação quanto às quantidades utilizadas, sendo considerados como ingredientes, já os amidos modificados quimicamente devem ser mencionados como amido modificado (CEREDA; VILPOUX; DEMIATE, 2003).

As modificações enzimáticas, além de serem um importante processo industrial para a produção de adoçantes, xaropes e outros produtos químicos (etanol, acetona, etc.) (LI et al., 2004), também podem ser utilizadas, como pré-tratamento do grânulo de amido com a finalidade de debilitar sua estrutura, para um posterior tratamento físico como a moagem (SANGUAPONG et al., 2003).

Segundo Sanguanpong et al. (2003) o processo enzimático utilizando α -amilase e amiloglicosidase no amido de mandioca apresentaram uma superfície esponjosa, com conchas em seu interior. A consequência do múltiplo ataque pelas enzimas é a degradação das regiões amorfas e cristalinas. Este enfraquecimento da estrutura granular proporcionado pelo pré-tratamento enzimático auxilia a redução de tamanho do grânulo após a moagem.

3.3.1 Amido Modificado por Enzima

Os amidos modificados por enzima são produzidos pelo uso de basicamente cinco grupos enzimáticos. As endo e exoamilases agem primeiramente nas ligações α -(1,4), ao passo que as enzimas desramificantes agem exclusivamente nas ligações α -(1,6). Um quarto grupo é constituído pelas isomerases que agem nos xaropes de glucose para convertê-los em xarope de frutose. Já as ciclodextrinaglicosiltransferase degradam o amido pela catalização de

reações de despolimerização e de ciclização (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LÓPES, 1995).

A taxa de hidrólise dos grânulos de amido está diretamente ligada à origem botânica do mesmo, assim como ao sistema enzimático utilizado, concentração, e ao tamanho dos grânulos. Amidos de superfície porosa, como é o caso dos grânulos de amido de milho, tendem a sofrer uma degradação mais rápida do que aqueles cuja superfície é lisa, como o de mandioca. Grânulos de menor diâmetro são mais suscetíveis às enzimas que aqueles de maior diâmetro (FRANCO; CIACCO, 1992; FRANCO; CIACCO; TAVARES, 1988, 1998).

Estudos apontam que a suscetibilidade do grânulo de amido ao ataque enzimático está relacionada também a fatores como seu teor de amilose e de amilopectina. Além disso, alguns estudos mostram que grande parte dos grânulos de amido tem seu teor de amilose reduzido após o ataque enzimático, como observado por Cho et al. (2009) para amido de arroz e por Rocha, Carneiro e Franco (2010) para os amidos de mandioca, batata-doce, mandioquinha-salsa e batata. Já Absar et al. (2009), avaliando a suscetibilidade de amidos de batata contendo diferentes teores de fósforo à ação enzimática de α -amilase e glucoamilase notaram que não houve influência da quantidade de amilose, mas que o maior teor de fósforo está relacionado à redução da ação enzimática nos grânulos.

Oates (1997) sugeriu que uma maior taxa de hidrólise enzimática poderia ser obtida mantendo-se o amido nativo incubado a temperaturas próximas a 60°C. Shariffa et al. (2009) conduziram um estudo com amidos de batata-doce e tapioca, avaliando a suscetibilidade dos grânulos à hidrólise enzimática sob ação sinérgica de α -amilase fúngica e amiloglicosidase e após o tratamento térmico (annealing), sempre abaixo da temperatura de gelatinização. Esses autores concluíram que a exposição dos grânulos a temperaturas mais elevadas (60°C), porém menores que a temperatura de gelatinização dos amidos, facilita a ação das enzimas e aumenta a taxa de hidrólise, possivelmente porque em temperaturas próximas as de gelatinização, a região amorfa do grânulo de amido sofre um inchamento irreversível, permitindo o maior ataque das enzimas.

Durante o processo de hidrólise por enzimas, as regiões dos grânulos são degradadas de forma desigual, as áreas amorfas por serem menos organizadas são mais suscetíveis que as áreas cristalinas que oferece uma maior resistência à ação enzimática (OATES, 1997). Porém Colonna; Buléon; Lemane (1988) observaram que a α -amilase pode atacar simultaneamente as áreas amorfas e cristalinas do amido granular, enquanto LAURO et al. (1999)

reportaram que em um estágio inicial da hidrólise de amido de cevada, ambas as áreas cristalinas e amorfas foram igualmente atacadas.

3.3.1.1 Ação da Enzima α -amilase

Pandey et al. (2005) definem α -amilase (1,4- α -glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1.) como sendo uma endoenzima que quebra as ligações $\alpha(1,4)$ dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glucose ligadas em $\alpha-1,4$. O ataque ocorre de forma não seletiva e, sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Isso representa um ataque preferencial sobre cada passo da estrutura helicoidal da amilose ou da dupla hélice da amilopectina (BRUCHMANN, 1980).

A enzima forma com o substrato um complexo, independentemente da posição inicial do substrato. O complexo enzima substrato formado possui uma conformação ideal para a catalise. A ligação da direita esta mais fracamente associada à enzima que a da esquerda, por isso a ligação da direita se associa deixando o lugar desocupado. O fragmento da esquerda se rearranja para ocupar todo lugar da ligação, este processo produz um complexo enzima-substrato com geometria ideal para posterior catálise (HOOVER; ZHOU, 2003).

Contudo, diversos fatores são responsáveis pela ação enzimática. Além da concentração, tempo e temperatura, a espécie botânica do substrato pode facilitar ou limitar a extensão da hidrolise. Por exemplo, amidos de tuberosas e raízes são hidrolisados por somente uma enzima purificada, já os amidos de cereais são completamente e rapidamente digeridos pelas enzimas (ROBERTSON et al., 2006). Estudos realizados por Tester, Qi e Karkalas (2006) observaram que amidos com alto teor de amilose são altamente resistentes à hidrólise por α -amilase devido à ação desta enzima na fração amilose.

3.3.1.2 Ação da enzima amiloglucosidase

Conhecida como glucoamilase, a amiloglucosidase é uma exoenzima produzindo D-glicose a partir da extremidade não redutora da cadeia do amido. Esta enzima é capaz de catalisar a hidrolise de ligações glicosídicas $\alpha-1,4$ e $\alpha-1,6$ (KIM, ROBYT, 1999;

NOROUZIAN et al., 2006), portanto é importante biocatalisador industrial utilizado na produção de xarope de glicose (NOROZIAN, et al., 2006; SHARIFFA, et al., 2009).

A atuação da enzima amiloglucosidase fúngica ocorre por três domínios, um domínio do sítio de atividade, um domínio ligador glicosilado, e um domínio de quebra do amido. A presença do domínio de quebra do amido permite a enzima hidrolisar todo o grânulo de amido (KIMURA; ROBYT, 1996).

A atividade específica da amiloglucosidase na clivagem de ligações glicosídicas α -1,6 é apenas 0,2% da atividade específica na clivagem de ligações α -1,4. A baixa taxa de clivagem de ligações α -1,6 é um efeito adverso na cinética da enzima e na eficiência de sacarificação, e portanto diminui a sua velocidade de atuação (NOROUZIAN et al., 2006).

A amiloglucosidase fúngica age sobre a amilose numa velocidade lenta quando comparada com o ataque à amilopectina, pois sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose. O grânulo de amido adsorve a amiloglucosidase da solução em diferentes proporções, dependendo do tipo de amido (KIM; ROBYT, 1999).

Kim e Robyt (1999) estudando o amido de milho normal e ceroso observou que amidos que possuem poros em sua superfície são mais facilmente hidrolisados pelas amilases. Para esses autores, a penetração da amiloglucosidase fúngica no grânulo de amido produz buracos aumentando o tamanho dos poros na superfície do grânulo.

3.3.1.3 Efeito da ação sinérgica da α -amilase e a amiloglucosidase

Segundo Fellows (2006) e Pandey et al (2005), as enzimas α -amilases e amiloglucosidases são amplamente empregadas industrialmente para a manufatura de diversos produtos. Devido a isso, muitos estudos vêm sendo realizados para a melhor compreensão deste sinergismo.

Quando a amiloglucosidase age sozinha não há mudança no número de sítios do substrato até a amilose ou amilopectina serem digeridas aos seus últimos resíduos. No entanto quando as enzimas α -amilase e amiloglucosidase agem em conjunto, a ação endo-catalítica aumenta o número de sítios do substrato para a ação da exo-enzima, permitindo um aumento na taxa de conversão. No estágio inicial da hidrólise, as ações catalíticas das enzimas podem

permitir à desintegração física da estrutura e conseqüentemente exporem novos sítios suscetíveis à ação de ambas as enzimas (ROBERTSON et al.,2006).

Existem muitos trabalhos sobre o efeito sinérgico das duas enzimas incluindo amidos de mandioca e a própria mandioquinha-salsa (FRANCO; CIACCO; TAVARES, 1988; SANGUAPONG et al., 2003; ROCHA; CARNEIRO; FRANCO, 2010). A eficiência do uso destas duas enzimas foi observada em grânulos de amido de arroz, sagu e batata por Monna et al. (1989). Estes pesquisadores concluíram que esta combinação apresenta bons rendimentos na conversão do amido à glicose em todos os substratos.

Matsubara et al. (2004) comparou a ação da α -amilase e amiloglicosidase nos grânulos de amido de milho, e observou que os resíduos obtidos da hidrólise por α -amilase resultam na formação de grandes buracos na superfície do grânulo de amido.

Estudos realizados por Sanguanpong et al. (2003) observaram que a hidrólise enzimática pode ser utilizada como um pré-tratamento para fragilizar o grânulo de amido e promover a degradação das áreas amorfas e cristalinas do grânulo de amido. A hidrólise com α -amilase e amiloglicosidase no amido de mandioca produziu grânulos com uma estrutura esponjosa e conchas em seu interior. Amilose e amilopectina foram sujeitos a ataques múltiplos pelas enzimas, sem qualquer alteração significativa na cristalinidade dos grânulos.

3.3.2 Amido Modificado Fisicamente

Modificações físicas a fim de diminuir o tamanho do grânulo de amido e suas aplicações tais como substitutos de gordura, filmes plásticos, cosméticos e produtos farmacêuticos tem sido investigadas (JANE, et al. 1992). Grânulos de amidos com tamanho reduzido apresentam uma sensação cremosa na boca, característica apreciada em diversas formulações (MALINSKI; DANIEL; ZHANG; WHISTLER, 2003).

A quebra mecânica do grânulo de amido por aplicação de uma força física pode ser efetiva na obtenção de grânulos de tamanho similar aos da micela de gordura, principalmente após um pré-tratamento para debilitar a estrutura granular, como a hidrólise enzimática ou ácida (JANE et al., 1992; NIEMANN; WHISTLER, 1992; SANGUANPONG et al.,2003).

Quando o grânulo de amido é submetido a forças físicas, durante a moagem, acontecem consideráveis alterações na sua na estrutura molecular, estrutura cristalina, solubilidade em água, características térmicas e morfológicas (JANE et al. 1992;

MORRISON, TESTER, 1994; TAMAKI et al., 1998; SANGUANPONG et al, 2003; HUANG et al., 2007). Ocorre a efetiva destruição da estrutura granular, pela moagem, com a formação de um material amorfo, mesmo sem a adição de água e calor (KIM et al., 2001), e com formação de uma estrutura amorfa, uma maior quantidade de partículas de menor diâmetro é obtida (SANGUANPONG et al, 2003).

A moagem pode ser conduzida em estado sólido, e a ação das bolas sobre os grânulos de amido não ocorre de forma homogênea. O resultado da ação da moagem é o rompimento das ligações glicosídicas, o que depende de diversos fatores, como, força de impacto, diâmetro do cilindro, quantidade de bolas e velocidade de rotação. Portanto, as mudanças nas regiões internas e externas no grânulo de amido são peculiares às condições de tratamento nele empregados (TAMAKI et al., 1998).

Conforme Ren et al. (2010) o tratamento físico em moinho de bolas é dividido em duas etapas. Na primeira etapa ocorrem as operações de cisalhamento, impacto e atrito entre a matriz de moagem e o amido, quebrando os grânulos em pequenos fragmentos, o que rompe as pontes de hidrogênio no grânulo, reduzindo e criando defeitos na região cristalina, incluindo mudanças na estrutura do grânulo de amido. Neste momento, as superfícies de alguns grânulos são espontaneamente ativadas, e são produzidos aglomerados, resultando em mudanças no tamanho das partículas maiores. Assim, grânulos pequenos são produzidos, e a distribuição do tamanho dos grânulos se torna mais ampla e uniforme. Na segunda etapa se estabelece um valor de granulação e os grânulos tornam-se mais resistentes e difíceis de quebrar. A quebra desses grânulos se torna impossível e somente transformações plásticas podem ocorrer.

Os resultados encontrados por Huang et al. (2007, 2008) no estudo dos efeitos da moagem em moinho de bolas nas características físico-químicas e propriedades estruturais de amido de mandioca mostraram que o tratamento melhorou a solubilidade do amido em água fria, sendo que o aumento da solubilidade estava relacionado ao tempo de ativação. A degradação da estrutura cristalina resultante da ativação mecânica permitiu uma maior entrada de água no interior do grânulo. Os danos na estrutura cristalina do amido também foram observados pela redução da viscosidade aparente, pois a afinidade intramolecular no amido foi diminuída.

Segundo Zhang, Zhao e Xiong (2010), à medida que o tempo de moagem aumentou, a forma e o tamanho dos grânulos de amido de arroz foram alterados como resultado da destruição da estrutura cristalina, pois ocorre uma decomposição da amilose e da amilopectina

do amido de arroz, causando um aumento da solubilidade, poder redutor e diminuição do “Blue Value”.

De acordo com Ren et al. (2010), após a moagem do amido de mandioca, as camadas mais externas do grânulo foram removidas como se o grânulo fosse descascado, a estrutura cristalina de amido foi danificada, o grau de desordem aumentou e o grau de cristalinidade e a temperatura de fusão diminuíram. Portanto, ao contrário dos amidos nativos, o grânulo de amido moído absorve menos água e é facilmente gelatinizado por tratamento térmico, devido à quebra ou enfraquecimento das cadeias poliméricas. Assim quantidade de água disponível no sistema é aumentada quando o tamanho do grânulo de amido é reduzido, causando queda na temperatura de transição vítrea.

Porém a moagem em moinho de bolas pode induzir à gelatinização sem aplicação de calor e água (CAVALLINI E FRANCO 2010 ;TAMAKI et al., 1998). A gelatinização a frio dos amidos danificados mecanicamente tem resultados muito similares à gelatinização causada por aquecimento (MORRISSON; TESTER; GIDLEY, 1994).

Visando facilitar a quebra do grânulo em moinho de bolas o pré-tratamento enzimático vem sendo estudado, e um fator importante é o grau de hidrólise para a obtenção de um amido com propriedades de substituto de gordura (LUCCA; TEPPER, 1994; ZAMBRANO; CAMARGO, 1999). A ação da enzima debilita a estrutura granular produzindo grânulos frágeis e mais fáceis de serem quebrados por uma posterior ação mecânica Dessa forma a combinação da modificação enzimática com a moagem produz amidos com tamanhos de partículas pequenas entre 3 e 8 μm , diâmetro bem menor quando comparadas às partículas de um amido nativo entre 3-30 μm (SANGUANPONG et al, 2003).

Sanguanpong et al. (2003) modificaram enzimaticamente amido de mandioca usando α -amilase e amiloglicosidase antes da moagem em moinho de bolas. Esses autores observaram, após a hidrólise, a formação de grânulos de amido de menor diâmetro e de aparência esponjosa, os quais se mostraram frágeis e sofreram considerável fragmentação e deformação durante o processo físico, portanto, a ação das enzimas proporcionou um desordenamento da estrutura granular.

Jane et al. (1992) e Niemann e Whister (1992) utilizando o pré-tratamento por ácido em amido de milho observaram a hidrólise produziu grânulos frágeis e que poderiam ser quebrados em pequenas partículas com o atrito mecânico. Estes autores observaram que as partículas cristalinas foram preservadas e o tamanho dos grânulos reduzidos a tamanhos de 2 μm .

3.4 MANDIOQUINHA-SALSA

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) é uma raiz originária dos Andes colombianos, tendo sido introduzida no Brasil por volta de 1900. É cultivada principalmente na região sudeste do Brasil, onde se adaptou às condições edafoclimáticas semelhantes às da região de origem (CAMARA; SANTOS, 2002).

Esta raiz, conhecida também como batata-baroa, batata-cenoura, cenoura-amarela, batata-fiusa, batata-tupinambá, batata-arracacha, batata-jujuba ou batata-suíça (CASALI; SEDYAMA, 1997), é um alimento de alto valor nutritivo, quando comparada com outras espécies amiláceas como a mandioca, batata, cará e batata doce. Caracteriza-se como um alimento essencialmente energético, apresentando 25 g de carboidratos, em média, por 100 g de raiz, além de constituir uma boa fonte de vitamina A e niacina, apresentando também consideráveis níveis de minerais, como cálcio, fósforo e ferro (PEREIRA, 1995).

O amido de mandioquinha-salsa apresenta baixa temperatura de gelatinização e alta viscosidade de pico, sendo muito suscetível ao atrito mecânico. Também possui baixa tendência à retrogradação e sinérese, o que contribui para sua alta digestibilidade. Trabalhos anteriores caracterizando este amido têm mostrado que o mesmo apresenta um padrão de difração de raios-X tipo-B e um teor de amilose aparente variando entre 17,8 a 21,7% dependendo da variedade (ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008). O teor de amilose absoluto encontrado para este amido foi de 9,1%, enquanto a distribuição de comprimento de cadeia da amilopectina mostrou altas proporções de cadeias curtas (DP 6-12) e longas (DP > 37) (ROCHA et al., 2011). Os grânulos do amido de mandioquinha-salsa são arredondados e irregulares, com diâmetro variando de 7 a 23µm (SANTACRUZ et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Raízes frescas de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) variedade Senador Amaral, obtidas na cidade de Tapiraí-SP e colhidas após 9 meses de plantio, foram utilizadas neste projeto. As enzimas puras α -amilase bacteriana (A6380) e amiloglucosidase fúngica (A7420) foram adquiridas da Sigma Chemical CO., USA.

Todos os outros reagentes utilizados foram puros para análise.

4.2 Métodos

4.2.1 Isolamento dos Amidos

As raízes de mandioca-salsa foram lavadas, descascadas e lavadas novamente para retirada das impurezas. Em seguida, foram cortadas em cubos pequenos, os quais foram moídos com água na proporção de 1:1 (v:v) num liquidificador industrial de aço inox com capacidade para 4 litros, por 30 s e filtrados através de peneiras de 80 mesh (0,177 mm) e 150 mesh (0,105 mm) para separar as fibras do amido. O resíduo retido nessas peneiras foi removido e moído novamente com água, na mesma proporção por um período de 15 s para melhor retirada do amido.

O amido recuperado das duas filtrações foi misturado e submetido a processo de decantação sob refrigeração por 12 h. Após este período, o líquido sobrenadante foi drenado por sifonação. O amido foi novamente suspenso em água destilada até que o sobrenadante estivesse límpido, recuperado por sifonação e seco em estufa com circulação de ar a 40°C por 12 h.

4.2.2 Composição Química

O amido de mandioca-salsa foi analisado, em triplicata, quanto ao teor de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas de acordo com os métodos descritos nos Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (AACC 2000). O teor de fósforo

foi determinado pelo método espectrofotométrico de acordo com Smith e Caruso (1964). O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença.

4.2.3 Hidrólise enzimática do amido

4.2.3.1 Atividade da enzima α -amilase bacteriana

A determinação da atividade em SKB da enzima α -amilase bacteriana (A6380, Sigma Chemical CO, EUA) foi calculada baseado na medida do tempo requerido para hidrolisar o amido a um tamanho definido de dextrina de acordo com Sandsted , Kneen e Blish (1939). Este tamanho foi indicado pela cor do complexo dextrina-iodo em relação à cor de uma solução padrão constituída de 25,00 g de cloreto de cobalto hexahidratado, 3,84 g de dicromato de potássio em 100 mL de ácido clorídrico 0,01 N. Uma solução de iodo foi preparada diluindo num volume total de 500 mL de água destilada, 2 mL de solução estoque de I₂-KI (5,5 g de I₂ e 11 g de KI em 250 mL de água destilada) com 20 g de KI. Uma alíquota de 1 mL de solução de enzima (0,002 % m/v) foi adicionada à 20 mL de uma solução de amido solúvel 2 % (m/v) em tampão fosfato (0,05 M e pH 6,0). O volume foi completado para 30 mL de água destilada e a solução deixada em banho-maria a 40 °C. A cada minuto uma alíquota de 1 mL da mistura de reação foi retirada e adicionada 5 mL da solução de iodo. Este procedimento foi repetido até a obtenção de uma coloração igual à da solução padrão. A atividade da α -amilase em SKB foi calculada pela equação 1 descrita por Sandsted, Kneen e Blish (1939).

$$\text{Unidades em SKB} = \frac{m \times t}{g \times t_c} \quad (\text{Equação 1})$$

m = massa em gramas de amido; t = 60 min; g = gramas da enzima/mL; t_c = tempo de incubação em min

4.2.3.2 Atividade da enzima amiloglucosidase fúngica

A atividade da amiloglucosidase fúngica (A7420, Sigma Chemical CO., EUA) foi determinada segundo Ueda et al. (1980), com modificações. A uma alíquota de 2,5 mL de solução do amido solúvel (1 % m/v) foi adicionada 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 (0,002% m/v). Esta mistura foi incubada a 55 °C por 10 min. Após este período, 1 mL de solução foi retirada e os açúcares redutores produzidos foram determinados pelo método de Somogyi (1945). Uma unidade de atividade (U) da amiloglicosidase fúngica foi definida como sendo aquela quantidade de enzima que produz 1 mg de glicose/mL da mistura de reação sob as condições descritas.

4.2.3.3 Hidrólise enzimática

O amido nativo foi hidrolisado com α -amilase bacteriana e amiloglicosidase fúngica segundo Franco e Ciacco (1992).

Suspensões de amido (10 % m/v) em solução tampão fosfato 0,5 M, pH 5,5 foram incubadas a 37 °C em três diferentes condições: A) 40 SKB/g de amido de α -amilase bacteriana e 10 U/g de amido de amiloglicosidase fúngica por 36 h; B) 20 SKB/g de amido de α -amilase e 5U/g de amido de amiloglicosidase fúngica por 12 h e C) 5 U/g de amido de amiloglicosidase fúngica por 12 h. Para evitar o crescimento microbiano, 1 mL de solução de azida de sódio (10 % m/v) foi adicionada às suspensões. As suspensões foram agitadas em shaker com agitação orbital (120 rpm) durante o período de incubação. A extensão da hidrólise foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores presentes no sobrenadante (SOMOGYI, 1945) a cada 2 ou 4 h. Após o período final de incubação, a reação foi interrompida com etanol absoluto e acetona segundo Vieira e Sarmiento (2008). Os resíduos foram secos em estufa com circulação forçada de ar a 38°C por 12 h e a porcentagem de hidrólise calculada através da equação 2:

$$\% \text{ Hidrolise} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: m_i = massa de amido inicial em base seca; m_f = massa de amido após a hidrólise em base seca.

4.2.4 Modificação física

O amido nativo e os resíduos obtidos das hidrólises enzimáticas foram moídos em

moinho de bolas da marca Marconi modelo MA 500 durante 1 e 2 h na posição máxima (200 rpm). As esferas utilizadas apresentavam 17g cada e 20 mm de diâmetro sendo que 30 esferas foram necessárias para a moagem de 30 g de amido.

4.2.5 Forma e distribuição do tamanho dos grânulos de amido

A distribuição de tamanho dos grânulos e forma dos amidos nativo e modificados foi determinada usando um Microscópio Ótico de Luz Olympos, acoplado a um sistema de análise de imagem “image-pró-plus” (média cybernetics), como descrito por Peroni, Rocha e Franco (2006). O parâmetro avaliado foi o diâmetro médio de cada grânulo (μm). Foram preparadas 3 lâminas para cada amostra e de cada lâmina foram tomadas medidas de 150 grânulos.

4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura das amostras foi realizada através de um Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo DSM 960 ZEISS - “Digital Scanning Microscope”. Uma pequena quantidade de amostra dos amidos nativo e modificados foi colocada sobre uma fita adesiva de carbono dupla face, aderida a um disco metálico que foi conduzido a um Metalizador, para aplicação de uma camada de ouro de 20 μm . As amostras assim preparadas foram observadas em MEV e imagens com aumento de 1000 x foram obtidas.

4.2.7 Distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina

4.2.7.1 Desramificação dos amidos

Os amidos nativo e modificados foram desramificados com isoamilase (EC 3.2.1.68) de *Pseudomonas* sp. (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Irlanda) seguindo procedimento de Wong e Jane (1995) com modificações. Suspensões de 5 mL dos amidos em DMSO 90 % (10 mg/mL) foram agitadas em banho de água fervente por 30 min, e por mais

16 horas a temperatura ambiente. Etanol absoluto (20 mL) foi adicionado e o precipitado foi recuperado por centrifugação a 2000 g por 20 min. O precipitado foi suspenso em 4,5 mL de H₂O e mantido em banho de água fervente por 15 min com agitação. Após resfriar, 0,5 mL de tampão acetato 0,1M , pH 3,5, 3 µL de solução de isoamilase (Megazyme, 3 U) e 6 µL de solução de azida sódica 10 % (m/v) foram adicionados e a mistura foi mantida a 37 °C por 24 h. Após este período, a mistura foi mantida em banho de água fervente por 15 min. Alíquotas de 0,5 mL foram diluídas em H₂O deionizada ultra pura (18 MΩ.cm) para 5 mL (concentração final de 1,0 mg/ml). Imediatamente antes da injeção no cromatógrafo as amostras foram filtradas em membranas de teflon de 0,22 µm.

4.2.7.2 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 seguindo metodologia descrita por Campanha (2010). As amostras de 20 µL preparadas como descrito acima foram automaticamente injetadas num 'loop' de 50 µL. A forma de onda empregada foi 'standard quadruple' com os seguintes pulsos de potenciais 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; o eluente A consistiu de 150 mM NaOH e o eluente B consistiu de 500 mM acetato de sódio em 150 mM NaOH. Os componentes lineares foram separados numa coluna CarboPac PA1 com gradiente de eluição (-2,3 a 0 min, 25 % B; 7 min, 40 % B; 12 min, 50 % B; 20 min, 60 % B; 50 min, 80 % B) a uma temperatura de 40 °C e fluxo de 1,0 mL/min. Um guarda-coluna CarboPac PA1 foi instalado antes da coluna analítica. Padrões de DP 1 a 7 (Sigma Chemical CO., EUA) foram usados para a identificação dos picos. Os dados foram coletados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA). As análises foram realizadas em duplicata.

4.2.8 Distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos

A distribuição de tamanho molecular dos componentes dos amidos nativo e tratados enzimática e/ou fisicamente foi determinada por cromatografia de permeação em gel seguindo o procedimento descrito por Song e Jane (2000). Utilizou-se uma coluna Pharmacia Biotech de 70 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro empacotada com gel Sepharose CL-2B conectada a uma bomba peristáltica para manter um fluxo constante de eluente de 0,5 mL/min. O eluente consistiu de NaCl (25 mM) e NaOH (1 mM) degaseificado a vácuo por no mínimo 4 h. As amostras dos amidos foram previamente preparadas adicionando-se 100 mg de amido em 10 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 90 %. A mistura foi mantida em banho de água fervente com agitação por 1 h e posteriormente resfriada e mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 h. Uma alíquota de 3 mL desta solução foi misturada com 12 mL de etanol absoluto e centrifugada a 3100 x g por 30 min. O sobrenadante foi descartado e ao amido precipitado foram adicionados 10 mL de água deionizada quente e 1 mg de glicose anidra. A mistura foi novamente mantida em banho de água fervente por 30 min e resfriada a temperatura ambiente para ser aplicada na coluna. Uma alíquota de 5,0 mL (15 mg de amido e 0,5 mg de glicose anidra) foi aplicada à base da coluna e eluída de forma ascendente. Frações de 2,5 mL foram coletadas a cada 5 min e analisadas quanto ao teor de açúcares totais, usando o método de fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) modificado segundo procedimento descrito por Fox e Robyt (1991), para proporcionar leitura em microleitora de absorvância, e quanto ao *blue value* através de reação de coloração com iodo (JULIANO, 1971).

4.2.9 Afinidade com iodo e teor de amilose aparente

Os amidos nativo e modificados foram previamente desengordurados conforme descrito por Franco et al. (2002), com modificações. Amostras de 0,5 g foram dispersas em 25 mL de DMSO 90%, colocadas sob agitação em banho de água fervente por 1 h e em seguida agitadas por mais 16 h a temperatura ambiente. Os amidos foram precipitados com aproximadamente 75 mL de etanol absoluto e recuperados por centrifugação a 4000 g por 10 min. Os amidos desengordurados foram secos em estufa com circulação forçada de ar a 38°C por 24 h.

As afinidades por iodo (AIs) dos amidos desengordurados foram determinadas usando

um autotituladores potenciométrico (716 DMS Titrino, Metrohm, Suíça). Os teores de amilose aparente foram determinados conforme descrito por Kasemsuwan et al. (1995). Todas as determinações foram realizadas, no mínimo, em triplicata. O teor de amilose aparente foi calculado segundo a equação 3:

$$AM_{ap}=100\times AI_A/20\% \qquad \text{Equação (3)}$$

Onde:

AM_{ap} = teor de amilose aparente

AI_A = afinidade por iodo do amido integral

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

4.2.10 Difração de raios-X

Amidos nativo e modificados foram armazenados por 10 dias a 25°C em um dessecador contendo uma solução de BaCl₂ que mantinha uma umidade relativa (UR) de 90% de acordo com Rocha et al. (2011).

Os padrões de difração de raios-X dos amidos nativo e modificados foram determinados, utilizando-se uma unidade RINT 2000, com radiação de Cu, linha K, L= 1,542 Å. A velocidade de varredura usada foi de 1° por min e as condições de uso foram de 50Kv e 100 mA. A cristalinidade relativa dos amidos foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e área total seguindo método de Nara e Komiya (1983) utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA).

4.2.11 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos nativo e modificados 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 selados, os recipientes foram mantidos por 2 h em

temperatura ambiente, e aquecidos a uma razão de 5 °C/min de 25 a 100 °C. Um recipiente de alumínio vazio foi utilizado como referência. As temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia (ΔH) dos amidos nativos e retrogradados foram determinadas utilizando o software Pyris 1 (Perkin Elmer, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.12 Propriedades de Pasta

As propriedades de pasta dos amidos nativo e modificados foram determinadas utilizando um Rápido Viscoanalisador (RVA-4, Newport Scientific, Austrália) de acordo com o procedimento descrito por Franco et al. (2002), com modificações. Suspensões de amido (10% p/p, num total de 27,5 g) foram colocadas em recipientes de alumínio próprios do equipamento, e estes acoplados ao RVA. No início da análise, o RVA foi mantido a 50°C durante 1 min; após este tempo, aqueceu a uma razão de 6°C/min até atingir 95°C e permaneceu nesta temperatura por 5 min; então resfriou até 50°C também a 6°C/min e permaneceu nesta temperatura até o final da análise. São necessários 23 min para completar o experimento. Durante todo o experimento o RVA manteve as suspensões sob agitação a 160 rpm. O programa Termoclines for Windows, versão 2.2 (Newport Scientific, Austrália) foi utilizado para o processamento dos resultados. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

4.2.13 Poder de inchamento e solubilidade

O poder de inchamento dos amidos de mandioquinha-salsa nativo e modificados foi determinado de acordo com método descrito por Schoch (1964), com modificações. Em um tubo de centrífuga, previamente pesado adicionou-se 0,2 g de amostra em base úmida; em seguida foi acrescentado exatamente 18 g de água destilada. A suspensão foi mantida a 60, 70, 80 e 90°C durante 30 min sob leve agitação intermitente. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 3000 g durante 15 min. Uma alíquota (5 mL) do sobrenadante, em duplicata, foi seca em estufa a 105 °C até peso constante e o precipitado (gel) foi pesado. O poder de inchamento (PI) e a porcentagem de sólidos solúveis foram determinados conforme as equações 4 e 5, respectivamente. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

$$P.I = \left(\frac{M_{gel}(g)}{M_a (g) (b.s)} \times 100 \right) \times (100 - \% \text{solúveis}) \quad (\text{Equação 4})$$

$$\% \text{ solúveis} = \left(\frac{M_s}{M_a (g) (b.s)} \right) \times 400 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

M_{gel} = massa do sedimento (g)

M_a = massa da amostra em base seca

M_s = massa de sólido do sobrenadante (g)

4.3 Análise Estatística

O delineamento experimental adotado para os experimentos foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por duas ou três repetições. Os dados foram avaliados pelo emprego do programa Statistica for Windows (v. 7.0, Statsoft, Tulsa, OK) abrangendo a análise de comparação de médias e as análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento do amido

O amido de mandioquinha-salsa foi obtido como pó branco, sem nenhuma impureza aparente. O isolamento do amido de mandioquinha-salsa foi realizado a frio e assim alterações nas propriedades físico-químicas do mesmo foram minimizadas.

5.2 Composição química do amido nativo

Segundo Franco et al. (2001) é importante que o amido apresente baixos teores de constituintes menores. Dentre as frações destes constituintes menores, as de lipídeos e fósforo são as mais importantes, pois influenciam nas propriedades funcionais dos amidos.

A composição química do amido de mandioquinha-salsa está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química do amido de mandioquinha-salsa (% em relação à matéria seca).

<i>Constituintes</i>	<i>%</i>
Carboidratos totais *	99,71
Lipídeos	0,06 (0,03)
Proteínas	0,07(0,02)
Cinzas	0,16(0,03)
Fósforo	0,018 (0,003)

¹ Os valores representam a média de três determinações com o respectivo desvio-padrão apresentado entre parênteses;

* Determinado por diferença.

Segundo Buléon et al. (1998) os lipídeos são a fração mais importante associada aos grânulos de amido. Altos conteúdos são geralmente observados em amidos de cereais. Os lipídeos são os responsáveis pela fixação de cor, desenvolvimento de aromas e complexos. Nos amidos de tuberosas são encontrados em pequenas quantidades, tornando esses amidos mais neutros e menos sujeitos a formação de complexos (FRANCO et al., 2001). O teor de lipídeos encontrado nesse trabalho para o amido de mandioquinha-salsa foi inferior aos obtidos por Rocha, Demiate e Franco (2008), Matsuguma et al. (2009) e Rocha, Carneiro e Franco (2010) que encontraram valores de 0,10, 0,42 e 0,13%, respectivamente.

O fósforo pode ser encontrado nos amidos em três formas principais: monoéster fosfato, lisofosfolípídeos e fosfatos inorgânicos. Em tubérculos e raízes, o fósforo é encontrado principalmente na forma de monoéster fosfatos ligados covalentemente ao amido (HOOVER, 2001). O método para a determinação do teor de fósforo, usado neste trabalho, é baseado na destruição da matéria orgânica por incineração e pela conversão do fósforo presente na amostra para sua forma inorgânica fornecendo o teor de fósforo total (KASEMSUWAN; JANE, 1995). O amido de mandioquinha-salsa apresentou teor de fósforo de 0,018 %, valor próximo ao encontrado por Rocha, Demiate e Franco (2008) que observaram um teor de 0,017 % deste mineral. Algumas variações no teor de fósforo de amidos da mesma fonte botânica, no entanto, podem estar relacionadas às características ambientais durante o desenvolvimento da planta, pois o teor de fósforo é inversamente proporcional à temperatura de desenvolvimento da planta (TESTER, et al. 1997).

O fósforo desempenha papel importante nas propriedades funcionais dos amidos. Por exemplo, o monoéster fosfato proporciona maior claridade de pasta, alta viscosidade, baixa temperatura de gelatinização e lenta taxa de retrogradação do amido (KASEMSUWAN; JANE, 1996), enquanto maiores quantidades de fosfolípídeos diminuem a claridade de pasta e a viscosidade (FRANCO; et al., 2001). Geralmente os amidos apresentam baixos teores de fósforo, com exceção do amido de batata pode exceder 0,09% Kasemsuwan e Jane (1996).

5.3 Modificação enzimática

Segundo Bertof e Manelius (1992) apud Li et al.(2004), a ação das enzimas sob o amido granular ocorre em solução sobre um substrato no estado sólido. Assim, a área de superfície acessível à enzima e a eficiência de adsorção da mesma são elementos importantes e críticos para a cinética.

As quantidades de açúcar redutor produzidas durante a hidrólise enzimática do amido de mandioquinha-salsa nas três diferentes condições de tratamento estão apresentadas na Figura 4.

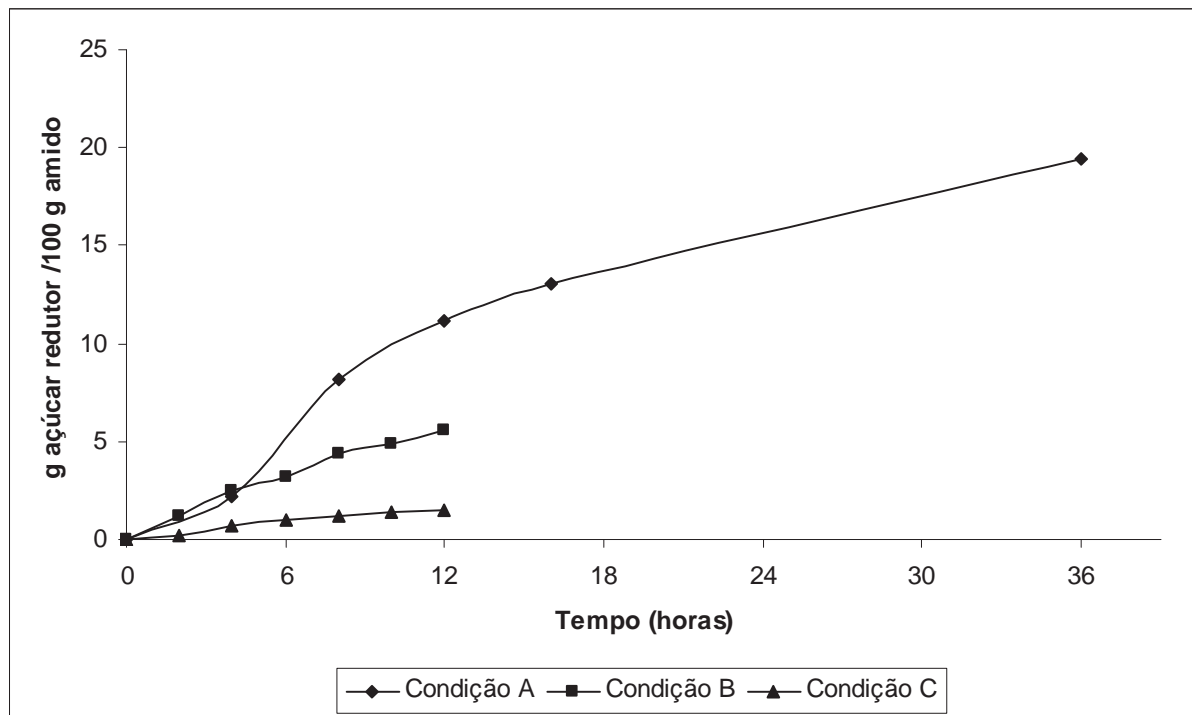


Figura 4 Porcentagem de açúcar redutor produzido em função do tempo durante a hidrólise enzimática do amido de mandioca-salsa, em diferentes condições: A: 40 SKB/g de amido de α -amilase bacteriana e 10 U/g de amido de amiloglicosidase fúngica por 36 h; B) 20 SKB/g de amido de α -amilase e 5U/g de amido de amiloglicosidase fúngica por 12 h e C) 5 U/g de amido de amiloglicosidase fúngica por 12 h.

A quantidade de açúcar redutor produzida aumentou progressivamente com o tempo de tratamento para as condições B e C, em função do menor tempo de hidrólise (Fig. 5.1). Para a condição A, foi possível observar, nas primeiras 8 h, uma taxa de hidrólise mais rápida, enquanto os tempos seguintes mostraram uma redução na taxa de hidrólise. Segundo Sanguanpong et al. (2003) a taxa mais rápida de hidrólise nas primeiras horas de incubação do amido com as enzimas é atribuída à degradação das regiões amorfas dos grânulos de amido, e um segundo período, mais lento, é atribuído à degradação da lamela cristalina do amido onde a acessibilidade da enzima é dificultada.

Quando a porcentagem de hidrólise foi calculada por diferença de peso dos amidos nativos e hidrolisados, a condição A (40 SKB/g de α -amilase e 10 U/g de amiloglicosidase) mostrou 35 % após 36 h de hidrólise (Tabela 5.2). Nas condições B (20SKB/g de α -amilase e 5U/g de amiloglicosidase) e C (5U/g de amiloglicosidase) as porcentagens de hidrólise atingiram 10 e 2,7 %, respectivamente após 12 h de incubação.

Tabela 2 - Porcentagem de hidrólise, por diferença de peso dos amidos hidrolisados.

<i>*Condição de hidrólise</i>	<i>Hidrólise por peso (%)</i>
A	35
B	10
C	2,7

*A: 40 SKB/g de α -amilase e 10 U/g de amiloglucosidase, 36 h;

B: 20 SKB/g de α -amilase e 5U/g de amiloglucosidase, 12 h;

C: 5U/g de amiloglucosidase, 12 h.

Estes resultados mostram que a suscetibilidade enzimática do amido é função, além da fonte botânica do amido, da concentração de enzima, bem como do complexo enzimático utilizado. Viera e Sarmento (2008) observaram para o amido de mandioquinha-salsa uma porcentagem de hidrólise de 38 % após 24 h em um sistema enzimático de α -amilase (100 SKB/g amido) e amiloglucosidase (50 U/g de amido). Segundo Franco e Ciacco (1987) a atuação das enzimas α -amilase e amiloglucosidase em conjunto mostrou-se bem mais eficiente para os amidos de milho e mandioca que a ação das enzimas sozinhas. Os resultados obtidos por Rocha, Carneiro e Franco (2010), utilizando para o amido de mandioquinha-salsa tratado somente por α -amilase por 48 h proporcionou uma porcentagem de hidrólise de 13,2%.

5.4 Distribuição do tamanho dos grânulos de amidos nativo e modificados

A Tabela 3 apresenta os diâmetros maior e menor, a média da população e a distribuição dos grânulos de amido de mandioquinha-salsa antes e após hidrólise e/ou moagem.

O amido de mandioquinha-salsa nativo apresentou diâmetro médio de 15,5 μm . Rocha, Demiate e Franco (2008) encontraram para este amido 14,7 μm , enquanto Viera (2004) observou tamanho médio de 17,3 μm . Estas pequenas diferenças observadas nos valores de diâmetro médio dos grânulos deste amido pelos diferentes autores podem ser atribuídas a diferentes metodologias usadas para se determinar a medida dos grânulos, mas também às diferentes idades, épocas de colheita e variedades da planta.

Tabela 3 – Diâmetro menor e maior, diâmetro médio e distribuição dos grânulos de amido de mandioca-salsa nativos, hidrolisados e/ou moídos por 1 e 2 h.

Amido	Tamanho global (menor e maior) (μm)	Diâmetro médio (μm)	Distribuição de tamanho*	
			Diâmetro (μm)	%
<i>Nativo</i>	2,2 – 75,2	15,5(0,9) ^a	< 5 – 10	19
			10,1 – 20	48
			> 20	33
<i>Moído 1h</i>	2,2 – 73,5	12,2(1,2) ^{bc}	< 5 – 10	22
			10,1 – 20	52
			> 20	26
<i>Moído 2h</i>	2,2 - 73,2	10,6(1,0) ^{cd}	< 5 – 10	25
			10,1 – 20	54
			> 20	21
<i>Hidrolisado A</i>	2,2 – 65,9	10,5 (1,0) ^{cd}	< 5 – 10	26
			10,1 – 20	52
			> 20	22
<i>Hidrolisado A moído 1h</i>	2,2 – 66,9	9,6 (0,5) ^d	< 5 – 10	30
			10,1 – 20	56
			> 20	14
<i>Hidrolisado A moído 2h</i>	2,2 – 65,3	8,6 (0,3) ^d	< 5 – 10	28
			10,1 – 20	49
			> 20	23
<i>Hidrolisado B</i>	2,2 - 74,2	13,6(1,1) ^{ab}	< 5 – 10	23
			10,1 – 20	51
			> 20	26
<i>Hidrolisado B moído 1h</i>	2,2 - 73,1	10,2(0,8) ^{cd}	< 5 – 10	29
			10,1 – 20	57
			> 20	14
<i>Hidrolisado B moído 2h</i>	2,2 - 72,9	9,5(0,7) ^d	< 5 – 10	30
			10,1 – 20	60
			> 20	10
<i>Hidrolisado C</i>	2,2 - 74,9	15,5 (0,7) ^a	< 5 – 10	21
			10,1 – 20	50
			> 20	29
<i>Hidrolisado C moído1h</i>	2,2 - 73,8	10,8 (0,5) ^{cd}	< 5 – 10	23
			10,1 – 20	56
			> 20	21
<i>Hidrolisado C moído2h</i>	2,2 - 73,5	9,3 (0,4) ^d	< 5 – 10	25
			10,1 – 20	60

Hidrolisado A: hidrólise com α -amilase (40 SKB/g) e amiloglucosidase (10 U/g) por 36 h; Hidrolisado B: hidrólise com α -amilase (20 SKB/g) e amiloglucosidase (5 U/g) por 12 h; Hidrolisado C: hidrólise com amiloglucosidase (5 U/g) por 12 h. * Considerando o diâmetro médio de cada grânulo ^a Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A moagem causou progressiva redução do diâmetro médio dos grânulos que atingiu 10,6 μm após 2 h de tratamento. Este resultado sugeriu que a aplicação de uma força mecânica sobre os grânulos intactos provocou a quebra dos mesmos, e os fragmentos obtidos foram contabilizados com os grânulos de menor diâmetro. Resultados semelhantes foram observados por Cavallini e Franco (2010) para amostras de amidos de mandioca submetidas à moagem em moinho de bola durante 1 h.

A hidrólise provocou redução no diâmetro médio dos grânulos de 15,5 (amido nativo) para 10,5 μm (condição A) 13,6 μm (condição B) e não alterou o tamanho dos grânulos na condição C, sugerindo que a ação sinérgica das enzimas alfa-amilase e amiloglucosidase provocou uma erosão superficial dos grânulos de amido, o mesmo observado por Sanguapong et al. (2003) para o amido de mandioca. Rocha (2007) observou uma leve redução no diâmetro médio dos grânulos de 14,7 μm para 14,4 μm quando o amido de mandioquinha-salsa foi hidrolisado com 60 SKB/g de amido de α -amilase e 1,5 unidades/g de amido de amiloglucosidase por 48 horas.

A moagem por 1 h dos grânulos hidrolisados facilitou a quebra dos mesmos que apresentaram diâmetro médio de 10,6 μm , mas o aumento no tempo de moagem não alterou o diâmetro médio dos grânulos. Assim, os grânulos nativos moídos por 2 h apresentaram diâmetro médio igual àqueles hidrolisados nas condições B ou C e moídos por 1 ou 2 h. Mesmo na condição A, a redução no tamanho dos grânulos de amido após 2 h de moagem esteve muito próxima daquela das condições B e C. No entanto, pela análise da distribuição dos grânulos (Tabela 3), é possível observar que houve um aumento de 31 % de grânulos com tamanho entre 5 e 10 μm quando os mesmos foram moídos por 2 h, enquanto a hidrólise seguida da moagem por 1 e 2 h provocou um aumento de 52 e 57 %, respectivamente, na proporção de grânulos com esse diâmetro.

Sanguapong et al.(2003) observaram a redução no diâmetro médio dos grânulos de amido de mandioca após o tratamento enzimático com α -amilase e amiloglucosidase e moagem. Após hidrólise a redução na quantidade de grânulos grandes e aumento considerável da quantidade de grânulos pequenos, se tornou ainda maior após o tratamento físico por 3

horas, evidenciando assim que o pré-tratamento enzimático é efetivo na redução do tamanho granular do amido.

Neste trabalho a hidrólise enzimática foi utilizada como um pré-tratamento do amido antes da moagem em moinho de bola, visando fragilizar os grânulos de amido e garantir grânulos de menor diâmetro após moagem. Assim, a condição B, que apresentou uma porcentagem de hidrólise de 10% e provavelmente com apenas parte das áreas amorfas dos grânulos degradados pelas enzimas, foi então escolhida como o pré-tratamento do amido antes da moagem, uma vez que também proporcionou aumento considerável na porcentagem de distribuição dos grânulos com diâmetro entre 5 e 10 μm .

5.5 Forma dos grânulos de amidos nativo e modificados

A Figura 5 mostra as micrografias dos grânulos de amido de mandioquinha-salsa, nativos, hidrolisados com α -amilase e amiloglucosidase (condição B) submetidos ou não a moagem em moinho de bolas por 1 e 2 h, observados em microscópio óptico com luz normal.

Os grânulos de amido nativo (Fig. 5 a) mostraram-se com formato arredondado e sem qualquer sinal de corrosão ou gelatinização. As imagens dos grânulos de amido de mandioquinha-salsa moídos (Fig. 5 c, d) não diferiram muito daquelas observadas para os grânulos de amido nativo, com exceção de um ou outro grânulo disforme no amido moído por 2 h, sugerindo gelatinização parcial do amido. Os grânulos submetidos à hidrólise enzimática antes (Fig. 5 d) e após moagem (Fig. 5 e, f) mostraram-se bastante corroídos indicando ação das enzimas sobre a superfície granular. Os grânulos hidrolisados e moídos por 1 ou 2 h mostraram-se bem mais fragmentados sugerindo que a moagem quebrou de forma mais intensa os grânulos hidrolisados do que os grânulos nativos, o que confirma os dados de distribuição de tamanho dos grânulos apresentados na Tabela 5.

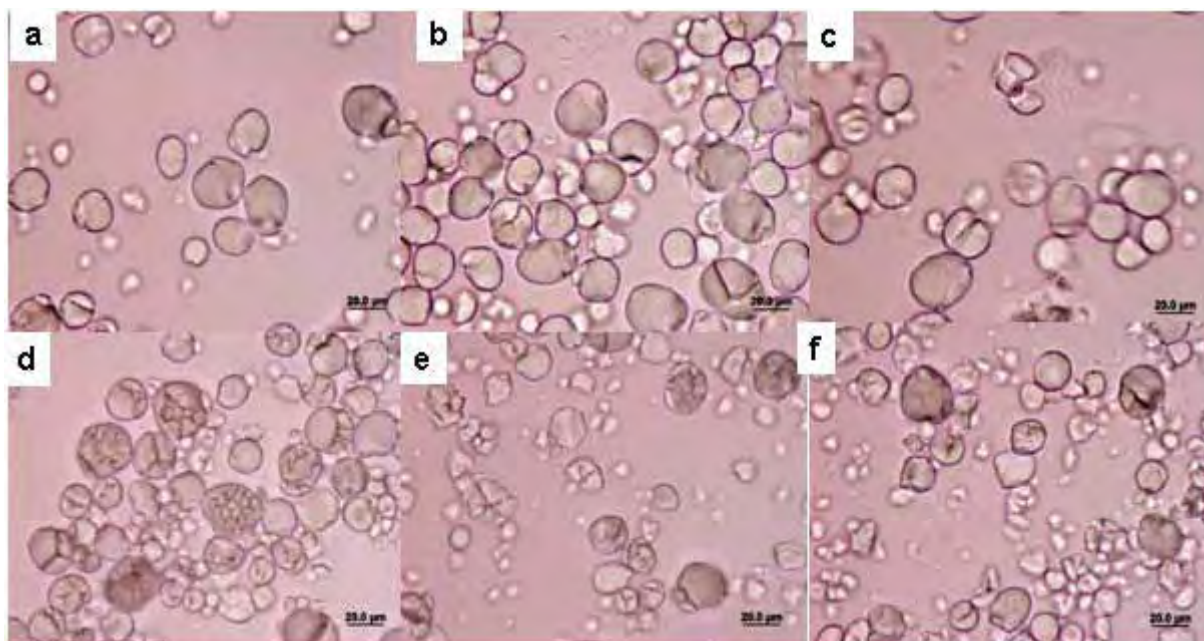


Figura 5 Micrografias dos grânulos de amido de mandioca-salsa observados em microscópio óptico sob luz normal: (a) nativo; (b) moído 1h; (c) moído 2h; (d) hidrolisado com α -amilase e amiloglucosidase; (e) hidrolisado com α -amilase e amiloglucosidase e moído por 1h; (f) hidrolisado com α -amilase e amiloglucosidase e moído por 2h;

A Figura 6 mostra micrografias obtidas a partir do microscópio eletrônico de varredura (MEV) dos amidos nativo, hidrolisados com α -amilase e amiloglucosidase (condição B) submetidos ou não a moagem em moinho de bolas por 1 e 2 h.

O amido de mandioca-salsa nativo apresentou grânulos com formatos circulares e truncados, com depressões e irregularidades na superfície granular que se mostrou lisa (Figura 6a). Tais irregularidades também foram observadas por Rocha et al. (2011), Rocha, Demiate e Franco (2008) e Vieira e Sarmiento (2008) para este amido. Foi possível observar, para os grânulos moídos por 1 h, o aparecimento de algumas fissuras na superfície granular. Para o amido submetido à moagem por 2 h observou-se grânulos mais inchados e alguns grudados uns nos outros sugerindo uma gelatinização parcial que pode ter ocorrido durante a moagem. Sanguanpong et al. (2003), durante a moagem de amido de mandioca em moinho de bolas também observaram grânulos grudados uns aos outros e sugeriram que o calor gerado pela transformação da energia mecânica em térmica durante a moagem, seria responsável pela formação de um “líquido derretido” altamente viscoso que atuaria como uma “cola” unindo os grânulos de amido.

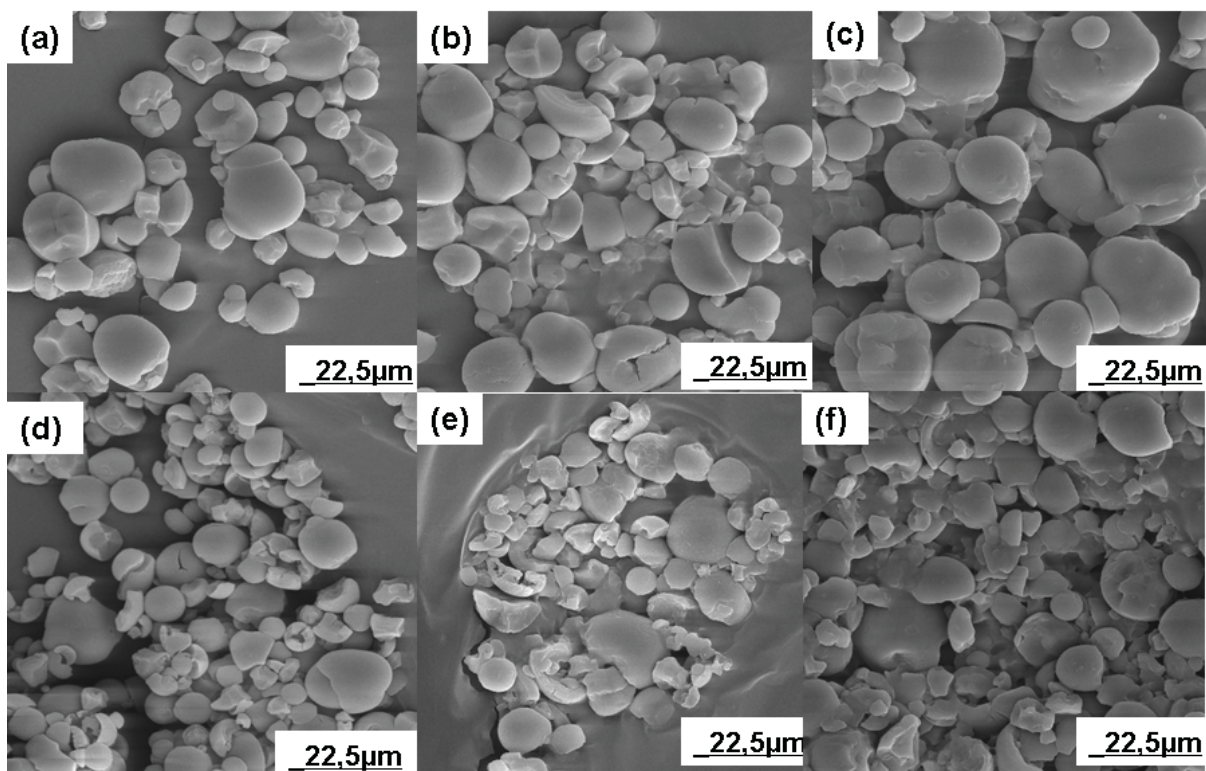


Figura 6 Micrografias dos grânulos dos amidos observados em microscópio eletrônico de varredura: (a) nativo; (b) moído 1h; (c) moído 2h; (d) hidrolisado com α -amilase e amiloglucosidase; (e) hidrolisado com α -amilase e amiloglucosidase e moído por 1h; (f) hidrolisado com α -amilase e amiloglucosidase e moído por 2h;

A ação enzimática provocou aparecimento de algumas depressões e fissuras na superfície dos grânulos de amido (Figura 6d). Após a moagem de 1 hora (Figura 6e) os grânulos hidrolisados mostraram-se mais truncados e a estrutura em camadas do grânulo de amido mais evidente. Na Figura 6f, os grânulos tratados e moídos por 2 horas mostraram uma maior proporção de grânulos de menor tamanho, confirmando os resultados de tamanho e distribuição. Segundo Rocha (2007) as fissuras e perfurações causadas pelas enzimas fragilizam o grânulo, pois as enzimas atacaram os grânulos provocando solubilização do seu interior e a partir da exo-corrosão da superfície granular ocorreu a solubilização da região externa aumentando a fragilidade e reduzindo o diâmetro do grânulo de amido respectivamente.

5.6 Distribuição do Comprimento das Cadeias Laterais da Amilopectina

As distribuições normalizadas do comprimento de cadeias laterais da amilopectina dos amidos nativo e modificados estão apresentadas na Figura 5.4 e os resultados estão sumarizados na Tabela 5.4.

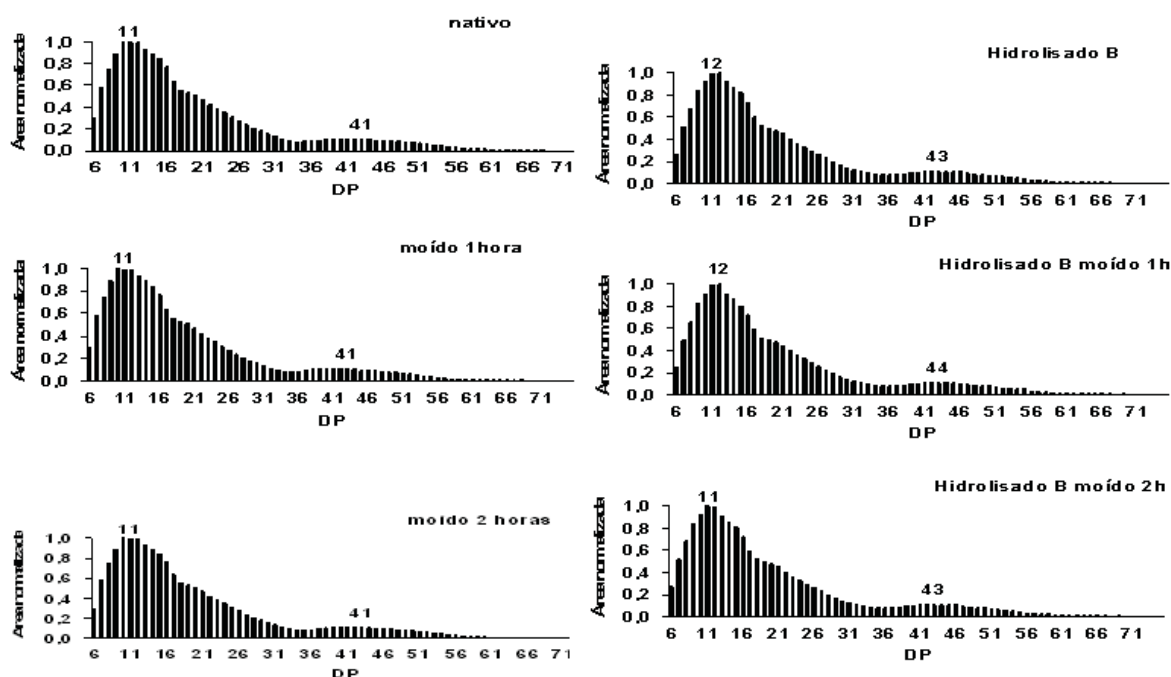


Figura 7 Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativo, moídos e hidrolisados e moídos.

Todos os amidos estudados apresentaram distribuição bimodal em que dois picos foram observados (Figura 7). Para o amido nativo e amidos moídos o primeiro pico ocorreu no grau de polimerização DP 11, e o segundo no DP 41. No caso dos amidos hidrolisados, o primeiro pico ocorreu no DP 11 e o segundo entre DP 43 e 44 sugerindo que a hidrólise degradou mais as cadeias curtas e médias o que proporcionou uma maior proporção de cadeias ramificadas longas. O amido de mandioquinha-salsa, como já observado em trabalhos anteriores de Campanha (2010) e Rocha et al. (2011), apresentou um ombro acentuado entre os DPs 17 -21, sugerindo uma estrutura cristalina defeituosa conforme postulado por Jane et al. (1999) e Genkina et al. (2007). Segundo estes autores, o comprimento das cadeias de DP18 a 21 estaria entre 6,3-7,4 nm, considerando que o comprimento de cada unidade de glicose anidra seja de 0,35 nm. Esta faixa de comprimento se aproxima à da espessura da lamela cristalina da amilopectina, assim as cadeias de DP 18 a 21 representariam a extensão total da

lamela cristalina, e a razão entre o pico de distribuição e o ombro indicaria a proporção de cadeias curtas que resultam em defeitos cristalinos. As modificações a que o amido nativo foi submetido não foram capazes de eliminar esses defeitos na estrutura cristalina do amido.

O comprimento médio de cadeia (\overline{DP}) foi o mesmo para os amidos nativo (19,5) e submetido à moagem por 1 hora (19,2) e por 2 horas (19,1). Resultado também observado por Rocha (2010) e Campanha (2010) para o amido nativo de mandioca-salsa.

Com a moagem foi possível detectar uma pequena porcentagem de cadeias entre o DP 2-5 sugerindo que houve uma ligeira degradação das moléculas de amilopectina pela ação das bolas e da força do impacto que ocasiona o rompimento das ligações glicosídicas.

Tabela 4 - Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos e modificados.

Amostras de amido	Comprimento de cadeia (%)					\overline{DP}	Maior DP detectado
	DP 2-5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP \geq 37		
<i>Nativo</i>	0,0(0,0) ^e	32,7(0,7) ^a	44,0(0,0) ^a	12,1(0,3) ^a	11,2(0,3) ^a	19,5(0,2) ^a	75
<i>Moído 1h</i>	0,2(0,0) ^{cd}	33,7(0,3) ^a	43,9(0,1) ^a	11,6(0,2) ^a	10,6(0,3) ^a	19,2(0,1) ^a	73
<i>Moído 2h</i>	0,2(0,0) ^d	33,8(0,4) ^a	44,0(0,2) ^a	11,5(0,1) ^a	10,5(0,1) ^a	19,1(0,1) ^a	71
<i>Hidrolisa do</i>	0,3(0,0) ^b	32,8(0,1) ^a	43,9(0,0) ^a	11,8(0,1) ^a	11,2(0,0) ^a	19,5(0,0) ^a	75
<i>do moído 1h</i>	0,3(0,0) ^{bc}	33,0(0,5) ^a	43,9(0,1) ^a	11,6(0,1) ^a	11,2(0,2) ^a	19,4(0,1) ^a	74
<i>Hidrolisa do moído 2h</i>	0,4(0,0) ^a	32,8(0,3) ^a	43,7(0,2) ^a	11,8(0,1) ^a	11,3(0,0) ^a	19,5(0,0) ^a	74

Hidrolisado: hidrólise com α -amilase (20 SKB/g amido) e amiloglucosidase (5 U/g) por 12 h;

DP: grau de polimerização

Cada valor representa a média de duas determinações.

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

A moagem proporcionou para os amidos hidrolisados um leve aumento somente para (DP 2-5) para os amidos moídos por 2 horas, de 0,3 para 0,4 confirmando a degradação das moléculas de amilopectina, porém a distribuição se manteve mesmo após a hidrólise e a moagem. Entretanto, Cavallini e Franco (2010) não observaram degradação das moléculas de

amilopectina do amido de mandioca submetidos à moagem, mesmo após estes amidos terem sido hidrolisados com solução ácido-etanólica.

Segundo Tamaki et al. (1997), a ação das bolas não é homogênea durante a moagem do amido. O rompimento das ligações glicosídicas é dependente da frequência da ação das bolas e da força do impacto que dependem do diâmetro do cilindro, quantidade de bolas e velocidade de rotação durante a moagem.

5.7 Distribuição do Tamanho Molecular dos Amidos

As distribuições das massas moleculares dos componentes dos amidos nativo e modificados, determinadas por cromatografia de permeação em gel, estão apresentadas na Figura 8. O primeiro pico em todos os perfis cromatográficos, correspondeu à amilopectina, a qual possui grande massa molecular que não interage com o gel e eluiu no volume vazio da coluna. O segundo pico correspondeu à amilose e o terceiro, de menor intensidade representou a glicose, adicionada para indicar o final da eluição. O amido nativo de mandioquinha-salsa (Figura 8a) mostrou o pico de amilopectina eluindo no volume 65mL, enquanto o pico da amilose que mostrou-se mais disperso eluiu no volume 142,5mL. A moagem por 2 h provocou redução no pico da amilopectina enquanto houve um leve deslocamento do pico da amilose para esquerda, sugerindo que pode ter havido quebras nas moléculas de amilopectina que passaram a apresentar massa molecular intermediária e então eluíram em volumes intermediários entre amilopectina e amilose. As relações entre *blue value* e açúcares totais (BV/CHO), nos picos da amilopectina foram de 0,33 e 0,37 para o amido nativo e moído por 2 horas, respectivamente, indicando uma maior proporção de cadeias ramificadas longas (FRANCO et al., 2002) para o amido submetido a moagem. Huang et al. (2008) estudando o amido de milho e mandioca e Tamaki et al (1997) estudando o amido de batata também observaram degradação das ligações glicosídicas da amilopectina quando esses amidos foram submetidos à moagem em moinho de bolas.

A hidrólise provocou uma leve redução no pico de amilopectina (Figura 8c) e o pico de amilose pouco definido e disperso. O aumento do material intermediário, moléculas de tamanho entre a amilose e amilopectina, sugere que as enzimas degradaram as moléculas de amilopectina em produtos de menor massa molecular. O pico da amilose apresentou uma leve

redução. Portanto, a degradação da amilopectina resultou em moléculas menores que puderam ser eluídas juntamente com a amilose.

Já no amido hidrolisado moído observou-se uma redução no pico de amilopectina mais acentuado quando comparado ao amido submetido somente à moagem e o aparecimento de algum material intermediário resultado da degradação das moléculas de amilopectina, sugerindo assim que a hidrólise fragilizou o grânulo de amido tornando-o mais susceptível a ação física, entretanto Sanguanpong et al. (2003) não observaram nenhuma degradação macromolecular, indicando que o tratamento físico no amido de mandioca pré-hidrolisado por α -amilase e amiloglicosidase degradou somente as pontes de hidrogênio e não as ligações glicosídicas. É provável que as condições de hidrólise e moagem sobre o amido de mandioquinha-salsa tenha debilitado tanto as pontes de hidrogênio quanto as ligações glicosídicas. Como, a distribuição de cadeias laterais da amilopectina praticamente não se alterou (Tabela 4), é provável que as ligações glicosídicas mais afetadas pelo tratamento tenham sido as ligações α (1-6), as quais fazem parte das regiões mais amorfas dos grânulos e portanto menos resistentes a ácidos e enzimas.

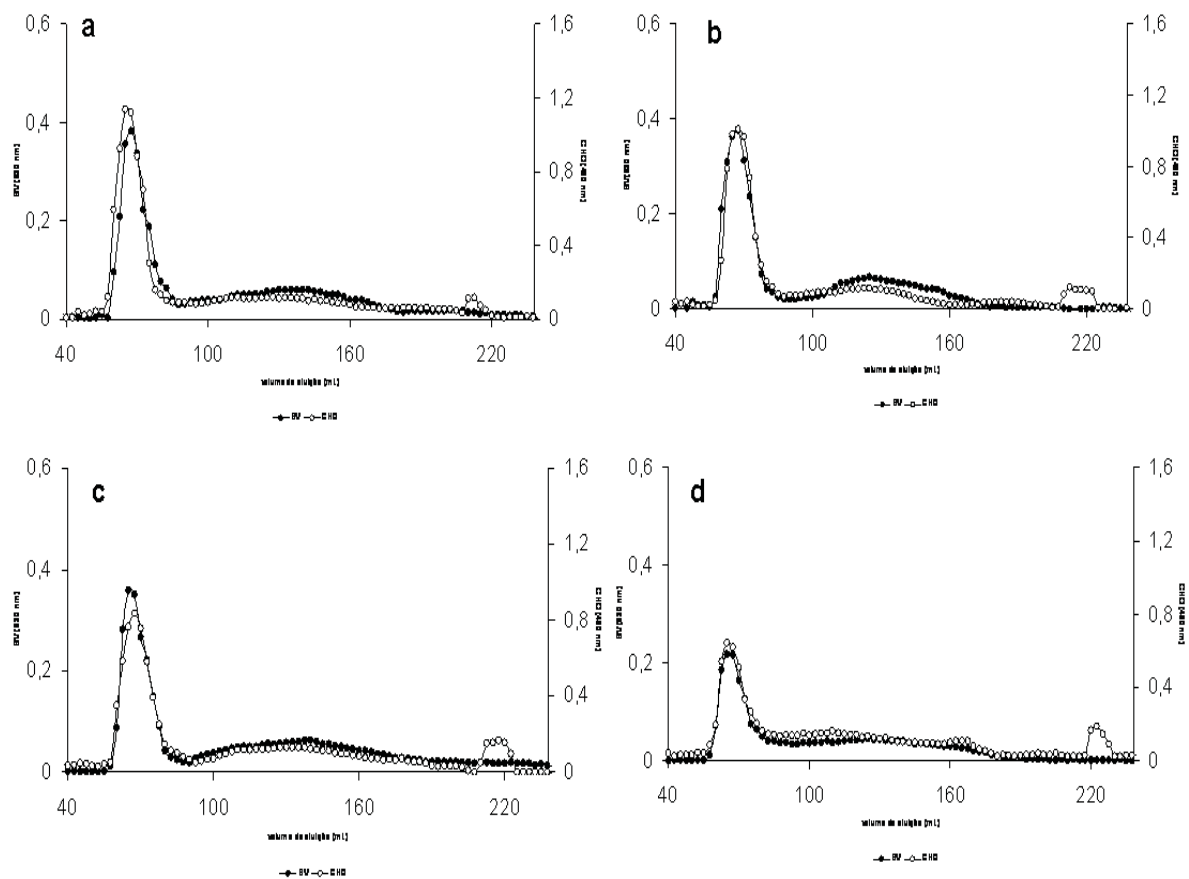


Figura 8 Perfil de eluição dos amidos de mandioca-salsa (a) nativo; (b) moído por 2 h; (c) Hidrolisado com α -amilase e amiloglucosidase e (d) Hidrolisado com α -amilase e amiloglucosidase e moído por 2 h.

5.8 Afinidade com Iodo e Teor de Amilose

Os valores encontrados para o teor de amilose aparente dos amidos nativos e modificados estão apresentados na Tabela 5. O amido nativo de mandioca-salsa apresentou um teor de amilose aparente muito próximo ao encontrado por Rocha, et al. (2011) 20%, e inferior ao encontrado por Vieira e Sarmiento (2008) de 17,2%.

Tabela 5 - Afinidade por iodo e teores de amilose aparente dos amidos nativo e modificados¹.

Amostras de amido	Afinidade por iodo (%)	Teor de amilose (%)
	Amido	Aparente ²
<i>Nativo</i>	4,08(0,11) ^{ab}	20,43
<i>Moído 1h</i>	4,37(0,09) ^a	21,87
<i>Moído 2h</i>	4,39(0,07) ^a	21,93
<i>Hidrolisado</i>	3,70(0,06) ^b	18,50
<i>Hidrolisado moído 1h</i>	3,99(0,19) ^{ab}	19,93
<i>Hidrolisado moído 2h</i>	3,92(0,07) ^b	19,61

Hidrolisado: hidrólise c/ α -amilase (20 SKB/g amido) e amiloglucosidase (5 U/g amido) por 12 h

¹ Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Cada valor representa a média de três determinações, com o respectivo desvio-padrão apresentado entre parênteses.

² % amilose aparente = $(AI_A/0,20)$, onde AI_A é a afinidade por iodo do amido.

Apesar das afinidades com iodo dos amidos de mandioquinha-salsa nativo e moídos não terem apresentado diferença significativa ($P \leq 0,05$), observou-se uma tendência a aumentar o que provocou um pequeno aumento no teor de amilose para os amidos moídos por 1 e 2 horas quando comparado ao amido nativo.

Esses resultados também poderiam sugerir que o tratamento promoveu algum tipo de degradação nas moléculas de amilopectina, com a quebra das ligações α (1 \rightarrow 6), presentes principalmente nas áreas amorfas dos grânulos e, portanto mais suscetíveis às alterações provocadas pela moagem, formando assim, cadeias lineares capazes de complexar com iodo e confirmando assim os dados de distribuição de tamanho molecular observados em GPC. Huang et al. (2008), observaram a mesma degradação nas moléculas de amilopectina

O teor de amilose aparente caiu para o amido hidrolisado, o mesmo observado por Rocha, Carneiro e Franco (2010) para os amidos submetidos à hidrólise enzimática de mandioca, batata-doce e mandioquinha-salsa, sugerindo que as enzimas atacaram preferencialmente as áreas amorfas. Entretanto Serrano e Franco (2005) não observaram diferença significativa nos teores de amilose de amido de mandioca tratado com α -amilase bacteriana e o mesmo comportamento foi verificado por Franco e Ciacco (1992) quando trataram amidos de mandioca e milho com α -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica.

Apesar de não haver diferença significativa entre as afinidades com iodo para os amidos hidrolisados e moídos, houve também nesse caso uma leve tendência de aumento no

teor de amilose com a moagem dos amidos, reforçando a hipótese de que o tratamento físico degradou as ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 6) da amilopectina e que possivelmente as cadeias laterais longas da amilopectina foram liberadas e assim contabilizadas como amilose. Resultados semelhantes foram observados por Huang et al. (2007, 2008) para os amidos de milho e mandioca, moídos de 1 a 3 horas.

5.9 Difração de Raios-X e Cristalinidade Relativa

A difração de raios-X pode detectar mudanças na cristalinidade dos grânulos de amido causadas por tratamentos físicos e/ou enzimáticos. Os difractogramas de raios-X dos amidos nativos e modificados de mandioquinha-salsa estão apresentados na Figura 9, enquanto a Tabela 6 apresenta as cristalinidades relativas (C_{rel}) desses amidos.

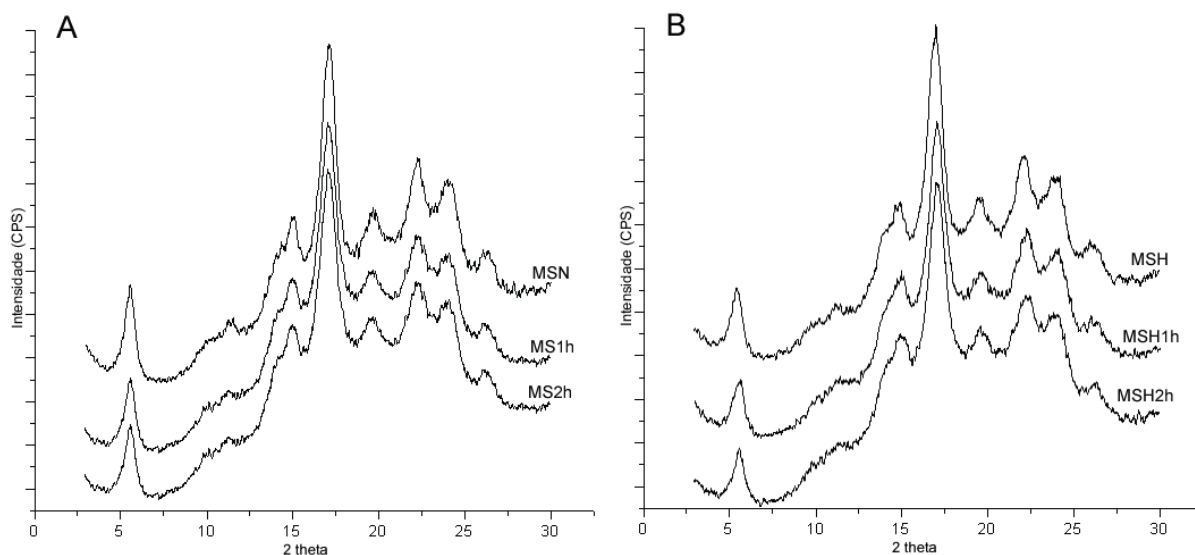


Figura 9 Difractogramas de raios-X dos amidos: A- MSN: nativo; MS1h: nativo moído 1h; MS2h: nativo moído 2h; B- MSH: hidrolisado; MSH1h: hidrolisado e moído 1h; MSH2h: hidrolisado e moído 2h;

Independente dos tratamentos aplicados os amidos apresentaram difractogramas semelhantes com picos singletos bem definidos por volta 5,6° e 17° e um dubleto em 22° e 24° em 2θ , caracterizando amidos de padrão cristalino tipo B (BÚLEON et al., 1998; THYS et al., 2008).

Apesar da não alteração do padrão de difração de raios-X para os amidos submetidos aos diferentes tratamentos, houve uma expressiva redução na cristalinidade relativa dos

amidos modificados (Tabela 6). Os amidos submetidos apenas à moagem apresentaram uma redução de aproximadamente 21 % na cristalinidade relativa, independente do tempo de moagem, sugerindo que o tratamento provocou o rompimento das pontes de hidrogênio das áreas cristalinas dos grânulos reduzindo assim sua cristalinidade. Apesar de não haver diferença estatística, observou-se uma tendência na redução da cristalinidade com o aumento do tempo de moagem.

O amido hidrolisado também apresentou uma substancial redução na cristalinidade relativa (24 %) quando comparado ao amido nativo. A hidrólise enzimática degrada inicialmente as regiões amorfas dos grânulos e era de se esperar que então a cristalinidade relativa tivesse aumentado, porém é possível que nas condições usadas neste experimento, as enzimas tenham atacado também as áreas cristalinas dos grânulos de amido de mandioca-salsa resultando na redução da sua cristalinidade. A redução na cristalinidade relativa também foi observada, por Rocha (2010) para o amido de mandioca-salsa tratado com 60 SKB/g de amido de e 1,5 unidades/g de amido de amiloglucosidase por 48 horas e Sanguapong et al. (2003) para o amido de mandioca tratado com 120 U α -amilase e 300 U/mL de amiloglucosidase durante 12 horas. Esses autores sugeriram que a redução na cristalinidade é devido ao ataque das enzimas tanto nas regiões amorfas quanto nas regiões cristalinas do grânulo de amido.

O amido hidrolisado e moído por 2 h apresentou a maior redução na cristalinidade relativa (~30 %) indicando que os resíduos da hidrólise ficaram mais suscetíveis à ação da moagem propiciando maior rompimento de suas pontes de hidrogênio.

Tabela 6 - Cristalinidade relativa dos amidos de mandioca nativa e modificados¹.

Amostras de amido	Cristalinidade relativa (%)
<i>Nativo</i>	39,1(1,5) ^a
<i>Moagem 1h</i>	31,1(0,5) ^b
<i>Moagem 2h</i>	30,1(0,8) ^{bc}
<i>Hidrolisado</i>	29,6(0,8) ^c
<i>Hidrolisado e moído 1h</i>	29,4(0,4) ^c
<i>Hidrolisado e moído 2h</i>	27,6(0,3) ^d

Hidrolisado: hidrólise com α -amilase (20 SKB/g amido) e amiloglucosidase (5 U/g amido);

¹ Média de triplicatas, com o respectivo desvio-padrão apresentado entre parênteses. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Zhang, Zhao e Xiong (2010) estudaram o amido de arroz após a moagem e observaram uma acentuada redução na cristalinidade relativa. Após 10 horas de tratamento no amido de arroz a estrutura cristalina praticamente desapareceu, sugerindo que o atrito mecânico pode resultar na destruição da estrutura cristalina dos grânulos de amido.

5.10 Propriedades Térmicas dos Amidos Nativos e Modificados

Os perfis endotérmicos estão apresentados na Figura 10 e as propriedades de gelatinização dos amidos nativos e modificados estão apresentadas na Tabela 7. O amido nativo apresentou pico estreito bem definido, sugerindo cristais mais homogêneos. O pico ligeiramente mais largo para os amidos submetidos ao tratamento físico indicou maior heterogeneidade e menor estabilidade estrutural dos grânulos (Figura 10).

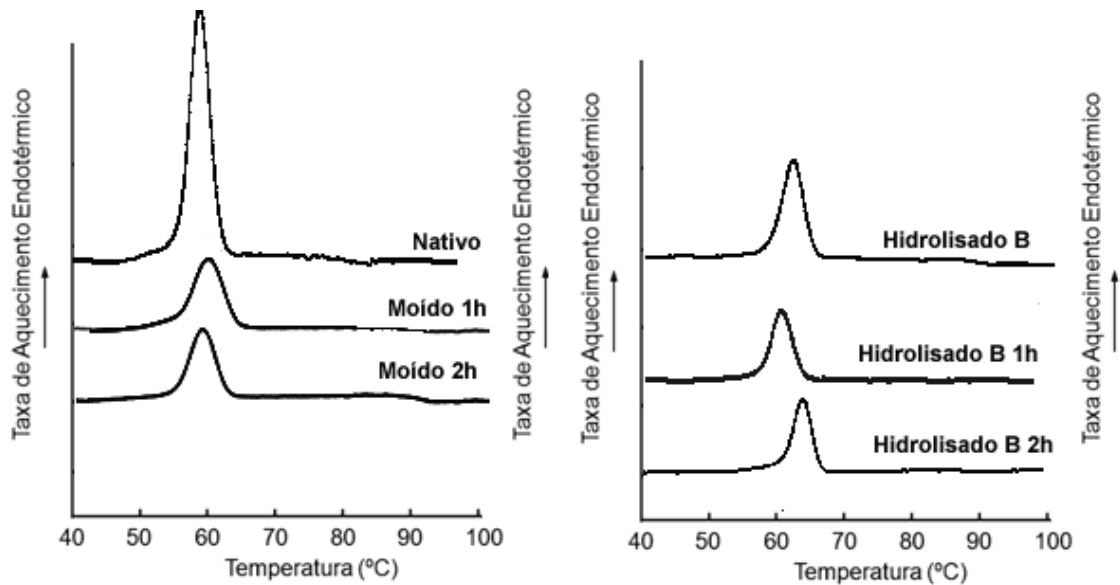


Figura 10 Perfil endotérmico dos amidos nativos e modificados, determinados por DSC.

O grânulo de amido nativo de mandioca-salsa apresentou temperatura de gelatinização inicial (T_0), de pico (T_p) e final (T_f) de 55,37 °C, 59,64 °C e 64,58 °C respectivamente, e variação de entalpia de 17,88 J/g. Esses resultados são semelhantes aos apresentados por Rocha, Demiate e Franco (2008) que observaram valores de 57,9°C, 62,01 °C, 65,29 °C para as temperaturas de início, pico e final, respectivamente, e ΔH de 15,2 J/g para amido obtido da mesma variedade de raízes.

A moagem em diferentes tempos provocou alterações significativas nas temperaturas de gelatinização (T_0 , T_p , T_f) deste amido, no entanto causou uma redução no ΔH quanto maior o tempo de tratamento. Esta redução do ΔH está relacionada ao rompimento das duplas hélices da amilopectina (TESTER; KARKALAS; QI, 2004) em função da quebra das pontes de hidrogênio, pela moagem, as quais estabilizam as moléculas de amido confirmando os resultados de cristalinidade obtidos (Tabela 6). Huang et al. (2007, 2008) também observaram para o amido de mandioca, redução na entalpia de gelatinização com o aumento do tempo de moagem.

Tabela 7 - Propriedades térmicas¹ dos amidos nativos e modificados .

<i>Amidos</i>	T_0^* (°C)	T_p^* (°C)	T_f^* (°C)	$T_f - T_0^*$ (°C)	ΔH_{gel}^* (J/g)
<i>Nativo</i>	55,37(0,24) ^c	59,64(0,37) ^c	64,58(0,50) ^a	8,67	17,88(0,01) ^a
<i>Moagem 1h</i>	55,40(0,38) ^c	60,18(0,18) ^{bc}	64,36(0,41) ^a	8,96	15,22(0,14) ^{bc}
<i>Moagem 2h</i>	56,31(0,79) ^b	60,29(0,12) ^{bc}	64,63(0,14) ^a	8,32	14,69(0,12) ^c
<i>Hidrolisado</i>	56,63(0,30) ^b	60,61(0,02) ^{ab}	65,17(0,29) ^a	8,54	16,09(0,55) ^{ab}
<i>Hidrolisado moído 1h</i>	57,24(0,21) ^b	61,04(0,01) ^a	64,82(0,07) ^a	7,53	8,35(0,52) ^d
<i>Hidrolisado moído 2h</i>	60,51(0,13) ^a	61,30(0,14) ^a	64,22(0,11) ^a	3,71	8,37(0,63) ^d

Hidrolisado: hidrólise com α -amilase (20 SKB/g) e amiloglucosidase (5 U/g) por 12 h;

¹ Média de três replicatas; ^a Valores seguidos pela mesma letra, numa 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; ΔH = variação de entalpia.

O amido submetido à hidrólise apresentou um ligeiro aumento nas temperaturas de gelatinização, enquanto houve uma tendência em reduzir o ΔH , quando comparado ao amido nativo. Estes resultados reforçam que as enzimas tenham atacado as regiões amorfas e cristalinas do grânulo de amido, pois a reorganização molecular faz com que as regiões cristalinas necessitem de uma temperatura mais elevada para se romper. De acordo com Sanguapong et al. (2003) a hidrólise enzimática acontece em duas fases, a fase inicial, relativamente rápida indicando a degradação das regiões amorfas do grânulo de amido e o segundo período mais lento indicando a degradação das regiões cristalinas.

A moagem dos grânulos de amido hidrolisado provocou aumento das temperaturas de gelatinização e redução acentuada da entalpia indicando que o tratamento enzimático debilitou a estrutura granular facilitando o rompimento das pontes de hidrogênio pela moagem, tornando o tratamento físico mais eficiente em comparação ao amido sem o pré-tratamento enzimático.

5.11 Propriedades de Pasta

De acordo com Jane et al. (1999), as propriedades de pasta de amidos são afetadas pelos teores de amilose, lipídeos e fósforo e pela distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina. A amilopectina contribui para inchamento do grânulo de amido e empastamento, enquanto a amilose e lipídeos os inibem.

As propriedades de pasta dos amidos de mandioca-salsa nativo e modificados estão apresentadas na Figura 11 e Tabela 8.

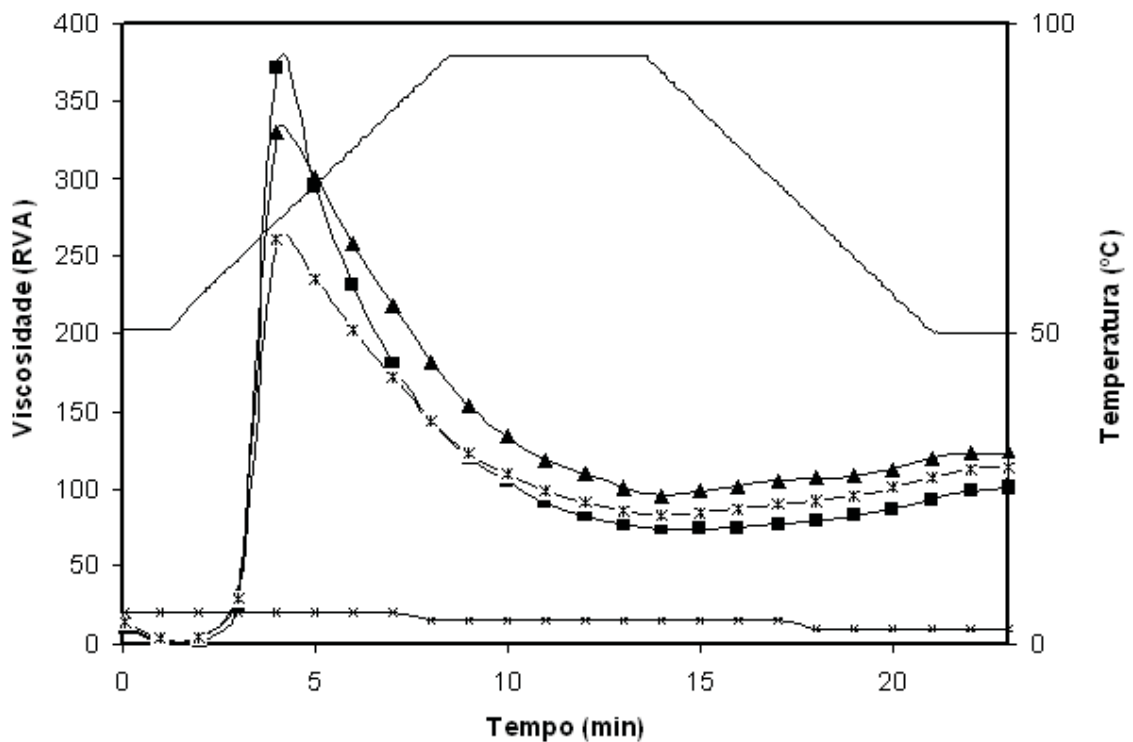


Figura 11 Perfil viscoamológico do (a) amido nativo(■); submetido a moagem por 1 h (▲); submetido a moagem por 2 h (*); hidrolisado (X).

O perfil de viscosidade obtido para o amido de mandioca-salsa nativo apresentou curva típica para esse amido, com baixa temperatura de pasta (62,0°C), aumento acentuado de viscosidade até seu pico máximo (377,0 RVU), seguido da queda rápida da mesma. Durante a fase de temperatura constante (95°C) os grânulos começaram a se romper, ocorrendo à solubilização dos polímeros. Neste ponto foi registrada uma queda na viscosidade. Na fase de resfriamento, os polímeros de amilose e amilopectina são solubilizados e ocorre uma

reassociação (tendência a retrogradação) entre eles, principalmente das moléculas de amilose sendo registrado um novo aumento na viscosidade de (31 RVU).

A moagem dos grânulos nativos reduziu a temperaturas de pasta, viscosidades de pico, de quebra e final do amido, enquanto provocou aumento na tendência à retrogradação (*set back*) (Tabela 8). Cavallini e Franco (2010) também observaram uma redução nas temperaturas de pasta para o amido de mandioca submetido à moagem no período de 1 h.

Tabela 8 - Propriedades de Pasta¹ dos amidos nativo e modificados^a.

Amidos	Temperatura De Pasta (° C)	Viscosidades (RVU)			
		Pico	Quebra	Final	Set Back
<i>Nativo</i>	62,0 (0,0) ^a	377,0(4) ^a	279,5(1,4) ^a	128,3(3,0) ^a	31,0(0,8) ^b
<i>Moído 1h</i>	60,7 (0,07) ^b	320,0(4,0) ^b	231,0(1,9) ^b	120,0(0,0) ^{ab}	40,9(1,4) ^a
<i>Moído 2h</i>	60,7 (0,07) ^b	265,0(12,0) ^c	183,6(3,7) ^c	113,0(0,0) ^b	41,6(1,4) ^a
<i>Hidrolisado</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Hidrolisado e moído 1h</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Hidrolisado e moído 2h</i>	nd	nd	nd	nd	nd

Hidrolisado: hidrólise com α -amilase (20 SKB/g amido) e amiloglicosidase (5 U/g amido) por 12 h;

nd : não detectado

¹ Média de duas replicatas;

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

A temperatura de pasta determina o início do inchamento dos grânulos, quando a viscosidade aumenta e o aparelho detecta a primeira resistência para manter a agitação constante. Quanto menor esta temperatura, maior a facilidade de cozimento do amido. Altas temperaturas de pasta refletem uma maior resistência do amido a gelatinização causada por uma maior estabilidade estrutural dos grânulos (TESTER; MORRISON, 1990), confirmando assim que o amido de mandioca é de fácil cozimento e de difícil retrogradação e sinérese, como observado por Rocha, Demiate e Franco (2008).

Após moagem, o amido nativo apresentou redução das viscosidades de pico, quebra e final, indicando menor inchamento desses grânulos. De acordo com Zhang, Zhao, Xiong (2010), a redução nas viscosidades do amido após moagem em moinho de bolas é devido ao menor número de grânulos que ainda estão intactos e que ainda apresentam capacidade de

inchamento. Resultados semelhantes foram observados por Cavallini and Franco (2010) quando amido de mandioca foi moído em um moinho de bolas e também por Dhital, Shrestha e Gidley (2009), quando amidos de batata e milho foram moídos em moinho criogênico.

A hidrólise enzimática alterou significativamente as viscosidades de pico, quebra, final e *setback* não sendo possível observar qualquer valor de viscosidade para este amido, em função da degradação das moléculas de amilose e amilopectina pelas enzimas em dextrinas de menor massa molecular (OATES, 1997).

5.11 Poder de Inchamento e Solubilidade

Para obter informações sobre o inchamento é necessário que a gelatinização seja conduzida em excesso de água, para que os grânulos inchem livremente sem desintegração mecânica. As curvas de poder de inchamento e solubilidade em função da temperatura podem ser observadas na Figura 12 e 13. Os amidos hidrolisados e hidrolisados e moídos não apresentaram qualquer gel estando 100 % solúveis após essa análise.

Os perfis de inchamento obtidos para os amidos nativo e moídos mostraram-se semelhantes quanto ao formato com a variação das temperaturas de 60°C a 90°C. Assim, quanto maior a temperatura de análise, maior o poder de inchamento. Com o aumento da temperatura obteve-se maior expansão dos grânulos do amido de mandioca-salsa, pois com o aquecimento, as interações entre as cadeias são rompidas, permitindo a maior absorção de água. Assim o poder de inchamento está mais associado com a estrutura do grânulo e composição química, particularmente teor de amilose e lipídeos, do que com o tamanho dos grânulos (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004).

A moagem provocou aumento significativo no poder de inchamento dos amidos, o qual aumentou com o aumento do tempo de moagem sugerindo que este tratamento provoca uma desestabilização na estrutura cristalina facilitando o inchamento dos grânulos de amido.

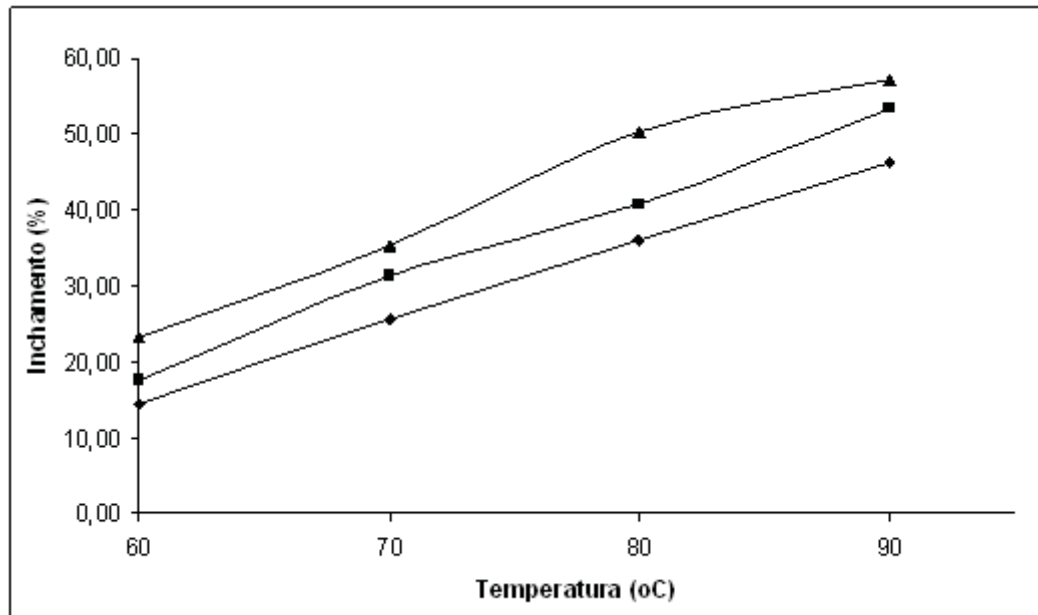


Figura 12 Poder de inchamento dos amidos de mandioca-salsa, em função da temperatura: ◆ nativo; ■ moído 1 hora; ▲ moído 2 horas.

A solubilidade do amido nativo aumentou com a temperatura de análise, e a 90°C o amido de mandioca-salsa nativo mostrou 9,22 % de solubilidade. Peroni (2003) encontrou solubilidade maior que a encontrada neste trabalho para o amido de mandioca-salsa nativo, que foi de 27,07 % para 90 °C. A solubilidade do amido de mandioca-salsa, à temperatura de 90 °C, aumentou com o tempo de moagem atingindo 18,21% após 2 horas de tratamento. Este aumento na solubilidade após moagem também foi observado por Huang et al. (2008) para os amidos de milho e mandioca moídos por até 3 horas. Entretanto Cavallini e Franco (2010) não observaram nenhuma alteração após a moagem para o amido de mandioca tratado por 1 hora.

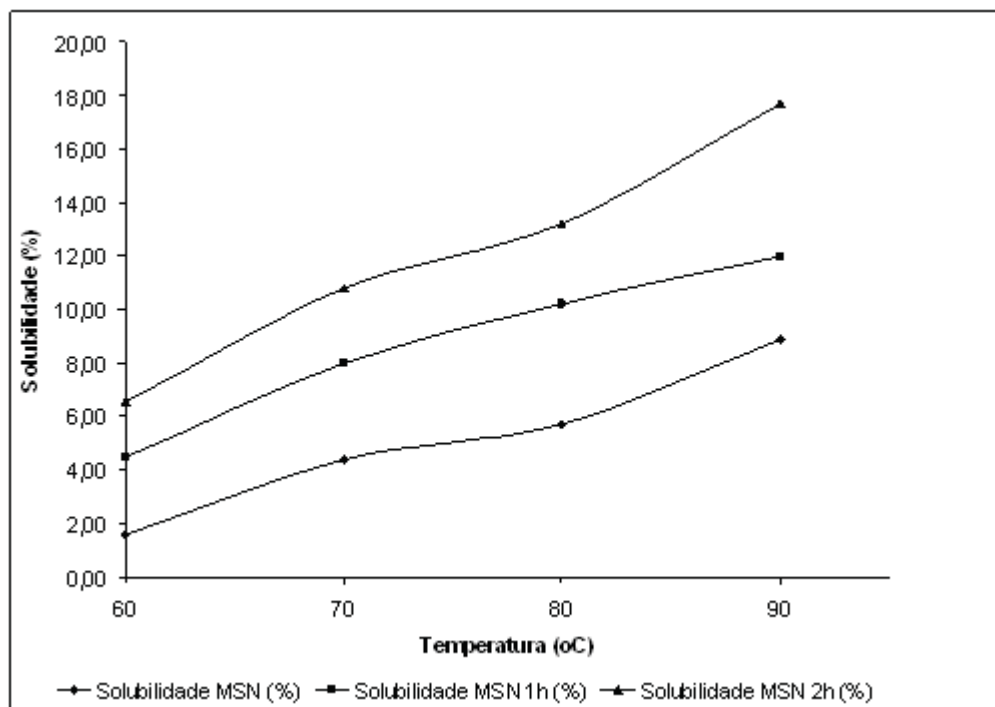


Figura 13 Solubilidade em função da temperatura dos amidos de mandioca-salsa (a) ♦ nativo; ■ moído 1h; ▲ moído 2 horas;

6 CONCLUSÕES

O pré-tratamento enzimático proporcionou a degradação tanto das áreas amorfas quanto das áreas cristalinas do grânulo de amido, facilitando o posterior tratamento físico da moagem.

Houve redução do tamanho médio dos grânulos de amido moídos, mas a hidrólise potencializou essa redução.

A moagem causou a quebra das ligações de hidrogênio e ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 6), o que resultou na degradação das áreas cristalinas dos grânulos.

O tratamento enzimático debilitou a estrutura granular facilitando o rompimento das pontes de hidrogênio pela moagem, tornando o tratamento físico mais eficiente em comparação ao amido sem o pré-tratamento enzimático.

Esses amidos modificados poderiam ser indicados para aplicação como substitutos de gordura em inúmeros produtos, porém mais estudos sobre sua aplicação tecnológica são necessários.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABSAR, N.; ZAIDUL, I. S. M.; TAKIGAWA, S.; HASHIMOTO, N.; MATSUURA-ENDO, C.; YAMAUCHI, H.; NODA, T. Enzymatic hydrolysis of potato starches containing different amount of phosphorus. **Food Chemistry**, 112, p. 57-62, 2009.

APLEVICZ, K.S.; DEMIATE, I.M. Caracterização de amidos de mandioca nativos e modificados e utilização em produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 787-792, 2007.

ATWELL, W. A.; HOOD, L. F.; LINEBACK, D. R.; VANIAN-S-MARSTON, E.; ZOBEL, H. F. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. **Cereal Foods World**, v.33, p. 306-311, 1988.

BEMILLER, J.N. Starch modification: challenges and prospects. **Starch/Stärke**, v. 49, n. 4, p 31-127, 1997.

BERTOFT, E., & MANELIUS, R. A method for the study of the enzymatic hydrolysis of starch granules. **Carbohydrate Research**, v. 227, p.269–283, 1992.

BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food constituents. **Canadian Journal Physiology Pharmacology** , v. 69, n. 1, p.60-78, 1991.

BORTOLO, V. F. **Utilização de amidos de milho ceroso pré-gelatinizado e gomas xantana e guar como substitutos de gorduras em bolos**. 1998. 138f. Tese (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1998.

BRUCHMANN, E. Bioquímica técnica. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 233 p.

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

CÂMARA, F.L.A.; SANTOS F.F. Cultura da mandiocinha-salsa. In: CEREDA, M.P. Agricultura: Tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: **Fundação Cargill**, 2002 v.2, Cap.26, p.519-532.

CAMPANHA R.B. **Características físico-químicas e estruturais de amidos nativos e suas dextrinas naegeli**. 2010, 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). IBILCE/UNESP. São José do Rio Preto, 2010.

CASALI V. W.D; SEDIYAMA M.A.N. Origem botânica da mandiocinha-salsa. **Informe Agropecuário**, v.190, n.19, p. 13-14, 1997.

CASTRO, G. A. de. **Estudo da utilização de amido de milho ceroso hidrolisado por alfa-amilase como substituto de gordura de bolos**. 2000, 198f. Campinas, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2000.

CAVALLINI, M.C; FRANCO C.M.L. Effect of acid-ethanol treatment followed ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava starch **Starch/Stärke** v.62 p.236-245, 2010

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O.; DEMIATE, I. M. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. v.3, São Paulo: **Fundação Cargil**, 2003. 711p.

CHO, K. -H; AUH, J. -H.; RYU, J. -H.; KIM, J. -H.; PARK, K. H.; PARK, C. -S.; YOO, S. -H. -H. Structural modification and characterization of rice starch treated by *thermus aquaticus* 4- α -glucanotransferase. **Food**

Hydrocolloids, 23, p. 2403-2409, 2009.

CIACCO, C.F.; CRUZ, R. Fabricação de amido e sua utilização. São Paulo: **Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, (Série Tecnologia Agroindustrial, 7)** 152 p., 1982

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.

DEMIATE, I. M. Amidos nativos e modificados: propriedades e aplicações em alimentos. **Bol. SBCTA**, v. 37, p. 101-106, 2003.

DHITAL, S.; SHRESTHA, A.K.; GIDLEY, M.J. Effect of cryo-milling on starches: Functionality and digestibility. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 152-163, 2010.

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.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de los Alimentos: Principios y Prácticas**. Zaragoza: Acribia, 2006 549 p.

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

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

FRANCO, C. M. L.; CIACCO, C. F.; TAVARES, D. Q. The structure of waxy corn starch: effect of granule size. **Starch/Stärke**, v. 50, n. 5, p. 193-198, 1998.

FRANCO, C. M. L.; CIACCO, C. F.; TAVARES, D. Q. Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part 2. Study of the granular structure of starch. **Starch/Stärke**, v. 40, n. 1, p. 29-32, 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.; CIACCO, C. F. Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part 1. Study of conditions of hydrolysis. **Starch/Stärke**, v. 39, n. 12, p. 432-435, 1987.

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

FRANCO, C. M. L.; WONG, K. S.; YOO, S.; JANE, J. Structural and Functional Characteristics of Selected Soft Wheat Starches. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 243-248, 2002.

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

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, n. 3-4, p.177-191, 1997.

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

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzyme and products derived from starch. A review. Critical reviews in **Food and Nutrition**, v.36, n.5, p.373-403, 1995.

- 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.
- HUANG, Z.Q.; LU, J.; LI, X.; TONG, Z. Effect of mechanical activation on physicochemical properties and structure of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 128-135, 2007.
- HUANG, Z.Q.; XIE, X-L; CHEN, Y.; LU, J.; TONG Z. Ball-milling treatment effect on physicochemical properties and features for cassava and maize starches. **C.R. Chimie**, v.11, p. 73-79, 2008.
- JANE, J. Current understanding on starch granule structures. **Journal of Applied Glycoscience**. v. 53, p. 205-213, 2006.
- JANE, J.; CHEN, Y.Y.; LEE, L.F.; MCPHESON, A.E. WONG, K S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMUWAM, 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.; SHEN, L.; CHEN, J.; LIM, S.; KASEMSUWAN, T.; NIP, W.K. Physical and chemical studies of taro starches and flours. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 5, p. 528-535, 1992
- JULIANO, B. O. A simplified assay for milled-rice amylose. **Cereal Science Today**, v. 16, n. 10, p. 334-340, 1971.
- KASEMSUWAN, T.; JANE, J.; SCHNNABLE, P.; STINARD, P.; ROBERTSON, D. Characterization of the dominant mutant amylose extender (Ac1-5180) maize starch. **Cereal Chemistry**, v.72, n.5, p.457- 464, 1995.
- KIM, Y.J.; SUZUKI, T.; HAGIWARA, T.; YAMAJU, I.; TAKAI, R. Enthalpy relaxation and glass to rubber transition of amorphous potato starch formed by ball-milling. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 1-6, 2001.
- 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: enhanced reaction of glucoamylase with gelatinized starch granules. **Carbohydrate Research**, v. 288, p. 233-240, 1996.
- LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Carbohidratos em alimentos regionales Iberoamericanos. São Paulo: **Universidade de São Paulo**, 2006. 648p.
- LAURO, M.; FORSELL, P. M.; SUORTTI, M. T.; HULLEMAN, S. H. D.; POUTANEN, K. S. Alpha-amylolysis of large barley starch granules. **Cereal Chemistry**, v. 76, p. 925-930, 1999.
- LEONEL, M.; GARCIA, A. C. D. B.; REIS, M. M. Caracterização físico-química e microscópica de amidos de batata-doce, biri, mandioca e taioba e propriedades de expansão após modificação fotoquímica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 129-137, jul-dez, 2004.
- 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 hidrolisis by alpha-amylases and amyloglucosidase. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 621-632, 2004.
- LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R. T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch/Stärke**, v. 56, n. 3-4, p. 89-99, 2004.

- LUCCA, P. A.; TEPPER, B.J. Fat replacers and the functionality of fat in foods. Trends in **Food Science and Technology**, (S.I.), v.5, n.1, p. 12-19, 1994.
- MALINSKI, E.; DANIEL, J. R.; ZHANG, X. X.; WHISTLER, R. L. "Isolation of Small Starch Granules and Determination of Their Fat Mimetic Characteristics", **Cereal Chemistry**, v. 80, p. 1-4, 2003.
- MATSUBARA, L. S.; LACERDA, L. G.; SCHNITZLER, E.; CARVALHO, FILHO M. A. S.; FRANCO, C. M. L. ; DEMIATE, I. M. Characterization of Native and Oxidized Starches of Two Varieties of Peruvian Carrot (*Arracacia xanthorrhiza*, B.) From Two Production Areas of Paraná State, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 52, n.2, p. 701-713, 2009.
- MONNA, M.; YAMAMOTO, Y.; KAGEI, N.; KAINUMA, K. Raw starch digestion by α -amylase and glucoamylase from *Chalara paradoxa*. **Starch/Stärke**. v. 41, n. 10, p. 382-385, 1989.
- MORRISON, W.R.; TESTER, R.F.; GIDLEY, M.J. Properties of damaged starch granules. II. Crystallinity, molecular order and gelatinization of ball-milled starches. **Journal of Cereal Science**, v. 19, p. 209-217, 1994.
- MUKERJEA, R., SLOCUM, G., ROBYT, J. F. Determination of the maximum water solubility of eight native starches and the solubility of their acidic-methanol and - ethanol modified analogues. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 103- 110, 2007.
- MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal amylases – An Overview. **Carbohydrate Polymers**. v. 60, p. 163-173, 2005.
- 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.
- NIEMANN, C., WHISTLER, R. L. Effect of acid hydrolysis and ball milling on porous corn starch. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 44, n. 11, p. 409- 414, 1992.
- NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 80-85, 2006.
- OATES, C.G. Towards an understand of starch granule structure and hydrolysis. Trends in **Food Science Technology**, v.8, n.11, p.375-382, 1997.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1^{ed}. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.
- PEREIRA A. S. Valor nutritivo da mandioca. **Informe Agropecuário**, v. 190, n.19, p.11-12, 1995.
- PERONI, F.H.G. **Características estruturais e físico-químicas dos amidos obtidos de diferentes fontes botânicas**. 2003. Dissertação para obtenção de título de mestre, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto.
- PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 6, p. 505-513, 2006.
- REN, G. et al. Morphological properties and thermoanalysis of micronized cassava starch. **Carbohydrate Polymers**. v. 79, p. 101-105, 2010.
- ROBERTSON, G. H.; et al. 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. **Estudo das características estruturais de amidos: efeito do 'annealing', da hidrólise ácida e da hidrólise enzimática**. 2010. 200f. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), IBILCE

– UNESP. São José do Rio Preto, 2010.

ROCHA, T. S. **Estudo da hidrólise enzimática do amido de mandioca-salsa (*arracacia xanthorrhiza*): efeito do tamanho dos grânulos**. 2007. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, 2007.

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**, 2010, 25 p.

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.

ROCHA, T. S.; CUNHA, V. A. G.; JANE, J.L.; FRANCO, C. M. L. Structural Characterization of Peruvian Carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) Starch and the Effect of Annealing on Its Semicrystalline Structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4208-4216, 2011.

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.

SANGUANPONG, V.; CHOTINEERANAT, S.; PIYACHOMKWAN, K.; OATES, C. H.; SRIROTH, K. Preparation and structural properties of small-particle cassava starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 760-768, 2003.

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

SCHOCH, T. J. Swelling power and solubility of granular starches. In: WHISTLER, R.L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**; Starch. New York: Academic Press.1964. v. 4. p. 106-109. 1964

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.

SHARIFFA, Y. N.; KARIN, A. A; FAZILAH, A.; ZAIDUL, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food hydrocolloids**, v.23, p.434-440, 2009.

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: R.L. WHISTLER, R.L. **Methods in carbohydrate chemistry**; New York, Starch. ed., Academic Press, v. 4, p. 43 - 47, 1964.

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

SONG, Y.; JANE, J. Characterization of barley starches of waxy, normal and high amylose varieties. **Carbohydrate Research**, v. 41, n. 4, p. 365-377, abr, 2000.

TAKEDA, Y.; HIZUKURI, S.; JULIANO, B. O. Structures of rice amylopectin with low and high affinities for iodine. **Carbohydrate Research**, v. 168, p. 79 – 88, 1987.

TAMAKI, S.; HISAMATSU, M.; TERANISHI, K.; ADACHI, T.; TSU, T.Y. Structural change of maize starch granules by ball-mill treatment. **Starch/Stärke**. v. 50, p. 342-348, 1998.

TESTER, R. F. Starch: The polysaccharide fractions. In: FRAZIER, P. J.; RICHMOND, P.; DONALD, A. M. **Starch: Structure and Functionality**. London: Royal Society of Chemistry. 1997. p. 163-171.

- TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of starches 1. Effects of amylopectins, amyloses and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 551-557, nov-dez, 1990.
- 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, set, 2006.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151-165, mar, 2004.
- THYS, R. C. S.; WESTFAHL, H. J.; NOREÑA, C. P. Z.; MARCZAK, L. D. F.; SILVEIRA, N. P.; CARDOSO, M. B. Effect of the alkaline treatment on the ultrastructure of C-type starch granules. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1894-1901, 2008.
- THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. Practical Guide for Food Industry In: **Starches**. Minesota, Eagan Press, p.1-30, 1999.
- 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** **23** (2): 291-299, 1980.
- VIEIRA F.C; SARMENTO S.B.S. Heat-Moisture and enzymatic Digestibility of peruvian carrot, sweet potato and ginger starches. **Starch/Stärke**, v.60, p.223-232, 2008.
- VIEIRA, F. C. **Efeito do tratamento com calor e baixa umidade sobre características físicas e funcionais dos amidos de mandioca-salsa (*Arracacia Xanthorrhiza*), de batata-doce (*Ipomoea batatas*) e de gengibre (*zingiber officinale*)**. 2004. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) , ESALQ/USP, Piracicaba, 2004.
- WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. Starch. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Carbohydrate chemistry for food scientists**. St. Paul: Eagan Press, 1997. p. 117- 151.
- 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.
- WU, Q., MIOU, Y. Mechanochemical effects of micronization on enzymatic hydrolysis of corn flour. **Carbohydrate Polymers**, v.72, p. 398-402. 2007
- YOO S.H; JANE J.L. Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. **Carbohydrate Polymers**, v.49, p. 297-305. 2002.
- YU, L.; CHRISTIE, G. Measurement of starch thermal transitions using differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 46, n. 2, p. 179-184, Oct. 2001.
- ZAMBRANO, F. M.; CAMARGO, C. R. O. Substitutos de gordura: Efeito da concentração de ácido e do tempo de hidrólise de amido de mandioca em algumas características dos hidrolisados. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1- 2, p. 155-159, 1999.
- ZAVARESE, E.R; RODRIGUES, A. O.; STOCK, C. R.; ASSIS, L. M.; WALLY, A. P. S.; DIAS, A. R. G. Poder de inchamento e solubilidade de amido de arroz submetido ao tratamento térmico com baixa umidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 31-35, 2009.
- ZHANG Z.; ZHAO S.; XIONG S. Morphology and physicochemical properties of mechanically activated rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 341-348. 2010.