

Polyana de Oliveira Serrano

Anelamento e Hidrólise Enzimática
do Amido de Mandioca



1910001336



POLYANA DE OLIVEIRA SERRANO

Engenheira de Alimentos

**ANELAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DO AMIDO DE MANDIOCA**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de **Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria Landi Franco

São José do Rio Preto, SP
Outubro, 2004



664.27
5487a

664.27
5487a

20/01/2005
Doação
R\$ 23,00
Autor(a)
076/2005
27/2005

Serrano, Polyana de Oliveira.

Anelamento e hidrólise enzimática do amido de mandioca / Polyana de Oliveira Serrano – São José do Rio Preto: [s.n], 2004.
83 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Célia Maria Landi Franco

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Amido. 3. Amido de mandioca - Anelamento. 4. Amido de mandioca -Hidrólise enzimática. I. Franco, Célia Maria Landi . II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664.27



POLYANA DE OLIVEIRA SERRANO

**ANELAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DO AMIDO DE MANDIOCA**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Célia Maria Landi Franco - Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto, SP (Orientadora)

Profa. Dra. Maria Victória Eiras Grossmann - Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR (Titular)

Prof. Dr. Maurício Boscolo - Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto, SP (Titular)

Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda - ONG - RAÍZES - Botucatu, SP (Suplente)

Prof. Dr. Roberto da Silva - Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto, SP (Suplente)

"...Tea Palavra é lampada para meus pés e luz para meu caminho..."

Salmos 119-105

São Jose do Rio Preto, 01 de outubro de 2004.



“...Tua Palavra é lâmpada para meus pés e luz para meu caminho...”

Salmo 119:105



AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em todos os momentos, iluminando o caminho para a concretização de meus objetivos;

A Prof. Dra. Celia Maria Landi Franco, pela oportunidade, amizade e dedicação na orientação desse trabalho;

Ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, pela contribuição na realização desse projeto;

Aos professores integrantes da banca examinadora, Prof. Dra. Maria Victória Elias Grossmann, Prof. Dr. Maurício Boscolo, Prof. Dra. Marney Pascoli Caneda, Prof. Dr. Roberto da Silva, pelas correções e sugestões que enriqueceram a pesquisa realizada;

Ao Prof. Dr. Sabaki, por ceder o equipamento necessário à realização das análises de microscopia óptica;

A todos os professores do Curso de Pós Graduação, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento do Curso de Mestrado;

Ao Instituto de Física de São Carlos - USP, pela realização das análises de difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura;

A CAPES, pela concessão de Bolsa de Mestrado;

A todos os amigos do Curso de Pós Graduação, Alan, Apolônio, Antônio, Fernanda, Heloisa, Jamile, Milla, Marcelo, Matheus, Raquel, Vinícius, pelo carinho e compartilhamento de ideias;

Ao minhas amigas do Laboratório de Alimentos, Renata, Sueli, Tália e Thais, pelo companheirismo e apoio durante todo o projeto;

Ao minhas amigas de apartamento, Darlene e Michela, pelo apoio e amizade incondicionais;

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram positivamente para a realização deste trabalho.



AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em todos os momentos, iluminando o caminho para a concretização de meus objetivos;

À Prof. Dra. Célia Maria Landi Franco, pela oportunidade, amizade e dedicação na orientação desse trabalho;

Ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, pela contribuição na realização deste projeto;

Aos professores integrantes da banca examinadora, Profa. Dra. Maria Victória Eiras Grossmann, Prof. Dr. Maurício Boscolo, Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda, Prof. Dr. Roberto da Silva, pelas correções e sugestões que enriqueceram a pesquisa realizada;

Ao Prof. Dr. Sebaka, por ceder o equipamento necessário à realização das análises de microscopia óptica;

A todos os professores do Curso de Pós Graduação, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento de Curso de Mestrado;

Ao Instituto de Física de São Carlos - USP, pela realização das análises de difração de raio-X e microscopia eletrônica de varredura;

À CAPES, pela concessão da Bolsa de Mestrado;

A todos os amigos do Curso de Pós Graduação, Alan, Amanda, Andréia, Fernanda, Heloísa, Jamile, Mara, Marcelo, Marialba, Raquel, Ulisses, pela amizade e companheirismo vividos;

Às minhas amigas do Laboratório de Cereais do DETA, Ana Paula, Carol, Renata, Susi, Talita e Thaís, pelo companheirismo e auxílio na parte experimental do projeto;

Às minhas amigas de apartamento, Daniela e Michela, pelo apoio e amizade incondicional;

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram positivamente para a realização deste trabalho.



ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Introdução.....	5
3.1.1. Amilose e Amilopectina	6
3.1.2. Constituintes Menores no Grânulo de Amido	11
3.1.3. O Grânulo de Amido	13
3.1.4. Hidrólise Enzimática	18
3.2. Transformações Hidrotérmicas do Amido	21
3.2.1. Transição Vítreas	21
3.2.2. Gelatinização	22
3.2.3. Retrogradação	24
3.3. Estudo do Comportamento Térmico e de Pasta do Amido	25
3.4. Anelamento	29
3.5. Anelamento X Hidrólise Enzimática	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Materiais	38
4.2. Métodos	38
4.2.1. Extração do Amido	38
4.2.2. Anelamento	39
4.2.3. Teor de Umidade	39
4.2.4. Propriedades de Pasta	39



4.2.5. Propriedades Térmicas	40
4.2.6. Poder de Inchamento	41
4.2.7. Hidrólise Enzimática	42
4.2.8. Determinação do Teor de Açúcares Redutores	43
4.2.9. Afinidade com Iodo e Teor de Amilose	43
4.2.10. Difração de Raio-X	43
4.2.11. Propriedades Térmicas dos Amidos Hidrolisados	44
4.2.12. Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura	45
4.2.13. Delineamento Experimental e Análise Estatística dos Resultados ..	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1. Propriedades de Pasta	47
5.2. Propriedades Térmicas	50
5.3. Poder de Inchamento	54
5.4. Hidrólise Enzimática dos Amidos de Mandioca Natural e Submetidos ao Anelamento nas Diferentes Temperaturas	57
5.5. Teor de Amilose dos Amidos de Mandioca Natural, Anelados e Hidrolisados.....	59
5.6. Difração de Raios-X	61
5.7. Propriedades Térmicas dos Amidos Natural e Anelados Hidrolisados ...	66
5.8. Análises Microscópicas	69
5.8.1. Microscopia Óptica	69
5.8.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	71
6. CONCLUSÕES	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75



ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades de pasta dos amidos de mandioca natural e anelados....	47
Tabela 2 – Características de gelatinização dos amidos de mandioca natural e anelados	50
Tabela 3 – Propriedades térmicas dos amidos de mandioca natural e anelados.. retrogradados	53
Tabela 4 – Poder de Inchamento a 60, 70, 80°C dos amidos de mandioca natural e anelados	55
Tabela 5 – Teor de amilose dos amidos de mandioca natural, anelados e tratados enzimaticamente.....	60
Tabela 6 – Intensidade dos principais picos dos difractogramas de raios-X e índice de cristalinidade dos amidos natural e anelados submetidos ou não a hidrólise enzimática	64
Tabela 7 – Características de gelatinização dos amidos de mandioca natural e anelados submetidos à hidrólise enzimática	67
Tabela 8 - Características de gelatinização dos amidos de mandioca natural e anelados submetidos à hidrólise enzimática retrogradados	68



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de glicose.....	6
Figura 2 - Estrutura química da amilose.....	7
Figura 3 - Estrutura helicoidal da amilose.....	8
Figura 4 - Estrutura química da amilopectina	10
Figura 5 - Grânulo de amido tratado com α -amilase bacteriana.....	17
Figura 6 - Representação esquemática das mudanças que ocorrem em uma mistura de amido e água durante o aquecimento e resfriamento	24
Figura 7 - Curva de empastamento típica de RVA apresentando os parâmetros comumente medidos e viscosidade em unidade RVU.....	28
Figura 8 - Perfil viscoamilográfico dos amidos de mandioca natural e anelados a diferentes temperaturas.....	48
Figura 9 - Poder de Inchamento dos amidos de mandioca natural e anelados.....	55
Figura 10 - Quantidade de açúcar redutor, produzida por 100 g de amido em função do tempo de incubação durante a hidrólise dos amidos de mandioca natu- ral e anelados a diferentes temperaturas.....	58
Figura 11 - Difractogramas de raios-x dos amidos de mandioca natural e anelados	62
Figura 12 - Difractogramas de raios-x dos amidos de mandioca natural e anelados submetidos à hidrólise enzimática.....	63
Figura 13 - Micrografias dos amidos de mandioca natural e anelados submetidos ou não à hidrólise enzimática, observados em microscópio óptico comum. 70	70
Figura 14 - Amido de mandioca natural e anelados observados ao microscópio eletrônico de varredura	72
Figura 15 - Amido de mandioca natural e anelados observados ao microscópio eletrônico de varredura	73



RESUMO

Anelamento é o processo físico no qual uma suspensão de amido é exposta a uma temperatura superior àquela de transição vítrea e ligeiramente inferior à temperatura de gelatinização. Informações sobre a relação entre anelamento e hidrólise enzimática do amido são relativamente escassas. Neste trabalho, amido de mandioca foi anelado em excesso de água (50% p/v) durante 48 horas nas temperaturas de 50, 55 e 60°C. Amostras de amido natural e anelados foram submetidos à hidrólise enzimática com α -amilase bacteriana durante 48 horas a 37°C. A extensão da hidrólise foi acompanhada pela quantidade de açúcares redutores produzida. Os amidos natural e anelados submetidos ou não a hidrólise enzimática foram analisados quanto às suas características físico-químicas e estruturais. As propriedades térmicas e de pasta foram determinadas através de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Rápido Visco Analizador (RVA), respectivamente, enquanto o poder de inchamento foi determinado nas temperaturas de 60, 70 e 80°C. O teor de amilose foi determinado por titulação potenciométrica. Análises de difração de raios-x e observação em microscópios óptico e eletrônico de varredura foram realizadas. As temperaturas de gelatinização e entalpia aumentaram, enquanto a faixa de temperatura de gelatinização diminuiu com o anelamento. As temperaturas de pasta e as viscosidades de pico aumentaram com o tratamento. O anelamento não mudou o padrão de difração do amido de mandioca. Dos difratogramas de raios-X observou-se aumento do índice de cristalinidade relativa dos amidos anelados a 50 e 55°C de 21,6 para 23,3 e 25,8% respectivamente, enquanto diminuiu de 21,6 para 19,3 para o amido anelado a 60°C. Os resultados sugeriram uma reorganização molecular dos grânulos com maior perfeição dos cristais e aumento da cristalinidade provocada pelo anelamento, às



temperaturas de 50 e 55°C. Os amidos anelados foram mais suscetíveis à hidrólise enzimática com α -amilase quanto maior a temperatura de tratamento. Não foram observadas mudanças no teor de amilose dos amidos submetidos ao anelamento e/ou a hidrólise enzimática (~20%). Através de microscópio eletrônico de varredura, foram observados poros e fissuras na superfície dos grânulos anelados a 55°C. Esses resultados sugeriram que o anelamento altera o padrão de hidrólise do amido facilitando a penetração das enzimas da superfície para o interior dos grânulos aumentando a acessibilidade às regiões amorfas pelas enzimas, apesar da maior ordem dos cristais. A menor cristalinidade e maior taxa de hidrólise apresentadas pelo amido anelado a 60°C sugeriram uma gelatinização parcial dos grânulos desta amostra em função da temperatura de anelamento praticamente coincidir com a temperatura inicial de gelatinização do amido de mandioca (59,82°C).

Palavras-chaves: mandioca, amido, anelamento, hidrólise enzimática.



ABSTRACT

Annealing is a physical treatment that involves incubation of starch granules in excess water at a temperature above the glass transition temperature but below the gelatinization temperature. Information about annealing and enzymatic hydrolysis relationship is insufficient. In this work, cassava starch was annealed in excess water (50% p/v) during 48 hours at 50, 55, and 60°C. Natural and annealed starches were submitted to enzymatic hydrolysis with bacterial α -amylase during 48 hours at 37°C. The hydrolysis extension was determined by reduced sugar quantity produced. Natural and annealed starches submitted or not to hydrolysis were analyzed by their physicochemical and structural characteristics. Thermal and pasting properties were determined by Differential Scanning Calorimetry (DSC), and Rapid Visco Analyzer (RVA), respectively, whereas swelling power was determined at 60, 70, and 80°C. Amylose content was determined by potentiometric titration. X-ray diffraction and optical and scanning electron microscopy of starches were determined. Gelatinization temperatures and enthalpy increased whereas gelatinization temperature range became more narrow with the annealing. Pasting temperatures and viscosity peaks also increased with the treatment. The annealing did not change the X-ray diffraction pattern of cassava starch. From X-ray diffractograms, it was observed the relative crystallinity index of starches annealed at 50 and 55°C increased from 21.6 to 23.3 and 25.8%, respectively, whereas decreased from 21.6 to 19.3 for starch annealed at 60°C. The results suggested the annealing provided molecular reorganization of granules with formation of more perfect crystals, and increase of the crystallinity for starches treated at 50 and 55°C. Annealed starches were more susceptible to enzymatic hydrolysis. The amylose content of starches (~20%) did not change with the annealing and/or enzymatic hydrolysis. From



scanning electronic microscopy, it was observed pores and fissures on the granule surface of starch annealed at 55°C. These results suggested the annealing alters the pattern of hydrolysis of starch easing enzyme penetration from surface to interior of the granules increasing the accessibility to the amorphous regions by enzymes, despite higher crystalline order. The lower crystallinity and the higher hydrolysis extension displayed by the starch annealed at 60°C suggested a partial gelatinization of the granules due to annealing temperature be coincident to onset gelatinization temperature of cassava starch (59,82°C).

Key-words: Cassava, starch, annealing, enzymatic hydrolysis.



1. INTRODUÇÃO

O amido é encontrado em abundância na natureza, só competindo em quantidade com a celulose. Os depósitos permanentes desse polissacarídeo nas plantas ocorrem principalmente nos órgãos de reserva como é o caso dos amiloplastos de grãos de cereais, tubérculos, raízes, e leguminosas (LEONEL; CEREDA, 2002).

Além de ser utilizado como fonte de energia, o amido é largamente usado pela indústria de alimentos, nacional e internacional, como ingrediente em sistemas alimentícios. Dependendo de sua fonte botânica e de sua natureza nativa ou modificada ele pode, entre outras funções, servir para facilitar o processamento, fornecer textura, servir como espessante, fornecer sólidos em suspensão ou proteger os alimentos durante o processamento. Assim, o amido desempenha um importante papel no controle das características de um grande número de alimentos processados.

Nem sempre o amido, na sua forma nativa, possui as propriedades físico-químicas adequadas a determinados tipos de processamento. Deste modo, amidos modificados são largamente utilizados na fabricação de alimentos preparados, principalmente em países desenvolvidos. Na maioria das vezes, a modificação química é usada, mas há um crescente interesse na modificação física do amido, especialmente para aplicações em alimentos. Os amidos modificados fisicamente são considerados materiais naturais de alta segurança (JACOBS, 1998). A demanda por produtos mais naturais e normas de proteção aos consumidores mais rigorosas, têm dificultado o desenvolvimento de amidos alimentares a partir de modificações, principalmente químicas. Novos reagentes para a modificação de amidos, ou novos



derivados de amidos para uso alimentar são cada vez mais difíceis de serem aprovados (BeMILLER, 1997).

O anelamento (*annealing*) é o processo físico no qual uma suspensão de amido é exposta a uma temperatura superior àquela de transição vítrea e ligeiramente inferior à temperatura de gelatinização, o que permite uma discreta reorganização molecular com formação de uma estrutura mais organizada de menor energia livre (BLANSHARD, 1987). Tester e Debon (2000) reconhecem que este processo possa estar associado a uma gelatinização parcial dos grânulos, mas acreditam que a definição de anelamento deva ser aplicada somente em casos em que a gelatinização ainda não ocorreu e assim, a temperatura inicial de gelatinização (T_0) não deve ser excedida durante o processo.

O processo de anelamento afeta as propriedades funcionais do amido tais como suas propriedades térmicas e de pasta. As temperaturas de gelatinização iniciais e de pico são aumentadas, enquanto a faixa de temperatura de gelatinização e a mudança de entalpia diminuem com o anelamento (JACOBS et al., 1998b; TESTER; DEBON; SOMMERVILLE, 2000). Já o efeito do anelamento sobre as propriedades de pasta dos amidos ainda não está bem esclarecido. Alguns autores (HOOVER; VASANTHAN, 1994) observaram redução da viscosidade a quente, enquanto outros (JACOBS et al., 1996) observaram um aumento deste parâmetro, estando possivelmente essas diferenças relacionadas com as características estruturais dos amidos e, em última análise, à fonte botânica dos mesmos.

Devido aos efeitos marcantes que o processo de anelamento provoca nas propriedades funcionais do amido, é importante que os eventos moleculares básicos sejam elucidados (TESTER; DEBON, 2000). Além disso, esses autores reconhecem que este processo fornece um modelo útil para investigar a cristalização da



amilopectina sendo uma técnica simples, capaz de fornecer informações sobre a estrutura dos grânulos de amido.

A hidrólise enzimática também tem sido muito utilizada como técnica que possibilita o entendimento da estrutura física e química do grânulo de amido e de seus componentes. A taxa de hidrólise dos grânulos de amido depende fortemente da origem botânica, do sistema enzimático utilizado e do tamanho dos grânulos, entre outros fatores. Amidos que naturalmente apresentam superfície porosa, como o de milho, são degradados mais facilmente que aqueles cuja superfície é lisa, como o de mandioca, e grânulos de menor diâmetro são mais suscetíveis às enzimas que aqueles de maior diâmetro (FRANCO; CIACCO, 1992; FRANCO; CIACCO; TAVARES, 1998).

Informações sobre a relação entre anelamento e hidrólise enzimática do amido são relativamente escassas e não encontramos na literatura especializada estudos sobre o anelamento do amido de mandioca.

Neste trabalho, o impacto do anelamento sobre a hidrólise enzimática do amido de mandioca e a caracterização dos amidos natural e anelados antes e após a hidrólise com α -amilase bacteriana foram estudadas. Três temperaturas de anelamento foram utilizadas e os amidos antes e após o tratamento físico foram tratados com α -amilase bacteriana. Os amidos naturais, anelados e tratados enzimaticamente foram estudados quanto às suas características estruturais tais como teor de amilose, cristalinidade, microscopia óptica e eletrônica de varredura, e propriedades térmicas. Os amidos naturais e anelados também foram analisados quanto às suas propriedades de pasta e poder de inchamento.



2.OBJETIVOS

- O objetivo deste trabalho foi investigar o impacto do anelamento sobre a hidrólise enzimática do amido de mandioca e caracterizar os amidos naturais e anelados antes e após a hidrólise com α -amilase bacteriana.



3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Introdução

O amido é um polímero de elevado peso molecular e fornece de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem em todo o mundo (WHISTLER; BeMILLER, 1997; CEREDA et al., 2001). Além de ser facilmente convertido em muitas substâncias por processos químicos e bioquímicos, é uma fonte potencial e renovável que possui papel importante em vários campos da vida do homem (HIZUKURI et al., 1997).

As características do amido dependem principalmente do local onde é estocado na planta. Os amidos podem ser subdivididos em amidos de cereal e amidos derivados de raízes e tubérculos, sendo que os grânulos de diferentes fontes botânicas vão variar na composição, forma e tamanho. Como exemplo, os amidos de cereais são menores, e contêm mais resíduos de proteínas e lipídios que os amidos de raízes e tubérculos (HERMANSSON; SVEGMARK, 1996).

A molécula de amido possui dois importantes grupos funcionais: o grupo $-OH$, suscetível às reações de substituições e as ligações $C-O-C$, susceptíveis à ruptura de cadeias. O grupo hidroxila da glicose tem caráter nucleofílico (SEBIO, 2003).

O amido é um polissacarídeo que consiste unicamente de resíduos de α -D-glicose, com suas ligações glicosídicas numeradas de um a seis como se apresenta na Figura 1. Essas numerações facilitam a compreensão das propriedades e da reatividade do amido (BULEON et al., 1998).



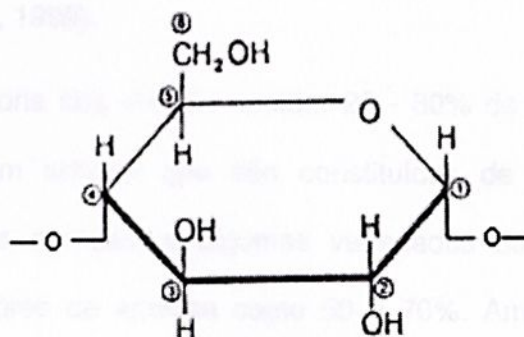


Figura 1-Molécula de glicose

Fonte: BULÉON et al., 1998.

O amido é único dentre os carboidratos, por ocorrer naturalmente como discretas partículas, chamadas grânulos, que são compostos de uma mistura de dois polímeros: um polissacarídeo essencialmente linear chamado amilose e um polissacarídeo altamente ramificado denominado amilopectina, em proporções que variam com a espécie e o grau de maturação da planta (WHISTLER; BeMILLER, 1997).

3.1.1. Amilose e Amilopectina

O amido deve muito de sua funcionalidade às duas macromoléculas, amilose e amilopectina, assim como à organização física das mesmas dentro da estrutura granular (BILIADERIS, 1991). A proporção de amilose e amilopectina é variável com a fonte botânica, o que irá conferir características específicas à pasta de amido (FRANCO et al., 2001). O conteúdo desses polissacarídeos afeta a arquitetura do

grânulo de amido, as propriedades de gelatinização, e os atributos texturais (THOMAS; ATWELL, 1999).

A grande maioria dos amidos contém 20 - 30% de amilose e 70 - 80% de amilopectina. Existem amidos que são constituídos de 100% de amilopectina denominados amidos cerosos, e algumas variedades de amidos de milho que apresentam altos teores de amilose como 50 e 70%. Amidos de milho definidos como de alto teor de amilose, na verdade, são constituídos de aproximadamente 25% de amilose de baixo peso molecular (grau de polimerização [DP] entre 250 a 300), e também de uma fração parecida com amilose que substitui aproximadamente metade a dois terços das moléculas de amilopectina, respectivamente para amidos com 50 e 70% de amilose (WHISTLER; BeMILLER, 1997).

A amilose é essencialmente um polímero linear formado por unidades de D-glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ (Figura 2). O grau de polimerização (DP) está usualmente na faixa de 500-6000 unidades de glicose. Somente poucas ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ estão presentes, correspondendo de 09 a 20 pontos de ramificações (JACOBS; DELCOUR, 1998; BULÉON et al., 1998; AHMAD et al., 1999; HOOVER, 2001).

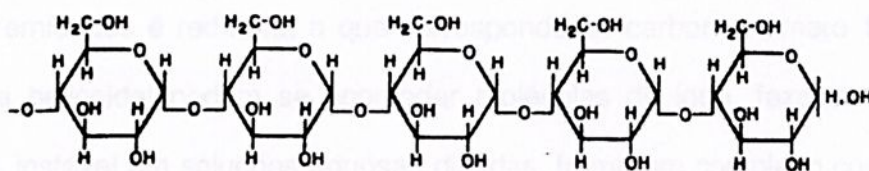


Figura 2– Estrutura química da amilose
Fonte: SMITH, 1982

A amilose possui facilidade para adquirir uma conformação helicoidal, pois as cadeias de α -D-glicose costumam enrolar-se em espiral, formando uma estrutura na qual a hélice é formada por pontes de hidrogênio entre os radicais hidroxilas das moléculas. O interior da α -hélice contém somente átomos de hidrogênio (lipofílico), enquanto os grupos hidroxilas posicionam-se no lado externo da mesma (Figura 3).



Figura 3- Estrutura helicoidal da amilose.

Fonte: CAMPBELL, 2000.

A amilose, durante a distensão de sua estrutura helicoidal não ramificada, apresenta a propriedade de absorver até 25 vezes seu peso em água. Apenas uma das extremidades é redutora, a que corresponde ao carbono número 1. Dentro da estrutura helicoidal podem se acomodar moléculas de iodo, fazendo com que a amilose, instável em soluções aquosas diluídas, forme um complexo com o mesmo, dando uma coloração azul (FRANCO et al., 2001). A amilose também é capaz de se ligar com moléculas de álcoois e lipídeos através da formação de complexos, devido à sua estrutura helicoidal.

Segundo Buléon et al. (1998), as ramificações que se apresentam na molécula de amilose são separadas por grandes distâncias, permitindo a estas moléculas agirem como se fossem essencialmente lineares, não alterando significativamente algumas de suas propriedades como peso molecular e a capacidade de se complexar com o iodo, álcoois ou lipídeos.

Segundo Jane et al. (1992), essa molécula linear se intercala entre as moléculas de amilopectina, ao invés de estar localizada em feixes. De acordo com Jenkins et al. (1994 apud JACOBS, 1998), a maioria das moléculas de amilose está localizada nas camadas amorfas dos anéis de crescimento. Muitos estudos indicam que o conteúdo de amilose aumenta do centro para periferia do grânulo (HIZUKURI, 1996 apud JACOBS, 1998).

A amilopectina é uma molécula muito grande, altamente ramificada, formada por unidades de D-glicose ligadas em $\alpha(1\rightarrow4)$ e com 5 a 6 % de ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ nos pontos de ramificação (Figura 4). Possui um dos maiores pesos moleculares relativos (10^7 - 10^9 g/mol), com a maioria na faixa de 10^8 g/mol (BULÉON et al., 1998).

A molécula de amilopectina consiste de uma cadeia principal C, que carrega o grupo redutor, e numerosas cadeias ramificadas denominadas cadeias A e B. As cadeias A são conectadas às cadeias B ou C via ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, mas não carregam qualquer ramificação, enquanto as cadeias B, também conectadas a outras cadeias via ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, possuem uma ou mais cadeias A ou B ligadas a ela nos pontos de ramificação.

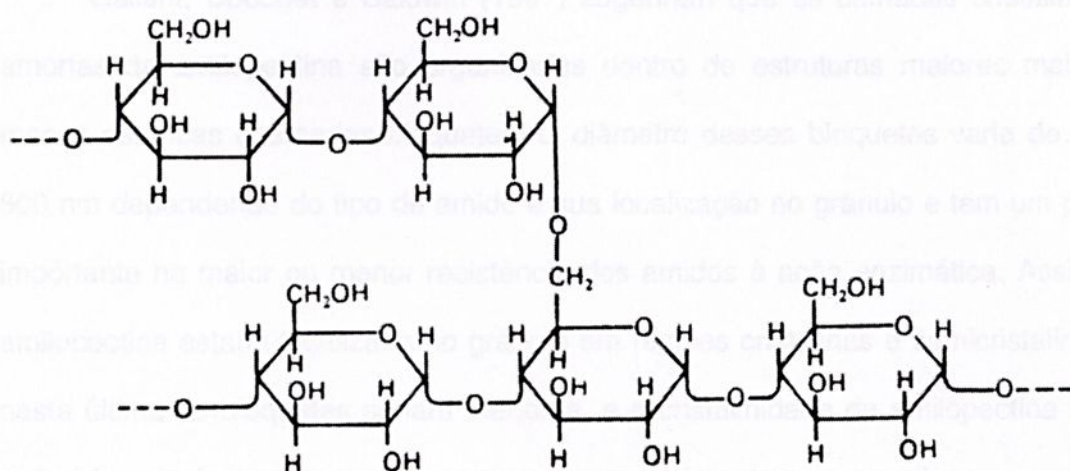


Figura 4— Estrutura química da amilopectina

Fonte: COULTATE, 1986.

Diversos modelos de estrutura para a amilopectina foram postulados com relação ao modo como as cadeias estão arranjadas para formar uma estrutura altamente ramificada. No modelo de estrutura mais aceito, *clusters* associados de cadeias A, com grau de polimerização (DP) igual a 15, passam a constituir uma camada cristalina com 60 Å de espessura na direção axial (FRENCH, 1973; ROBIN et al., 1974) e constituem a fração dos grânulos de amido resistentes ao ácido. A maior parte das ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ presente nas regiões intercristalinas entre os *clusters* sucessivos são bem mais suscetíveis ao ácido. Outros autores sugerem variações deste modelo (MANNERS; MATHERSON, 1981; HIZUKURI, 1986; BERTOFT, 1989) e ainda não está claro se ele se aplica a todas as amilopectinas, independente da fonte botânica. A relação amilopectina e cristalinidade do amido frente ao padrão de degradação mostrado pelas α -amilases e a maior viscosidade desta molécula quando comparada ao glicogênio explica o sucesso do modelo tipo *cluster* (BULÉON et al, 1998).

Gallant, Bouchet e Baldwin (1997) sugeriram que as camadas cristalinas e amorfas da amilopectina são organizadas dentro de estruturas maiores mais ou menos esféricas chamadas bloquetes. O diâmetro desses bloquetes varia de 20 a 500 nm dependendo do tipo de amido e sua localização no grânulo e tem um papel importante na maior ou menor resistência dos amidos à ação enzimática. 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.

Estudos têm mostrado a existência de um terceiro componente do amido denominado material intermediário (WANG et al., 1993; KASEMSUWAN et al., 1995). A quantidade e estrutura deste material diferem de acordo com o tipo e grau de maturação do grânulo de amido (WANG et al., 1993). Este material intermediário consiste de cadeias lineares com DP variando de 50 a 200, moléculas levemente ramificadas de baixo peso molecular ($< 10^6$ g/mol), com comprimento de cadeia maior que o comprimento da amilopectina normal (BILIADERIS, 1991), e com peso molecular menor que o da amilose. Essas moléculas mostraram respostas intermediárias, entre amilose e amilopectina em sua afinidade com o iodo (GERARD; BARRON; PLANCHOT, 2001).

3.1.2. Constituintes Menores no Grânulo de Amido

O amido é constituído basicamente de carboidratos. No entanto, o produto industrial apresenta como acompanhantes substâncias tais como matéria-graxa, proteínas, minerais e sais, conhecidos como cinzas. Essas substâncias são parte da própria planta de onde o amido foi extraído, dependendo da composição da planta e



do método de extração e purificação. Quanto menor o teor dessas substâncias, melhor a qualidade do amido. Teores menores também refletem processos de extração e purificação mais eficientes (FRANCO et al., 2001).

Os lipídeos estão tipicamente presentes em amidos de cereais em quantidades maiores que 1% (JACOBS, 1998). Amidos de legumes e tubérculos possuem somente traços de lipídeos (0,02-0,2%), principalmente lipídeos de superfície (MORRISON, 1988). O conteúdo de proteína de amidos comerciais é tipicamente abaixo de 1%. Amidos de cereais e legumes contêm níveis mais altos de proteínas (0,25-0,5% e 0,7-0,9%, respectivamente) do que o amido de batata (0,06%) (SWINKLES, 1985b; DOUBLIER, 1987).

O amido também contém traços de quantidades de elementos minerais e sais inorgânicos, como cálcio, potássio, magnésio e sódio, encontrados na sua forma iônica (JACOBS, 1998). O conteúdo de cinzas pode variar dependendo da fonte do material natural, práticas agrônômicas, procedimentos de moagem, e tipos de modificações químicas que podem sofrer os amidos. O conteúdo de cinzas é tipicamente menor que 0,5% da matéria seca (THOMAS; ATWEEL, 1999).

Dos constituintes menores, os que mais influenciam as propriedades funcionais dos amidos são os lipídeos e o fósforo. Os lipídeos afetam a gelatinização, modificam o comportamento reológico das pastas resultantes e inibem a cristalização das moléculas reduzindo assim a retrogradação (WANG; WHITE, 1994). O movimento de água dentro dos grânulos é inibido na presença de lipídeos de superfície, enquanto o inchamento e a lixiviação da amilose são reduzidos na presença de complexos amilose-lipídeos (RAEKER et al., 1998).



Os amidos de cereais, de um modo geral, contém fósforo principalmente na forma de fosfolipídeos (MEREDITH; DENGATE; MORRISON, 1978), enquanto que em amidos de raízes e tubérculos o fósforo se encontra principalmente na forma de monoéster fosfato (HIZUKURI, 1970). Amidos de alguns cereais como milho, milho ceroso, arroz e arroz ceroso também apresentam quantidades menores de monoéster fosfato (6-15 ppm), que estão localizados principalmente no C-6 de suas unidades glicosídicas (TABATA et al., 1975 apud LIM; KASENUWAM; JANE, 1994).

3.1.3. O Grânulo de Amido

O amido é sintetizado na forma de grânulos dentro de organelas celulares (amiloplastos) (JACOBS; DELCOUR, 1998). Os grânulos são relativamente densos, insolúveis, e se hidratam ligeiramente em água à temperatura ambiente (WHISTLER; BeMILLER, 1997).

Os amidos de diferentes fontes botânicas apresentam grânulos de forma e tamanho distintos, além de outras particularidades superficiais, como posição do hilum e temperatura de gelatinização (FRANCO et al., 2001). O tamanho dos grânulos também varia com o grau de maturação da planta. Os tamanhos dos grânulos de diversos amidos variam de $<5\ \mu\text{m}$ em diâmetro, para o amido de arroz a $>80\ \mu\text{m}$ em diâmetro para o amido de batata (FRANCO et al., 2001). O amido de mandioca, uma vez purificado e examinado ao microscópio, apresenta grânulos de diâmetros que variam de 8 a $22\ \mu\text{m}$. Já as formas encontradas para o amido de mandioca são redonda, oval, truncada, poligonal e cilíndrica, de acordo com Rickard, Asaoka e Blanshard (1991).



O grânulo de amido é birrefringente e, sob luz polarizada, apresenta uma típica "cruz de malta" que pode ser cêntrica ou excêntrica. A birrefringência dos amidos nativos, quando vista sob luz polarizada, indica um grau de ordem no grânulo de amido. Além disso, a cruz de malta observada é característica de uma ordenação radial de macromoléculas (JACOBS, 1998).

Os diferentes graus de ordenamento estrutural do grânulo são responsáveis pelas propriedades de birrefringência e cristalinidade. No entanto, estas não são necessariamente relacionadas, ou seja, a birrefringência implica apenas na existência de um alto grau de organização molecular no grânulo sem que isso se refira a qualquer forma de cristalinidade (LINEBACK, 1984; ZOBEL, 1984, 1988).

Os grânulos de amido estão organizados em regiões cristalinas e amorfas, sendo a transição entre essas regiões gradual. Estudos mostram que a amilopectina é a principal responsável pela cristalinidade do amido. Em amidos provenientes de raízes e tubérculos, a região cristalina é constituída das frações lineares da amilopectina, enquanto que os pontos de ramificação e a amilose são os principais componentes das regiões amorfas (CUI; OATES, 1997; PARKER; RING, 2001). Já em amidos de cereais, a amilopectina é o elemento mais importante da estrutura cristalina, enquanto uma porção de moléculas de amilose aparece associada com substâncias lipídicas, que formam uma estrutura cristalina fraca (PLATA-OVIEDO, 1991; SWINKLES, 1985a).

A cristalinidade do grânulo de amido, que se deve basicamente à amilopectina, varia entre 15 e 45% (ZOBEL, 1988). Sua caracterização através de difração de raios-X fornece três padrões principais, A, B, ou C como consequência do empacotamento em dupla hélice das cadeias ramificadas deste polímero. Estes

padrões são dependentes da fonte botânica e temperatura do ambiente (HIZUKURI, 1996).

A técnica de difração de raios-X detecta as repetições ordenadas regulares das hélices, refletindo a ordem tridimensional dos cristais do amido. Esta técnica é o melhor método para estimar a cristalinidade. Porém, para efeito de comparação, todas as amostras analisadas precisam conter a mesma quantidade de água. Além disso, segundo Colonna, Leloup e Buléon (1992), a difração de raios-X somente detecta cristais agregados em dupla hélice. A partir desta técnica é possível evidenciar e definir os tipos de arranjos segundo a posição dos picos de difração (MESTRES, 1996 apud FRANCO et al, 2001).

Os padrões A e B diferem entre si quanto à forma dos cristais e quanto ao conteúdo de água. O padrão A, encontrado na maioria dos cereais, consiste de duplas hélices dispostas em arranjo monocíclico (THOMAS; ATWELL, 1999), e hélices paralelas e duplas hélices, separadas por moléculas de água intersticiais (WHISTLER; BeMILLER, 1997). Em amidos de tubérculos e raízes, que produzem padrões de raios-X tipo-B, uma coluna de moléculas de água substitui uma das duplas hélices (WHISTLER; BeMILLER, 1997). Já os amidos de legumes exibem um padrão tipo C, que segundo Gallant et al. (1992), pode ser formado pela mistura de grânulos com padrão cristalográfico A e com padrão cristalográfico B; ou ainda, existe a possibilidade da coexistência, internamente nos grânulos, dos dois padrões citados.

Os amidos tipo B são formados em órgãos de plantas oriundas de ambientes com alta umidade e baixa temperatura. Em baixas condições de umidade e altas temperaturas, os amidos tipo B podem ser convertidos irreversivelmente para



amidos tipo A, devido à falta de água e à reorganização das duplas hélices. No entanto, a passagem do padrão A para o B só é possível se os grânulos de amido forem inteiramente destruídos e então recristalizados em um novo sistema que possuirá um nível diferente de organização (COLONNA; LELOUP; BULÉON, 1992; GALLANT et al., 1992).

As moléculas de amilose e amilopectina estão arranjadas no grânulo formando uma estrutura de camadas que pode ser observada por microscopia óptica e eletrônica. As camadas correspondem a regiões alternadas de alto e baixo índice de refração, densidade, cristalinidade e resistência ao ácido e a enzimas representando os anéis de crescimento (FRENCH, 1984 apud JACOBS et al., 1998a).

Muito do que é conhecido sobre a estrutura interna do grânulo de amido é resultado de avaliações microscópicas de grânulos parcialmente degradados. Comparados com áreas cristalinas, as áreas amorfas do grânulo são geralmente degradadas mais facilmente por ácidos e enzimas, como a α -amilase (THOMAS; ATWELL, 1999). Nas regiões amorfas, as cadeias poliméricas estão menos ordenadas e, portanto, mais susceptíveis ao ataque ácido ou enzimático (GALLIARD; BOWLER, 1987).

Os grânulos tratados exhaustivamente com enzima demonstram um padrão de anéis análogo a anéis concêntricos em um tronco de árvore cortado no sentido transversal (Figura 5). Este modelo indica que as áreas cristalinas e amorfas do grânulo se alternam, e assim, a configuração resulta em períodos alternados de crescimento e descanso durante a síntese do grânulo de amido (THOMAS; ATWELL, 1999).



Figura 5- Grânulo de amido tratado com α -amilase bacteriana.

Fonte: THOMAS; ATWELL, 1999.

Informações sobre a estrutura dos grânulos de amido têm sido obtidas usando uma combinação de técnicas microscópicas. A escolha da técnica e do microscópio, para uma visualização de alta resolução da estrutura dos grânulos de amido depende do tipo de informação requerida, ou seja, superfície ou estrutura interna. Informações sobre a superfície dos grânulos podem ser conseguidas, tanto com a microscopia eletrônica de varredura (SEM) como por microscopia de força atômica (AFM). Já informações sobre estrutura interna requerem o uso da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

Uma técnica em microscopia bastante utilizada no estudo da estrutura de grânulos é o uso da luz polarizada. Como consequência da cristalinidade, a maioria dos grânulos de amido apresenta uma cruz de malta, quando observados sob luz polarizada. Utilizando-se um filtro adicional, a luz polarizada revela uma birrefringência positiva dos grânulos de amido, o que teoricamente indica uma

orientação radial do eixo principal dos cristais (GALLIARD; BOWLER, 1987; GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

A microscopia óptica possibilita a obtenção de informações sobre as características dos grânulos, como a sua distribuição e grau de inchamento (HERMANSSON; SVEGMARK, 1996), além da distinção e identificação dos grânulos de diferentes fontes de amido, pela forma e tamanho característicos.

3.1.4. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática do amido granular tem sido utilizada como técnica que possibilita o entendimento da estrutura física e química do grânulo e de seus componentes (GALLANT; MERCIER; GUIBOT, 1972; GALLANT et al., 1982; GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997; FRANCO; CIACCO, 1987, 1992; FRANCO; CIACCO; TAVARES, 1988, 1995, 1998).

A taxa de hidrólise dos grânulos depende fortemente de vários fatores, como origem botânica, sistema enzimático utilizado, tamanho dos grânulos, grau de degradação dos amidos, taxa de aumento de temperatura, temperatura de gelatinização e sua extensão, assim como da presença de outros ingredientes, que podem afetar o inchamento dos grânulos de amido ou a atividade da enzima (RADLEY, 1976).

Segundo Zhang e Oates (1999) e Cui e Oates (1997), a suscetibilidade do amido ao ataque enzimático é influenciada pela estrutura cristalina e granular e pela presença de inibidores de enzima. Entre esses fatores, a estrutura granular é



considerada a mais importante (GRANFELDT; HAGANDER; BJORCK, 1995; HOLM; LUNDQUIST; BJORCK, 1988 apud CUI; OATES, 1997).

Dos dois componentes do amido, a amilopectina representa um grande desafio para os sistemas de hidrólise enzimática. Isso acontece devido aos resíduos envolvidos nos pontos de ramificação glicosídica α -(1→6), que constitui ao redor de 4 a 6% da glicose presente. A maioria das enzimas hidrolíticas é específica para a ligação glicosídica α -(1→4), porém as ligações glicosídicas α -(1→6) devem ser também quebradas para a completa hidrólise da amilopectina a glicose (CHAPLIN; BUCKE, 1990).

As α -amilases rompem as ligações no interior do substrato (endoamilase), as β -amilases hidrolisam as unidades da extremidade não-redutoras do substrato (exoamilase) e as glucoamilases separam as unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (KULP, 1975).

Particularmente, a α -amilase é uma endoenzima que degrada internamente tanto moléculas de amilose como de amilopectina, produzindo oligossacarídeos. Ela atua somente nas ligações α -(1→4), não atacando as ligações α -(1→6) (BeMILLER; WHISTLER, 1996). A ação da α -amilase ocorre em duas etapas. A primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando em maltose e maltotriose, enquanto que a segunda, bem mais lenta, permite a formação de glicose e maltose. A hidrólise da amilopectina pela α -amilase produz oligossacarídeos contendo ligações α -(1→6), além de glicose e maltose.

A descoberta de enzimas que hidrolisam especificamente as ligações glicosídicas α -(1→6), associado a métodos cromatográficos de separação dos



produtos da hidrólise têm propiciado grande avanço na exploração da organização das cadeias da amilopectina.

Informações detalhadas sobre o modo de ação das amilases são ainda incompletas, principalmente em função da variedade de fontes de α -amilase existentes e da estrutura complexa dos grânulos de amido. Em geral, amidos de cereais são menos resistentes à degradação enzimática do que os amidos de não cereais (OATES; ZHANG, 1997). Dentre estes últimos, o amido de mandioca tem uma suscetibilidade enzimática relativamente mais alta que a de outros amidos (OATES; ZHANG, 1997), enquanto o amido de batata mostra maior resistência ao ataque enzimático.

Amidos que naturalmente apresentam superfície porosa, como o de milho, são degradados com maior facilidade que aqueles cuja superfície é lisa como, por exemplo, o de mandioca e grânulos de menor diâmetro são mais suscetíveis às enzimas que aqueles de maior diâmetro (FRANCO; CIACCO; TAVARES, 1988, 1998; FRANCO; CIACCO, 1992).

Os grânulos polimórficos com padrão de cristalização tipo A, mais densamente empacotados, são geralmente mais rapidamente hidrolisados que aqueles menos densamente empacotados, de padrão tipo B (GALLANT; BOUCHET 1986 apud OATES, 1997).

A reação enzimática do amido granular ocorre em vários estágios: difusão da superfície sólida, adsorção e catálise final. O segundo estágio, adsorção, é um pré-requisito para a atividade catalítica subsequente, e requer que a enzima ultrapasse uma fronteira entre as fases aquosas e sólidas, a fim de atacar o grânulo. A



porosidade e acessibilidade da superfície do substrato essencialmente controlam o número de locais de adsorção nos grânulos nativos (OATES, 1997).

3.2. Transformações Hidrotérmicas do Amido

As reações hidrotérmicas tratam das relações dos grânulos de amido com a água e as variações de temperatura na faixa de 30 a 200°C, provocando profundas alterações estruturais e evidenciando muitas propriedades funcionais de interesse industrial (FRANCO et al., 2001). As transformações hidrotérmicas são caracterizadas pela transição vítrea, gelatinização e retrogradação.

3.2.1. Transição Vítrea

Uma propriedade importante de materiais parcialmente cristalinos, como os grânulos de amido, é a transição vítrea das regiões amorfas (JACOBS, 1998). Apesar da transição vítrea ser um tópico de estudo comparativamente recente nas ciências físicas e mais ainda na ciência de alimentos, é um fenômeno amplamente observado nos sistemas naturais (BLANSHARD, 1995).

A temperatura de transição vítrea (T_g) é um parâmetro muito importante que afeta as propriedades físicas dos polímeros. O termo descreve a temperatura que induz a transição de um sistema polimérico amorfo vítreo para um estado progressivamente mais gomoso (borrachoso), quando aquecido (TESTER; DEBON, 2000).

A temperaturas abaixo da T_g , a mobilidade das moléculas nos domínios amorfos e cristalinos é restrita. Quando a T_g é ultrapassada durante o aquecimento,



as regiões amorfas são transformadas de um estado rígido vítreo para um estado móvel gomoso. Isto significa que a mobilidade aumenta a temperaturas acima da T_g . O “amaciamento” das regiões amorfas é requerido antes que aconteça a fusão dos cristais (SLADE; LEVINE, 1987 apud JACOBS, 1998). Assim, a transição vítrea sempre precede a gelatinização.

A temperatura de transição vítrea (T_g) é sensível em relação à quantidade de água, diminuindo com o seu aumento, sendo que a água é um efetivo plastificante de polímeros sintéticos e biopolímeros, como o amido (JACOBS, 1998).

A maioria dos polímeros semicristalinos passa por uma transição vítrea. Contudo, na maioria das vezes, uma grande diferença existe entre a T_g e a temperatura de fusão (gelatinização), para qualquer polímero (YOST; HOSENEY, 1986).

No caso do amido, a T_g está muito próxima da temperatura de gelatinização e é de difícil verificação. Como para a temperatura de gelatinização, a temperatura de transição vítrea do amido nativo aumenta exponencialmente quando a umidade diminui abaixo de 25% p/p, sendo de 200°C para um amido seco (BILIADERIS, 1986 apud FRANCO et al, 2001).

3.2.2. Gelatinização

Durante o aquecimento do amido em excesso de água, as pontes de hidrogênio mais fracas nas regiões amorfas do grânulo são rompidas e este absorve água resultando em seu entumescimento. As áreas mais ordenadas permanecem intactas mantendo a estrutura do grânulo. A birrefringência é perdida e o grânulo



continua inchando e absorvendo água, com conseqüente aumento da viscosidade. As moléculas de amilose são solubilizadas e passam para a solução. Se nesta etapa houver aplicação de atrito, os grânulos se rompem e uma pasta é formada. Este fenômeno é chamado de gelatinização e, de acordo com Atwell et al. (1988), é definida como o colapso da ordem molecular dentro do grânulo de amido, manifestada através de mudanças irreversíveis em propriedades como inchaço granular, fusão de cristais, perda da birrefringência e solubilização do amido. O ponto inicial da gelatinização e a faixa na qual ela ocorre é governada pela concentração de amido, método de observação, tipo do grânulo, e heterogeneidades dentro do grânulo sobre observação (THOMAS; ATWELL, 1999).

A energia requerida para a ruptura da ordem molecular difere entre os grânulos e, então, a gelatinização ocorre em uma faixa de temperatura, com grânulos maiores gelatinizando primeiro e os menores, depois. O inchamento do grânulo durante a gelatinização age para desestabilizar os cristais de amilopectina dentro da lamela cristalina, os quais são rompidos separadamente (cristais menores são destruídos primeiro). Este processo ocorre rapidamente para um cristal individual, mas sob uma faixa ampla de temperatura para o grânulo como um todo (JENKINS, 1994 apud HOOVER, 2001). A faixa de temperatura de gelatinização do amido é uma característica do genótipo da planta na qual o amido é sintetizado e é afetada pelas condições do meio, especialmente a temperatura durante o desenvolvimento do grânulo (ELLIS et al., 1998).

As alterações que ocorrem no grânulo de amido durante o tratamento térmico em água podem ser observadas na Figura 6 (JACOBS, 1998).



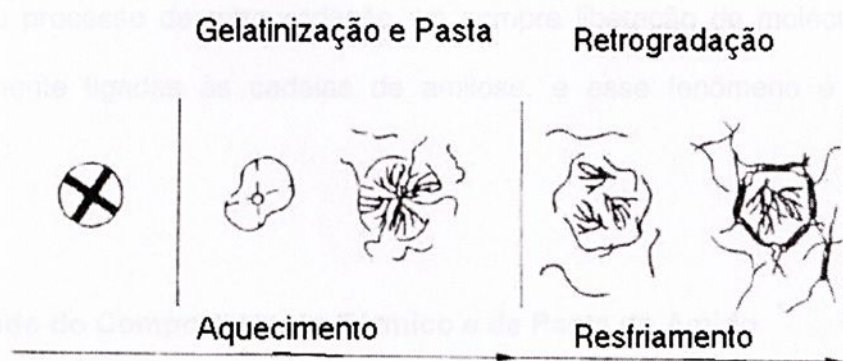


Figura 6-Representação esquemática das mudanças que ocorrem em uma mistura de amido e água durante o aquecimento e resfriamento

Fonte: JACOBS, 1998.

3.2.3. Retrogradação

A retrogradação é o processo que ocorre quando moléculas de amido gelatinizadas começam a se reassociar através de pontes de hidrogênio, formando partículas de maior tamanho e favorecendo uma estrutura mais ordenada (FRANCO et al., 2001).

Nas fases iniciais da retrogradação, duas ou mais cadeias de amido podem formar um ponto de junção simples, que depois pode se desenvolver em regiões mais extensivamente ordenadas. Sob condições favoráveis, esta estrutura ordenada pode se desenvolver em forma cristalina (ATWEEL et al., 1988). As interações moleculares (pontes de hidrogênio entre cadeias de amido) que ocorrem durante a retrogradação são dependentes do tempo e temperatura. Durante a retrogradação, a firmeza inicial do gel se deve à formação de uma matriz de amilose e o subsequente aumento moderado desta firmeza se deve à reversível cristalização da amilopectina (MILES et al, 1985; RING et al., 1987).

No processo de retrogradação, há sempre liberação de moléculas de água anteriormente ligadas às cadeias de amilose, e esse fenômeno é denominado sinérese.

3.3. Estudo do Comportamento Térmico e de Pasta do Amido

Nos últimos vinte anos, as transformações térmicas do amido durante o aquecimento e resfriamento em presença de água, incluindo temperaturas de gelatinização, retrogradação, temperatura de transição vítrea e cristalização, foram muito estudadas utilizando-se Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) (YU; CHRISTIE, 2001). Stevens e Elton (1971 apud YU; CHRISTIE, 2001), foram os primeiros a apresentarem as aplicações da DSC para medidas de temperaturas de gelatinização e retrogradação do amido.

Quando aplicado ao amido, a calorimetria diferencial de varredura fornece medidas quantitativas do fluxo de calor associado a gelatinização, medindo a quebra das ligações (principalmente pontes de hidrogênio que estabilizam as duplas hélices) dentro dos grânulos de amido quando os mesmos são aquecidos em água. A temperatura e energia envolvida (entalpia) na transição de um grânulo semicristalino para um gel amorfo são quantificadas. Esta técnica também pode ser empregada para medir maiores transições de temperaturas em amidos quando complexos amilose-lipídio se dissociam (TESTER, 1997).

A avaliação da gelatinização do amido em água a partir da calorimetria diferencial de varredura resulta em um sinal endotérmico, que é o resultado de vários eventos endotérmicos (poder de inchamento, fusão dos cristais) e eventos



exotérmicos (hidratação do amido, formação de complexos amilose-lipídio) que podem ocorrer durante a gelatinização do amido (JACOBS, 1998).

Cada amido possui suas temperaturas características de gelatinização, T_o , T_p e T_f (temperaturas inicial, de pico e final, respectivamente) e sua entalpia de gelatinização (ΔH) obtidas da DSC (TESTER, 1997). O intervalo de temperatura $T_f - T_o$ representa o período de gelatinização. Depois de atingida a temperatura final (T_f), toda dupla hélice é dissociada, embora a expansão da estrutura granular possa ser conservada até que temperaturas mais altas sejam atingidas sob cisalhamento. As temperaturas de gelatinização inicial e de pico podem ser usadas como medida da estabilidade ou perfeição das regiões cristalinas, e a largura do pico endotérmico como estimativa da heterogeneidade da estrutura cristalina (BLENNOW et al., 2000).

Para a detecção das fases de transição nos amidos, os métodos de DSC têm a vantagem de serem independentes da birrefringência dos grânulos. Esta é uma importante consideração quando a birrefringência se deve à orientação molecular nas regiões amorfas, ou está ausente devido aos cristais serem pequenos ou orientados ao acaso. As mudanças de entalpia observadas através da DSC geralmente são relacionadas à transição do tipo ordem/desordem dos cristais presentes em extensos arranjos ordenados internos e em regiões de menor ordem cristalina do grânulo (BLENNOW et al., 2000).

As mudanças que ocorrem nos grânulos de amido durante a gelatinização e retrogradação são os principais determinantes do comportamento de pasta desses amidos. Essas transições de pasta têm sido medidas principalmente pelas mudanças de viscosidade durante o aquecimento e resfriamento de dispersões de amido usando equipamentos como o Viscoamílografo Brabender e mais



recentemente, o Rápido Visco Analisador (RVA). Este último está se tornando mais popular para a análise das propriedades de pasta dos amidos em função das menores quantidades de amostra utilizada, além do curto tempo de análise (25-30 minutos em relação a 45-90 minutos do viscoamilógrafo) (THOMAS; ATWELL, 1999), durabilidade e facilidade de operação do equipamento e versatilidade dos procedimentos de testes.

Medidas numa curva típica de RVA incluem pico de viscosidade, tempo para atingir este pico, *breakdown* e viscosidade final, conforme ilustrado na Figura 7 (THOMAS; ATWELL, 1999).

No RVA, durante a fase inicial de aquecimento, um aumento na viscosidade é registrado quando os grânulos começam a inchar. Neste ponto, polímeros com baixo peso molecular, particularmente moléculas de amilose, começam a ser lixiviadas dos grânulos. Um pico de viscosidade é obtido durante o empastamento, quando existe a maioria dos grânulos totalmente inchados, grânulos intactos e o alinhamento molecular de qualquer polímero solubilizado ainda não ocorreu dentro do campo de atrito do instrumento (TSAI; LI; LII, 1997; WHISTLER; BeMILLER, 1997).



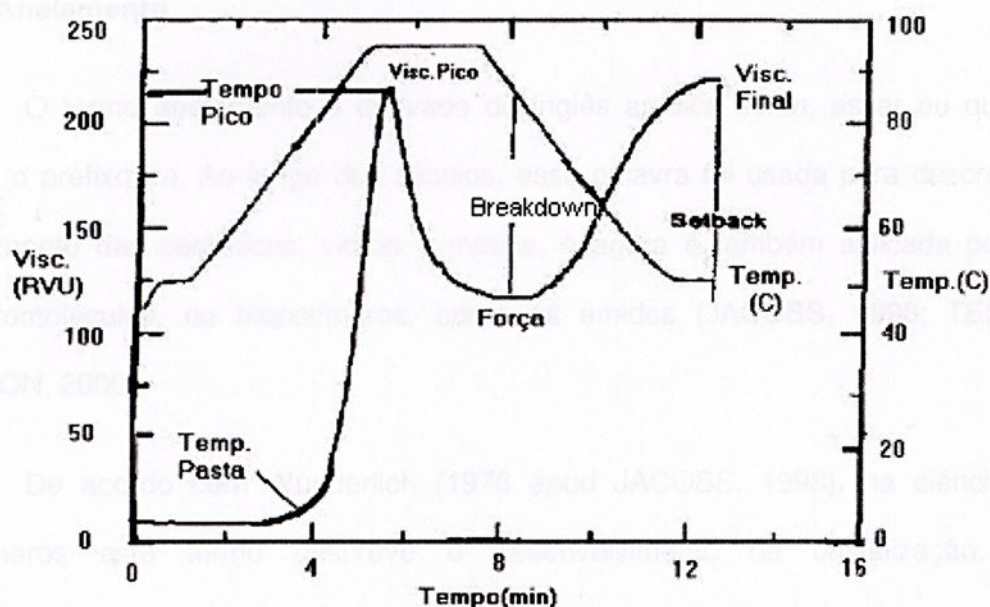


Figura 7-Curva de empastamento típica de RVA apresentando os parâmetros comumente medidos e viscosidade em unidade RVU.

Fonte: THOMAS; ATWELL, 1999.

Durante a fase de temperatura constante (95°C), os grânulos começam a quebrar, a solubilização dos polímeros continua e o alinhamento molecular ocorre dentro do campo de atrito do instrumento. Neste ponto é registrada uma queda na viscosidade. Durante a fase de resfriamento, polímeros de amilose e amilopectina solubilizados começam a se reassociar e um outro aumento de viscosidade é traçado. Este segundo aumento de viscosidade é usualmente conhecido como *set-back* ou tendência a retrogradação.

Dependendo do tipo de amido (fonte botânica, amido natural ou modificado), do nível de sólidos, do pH da suspensão aquosa e do regime de aquecimento, vários perfis de gelatinização e empastamento podem ser gerados (WHISTLER; BeMILLER, 1997).

3.4. Anelamento

O termo *anelamento* é derivado do inglês arcaico *aelan*, assar ou queimar mais o prefixo *an*. Ao longo dos séculos, essa palavra foi usada para descrever o tratamento das cerâmicas, vidros e metais, e agora é também aplicada para as macromoléculas, ou biopolímeros, como os amidos (JACOBS, 1998; TESTER; DEBON, 2000).

De acordo com Wunderlich (1976 apud JACOBS, 1998), na ciência dos polímeros este termo descreve o desenvolvimento da cristalização, pelo aquecimento a temperaturas abaixo do ponto de fusão, o que pode promover o crescimento das áreas cristalinas, perfeição dos cristais, e mudança para estruturas de cristais mais estáveis e melhoria na organização estrutural dos grânulos.

Sabe-se que o aquecimento restrito dos grânulos de amido resulta no fenômeno do *anelamento*, no qual o arranjo das macromoléculas passa por sutis mudanças resultantes de rearranjos das ligações de hidrogênio, que são quebradas e recompostas com os componentes dos grânulos, os quais alcançam um estado de formação de cristal mais ordenado (WANG; POWELL; OATES, 1997). Assim, esse processo representa a reorganização física dos grânulos de amido (TESTER; DEBON, 2000).

O *anelamento* é definido como um tratamento físico que envolve a incubação dos grânulos de amido em excesso de água ou a um conteúdo intermediário de água, isto é, acima de 40% p/v, durante um certo período de tempo, a uma temperatura acima da temperatura de transição vítrea, mas abaixo da temperatura de gelatinização. Este tratamento hidrotérmico altera as propriedades físico-químicas



do amido, sem destruir a estrutura do grânulo e pode somente acontecer quando polímeros de amido na fase amorfa estão no estado gomoso (JACOBS, 1998).

De acordo com a literatura, possíveis explicações para os fenômenos resultantes do processo de anelamento estão associadas ao crescimento ou a perfeição dos cristais de amilopectina (TESTER; MORRISON, 1990a), a fusão parcial dos cristais, seguida de um realinhamento das cadeias poliméricas (MARCHANT; BLANSHARD, 1980), ao desenvolvimento de cristalinidade nas áreas amorfas do grânulo (KRUEGER et al., 1987a), a interações entre amilose e amilopectina (KNUTSON, 1990) ou a alterações das forças de ligação entre cristais e a matriz amorfa (STUTE, 1992).

Apesar da estrutura do grânulo ser alterada durante o anelamento, estudos com difração de raios-X de amidos de trigo e batata submetidos a este tratamento são muito semelhantes aos de seus amidos naturais (STUTE, 1992; GOUGH; PYBUS, 1971). Isso significa que nem o tipo dos cristais (A, B, ou C) nem a cristalinidade dos grânulos mudam com o anelamento. Segundo Jacobs et al. (1998b), o empacotamento das duplas hélices, que permitem a formação das regiões cristalinas nos grânulos, não devem ser alteradas ou devem sofrer alterações muito sutis que não são detectadas por difração de raios-X.

Stute (1992) e Hoover e Vasanthan (1994) relatam que o anelamento não causa efeito na dimensão ou forma dos grânulos. Também, nenhuma quebra de carboidratos foi detectada durante o tratamento (KRUEGER et al., 1987a; KNUTSON, 1990; HOOVER; VASANTHAN, 1994).

Por outro lado, o anelamento afeta profundamente as propriedades funcionais dos amidos tais como suas propriedades térmicas e de pasta. O efeito do



anelamento sobre as propriedades térmicas do amido estudado a partir da DSC tem mostrado que os cristais se tornam mais perfeitos, as temperaturas iniciais de gelatinização e de pico são aumentadas, enquanto a faixa de temperatura de gelatinização diminui, bem como a mudança de entalpia (JACOBS et al., 1998b; TESTER; DEBON; SOMMERVILLE, 2000; YOST; HOSENEY, 1986; KISELEVA et al., 2004).

O aumento na temperatura de gelatinização está associado com uma diminuição no poder de inchamento (TESTER; DEBON; KARAKALAS, 1998), contando que alguma estrutura granular é conservada. De acordo com Jacobs e Delcour (1998), o poder de inchamento e o lixiviamento da amilose diminuíram após o anelamento de amido de trigo. Já o efeito do anelamento sobre as propriedades de pasta dos amidos ainda não está bem esclarecido. Alguns autores observaram redução da viscosidade a quente, enquanto outros observaram um aumento, estando possivelmente essas diferenças relacionadas com as características estruturais dos amidos e em última análise à fonte botânica dos mesmos. É difícil desvendar os efeitos nas características de pasta, pois este sistema é fortemente influenciado pelo tamanho do grânulo e solubilização dos polissacarídeos, mais até que a gelatinização e determinação do poder de inchamento.

De acordo com Stute (1992) durante o anelamento a interação entre os cristais e as partes amorfas das moléculas de amido são alteradas influenciando a temperatura de gelatinização dos mesmos. Evans e Haisman (1982), propõem que em nível granular, o anelamento pode estabilizar os cristais menos estáveis dos grânulos e assim, afetar o comportamento da gelatinização determinada por DSC. Zobel (1992 apud PEREZ; HAROS; SUAREZ, 2001) afirma que o anelamento pode provocar fusão parcial de alguns cristais e realinhamento das cadeias de amido em



regiões amorfas, favorecendo ascensão para os cristais mais ordenados com pontos de fusão mais altos.

Interpretações diferenciadas têm sido dadas por diferentes autores com respeito ao aumento da entalpia de amidos anelados.

Segundo MUHRBECK e SVENSSON (1996), geralmente, uma modificação na temperatura de gelatinização deve ser considerada como um fenômeno qualitativo que está relacionado aos rearranjos das duplas hélices em direção a uma maior perfeição, enquanto que o aumento da entalpia é um efeito quantitativo, devido ao aumento na quantidade de material cristalino.

Hoover e Vasanthan (1994), Muhrbeck e Svensson (1996), Tester e Morrison (1990b) sugerem que valores maiores de entalpia de gelatinização são explicados pelo aumento do número de duplas hélices e/ou suas estabilizações de ligações de hidrogênio, produzindo cristais mais perfeitos. De acordo com Cooke e Gidley (1992), o ΔH reflete principalmente a perda da ordem molecular de duplas hélices, em vez da perda de cristalinidade. Assim, isto significa que o aumento da entalpia depois do anelamento deve ser devido às interações moleculares fortes, em vez da maior cristalinidade. A diferença no ΔH entre os amidos naturais e anelados sugere que a quantidade de duplas hélices que desembaraçam e fundem durante a gelatinização é maior em amidos anelados do que em amidos naturais evidenciado pelo maior ΔH dos amidos anelados.

Por outro lado, de acordo com Jacobs (1998), é difícil interpretar o aumento da entalpia depois do anelamento. Diferentes processos ocorrem durante a gelatinização (isto é, hidratação, inchamento, fusão dos cristais), e todos eles contribuem para diferentes proporções na entalpia de gelatinização. Tanto Donovan



(1979 apud YOST; HOSENEY, 1986) e Evans e Haisman (1982) também sugeriram que a entalpia de gelatinização é resultado de processos térmicos múltiplos ocorrendo ao mesmo tempo. Essencialmente, a endoterma de gelatinização representa a diferença entre a energia endotérmica associada com a transição (fusão dos cristais, inchamento dos grânulos, desnaturação) e a energia exotérmica associada com a transição (hidratação das moléculas de amido, formação de complexos amilose-lipídio) (KUGIMIYA; DONOVAN; WONG, 1980 apud YOST; HOSENEY, 1986).

Segundo Jacobs (1998), a formação de duplas hélices durante o anelamento pode ser o resultado de interações entre: (a) as ramificações mais externas dos *clusters* das cadeias de amilopectina adjacentes, (b) a amilose e as ramificações mais externas da amilopectina e (c) as cadeias de amilose. De acordo com este autor o lento aumento no (ΔH) durante o tempo de anelamento seria influenciado principalmente pelas interações entre as ramificações mais externas dos *clusters* das cadeias de amilopectina adjacentes, enquanto o rápido aumento na T_o durante o tempo de anelamento seria influenciado pelas interações entre a amilose e as cadeias mais externas da amilopectina e pelas cadeias de amilose.

Para o amido anelado de batata, Hoover e Vasanthan (1994), Kuge e Kitamura (1985 apud JACOBS, 1998) e Svensson (1996 apud JACOBS, 1998), encontraram um aumento no ΔH , enquanto nenhuma mudança foi observada por Stute (1992) para este amido.

Deffenbaugh e Walker (1989) detectaram diferenças nas propriedades de pasta obtidas pelo RVA entre amidos de trigo e milho anelados e naturais. Wiegel (1933 apud JACOBS, 1998), relatou uma diminuição da viscosidade, a temperaturas



entre 70 e 95°C, de uma suspensão de amido de batata depois de um tratamento preliminar de uma suspensão de amido a 52°C por 1 a 2 horas.

Hjermstad (1971 apud JACOBS, 1998) também encontrou uma diminuição da viscosidade durante o aquecimento de amido de batata anelado, junto com um aumento na temperatura de pasta (T_0), um aumento na estabilidade de cozimento, e um aumento na tendência de formar gel no resfriamento. A partir do aparelho Viscoamilógrafo, Kuge e Kitamura (1985 apud JACOBS, 1998) e Stute (1992) observaram os mesmos resultados de Hjermstad (1971 apud JACOBS, 1998).

Krueger et al. (1987b) e Knutson (1990) ao estudar o anelamento de amidos de milho com diferentes conteúdos de amilose relataram que as mudanças maiores nas propriedades térmicas obtidas a partir de DSC foram observadas para amidos com o mais alto conteúdo de amilose. Ao estudar os efeitos do anelamento do amido de batata com graus variáveis de fosforilação, o maior aumento da temperatura de gelatinização foi observado naquelas amostras com o menor grau de fosforilação, enquanto que o aumento maior na entalpia de gelatinização foi observado para amidos altamente fosforilados (SVENSSON, 1996 apud JACOBS, 1998; MUHRBECK; SVENSSON, 1996). Esses estudos demonstraram que o anelamento pode ser um caminho conveniente para um controle melhor das propriedades de gelatinização dos amidos de batata fosforilados.

O anelamento pode ser realizado sem intenção, como no caso da moagem úmida de milho usada para extrair o amido. De acordo com Perez, Haros e Suarez (2001), durante o processo de moagem úmida ocorre o anelamento do amido. Quando sementes de milho foram maceradas em solução de SO_2 por vários intervalos de tempo, as propriedades térmicas dos amidos isolados foram



modificadas, ocorrendo um aumento na temperatura de pico, um estreitamento da faixa de gelatinização e aumento na entalpia da gelatinização.

Shandera e Jackson (1996) também observaram a ocorrência de anelamento durante o processo de moagem úmida do milho. Eles observaram que temperaturas mais elevadas de maceração (~57°C), provocou anelamento parcial dos grânulos de amido dentro das sementes úmidas. A endoterma do amido de milho obtido a partir de uma maceração realizada a 57°C foi mais estreita em relação àquela correspondente ao amido de milho obtido a partir de uma maceração realizada a 43°C.

Algum grau de anelamento foi observado por Lorenz e Kulp (1978), durante o isolamento do amido de trigo natural. Os autores observaram que quando o tempo de maceração das sementes de trigo foi aumentado de 24 horas para 70 horas, o intervalo de gelatinização do amido diminuiu, caracterizando a ocorrência do anelamento.

3.5 Anelamento x Hidrólise enzimática

Informações sobre a relação entre anelamento e hidrólise do amido são relativamente escassas. De acordo com Wang, Powell e Oates (1997) a suscetibilidade dos grânulos de amido de sagu ao ataque enzimático foi modificada por um pré-aquecimento dos grânulos em uma solução aquosa de baixo pH (3,5) por duas horas. Neste caso, os grânulos foram mais sensíveis à hidrólise do que em materiais sem tratamento e o modelo do ataque enzimático foi também dependente das condições de tratamento inicial dos amidos. Amidos de sagu anelados e submetidos à hidrólise com α -amilase e glucoamilase mostraram, através de



análises de DSC, uma relação entre a extensão do anelamento e a hidrólise dos grânulos de amido. O padrão de degradação do grânulo se alterou passando da erosão na superfície até escavações preferenciais nas regiões internas dos grânulos.

Outros estudos indicaram que amidos de trigo, cevada e aveia anelados eram mais facilmente hidrolisados pela α -amilase do que os amidos nativos (GOUGH; PYBUS, 1971; HOOVER; VASANTHAN, 1994). De acordo com Lorenz e Kulp (1980), o anelamento aumentou a suscetibilidade do amido de trigo à degradação com α -amilase fúngica.

Hoover e Vasanthan (1994) também relataram um leve decréscimo no grau de solubilização do amido de trigo, e também dos amidos de lentilha e batata, depois de 72 horas de tratamento hidrolítico com α -amilase pancreática suína, fato que foi atribuído ao aumento das interações entre os componentes do amido durante o anelamento.

A taxa de hidrólise pela α -amilase para diferentes amidos segue duas distintas fases: uma inicial mais rápida e uma subsequente mais lenta. De acordo com Jacobs et al. (1998a), o anelamento alterou a extensão da hidrólise dessas diferentes fases em função da origem botânica do amido. Durante a segunda fase da hidrólise, amidos de trigo e ervilha anelados foram mais resistentes à hidrólise da α -amilase, enquanto o inverso ocorreu para o amido de batata.

Jacobs et al. (1998a) observaram que as propriedades térmicas dos amidos anelados e naturais de amido de batata não foram alteradas pela ação da enzima pancreática. Já para o estudo do amido de trigo, estes autores observaram a partir



de microscopia eletrônica de varredura, que a ação enzimática sobre os grânulos de amido não foi uniforme. Nos grânulos remanescentes, algumas cavidades grandes ou pequenas foram observadas. O mesmo fenômeno foi observado por Colonna, Buléon, Lemarie (1988 apud JACOBS, 1998) para a degradação enzimática pela α -amilase bacteriana do amido de trigo.

O impacto do anelamento na suscetibilidade à hidrólise enzimática depende da origem botânica e/ou do tipo do cristal do amido (JACOBS, 1998). As diferenças observadas entre as hidrólises dos amidos anelados e naturais sugeriram modificações moleculares dentro do grânulo que ocorreram durante o anelamento (JACOBS, 1998), as quais podem ser baseadas em modificações da cristalinidade e da fração amorfa, e ainda, em alterações das interações (forças de ligação) entre os cristais e as regiões amorfas, como por exemplo, a reorientação dos cristais dentro da matriz amorfa (JACOBS; DELCOUR, 1998).

Embora a origem botânica do amido seja importante com respeito ao padrão hidrolítico, a área superficial em proporção ao volume é provavelmente de mais significância que a real fonte da planta (TESTER; DEBON, 2000). É também possível que o processo de anelamento crie poros ou fissuras que alteram o padrão da hidrólise da superfície do grânulo para a erosão interna (WANG; POWELL; OATES, 1997). Conseqüentemente, embora as lamelas amorfas e cristalinas se tornem mais ordenadas, o acesso para as regiões amorfas é facilitado pelas enzimas (TESTER; DEBON, 2000).



4.MATERIAIS e MÉTODOS

4.1.Materiais

Neste trabalho, raízes frescas de mandioca obtidas na região de São José do Rio Preto foram utilizadas. A enzima α -amilase bacteriana A6380 (Sigma) com atividade 2150 unidades/mg sólidos foi utilizada nos experimentos de hidrólise. Todos os reagentes utilizados eram puros para análise e utilizados sem qualquer modificação.

4.2.Métodos

4.2.1.Extração do Amido

As raízes de mandioca foram lavadas, descascadas e cortadas em pequenos pedaços. Os mesmos foram mantidos em água destilada, à temperatura de 8-10°C, para evitar escurecimento. Em seguida, os pedaços foram triturados em liquidificador industrial com água destilada a 5°C (sendo 1 parte de raiz e 2 partes de água), por aproximadamente 3 minutos. A massa de amido obtida pela trituração foi passada através de peneiras com aberturas de 0,177 mm, 0,149 mm e 0,074 mm, para separação das fibras. O leite de amido obtido foi colocado em câmara fria a $\pm 5^\circ\text{C}$, para evitar a ação enzimática ou fermentativa por aproximadamente 24 horas, para decantação do amido. Após decantação, o sobrenadante foi descartado por sifonação e o amido recuperado e seco em estufa com circulação de ar a 40°C, por 24 horas. Após secagem, o amido foi triturado em almofariz para posterior utilização.



4.2.2. Anelamento

As amostras de amido 30g (b.s.), em triplicata, foram aneladas em excesso de água (50% p/v) por 48 horas, a 50, 55 e 60°C, segundo procedimento de Jacobs et al. (1998a), com modificações. As temperaturas de anelamento foram escolhidas em função da temperatura de gelatinização do amido de mandioca. Gotas de tolueno foram adicionadas como agente bacteriostático. As amostras foram incubadas nas diferentes temperaturas em shaker com agitação orbital de 200 rpm. Após o período de anelamento, as amostras foram recuperadas por centrifugação, lavadas com água destilada e etanol e secas em estufa com circulação forçada de ar a 40°C, por 24 horas.

4.2.3. Teor de Umidade

O teor de umidade dos amidos natural e anelados foi determinado em duplicata, segundo o método nº. 44 – 15 A da American Association of Cereal Chemists (A.A.C.C., 2000).

4.2.4. Propriedades de Pasta

As propriedades de pasta dos amidos natural e anelados foram determinadas usando-se um Rápido Visco Analisador RVA-4 (Newport Scientific, Austrália) seguindo o procedimento descrito por Franco et al. (2002). Suspensões de amido (9% p/p; 28 g de peso total) foram misturadas em container de alumínio, equilibradas a 30°C por 1 minuto, aquecidas a 95°C numa razão de 6°C/min, mantidas a 95°C por 5,5 minutos e resfriadas a 50°C numa razão de 6°C/min. As suspensões foram agitadas a 160 rpm durante todo o experimento.



Os resultados foram processados e analisados com auxílio do programa *Thermoclines for Windows*, versão 2.2, de acordo com as informações contidas no manual de instruções (NEWPORT SCIENTIFIC, 1998), e usando-se o perfil de temperatura STD 2 (*Standard Analysis 2*). A partir dos amilogramas obtidos do RVA, foram determinados os parâmetros: temperatura de pasta ($^{\circ}\text{C}$), viscosidade máxima, *set back*, *breakdown*, viscosidade final e tempo (minutos) para se atingir o pico de viscosidade máxima. As análises foram realizadas em duplicata.

4.2.5. Propriedades Térmicas

As propriedades térmicas dos amidos natural e anelados foram determinadas utilizando-se a técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (*DSC-Differential Scanning Calorimetry*), através de um equipamento Pyris 1- (Perkin Elmer, USA), equipado com um intracooler e um software de análise térmica (PERKIN ELMER, EUA), de acordo com Franco et al. (2002). Amostras de amido (2 mg, b.s.) foram pesadas em cápsulas padrão de alumínio (0219-0062, Perkin Elmer), misturadas com água deionizada (6 μl) e seladas. Antes da análise, as cápsulas seladas foram mantidas à temperatura ambiente por 2 horas para equilíbrio. As amostras foram aquecidas a uma razão de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 25 a 125°C . Uma cápsula vazia foi usada como referência. Após a corrida das amostras, as mesmas foram refrigeradas a 5°C por 15 dias e analisadas novamente nas mesmas condições para determinação das propriedades térmicas dos amidos retrogradados. As análises foram feitas em triplicata. As temperaturas de gelatinização inicial, de pico e final (T_o , T_p e T_f , respectivamente) e a variação de entalpia (ΔH) dos amidos nativos e retrogradados foram determinadas utilizando-se o programa Pyris 1, da Perkin Elmer, USA.



4.2.6. Poder de Inchamento

O poder de inchamento dos amidos natural e anelados foi determinado de acordo com método descrito por Schoch (1964a), com modificações. O procedimento consistiu na pesagem de 0,2 g (b.u.) de amido e adição de 18 g de água destilada em tubo de centrifuga, com agitação para que o amido não se depositasse. O tubo contendo a mistura amido-água foi então submetido a um banho com agitação a 60, 70 ou 80°C por 30 minutos, após o qual foi retirado do banho, seco por fora e pesado. Foi adicionada água destilada suficiente para se completar 20g, considerando o peso inicial de água da amostra. O tubo foi então fechado, invertido várias vezes para uma boa homogeneização e centrifugado a 3200 rpm por 20 min. O material sedimentado foi cuidadosamente pesado e o poder de inchamento determinado segundo a relação abaixo (Equação 1).

$$\text{Poder de Inchamento (PI)} = \frac{\text{peso de material sedimentado}}{\text{peso de amostra (b.s.)}} \quad (1)$$

4.2.7. Hidrólise Enzimática

Amidos natural e anelados nas diferentes temperaturas foram submetidos à hidrólise enzimática com α -amilase bacteriana, seguindo metodologia descrita por Franco e Ciacco (1987).

Os amidos (10 g, b.s.) foram suspensos em 48,5 ml de solução tampão fosfato 0,2M, pH 6,0. 1,0 ml de solução (0,25% p/v) de enzima α -amilase bacteriana Sigma (A6380), com atividade de 2150 unidades*/mg de sólidos declarada no rótulo da mesma, foi adicionada. 0,5 ml de solução de azida de sódio (10% p/v) foi adicionada para evitar crescimento microbiano.



4.2.8. As dispersões de amido foram incubadas em shaker com agitação orbital (120rpm) durante 48 horas a 37°C. A extensão da hidrólise foi determinada pela quantidade de açúcares redutores presentes no sobrenadante. Periodicamente, alíquotas do sobrenadante foram retiradas para quantificação dos açúcares redutores. Após o período de incubação, as suspensões foram retiradas do skaker, acidificadas a pH 3,0 com HCl 0,1N e agitadas durante 15 minutos para inativação das enzimas. Em seguida, foram neutralizadas com NaOH 0,1N e centrifugadas a 4200 rpm por 20 minutos. Os resíduos obtidos, após centrifugação, foram lavados com água destilada, filtrados em funil de Buchner e secos em estufa com circulação de ar a 40°C por 12 horas. Após secagem, os resíduos foram guardados em geladeira, para posterior utilização.

*1 unidade é definida como a quantidade necessária para liberar 1,0 mg de maltose por grama de amido incubado a 20°C durante 3 min a pH 6,9.



4.2.8. Determinação do Teor de Açúcares Redutores

O teor de açúcares redutores produzido durante a hidrólise foi determinado seguindo metodologia descrita por Somogy (1945). Uma curva de glicose foi utilizada como padrão.

4.2.9. Afinidade com Iodo e Teor de Amilose

Os amidos foram preparados para as determinações de afinidade com iodo como segue: 0,5 g de amido (b.s.) foi disperso em 25,0 ml de uma solução de 90% de DMSO, agitado em um banho de água fervendo por 1 hora e, à temperatura ambiente, por outras 24 horas. O amido foi precipitado da solução de DMSO com etanol absoluto e foi coletado por centrifugação, a 4200 rpm por 20 minutos. O amido precipitado foi lavado com etanol, recuperado por filtração e seco em estufa com circulação de ar a 38°C por 24 horas.

Afinidades com iodo dos amidos foram determinadas de acordo com o método reportado por Schoch (1964b) e Kasemsuwan et al. (1995). Um autotituladores potenciométrico modelo Titrino 716 Metrohm foi usado para medir a afinidade com iodo. Teores de amilose aparente foram determinados de acordo com procedimentos descritos por Takeda e Hizukuri (1987) e Kasemsuwan et al. (1995).

4.2.10. Difração de Raio-X

Os padrões de difração de raios-X dos amidos natural, anelados e hidrolisados foram determinados por difractogramas de raios-X (Laboratório de Cristalografia - Instituto de Física de São Carlos - IFSC - USP - Campus de São



Carlos), utilizando-se uma unidade RINT2000 *Wide Angle Goniometer*, com radiação de Cu, linha K, $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$. A velocidade de varredura foi de 1° por minuto e as condições de uso foram 50 Kv e 100 mA.

O índice de Cristalinidade Relativa (IC) foi quantitativamente estimado de acordo com o método proposto por Hermans e Weidinger (1948 apud SEBIO, 2003) e modificado por Rabek (1980 apud SEBIO, 2003). O Índice de Cristalinidade é definido como a razão entre a área da região cristalina (A_c) e a área total coberta pela curva ($A_c + A_a$), composta pela área da região cristalina (A_c) e a área da região amorfa (A_a), a partir da Equação 2.

$$I_c = \frac{A_c}{A_c + A_a} \quad (2)$$

Onde,

Ic: Índice de Cristalinidade Relativa

Ac: Área da região cristalina da curva

Aa: Área da região amorfa da curva

4.2.11. Propriedades Térmicas dos Amidos Hidrolisados

4.2.13. Delineamento Experimental e Análise Estatística dos Resultados

As propriedades térmicas dos amidos hidrolisados foram determinadas segundo o procedimento descrito no item 4.2.5.



4.2.12. Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura

A microscopia óptica dos amidos natural, anelados e hidrolisados foi realizada através de um Microscópio Óptico de Luz Olympos, acoplado a um sistema de análise de imagem "IMAGE-PRÓ-PLUS" (MÉDIA CYBERNETICS) (Laboratório de Microscopia - UNESP - Campus de São José do Rio Preto). Uma pequena quantidade de amostra foi colocada sobre uma lâmina. Adicionou-se sobre a amostra uma gota de solução de glicerol : água (1:1), e uma lamínula foi colocada sobre o material. Para um mesmo campo visualizado foram obtidas imagens sob luz normal e luz polarizada.

A microscopia eletrônica de varredura dos amidos natural, anelados e hidrolisados foi realizada através de um Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo DSM 960 ZEISS - *Digital Scanning Microscope* (Laboratório de Microscopia - Instituto de Física de São Carlos - IFSC - USP - Campus de São Carlos). Uma pequena quantidade de amostra de amido foi colocada sobre uma fita adesiva de carbono, aderida a um disco metálico e conduzida a um Metalizador *Balzers*, modelo SCD 050, para aplicação de uma camada de ouro de 20 nm. As amostras assim preparadas foram observadas no microscópio eletrônico de varredura e imagens com aumentos de 1500 e 3500 X foram obtidas.

4.2.13 Delineamento Experimental e Análise Estatística dos Resultados

O efeito das diferentes temperaturas de anelamento sobre as propriedades funcionais dos amidos foi analisado utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado, que incluiu o controle e as três temperaturas de anelamento, perfazendo-se um total de quatro tratamentos.



5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O processo de anelamento, por 48 horas e em três temperaturas diferentes, resultou em amidos modificados, que apresentaram cor, aparência e consistência similares às do amido natural.

5.1. Propriedades de Pasta

As propriedades de pasta e os perfis viscoamilógraficos dos diferentes amidos estão apresentados na Tabela 1 e Figura 8.

Tabela 1- Propriedades de pasta dos amidos de mandioca natural e anelados.

Amostra	Viscosidade (RVU)				Temp.pasta (°C)	Tempo pico (min)
	Pico	Breakdown	Final	Set back		
Natural	261± 2 ^c	178 ± 1 ^b	165 ± 2 ^b	83 ± 0 ^a	65,2 ± 0,0 ^c	5,83 ± 0,0 ^c
50°C	283± 4 ^a	194 ± 2 ^a	168 ± 3 ^b	78 ± 1 ^b	65,6 ± 0,1 ^c	6,11± 0,0 ^b
55°C	278 ± 11 ^{ab}	179 ± 6 ^b	166 ± 7 ^b	67 ± 3 ^c	67,8 ± 0,3 ^b	6,24 ± 0,0 ^b
60°C	267 ± 4 ^{bc}	161 ± 3 ^c	182 ± 7 ^a	74 ± 2 ^b	69,0 ± 0,2 ^a	7,02 ± 0,1 ^a

Cada valor representa a média de seis replicatas

Viscosidade: Unidade RVU; valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes (P < 0.05).

O perfil de viscosidade obtido a partir do amido de mandioca natural apresentou uma curva típica para este amido, com baixa temperatura de pasta (65,20°C), aumento acentuado de viscosidade até seu pico máximo (261 RVU), seguido de queda rápida da mesma sob agitação. Este comportamento sugeriu a existência de forças associativas fracas mostrando um amido com baixa resistência à agitação mecânica. No ciclo de resfriamento, a pasta apresentou baixa tendência à



retrogradação (83 RVU). Segundo Swinkels (1985a), os baixos teores de amilose de grande peso molecular seriam responsáveis pela baixa tendência à retrogradação do amido de mandioca natural.

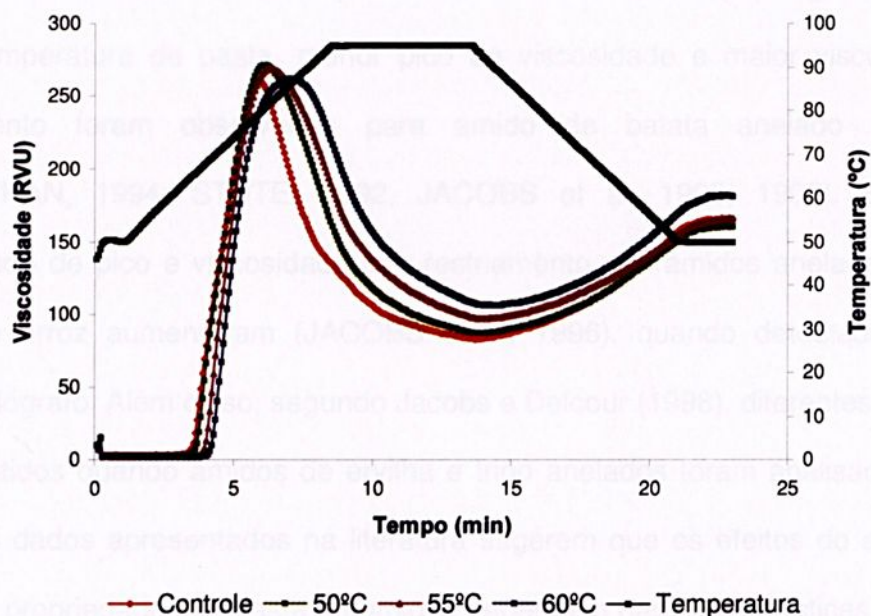


Figura 8- Perfil viscoamilográfico dos amidos de mandioca natural e anelados a diferentes temperaturas.

O teste de Tukey aplicado às médias dos resultados mostrou que o anelamento alterou, de modo significativo, as propriedades de pasta dos amidos. A viscosidade de pico aumentou, principalmente para os amidos tratados a 50 e 55°C. A temperatura de pasta aumentou, sendo maior quanto maior a temperatura de anelamento. Por outro lado, a tendência à retrogradação dos amidos diminuiu com o anelamento, sendo esta diminuição mais pronunciada para o amido anelado a 55°C. O anelamento também provocou aumento no valor *breakdown* para a temperatura de 50°C, enquanto que para a temperatura de 60°C observou-se um decréscimo no



valor desta propriedade, sugerindo um comportamento mais estável para o amido tratado a esta temperatura.

Não foram encontrados na literatura, dados sobre amido de mandioca anelado. No entanto, dados obtidos sobre o efeito do anelamento nas propriedades de pasta de diferentes amidos são bastante controversos. Em alguns trabalhos, maior temperatura de pasta, menor pico de viscosidade e maior viscosidade no resfriamento foram observados para amido de batata anelado (HOOVER; VASANTHAN, 1994; STUTE, 1992, JACOBS et al. 1995, 1996). Em outros, viscosidade de pico e viscosidade sob resfriamento dos amidos anelados de trigo, ervilha e arroz aumentaram (JACOBS et al. 1996), quando detectados em um viscoamilógrafo. Além disso, segundo Jacobs e Delcour (1998), diferentes resultados foram obtidos quando amidos de ervilha e trigo anelados foram analisados em um RVA. Os dados apresentados na literatura sugerem que os efeitos do anelamento sobre as propriedades de pasta de amidos dependem das características estruturais de cada um e, em última análise, da fonte botânica dos mesmos, além de depender, também, do instrumento de medida. Segundo Jacobs e Delcour (1998), amidos anelados são menos sensíveis à taxa de aquecimento e tempo de cisalhamento do que os amidos naturais.

De acordo com Tester e Debon (2000), a falta de consistência nos resultados obtidos das propriedades de pasta de amidos anelados, por diferentes autores, se deve, principalmente, ao fato de que as propriedades de pasta são fortemente influenciadas pelo tamanho dos grânulos e pela solubilização dos polissacarídeos, mais do que seriam as determinações das propriedades térmicas de gelatinização (determinadas por DSC) e poder de inchamento.



5.2. Propriedades Térmicas

As propriedades térmicas de gelatinização dos amidos natural e submetidos ao anelamento estão apresentadas na Tabela 2.

Pela observação dos termogramas obtidos da DSC (dados não mostrados), somente uma endoterma foi detectada para os amidos natural e anelados, semelhante aos resultados encontrados por Cottrelli et al. (1995), em sistemas com água em excesso. De acordo com Maafur et al. (2001), esse fenômeno ocorre porque em excesso de água ocorre uma hidratação e conseqüente inchamento das regiões amorfas no grânulo de amido.

Segundo Krueger et al. (1987) e Yoo e Jane (2002), a falta de uma segunda endoterma na faixa de temperatura de 91-100°C, significa que não há amilose complexada com lipídeos neste amido, já que estes, se existentes, poderiam fundir provocando a formação de uma segunda endoterma naquela faixa de temperatura. Isso era de se esperar uma vez que o amido de mandioca apresenta quantidade muito baixa de lipídeos.

Tabela 2- Características de gelatinização dos amidos de mandioca natural e anelados.

Amostra	T _o (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	Faixa (°C)	ΔH (J/g)
Natural	59,82 ± 0,14 ^d	63,18 ± 0,20 ^c	68,29 ± 0,33 ^b	8,47	6,27 ± 0,70 ^c
50°C	61,67 ± 0,29 ^c	63,78 ± 0,08 ^c	67,20 ± 0,64 ^b	5,53	7,80 ± 0,48 ^b
55°C	64,29 ± 0,45 ^b	66,46 ± 0,47 ^b	70,28 ± 0,51 ^a	5,99	11,49 ± 0,45 ^a
60°C	65,85 ± 0,68 ^a	67,33 ± 0,22 ^a	70,92 ± 0,48 ^a	5,07	12,48 ± 0,69 ^a

(T_o), (T_p), (T_f): Temperaturas inicial, de pico, e final, respectivamente; (ΔH): variação de entalpia; Faixa de temperatura de gelatinização = T_f - T_o. Valores são médias de seis replicatas de cada amostra. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes (P < 0.05)



O amido de mandioca natural apresentou temperaturas de gelatinização inicial, de pico e final de 59,82°C, 63,18°C e 68,29°C, respectivamente, e variação de entalpia (ΔH) de 6,27 J/g.

Os amidos anelados mostraram que a temperatura inicial de gelatinização (T_o), de pico (T_p) e final (T_f) aumentaram com o tratamento, sendo este aumento mais pronunciado quanto maior a temperatura de anelamento. A entalpia de gelatinização também aumentou significativamente quanto maior a temperatura de tratamento, enquanto a faixa de temperatura de gelatinização diminuiu. Esses resultados concordam com a grande maioria dos apresentados na literatura. Várias são as explicações apresentadas por diferentes autores para este fenômeno, entre elas a de que o anelamento provoca um rearranjo das moléculas de amilose e amilopectina aumentando a estabilidade e perfeição dos cristais com a formação de uma estrutura mais ordenada (KISELEVA et al., 2004; TESTER; DEBON; SOMMERVILLE, 2000; JACOBS, 1998), levando a um aumento nas temperaturas e entalpia de gelatinização. Segundo Tester, Debon e Karkalas (1998), se a entalpia de gelatinização aumenta em relação à entalpia do amido natural, significa em um aumento no número de duplas hélices presentes no amido ou um aumento na estabilização das pontes de hidrogênio produzindo cristais mais perfeitos. De acordo com Cooke e Gidley (1992), o ΔH reflete principalmente a perda da ordem molecular de duplas hélices, em vez da perda de cristalinidade. Assim, isto significa que o aumento da entalpia depois do anelamento deve ser devido às interações moleculares fortes, em vez da maior cristalinidade.

O amido anelado a 60°C mostrou um discreto aumento da temperatura inicial de gelatinização (T_o) e de pico (T_p), em relação à amostra tratada a 55°C. Da Tabela



1 também se observou que a viscosidade de pico do amido anelado a 60°C não diferiu significativamente daquele encontrado para o amido natural. Isto pode ter ocorrido em função da temperatura de tratamento praticamente coincidir com a temperatura inicial de gelatinização do amido natural (59,82°C), o que pode sugerir que alguns poucos grânulos desta amostra tenham sido parcialmente gelatinizados durante o tratamento.

A faixa de temperatura de gelatinização ($T_f - T_o$) diminuiu para os amidos anelados. Esses resultados concordam com aqueles reportados por Jacobs et al. (1998b), Tester, Debon e Sommerville (2000) e Lund (1987 apud PEREZ; HAROS; SUAREZ, 2001).

O estreitamento na faixa de temperatura de gelatinização pode ser atribuído a um aumento na homogeneidade dos cristais de amido (ZOBEL, 1992 apud PEREZ; HAROS; SUAREZ, 2001), às alterações das forças de ligação entre a matriz amorfa e os cristais (STUTE, 1992), à perfeição dos cristais do amido (LARSSON; ELIASSON, 1991), à maior orientação cristalina (KRUEGER et al., 1987a), ou à interação entre as cadeias de amilose e amilopectina (KNUTSON, 1990).

As propriedades térmicas dos amidos de mandioca natural e anelados retrogradados estão apresentadas na Tabela 3.



Tabela 3- Propriedades térmicas dos amidos de mandioca natural e anelados retrogradados

Amostra	T_o (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)	Faixa (°C)	ΔH (J/g)
Natural	$43,43 \pm 0,77^b$	$53,92 \pm 0,19^b$	$59,04 \pm 0,36^{ab}$	15,61	$0,84 \pm 0,22^a$
50°C	$43,65 \pm 0,77^b$	$53,00 \pm 0,76^b$	$61,08 \pm 1,24^a$	17,43	$0,77 \pm 0,10^a$
55°C	$48,87 \pm 1,08^a$	$54,09 \pm 0,27^b$	$58,58 \pm 0,59^b$	9,71	$0,42 \pm 0,14^{ab}$
60°C	$50,83 \pm 0,73^a$	$56,05 \pm 0,10^a$	$59,20 \pm 0,15^{ab}$	8,37	$0,21 \pm 0,02^b$

(T_o), (T_p), (T_f): Temperaturas inicial, de pico, e final, respectivamente; (ΔH): variação de entalpia; Faixa de temperatura de gelatinização = $T_f - T_o$. Valores são médias de seis replicatas.

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes ($P < 0.05$)

Para os amidos retrogradados, menores temperaturas e entalpia foram obtidas quando comparadas aos amidos nativos (Tabelas 2 e 3), como foi relatado também por Karim, Norziah e Seow (2000), em que os amidos retrogradados podem apresentar valores de entalpia entre 60-80% menores que as obtidas para os amidos nativos, além das temperaturas de transição endotérmica (T_o , T_p e T_f) associadas à fusão de amidos retrogradados que também ocorrem a temperaturas menores (10-26°C a menos).

Segundo esses autores, a faixa de temperatura de fusão dos cristais para os amidos retrogradados ($T_f - T_o$) é geralmente mais ampla do que aquela dos amidos nativos, como pode ser observado por comparação das Tabelas 2 e 3. Estes autores concluíram que durante o armazenamento a baixas temperaturas (~4°C), as moléculas de amido gelatinizadas reassociam, mas em menor ordenamento e, portanto, com menor perfeição que as moléculas de amido no grânulo de amido nativo. Portanto, menos energia é requerida para fundir os cristais reestruturados, o que foi relatado também por Kim, Weisenborn e Grant (1997) e Sasaki, Yasui e Matsuki (2000).



As temperaturas iniciais de gelatinização (T_0) aumentaram em relação ao amido de origem para os amidos anelados a 55 e 60°C, enquanto a temperatura de pico apenas diferiu para o amido anelado a 60°C. Houve uma grande diminuição da entalpia que foi mais pronunciada para os amidos tratados a maiores temperaturas. Esses valores de entalpia obtidos dos amidos anelados retrogradados foram muito baixos, sugerindo que houve pouquíssima reassociação entre as moléculas de amido após gelatinização. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados para as propriedades de pasta deste trabalho, em que a tendência a retrogradação dos amidos diminuiu com o anelamento.

5.3. Poder de Inchamento

Os grânulos de amido apresentam áreas cristalinas e amorfas, que estão relacionadas com a presença de macromoléculas ramificadas e lineares. As áreas cristalinas mantêm a integridade dos grânulos, permitindo o inchamento, mas não a completa dispersão das macromoléculas. Durante o aquecimento de uma suspensão aquosa de amido, as áreas amorfas absorvem água rapidamente e incham, permanecendo unidas pelas regiões cristalinas. Os grânulos inchados são elásticos, responsáveis pela viscosidade das pastas obtidas. Assim, o gráfico que relaciona poder de inchamento e solubilidade revela informações importantes a respeito da integridade granular (LEACH; McDOWEN; SCHOCH, 1959). Os valores de poder de inchamento, nas temperaturas de 60, 70 e 80°C do amido natural e daqueles submetidos ao anelamento estão apresentados na Tabela 4 e na Figura 9.



Tabela 4- Poder de inchamento a 60, 70, 80°C dos amidos de mandioca natural e anelados.

Amostra	60°C	70°C	80°C
Natural	8,46 ± 0,48 ^b	13,75 ± 0,55 ^a	15,72 ± 0,82 ^b
50°C	10,12 ± 0,14 ^a	13,47 ± 0,64 ^a	15,55 ± 1,30 ^b
55°C	8,72 ± 0,80 ^b	13,89 ± 0,43 ^a	17,73 ± 0,42 ^a
60°C	8,80 ± 0,18 ^b	13,06 ± 0,32 ^a	15,91 ± 0,76 ^b

Valores são médias de quatro replicatas.

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes (P < 0.05)

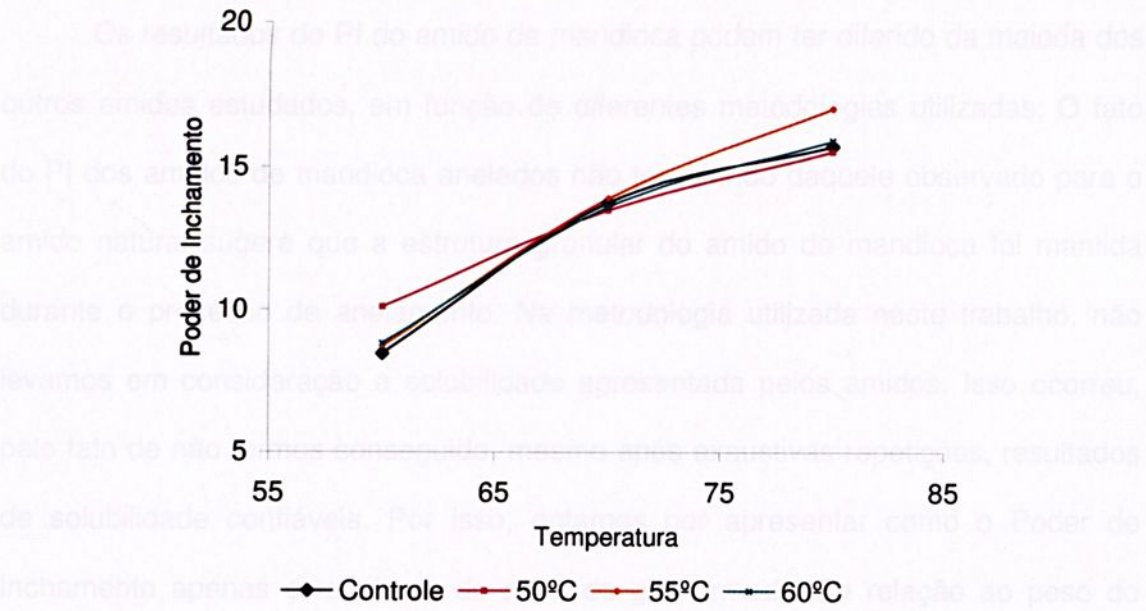


Figura 9 – Poder de Inchamento dos amidos de mandioca natural e anelados

Segundo Tester e Debon (2000), o aumento na temperatura de gelatinização dos amidos anelados está associado à diminuição no seu poder de inchamento, o que reflete que a estrutura granular é retida durante o processo.

Os resultados apresentados na Tabela 4 e na Figura 9 mostraram que, nas diversas temperaturas determinadas, os valores de poder de inchamento dos amidos



de mandioca natural e anelados praticamente permaneceram constantes. Foi relatado que o poder de inchamento diminuiu depois do anelamento de amido de trigo (LORENZ; KULP, 1978; HOOVER; VASANTHAN, 1994), de amido de batata (KUGE; KITAMURA apud JACOBS; DELCOUR, 1998; HOOVER; VASANTHAN, 1994), e de amidos de aveia e lentilha (HOOVER; VASANTHAN, 1994). Também os trabalhos de Adebowale e Lawal (2002) mostraram que o poder de inchamento do amido de *Bambara groundnut*, um tipo de legume africano, diminuiu com o anelamento.

Os resultados do PI do amido de mandioca podem ter diferido da maioria dos outros amidos estudados, em função de diferentes metodologias utilizadas. O fato do PI dos amidos de mandioca anelados não ter diferido daquele observado para o amido natural sugere que a estrutura granular do amido de mandioca foi mantida durante o processo de anelamento. Na metodologia utilizada neste trabalho, não levamos em consideração a solubilidade apresentada pelos amidos. Isso ocorreu, pelo fato de não termos conseguido, mesmo após exaustivas repetições, resultados de solubilidade confiáveis. Por isso, optamos por apresentar como o Poder de Inchamento apenas o resultado do peso do gel formado em relação ao peso do amido. Os cálculos do PI sem levar em consideração a solubilidade do amido, pode ter influenciado os resultados obtidos diferindo dos demais trabalhos analisados.

A redução do poder de inchamento seguido da modificação hidrotérmica de diversos amidos foi atribuída ao rearranjo interno dos grânulos, causando interações entre os grupos funcionais do amido, levando a um aumento da cristalinidade do mesmo (ADEBOWALE; LAWAL, 2002). No entanto, menores valores de PI podem implicar em um melhor ordenamento das moléculas em função de interações mais fortes e não necessariamente em um aumento da cristalinidade do amido.



5.4 Hidrólise Enzimática dos amidos de mandioca natural e submetido ao anelamento nas diferentes temperaturas

A Figura 10 mostra as porcentagens de açúcares redutores em função do tempo, dos amidos natural e anelados a diferentes temperaturas, incubados a 37°C, com α -amilase bacteriana.

A suscetibilidade enzimática à α -amilase bacteriana aumentou com o tratamento hidrotérmico e foi maior quanto maior a temperatura de anelamento. O tratamento hidrotérmico provavelmente provocou alterações nas áreas mais amorfas dos grânulos e, portanto mais acessíveis à amilólise.

Como amplamente difundido na literatura (PLANCHOT et al., 1995; LEACH; SCHOCH, 1961; JACOBS et al., 1998a), a cinética da α -amilase é caracterizada por uma etapa inicial em que ocorre uma alta taxa de hidrólise, seguida de uma segunda etapa em que a hidrólise é mais lenta. Neste experimento, todas as amostras estudadas apresentaram claramente estas duas fases. Na primeira, uma taxa de hidrólise mais rápida foi observada até aproximadamente 24 horas de tratamento enzimático, enquanto na segunda, de 24 a 48 horas, a taxa de hidrólise decresceu havendo uma tendência à estabilização.



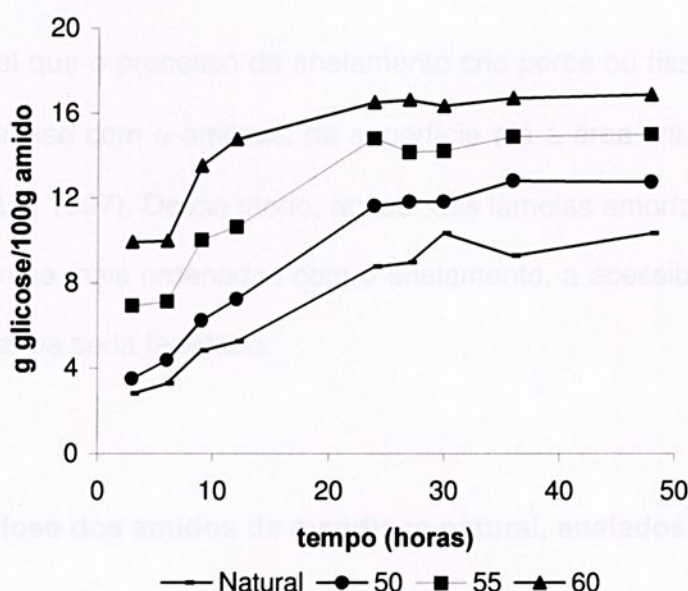


Figura 10- Quantidade de açúcar redutor, produzida por 100 g de amido em função do tempo de incubação durante a hidrólise dos amidos de mandioca natural e anelados a diferentes temperaturas

Os dados apresentados na literatura são controversos com relação à suscetibilidade enzimática dos amidos de diferentes fontes botânicas quando submetidos ao anelamento. Enquanto alguns estudos indicam que amidos de trigo, cevada e sagu anelados são mais facilmente hidrolisados pelas α -amilases que os amidos naturais (GOUGH; PYBUS, 1971; LORENZ; KULP, 1984 apud TESTER; DEBON, 2000), outros apresentam resultados contrários para trigo, lentilha e batata (HOOVER; VASANTHAN, 1994; KUGE; KITAMURA, 1985 apud TESTER; DEBON, 2000).

Independente desses resultados controversos, Jacobs et al. (1998a) observaram que o anelamento altera a extensão das diferentes etapas da hidrólise em função da origem botânica do amido. Segundo estes autores, durante a segunda fase da hidrólise, amidos de trigo e ervilha anelados são mais resistentes à ação da enzima enquanto o inverso ocorre para o amido de batata.

É possível que o processo de anelamento crie poros ou fissuras que alteram o padrão da hidrólise com α -amilase, da superfície até a área interna dos grânulos (WANG; POWELL, 1997). Desse modo, apesar das lamelas amorfas e cristalinas do grânulo tornarem-se mais ordenadas com o anelamento, a acessibilidade das áreas amorfas pela enzima seria facilitada.

5.5 Teor de amilose dos amidos de mandioca natural, anelados e hidrolisados

O teor de amilose no amido é conhecido por afetar suas propriedades funcionais como gelatinização, retrogradação, inchamento e suscetibilidade à hidrólise enzimática (GÉRARD; BARRON; PLANCHOT, 2001; YOU; IZYDORCZYK, 2002).

Os teores de amilose obtidos para os amidos de mandioca natural, anelados e tratados enzimaticamente, através de titulação potenciométrica, estão apresentados na Tabela 5.

O tratamento hidrotérmico não provocou qualquer modificação no teor de amilose dos amidos. Como o anelamento foi realizado a temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização, não se esperava qualquer lixiviação da amilose durante o tratamento. Nem mesmo a 60°C, praticamente a mesma temperatura inicial de gelatinização do amido de mandioca, como determinado por DSC (Tab. 2), foi suficiente para promover qualquer lixiviação da amilose. Esses resultados concordam com aqueles reportados por Knutson (1990) e Hoover e Vasanthan (1994b), para amidos submetidos ao anelamento.



Tabela 5- Teor de amilose dos amidos de mandioca natural, anelados e tratados enzimaticamente^a

Amostras de Amido	%Amilose	Amostras Hidrolizadas	% Amilose
Natural	20,22 ± 0,55	Natural	20,40 ± 0,23
Anelado a 50°C	20,21 ± 0,26	Anelado a 50°C	20,16 ± 0,04
Anelado a 55°C	20,73 ± 0,34	Anelado a 55°C	21,00 ± 0,41
Anelado a 60°C	20,01 ± 0,02	Anelado a 60°C	20,97 ± 0,39

^a Os valores são médias de três replicatas

O tratamento enzimático também não provocou qualquer alteração no teor de amilose dos amidos natural e anelados. Franco e Ciacco (1987, 1992) não observaram qualquer modificação no teor de amilose do amido de mandioca granular, após tratamento enzimático com α -amilase bacteriana. Isso não significa que a amilose não tenha sido atacada pela enzima, principalmente a maiores porcentagens de hidrólise como é o caso dos amidos anelados a 55 e 60°C que apresentaram porcentagens de hidrólise de aproximadamente 14 e 16%. O que pode ter ocorrido é que algumas cadeias laterais das moléculas de amilopectina que faziam parte das áreas amorfas na periferia dos grânulos, ao serem atacadas pela enzima, podem ter sido hidrolizadas de modo que cadeias laterais muito longas capazes de se ligarem com iodo tenham sido detectadas junto com a amilose, superestimando o teor de amilose detectado por titulação.

De acordo com Franco et al. (2001) ainda não está claro se é a amilose ou a amilopectina a fração mais afetada quando se faz o tratamento enzimático do



amido granular. Yamada et al. (1995 apud FRANCO et al., 2001), relataram que a amilose pode existir nos grânulos de maneira independente da amilopectina o que parece sugerir que essas moléculas lineares predominam na fração amorfa dos grânulos.

Zhang e Oates (1999) observaram que o peso molecular da amilose do amido de batata doce diminuiu após tratamento do mesmo com α -amilase bacteriana, indicando degradação desta molécula durante a hidrólise.

Análises cromatográficas de permeação em gel de amido de mandioca granular submetido à ação da α -amilase bacteriana mostraram que a enzima provocou a degradação das moléculas de amilose e de algumas poucas cadeias ramificadas da amilopectina, que passaram a ser eluídas tanto junto com o material intermediário quanto com as moléculas de amilose de menor peso molecular, aumentando a complexação destes com iodo (em fase de elaboração¹).

5.6 Difração de Raios-X

As Figuras 11 e 12 mostram os difractogramas de raios-X dos amidos de mandioca natural e anelados a diferentes temperaturas submetidos ou não à hidrólise enzimática, respectivamente. Os números 1, 2, 3 e 4 representam os maiores picos detectados nos difractogramas, listados na Tabela 6. A Tabela 6 também mostra os valores de intensidade, medidos em Contagens por Segundo (CPS), encontrados para cada pico apresentado nos difractogramas, além do Índice de Cristalinidade Relativa de cada amido.

¹ Suscetibilidade enzimática de amidos de diferentes fontes botânicas, de autoria de Carneiro, A.P.; Franco, C.M.L.



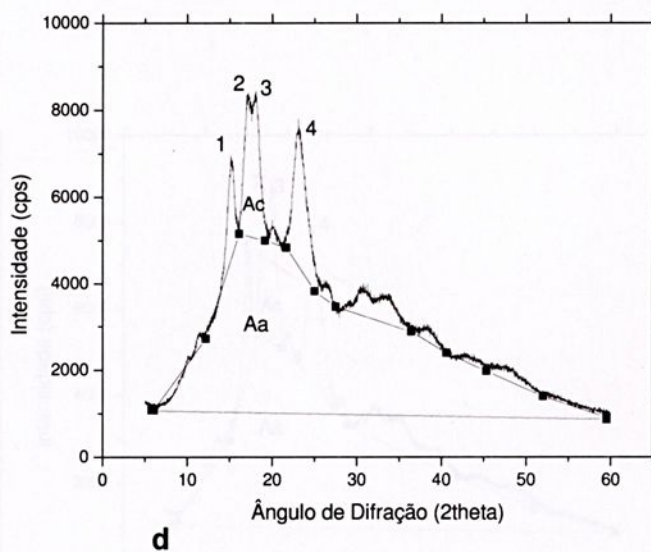
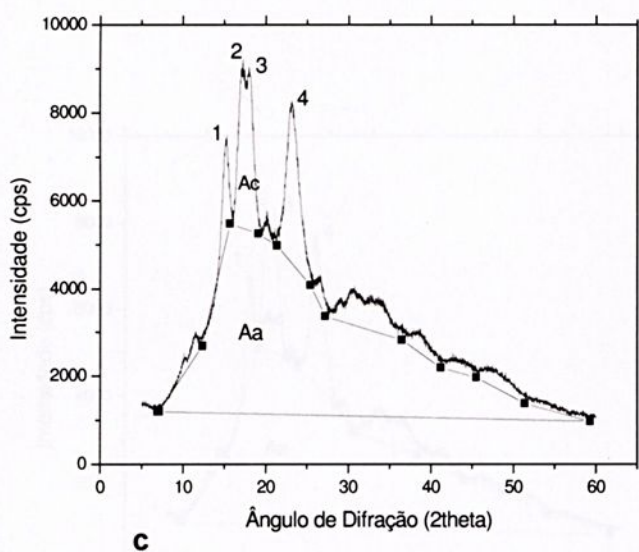
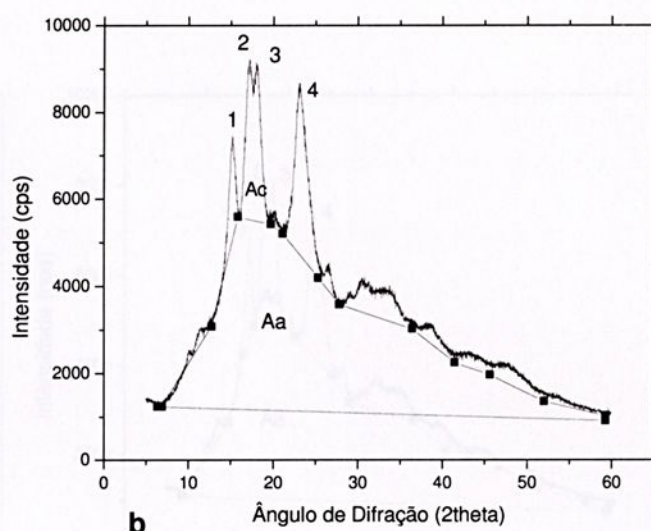
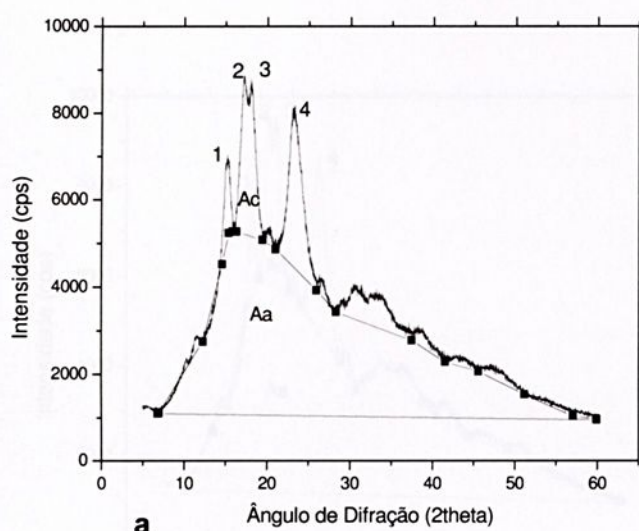


Figura 11- Difractogramas de raios-x dos amidos de mandioca natural e anelados
a: amido natural; b: amido anelado a 50°C; c: amido anelado a 55°C; d: amido anelado a 60°C

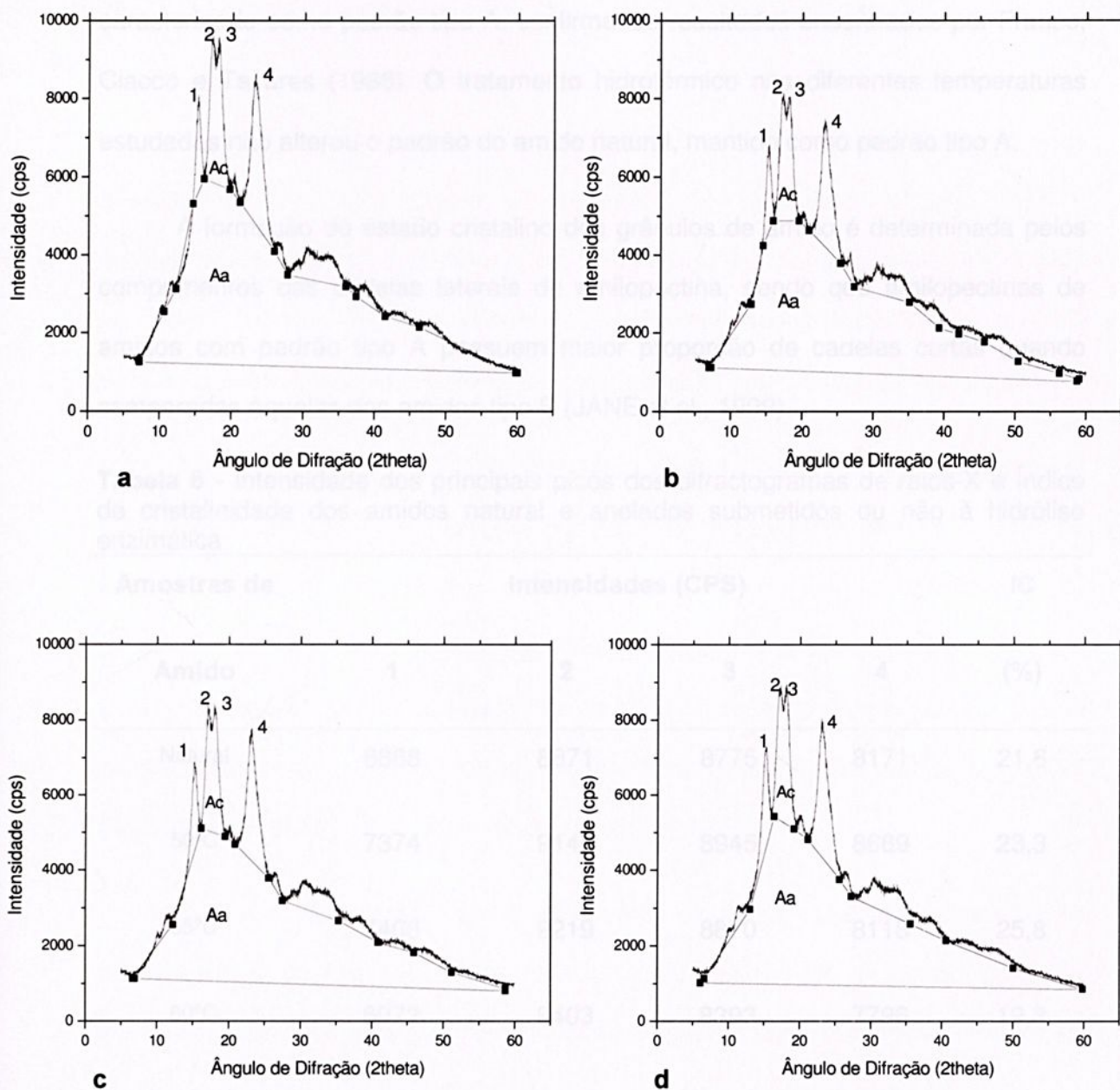


Figura 12- Difractogramas de raios-x dos amidos de mandioca natural e anelados submetidos à hidrólise enzimática. a: amido natural; b: amido anelado a 50°C; c: amido anelado a 55°C; d: amido anelado a 60°C

O amido de mandioca natural apresentou um difractograma de raios-X caracterizado como padrão tipo A, confirmando resultados encontrados por Franco, Ciacco e Tavares (1988). O tratamento hidrotérmico nas diferentes temperaturas estudadas não alterou o padrão do amido natural, mantido como padrão tipo A.

A formação do estado cristalino dos grânulos de amido é determinada pelos comprimentos das cadeias laterais de amilopectina, sendo que amilopectinas de amidos com padrão tipo A possuem maior proporção de cadeias curtas quando comparadas àsquelas dos amidos tipo B (JANE et al., 1999).

Tabela 6 - Intensidade dos principais picos dos difractogramas de raios-X e Índice de cristalinidade dos amidos natural e anelados submetidos ou não à hidrólise enzimática

Amostras de	Intensidades (CPS)				IC
Amido	1	2	3	4	(%)
Natural	6868	8871	8775	8171	21,6
50°C	7374	9146	8945	8669	23,3
55°C	7408	9219	8870	8118	25,8
60°C	6972	8403	8393	7796	19,3
Natural hidrolisado	8093	9600	9566	8651	20,0
50°C hidrolisado	6772	8149	7997	7480	23,20
55°C hidrolisado	6690	8395	8419	7717	23,30
60°C hidrolisado	7318	8838	8953	8032	24,40



Para os amidos anelados a 50 e 55°C houve um aumento da intensidade dos picos em relação ao amido natural, e um aumento do índice de cristalinidade relativa (IC) que passou de 21,6% do amido original para 23,3 e 25,8% para os amidos anelados a 50 e 55°C, respectivamente. Esse aumento na cristalinidade dos amidos anelados a 50 e 55°C sugeriu um rearranjo das moléculas de amido com o fortalecimento das ligações internas dos grânulos e, conseqüentemente maior grau de associação das cadeias de amido. Esses resultados explicam as maiores temperaturas de gelatinização determinadas por DSC para esses amidos.

O amido anelado a 60°C mostrou picos menos resolvidos e diminuição do IC em relação ao amido natural (19,3%). Isso pode ser explicado em função da temperatura de tratamento ser praticamente a mesma que a temperatura de gelatinização inicial do amido de mandioca. Apesar da maior entalpia observada para este amido a partir dos resultados de DSC (Tabela 2), é possível que a essa temperatura de anelamento, tenha ocorrido uma gelatinização parcial de alguns grânulos, causando a diminuição da cristalinidade.

Jacobs (1998), apesar de ter encontrado inúmeras evidências para a maior perfeição dos cristais de amido com o anelamento, não encontrou qualquer evidência mostrando aumento da cristalinidade dos grânulos, detectada por difração de raios-X (*Wide angle X-ray Scattering*). Segundo este autor, a maior perfeição dos cristais pode envolver um melhor empacotamento das duplas hélices na amilopectina.

O tratamento enzimático propiciou em relação ao amido original uma diminuição da intensidade dos picos, bem como do IC, para os amidos tratados a 50 e 55°C. Esses resultados sugeriram que a enzima provavelmente hidrolisou tanto as



áreas amorfas quanto as áreas cristalinas dos grânulos. Para o amido natural hidrolisado, apesar do IC ter diminuído, observou-se um aumento na intensidade dos picos. O amido anelado a 60°C e submetido ao tratamento enzimático mostrou aumento da intensidade dos picos e do IC. Os resultados de hidrólise apresentados na Figura 10 mostraram uma maior taxa de hidrólise para o amido anelado a 60°C sugerindo que nesse caso houve maior degradação das moléculas de amido sendo as áreas amorfas as mais afetadas causando um aumento relativo das regiões cristalinas. Isso também pode ter ocorrido em função da gelatinização parcial dos grânulos anelados a 60°C.

5.7 Propriedades térmicas dos amidos naturais e anelados hidrolisados

As propriedades térmicas de gelatinização dos amidos natural e anelados, hidrolisados, determinadas através de DSC, estão apresentadas na Tabela 7.

Comparando os resultados apresentados na Tabela 7 com aqueles obtidos do amido natural e amidos anelados antes da hidrólise (Tabela 2), observou-se que para o amido natural, praticamente não houve mudanças significativas nas temperaturas e entalpia de gelatinização com o tratamento enzimático, confirmando resultados de Collona et al. (1988) e Jacobs (1998).

Jacobs et al. (1998a) sugeriu que a hidrólise enzimática ocorre seletivamente grânulo a grânulo caracterizando-se como uma ação enzimática desuniforme em relação a toda a população de grânulos. A taxa de hidrólise do amido natural não foi suficiente para provocar qualquer alteração nas temperaturas de gelatinização deste amido.



Tabela 7- Características de gelatinização dos amidos de mandioca natural e anelados submetidos à hidrólise enzimática

Amostras	T _o (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	Faixa (°C)	ΔH (J/g)
Natural	58,99±0,29 ^d	62,60 ±0,25 ^d	67,76 ±0,23 ^d	8,77	6,32±0,42 ^b
50°C	61,68±0,09 ^c	64,22±0,07 ^c	68,67±0,16 ^c	6,99	6,74 ±0,63 ^{ab}
55°C	65,48±0,05 ^b	67,36±0,11 ^b	70,01±0,21 ^b	4,53	4,41 ±0,08 ^c
60°C	67,43±0,31 ^a	69,46±0,36 ^a	73,81 ±0,06 ^a	6,38	8,07 ±0,01 ^a

(T_o), (T_p), (T_f): Temperaturas inicial, de pico, e final, respectivamente; (ΔH): variação de entalpia; Faixa de temperatura de gelatinização = T_f – T_o. Valores são médias de seis replicatas de cada amostra. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes (P < 0.05)

O amido anelado a 50°C e submetido à hidrólise mostrou temperatura inicial e de pico muito próximas àquelas mostradas antes da ação enzimática, enquanto o amido anelado a 55°C hidrolisado apresentou temperatura inicial e de pico levemente superiores àquelas encontradas para este amido antes da hidrólise. Já para o amido anelado a 60°C e hidrolisado o aumento nas temperaturas de gelatinização foi mais pronunciado quando comparado aos valores obtidos antes da hidrólise (Tabela 2). Como observado da Tabela 6, o Índice de Cristalinidade Relativa (IC) aumentou para o amido anelado a 60°C e submetido à hidrólise indicando que tanto regiões amorfas como cristalinas foram hidrolisadas, provocando o aumento da cristalinidade relativa do resíduo da hidrólise. Isso contribuiu para o aumento mais pronunciado das temperaturas de gelatinização deste amido.

Se a entalpia de gelatinização reflete principalmente a perda da ordem das duplas hélices em uma escala molecular (COOKE; GIDLEY, 1992), a diminuição da entalpia para os amidos anelados depois da hidrólise (Tabela 7), em relação aos



amidos anelados (Tabela 2), pode indicar um aumento na suscetibilidade das estruturas de duplas hélices no grânulo frente à ação enzimática, como resultado do anelamento, explicando a maior taxa de hidrólise observada para esses amidos.

Tabela 8- Características de gelatinização dos amidos de mandioca natural e anelados submetidos à hidrólise enzimática retrogradados

Amostra	T _o (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	Faixa (°C)	ΔH (J/g)
Natural	36,27 ± 0,33 ^d	53,02± 4,30 ^a	61,53 ±2,86 ^a	25,26	2,80 ±0,51 ^b
50°C	38,64 ±0,07 ^c	49,90 ±0,05 ^a	59,12±0,08 ^a	20,48	4,29 ±0,11 ^a
55°C	39,99 ±0,36 ^b	49,89 ±0,06 ^a	59,29 ±0,33 ^a	19,30	4,44 ±0,10 ^a
60°C	41,70 ±0,25 ^a	50,45 ±0,57 ^a	59,14 ±0,07 ^a	17,44	3,77±0,06 ^{ab}

(T_o), (T_p), (T_f): Temperaturas inicial, de pico, e final, respectivamente; (ΔH): variação de entalpia; Faixa de temperatura de gelatinização = T_f – T_o. Valores são médias de seis replicatas.
Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes (P < 0.05)

Para as características de gelatinização dos amidos anelados e hidrolisados retrogradados, foram observados maiores temperaturas iniciais de gelatinização e valores de entalpia, e menores temperaturas de pico e finais, em relação ao amido natural hidrolisado. A faixa de temperatura de fusão dos cristais para os amidos anelados e hidrolisados retrogradados (T_f-T_o) diminui, sendo geralmente mais ampla do que a dos amidos anelados retrogradados (Tabela 3).



5.8 Análises Microscópicas

5.8.1 Microscopia óptica

A Figura 13 (a-h) mostra as micrografias ópticas dos amidos de mandioca natural e anelados a diferentes temperaturas, submetidos ou não à hidrólise enzimática. Não foram observadas diferenças marcantes nos grânulos de amidos de mandioca natural e anelados a 50, 55 ou 60°C, assim como não ocorreu mudança no tamanho ou forma dos grânulos. Para as amostras submetidas à ação enzimática foram observados poucos sinais de corrosão, principalmente no sentido radial, apenas para alguns grânulos naturais ou anelados. A quantidade pequena de grânulos de amido corroídos observados nas micrografias ópticas pode estar relacionada à fonte botânica do amido.

Franco, Ciacco e Tavares (1988) observaram que amidos que naturalmente apresentam superfície porosa, como o de milho, são degradados com maior facilidade mostrando uma extensa corrosão dos grânulos, através da formação de canais radiais, enquanto aqueles cuja superfície é lisa, como, por exemplo, o de mandioca, sofrem principalmente uma exocorrosão com solubilização da sua superfície.

Tanto o amido natural quanto os amidos anelados, submetidos ou não à hidrólise enzimática e observados ao microscópio óptico sob luz polarizada apresentaram a típica cruz de malta característica dos amidos (resultados não mostrados), indicando que tanto o tratamento hidrotérmico como o tratamento enzimático não foram suficientes para destruir a estrutura granular.

Figura 13- Micrografias dos amidos de mandioca natural e anelados a diferentes temperaturas submetidos ou não à hidrólise enzimática, observados em microscópio óptico: a) amido natural; b) natural mais enzima; c) anelado a 50°C; d) anelado a 50°C mais enzima; e) anelado a 55°C; f) anelado a 55°C mais enzima; g) anelado a 60°C; h) anelado a 60°C mais enzima.

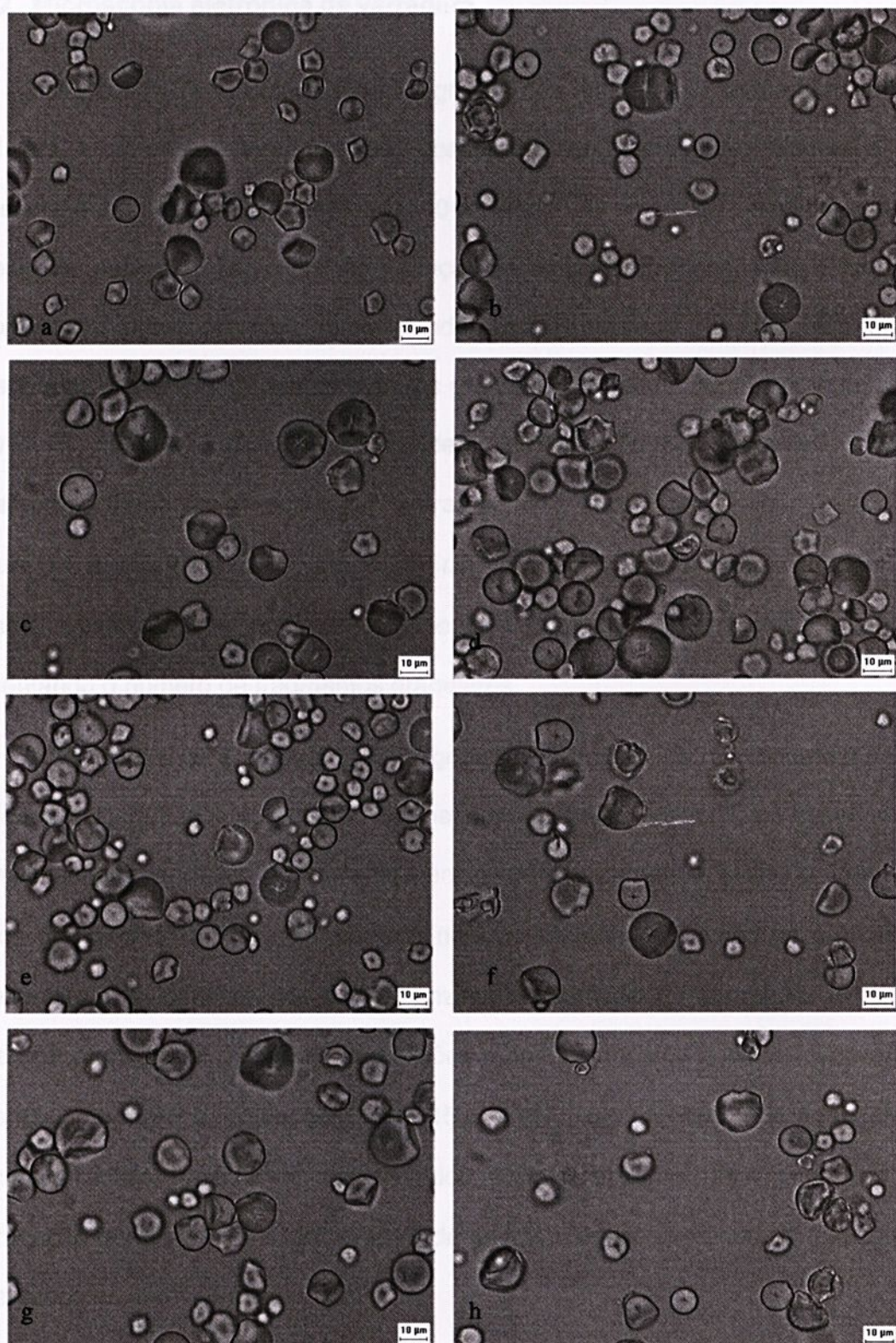


Figura 13- Micrografias dos amidos de mandioca natural e anelados submetidos ou não à hidrólise enzimática, observados em microscópio óptico comum a: amido natural; b: natural mais enzima; c: anelado a 50°C; d: anelado a 50°C mais enzima; e: anelado a 55°C ; f: anelado a 55°C mais enzima; g: anelado a 60°C; h: anelado a 60°C mais enzima.

5.8.2 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 14 (a-h) mostra as micrografias dos amidos de mandioca natural e anelados a diferentes temperaturas, observados ao microscópio eletrônico de varredura e em diferentes aumentos (1500 e 3500 X). O amido de mandioca natural apresentou superfície lisa e grande variação de tamanho predominando o formato redondo com alguns grânulos apresentando uma extremidade truncada. Não foram constatadas diferenças evidentes entre os grânulos submetidos ao anelamento a 50 e 60°C. Por outro lado, para os grânulos de amido submetidos ao tratamento a 55°C observou-se formação de poros ou fissuras sobre a superfície de alguns grânulos [Figura 14 e, f (↓)] deixando sua superfície com aspecto esponjoso. Também foi possível observar uma maior fragilidade dos grânulos com possíveis quebras aumentando o número de fragmentos granulares.

A Figura 15 (a-h) mostra as micrografias dos amidos de mandioca natural e anelados a diferentes temperaturas, submetidos à hidrólise enzimática e observados ao microscópio eletrônico de varredura em diferentes aumentos (1500 e 3500 X). Vários grânulos do amido de mandioca natural, submetidos à ação da α -amilase apresentaram evidências do ataque enzimático através da formação de uma superfície rugosa com pequenas depressões e apenas em alguns deles foi possível observar uma maior degradação [Figura 15 a, b (↓)]. Não foi observada a presença de canais radiais. Para os amidos anelados, pode-se observar uma maior taxa de degradação quanto maior a temperatura de anelamento, confirmando os resultados observados no item 5.4 deste trabalho.

Figura 14 - Amido de mandioca natural e anelados observados ao microscópio eletrônico de varredura, com aumentos de 1500 e 3500 X: a, b: amido natural, c, d: amido anelado a 50°C; e, f: amido anelado a 55°C; g, h: amido anelado a 60°C.

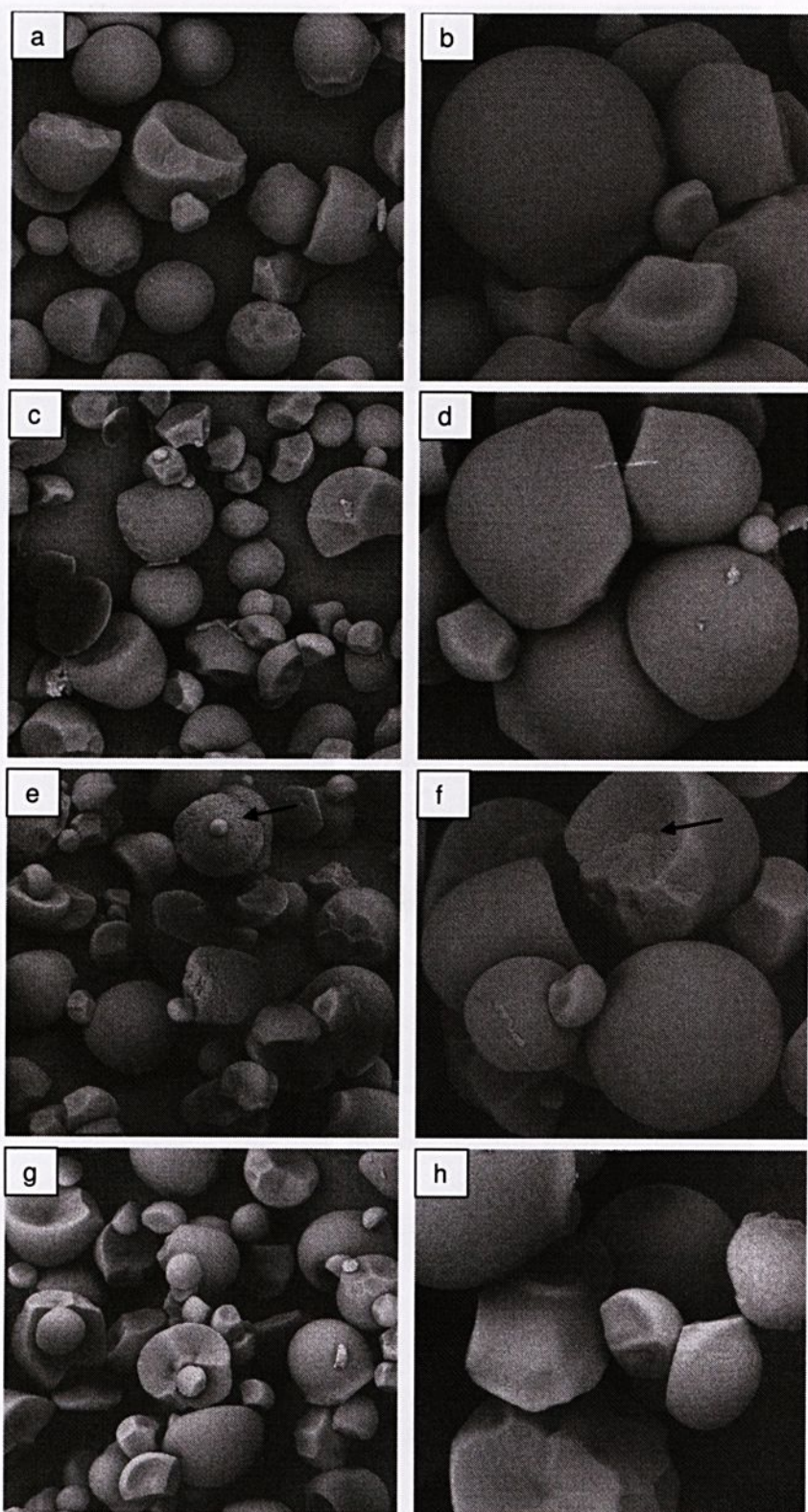


Figura 14 - Amido de mandioca natural e anelados observados ao microscópio eletrônico de varredura, com aumentos de 1500 e 3500 X: a, b: amido natural; c, d: amido anelado a 50°C; e, f: amido anelado a 55°C; g, h: amido anelado a 60°C

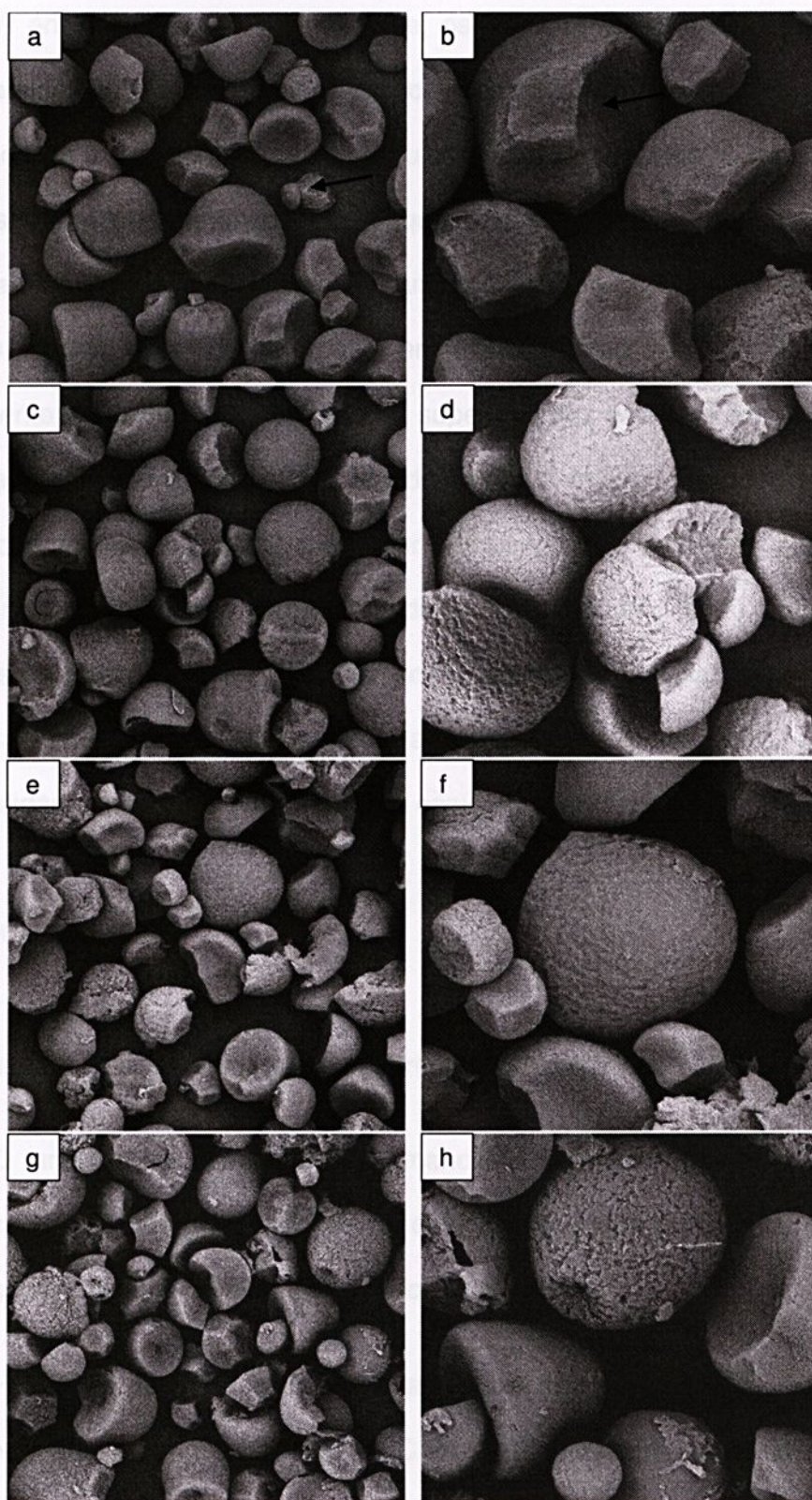


Figura 15- Amido de mandioca natural e anelados submetidos à hidrólise enzimática, observados ao microscópio eletrônico de varredura, com aumentos de 1500 e 3500 X. a,b: amido natural; c,d: amido anelado a 50°C; e,f: amido anelado a 55°C; g,h: amido anelado a 60°C.

A enzima atacou, principalmente, os grânulos anelados a 55 e 60°C. Para esses amidos houve uma extensa exocorrosão da superfície granular, causando em alguns casos a fragmentação dos grânulos (Fig. 15 e, g). Não foi possível observar grandes diferenças no modo de ataque desses grânulos tratados a diferentes temperaturas, apesar dos grânulos de amido anelado a 55°C ter apresentado muitas fissuras e poros antes do tratamento enzimático. Como discutido anteriormente, o anelamento, pode provocar fissuras na superfície dos grânulos expondo mais suas áreas acessíveis a amilólise, explicando assim a maior taxa de hidrólise para o amido que apresentou também a maior cristalinidade. Esses resultados sugeriram que o anelamento altera o padrão de hidrólise do amido facilitando a penetração das enzimas da superfície para o interior dos grânulos. Apesar das lamelas amorfas e cristalinas dos grânulos de amidos anelados tornarem-se mais ordenadas, a acessibilidade às regiões amorfas pelas enzimas é facilitada.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos deste trabalho permitiram concluir que:

- O anelamento do amido de mandioca provocou rearranjo das regiões cristalinas dos grânulos, que foi evidenciado pelas maiores temperaturas de gelatinização e entalpia dos amidos anelados.
- Houve acréscimo da cristalinidade dos amidos anelados a 50 e 55°C, enquanto o amido anelado a 60°C apresentou-se com menor cristalinidade.
- O anelamento a 55°C provocou a formação de fissuras e poros na superfície dos grânulos de amido.



- Os amidos anelados foram mais suscetíveis à hidrólise enzimática com α -amilase quanto maior a temperatura de anelamento. As fissuras observadas na superfície dos grânulos anelados a 55°C facilitaram a ação das enzimas aumentando a suscetibilidade enzimática dos grânulos, apesar da maior cristalinidade dos mesmos.
- A menor cristalinidade e a maior taxa de hidrólise apresentada pelo amido anelado a 60°C sugeriram uma gelatinização parcial dos grânulos em função da temperatura de anelamento coincidir com a temperatura inicial de gelatinização do amido de mandioca.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOWALE, K.O.; LAWAL, O. S. Effect of annealing and heat-moisture conditioning on the physicochemical characteristics of Bamabarra groundnut (*Voandzeia subterranea*) starch. **Nahrung/Food**, v.46, n.5, p.311-316, 2002.

AHMAD, F. B. et al. Physicochemical characterization of sago starch. **Carbohydrate Polymer**, v.38, p.361-370, 1999.

APPROVED METHODS OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. 10 th ed. Saint Paul : AACC, 2000.

ATWELL, W. A. et al. 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. 127-131, 1997.

BEMILLER, J.; WHISTLER, R. Carbohydrates. In: FENNEMA, O., **Food Chemistry**. Marcel Dekker Inc, 3 rd ed., cap. 4, 1996. p. 191-201.

BERTOFT, E. Investigation of the fine structure of amylopectin using alpha-amylase and beta-amylase. **Carbohydrate Research**, v.189, p.195-207, 1989.

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



BLANSHARD, J. M. V. Starch granule structure and function: a physicochemical approach. In: GALLIARD, T. (Ed.) **Starch: properties and potential**. New York : John Wiley, 1987. p.16-54.

BLANSHARD, J. M. V. The glass transition, its nature and significance in food processing. In: Beckett, S.T. (Ed.) **Physico-Chemical Aspects of Food Processing**. Blackie Academic Professional, 1995. p.17-20.

BLENNOW, A. et al. The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to starch crystallinity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.27, p.211-218, 2000.

BULEON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.23, p.85-112, 1998.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.p.430 - 431, 751 p.

CEREDA, M. P. et al. Modificação de fécula por fermentação. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**, São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap.20.

CHAPLIN, M.; BUCKE, C. The large scale use of enzymes in solution. In: CHAPLIN, M.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge University Press, 1990, cap.4, p. 138-166. .

COLONNA, P.; BULEON, A.; LEMARIE, F. Action of *Bacillus subtilis* α -amilase on native wheat starch. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.895-904, 1988.

COLONNA, P.; LELOUP, V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. **European Journal Clinical Nutrition**, v.46, p. 17-32, 1992.

COOKE, D.; GIDLEY, M.J. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization: Origin of the enthalpic transition. **Carbohydrate Research**, v.227, p. 103-112, 1992.

COTTRELLI, J. et al. Properties of potato starch: effects of genotype and growing conditions. **Phytochemistry**, v.40, n.4, p.1057-1064, 1995.

COULTATE, T. P. **Alimentos: química de sus componentes**. Editorial Acribia, 1986, 199 p.

CUI, R.; OATES, C. The effect of amylose-lipid complex formation on enzyme susceptibility of sago starch. **Food Chemistry**, v.65, p.417-425, 1997.

DEFFENBAUGH, L. B.; WALKER, C.E. Comparison of starch pasting properties in the Brabender viscoamylograph and the rapid visco-analyser. **Cereal Chemistry**, v. 66, p. 493-499, 1989.

DOUBLIER, J. L. A rheological comparison of wheat, maize, faba bean and smooth pea starches. **Journal of Cereal Science**, v.5, p.247-262, 1987.



ELLIS, R. P. et al. Starch production and industrial use. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.77, p.289-311, 1998.

EVANS, I. D.; HAISMAN, D. The effect of solutes on the gelatinization temperature range of potato starch. **Starch/Stärke**, v.34, p.224-231, 1982.

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.; 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.; 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.; TAVARES, D. Q. Effect of the heat-moisture treatment on the enzymatic susceptibility of corn starch granules. **Starch/Stärke**, v.47, p. 223-228, 1995.

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

FRANCO, C. M. L. et al. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas: propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, 2001. v.1, 224p.

FRANCO, C. M. L. et al. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, v.79, n.2, 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, M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v.32, n.3-4, p.177-191, 1997.

GALLANT, D. J.; MERCIER, C.; GUIBOT, A. Electron microscopy of starch granules modified by bacterial α -amylase. **Cereal Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 354-365, 1972.

GALLANT, D. J. et al. On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. **Starch/Stärke**, v.34, n.8, p.255-262, 1982.

GALLANT, D. J. et al. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. **European Journal Clinical Nutrition**, v. 46, p.3-16, 1992.

GALLIARD, T.; BOWLER, P. Morphology and Composition of starch. In: GALLIARD, T. (Ed.) **Starch: properties and potential**. Critical Reports on Applied Chemistry. Chichester, UK.: John Wiley, v.13, 1987, p.55-78.



GÉRARD, C.; BARRON, C. P.; PLANCHOT, V. Amylose determinations in genetically modified starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 19-27, 2001.

GOUGH, B.M.; PYBUS, J.N. Effect on the gelatinization temperature of wheat starch granules of prolonged treatment with water at 50°C. **Starch/Stärke**, v.23, p. 210-212, 1971.

HERMANSSON; A.-M., SVEGMARK, K. Developments in the understanding of starch functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.345-353, 1996.

HIZUKURI, S. Estimation of glucose 6-phosphate residues in starch and the presence of other bound phosphates. **Starch/Stärke**, v.22, p.338-341, 1970.

HIZUKURI, S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins and its significance. **Carbohydrate Research**, v.147, n.2, p.342-347, 1986.

HIZUKURI, S. **Starch**: analytical aspects. In: A.-C. Eliasson (Ed.) New York: Marcel Dekker, Inc., 1996, p. 347-429.

HIZUKURI, S. et al. **Analytical developments**: molecular and microstructural characterization. In: FRAZIER, P.J.; RICHMOND, P.; DONALD, A.M. (Ed.) **Starch: structure and functionality**. Royal Society of Chemistry, 1997, p.121-128.

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.; VASANTHAN, T. The effect of annealing on the physicochemical properties of wheat, oat, potato and lentil starches. **Journal of Food Biochemistry**, v.17, p. 303-325, 1994.

JACOBS, H. **Impact of annealing on physico-chemical properties of starch**. Dissertationes de Agricultura. 177 p. Katholieke Universiteit Leuven, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste, maart, 1998.

JACOBS, H.; DELCOUR, J.A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.8, p. 2895-2905, 1998.

JACOBS, H. et al. Influence of annealing on the pasting properties of starches from varying botanical sources. **Cereal Chemistry**, Belgium, v.72, n.5, p.480-487, 1995.

JACOBS, H. et al. Factors affecting the viscoamylograph and rapid visco-analyser evaluation of the impact of annealing on starch pasting properties. **Starch/Stärke**, v.48, p.266-270, 1996.

JACOBS, H. et al. Impact of annealing on the susceptibility of wheat, potato and pea starches to hydrolysis with pancreatin. **Carbohydrate Research**, v.305, p. 193-207, 1998a.

JACOBS, H. et al. Evaluation of the impact of annealing on gelatinization at intermediate water content of wheat and potato starches: A differential scanning



calorimetry and small angle X-ray scattering study. **Carbohydrate Research**, v. 306, p.1-9, 1998b.

JANE, J. et al. Location of amylose in normal starch granules. I. Susceptibility of amylose and amylopectin to cross-linking reagents. **Cereal Chemistry**, v.69, p. 405-409, 1992.

JANE; J. et al. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v.76, n.5, p.629-637, 1999.

KARIM, A.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v.71, p.9-36, 2000.

KASEMSUWAN, T. et al. Characterization of the dominant mutant amylose-extender (Ae1 - 5180) maize starch. **Cereal Chemistry**, v. 72, p.457-464, 1995.

KIM, Y. S.; WEISENBORN, P.; GRANT, I. A. Pasting and thermal properties of potato and bean starches. **Starch/Stärke**, v.49, p.97-102, 1997.

KISELEVA, V. et al. Annealing of normal, low and high amylose starches extracted from barley cultivars grown under different environmental conditions. **Carbohydrate Polymers**, 2004. In press.

KNUTSON, C. A. Annealing of maize starches at elevated temperatures. **Cereal Chemistry**, v. 67, p.376-384, 1990.

KRUEGER, B. R. et al. A differential scanning calorimetry study on the effect of annealing on gelatinization behavior of corn starch. **Journal of Food Science**, v. 52, p.715-718, 1987a.

KRUEGER, B. R. et al. Differential scanning calorimetry of raw and annealed starch isolated from normal and mutant maize genotypes. **Cereal Chemistry**, v.64, p.187-190, 1987b.

KULP, K. Enzymes in food processing. In: REED, G. (Ed.) **Food science and technology**. London: Academic Press Inc., 2nd ed., 1975, p. 62-80.

LARSSON, I.; ELIASSON, A.-C. Annealing of starch at an intermediate water content. **Starch/Stärke**, v.43, p.227-231, 1991.

LEACH, H.W.; SCHOCH, T.J. Structure of the starch granule. II. Action of various amylases on granular starches. **Cereal Chemistry**, v.38, p.34-46, 1961.

LEACH, H.W.; McDOWEN, L.D.; SCHOCH, T.J. Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. **Cereal Chemistry**, v.36, n.6, p.534-549, 1959.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n.1, p. 65-69, 2002.



LIM, S.; KASENUWAM, T.; JANE, J. Characterization of phosphorus in starch by ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v.76, p.488-493, 1994.

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

LORENZ, K.; KULP, K. Steeping of wheat at various temperatures-effects on physicochemical characteristics of the starch. **Starch/Stärke**, v.10, p.333-336, 1978.

LORENZ, K.; KULP, K. Steeping of starch at various temperatures-Effects on functional properties. **Starch/Stärke**, v. 32, p.181-186, 1980.

MAARUF, A. G. et al. Effect of water content on the gelatinization temperature of sago starch. **Carbohydrate Polymers**, v.46, n.4, p.331-337, 2001.

MANNERS, D. J.; MATHERSON, N. K. The fine structure of amylopectin. **Carbohydrate Research**, v.90, n.1, p.99-110, 1981.

MARCHANT, J. L.; BLANSHARD, J.M.V.. Changes in the birefringent characteristics of cereal starch granules at different temperatures and water activities. **Starch/Stärke**, v. 32, p. 223-226, 1980.

MEREDITH, P.; DENGATE, H.N.; MORRISON, H.R. The lipids of various sizes of wheat starch granules. **Starch/Stärke**, v.30, p.119-122, 1978.

MILES, M. J. et al. Recent observations on starch retrogradation, In: HILL, R.D.; MUNCH, L. (Ed.), **New approaches to research on cereal carbohydrates**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985, p.109-115.

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

MUHRBECK, P.; SVENSSON, E. Annealing properties of potato starches with different degrees of phosphorylation. **Carbohydrate Polymers**, v.31, p.263-267, 1996.

NEWPORT SCIENTIFIC. Operation manual for series 4: Instructions Manual. Warriewood. Austrália, 1998. 123p.

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

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

PÉREZ, O.E.; HAROS, M.; SUAREZ, C. Corn Steeping: influence of time and lactic acid on isolation and thermal properties of starch. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.251-256, 2001.

PLANCHOT, V. et al. Extensive degradation of native starch granules by α -amilase from *Aspergillus fumigatus*. **Cereal Science**, v.21, p.163-171, 1995.



PLATA-OVIEDO, M. S. V. P. **Efeito do tratamento ácido nas propriedades físico-químicas e funcionais do amido de mandioca**. 1991. 135 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) -Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

RADLEY, J.A. Industrial uses of starch and its derivatives. In: RADLEY, J. A. **Starch Production Technology**. London: Applied Science Publishers, 1976, 268p.

RAEKER, M.O. et al. Granule size distribution and chemical composition of starches from 12 soft wheat cultivars. **Cereal Chemistry**, v. 75, p.721-728, 1998.

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

RING, S.G. et al. The gelation and crystallisation of amylopectin. **Carbohydrate Research**, v.162, n.2, p.277-293, 1987.

ROBIN, J. P. et al. Lintnerized starches gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v.51, p.389-405, 1974.

ROSENTHAL, F.R.T. et al. Structure of starch granules. Part 3. Some considerations on leguminosae and tuberosae. **Starch/Stärke**, v.26,n.2, p.50-56, 1974.

SASAKI, T.; YASUI, T.; MATSUKI, J. Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation, and pasting properties of starch from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds. **Cereal Chemistry**, v.77, n.1, p.58-63, 2000.

SCHOCH, T. J. Swelling power and solubility of granular starches. In: WHISTLER, R. L.; SMITH, R. J.; BEMILLER, J. N. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. Orlando: Academic Press, 1964a. p.106-108.

SCHOCH, T. J. Iodimetric determination of amylose. In: WHISTLER, R. L.; SMITH, R. J.; BEMILLER, J. N. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. Orlando: Academic Press, 1964b. p.157-160.

SEBIO, L. **Desenvolvimento de Plástico Biodegradável a base de amido de milho e gelatina pelo processo de extrusão-Avaliação das propriedades mecânicas, térmicas e de barreira**. 2003. 182p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SHANDERA, D. L., JACKSON, D. S. Effect of corn wet-milling conditions (sulfur dioxide, lactic acid, and steeping temperature) on starch functionality. **Cereal Chemistry**. v.73, p.632-637, 1996.

SMITH, P. S. Starch derivatives and their use in foods. In: LINEBACK, D. R.; INGLETT, G. E. **Food carbohydrates**. Westport: Avi Publishing Company, 1982. p. 237-269.

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



STUTE, R. Hydrothermal modification of starches: the difference between annealing and heat-moisture treatment. **Starch/Stärke**, v.44, p.205-214, 1992.

SWINKELS, J. J. M. Sources of starch, its chemistry and physics. In: VANBEYNUM, G. M. A.; ROELS, J. A. **Starch Conversion Technology**. New York: Marcel Dekker, 1985a, cap. 2, p. 15-46.

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

TAKEDA, Y.; HIZUKURI, S. Structures of branched molecules of amylose of various origins, and molar fraction of branched and unbranched molecules. **Carbohydrate Research**, v.165, n.1, p.139-145, 1987.

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.; DEBON, S.J.J. Annealing of starch – a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.27, p.1-12, 2000.

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

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

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

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

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

TSAI, M.L., LI, C. F., LII, C.Y. Effects of granular structures on the pasting behaviors of starches. **Cereal Chemistry**, v.74, p.750-757, 1997.

WANG, Y. J.; WHITE, P. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. **Cereal Chemistry**, v.71, p.263-268 1994.

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

WANG, Y. J. et al. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh43 inbred line background. **Cereal Chemistry**, v.70, n.2, p.171-179, 1993.



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.

YOU, S.; IZYDORCZYK, M.S. Molecular characteristics of barley starches with variable amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v.49, n.1, p.33-42, 2002.

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

YOST, D. A., HOSENEY, R. C. Annealing and glass transition of starch. **Starch/Stärke**, v.38, p.289-292, 1986.

YU, L.; CHRISTIE, G. Measurement of starch thermal transitions using differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v.46, n.2, p.179-184, 2001.

ZHANG; T.; OATES, C. G. Relationship between α -amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches. **Food Chemistry**, v.65, 1999, p.157-163.

ZOBEL, H. F. Gelatinization of starch and mechanical properties of starch pastes. In: WHISTLER, R.L.; BEMILER, J. N.; Paschal, E. F. **Starch: chemistry and technology**. London: Academic Press, 1984.

ZOBEL, H. F. Starch crystal transformations and their industrial importance. **Starch/Stärke**, v.40, p. 1-7, 1988.



