

Raquel Bombarda Campanha

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DE
AMIDOS NATIVOS E SUAS DEXTRINAS NAEGELI

São José do Rio Preto
2010

Raquel Bombarda Campanha

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DE
AMIDOS NATIVOS E SUAS DEXTRINAS NAEGELI

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

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

São José do Rio Preto
2010

Raquel Bombarda Campanha

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DE
AMIDOS NATIVOS E SUAS DEXTRINAS NAEGELI

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

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Maria Victória Eiras Grossmann
UEL - Londrina

Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva
UNESP – Presidente Prudente

São José do Rio Preto
06 de agosto de 2010

Dedico esse trabalho

Às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, Jercelino e Maria José, minha irmã, Lívia e meu noivo Vinícius. Por todo amor, apoio e confiança, muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

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

Às amigas e colegas do Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos, Denise, Thaís, Flaviana, Larissa, Amanda, Suélen e Verena, pela ajuda e amizade.

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

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro à pesquisa.

RESUMO

Amido é um polímero semicristalino constituído basicamente por amilose e amilopectina. Seus grânulos são formados por regiões amorfas intercaladas com áreas mais densas compostas por lamelas alternadas de material cristalino e amorfo. O empacotamento das moléculas no grânulo é dependente da fonte botânica. Raízes e tubérculos são ricos em amido e seu plantio não requer muito investimento. Assim, o interesse industrial vem aumentando. O conhecimento da estrutura granular é fundamental para melhor entendimento das propriedades funcionais e melhor utilização do amido. A hidrólise ácida é uma técnica muito utilizada no estudo da estrutura do amido. O tratamento do amido com H_2SO_4 15% produz uma fração ácido-resistente, com baixa massa molar, conhecida como dextrina Naegeli (DN). O objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura granular dos amidos de mandioca, batata, batata-doce e mandioquinha-salsa através da hidrólise ácida. Os amidos foram incubados com H_2SO_4 15,3% a 38°C, por até 30 dias, e suas DN foram analisadas. A hidrólise ácida ocorreu em duas etapas: a primeira foi atribuída à rápida degradação das áreas amorfas dos grânulos, enquanto a segunda fase correspondeu à lenta hidrólise das regiões cristalinas. O amido de mandioquinha-salsa foi o mais suscetível à hidrólise, enquanto que os amidos de batata e batata-doce foram os mais resistentes. Os amidos de batata e mandioquinha-salsa apresentaram padrões cristalinos tipo B e mostraram maiores proporções de cadeias laterais longas da amilopectina ($GP \geq 37$) do que os amidos de mandioca (tipo C_A) e batata-doce (tipo C). Além de grande proporção de cadeias longas, o amido de mandioquinha-salsa também apresentou grande proporção de cadeias curtas (32,0%). O amido de mandioca também apresentou grande proporção de cadeias curtas (30,5%). Esses amidos mostraram um ombro em GP 17-21 na distribuição de comprimento de cadeias laterais da amilopectina, indicando defeitos na estrutura cristalina. Estes defeitos, aliados à grande quantidade de cadeias laterais curtas (GP 6-12), causaram redução da densidade e estabilidade das lamelas cristalinas, tornando os amidos de mandioca e mandioquinha-salsa menos resistentes à gelatinização e ao ataque ácido. Os padrões cristalinos dos amidos de mandioca, batata-doce e mandioquinha-salsa mudaram para A, A e C_B , respectivamente, à medida que o tempo de hidrólise aumentou, mas permaneceu inalterado para o amido de batata. As análises de HPAEC-PAD das DN, antes e após desramificação com isoamilase,

mostraram que o amido de mandioca tinha mais pontos de ramificação localizados nas lamelas cristalinas do que os amidos com padrão tipo B. No entanto, o amido de mandioquinha-salsa apresentou quantidade significativamente maior de pontos de ramificação nas lamelas cristalinas do que o amido de batata, provavelmente devido à maior proporção de cadeias laterais curtas de sua amilopectina. O teor de amilose aparente reduziu até o terceiro dia de hidrólise. Após esse período, as cadeias curtas da amilopectina foram preferencialmente hidrolisadas, aumentando a proporção de cadeias longas que, por formarem complexos com iodo, resultaram em aumento dos teores de amilose aparente, principalmente para os amidos de mandioca e mandioquinha-salsa. Os resultados mostraram que dentre os amidos estudados, o de mandioquinha-salsa apresentou características estruturais singulares.

Palavras-chave: Amido. Hidrólise ácida. Características estruturais. Dextrina Naegeli.

ABSTRACT

Starch is a semi-crystalline polymer composed mainly of amylose and amylopectin. The starch granules are formed by successive layers that include amorphous areas interspersed with more dense areas composed of alternated lamellae of crystalline and amorphous material. Packing of amylose and amylopectin into granules is dependent of botanical source. Tubers and roots are rich in starch and their cultivation does not require much investment. Thus, the industrial interest has increased. Knowledge of the starch structure is fundamental for better understanding the functional properties and better utilization of the starch. Acid hydrolysis is widely used to study starch structure. Treatment of starch with 15% H₂SO₄ solution produces an acid-resistant fraction with low molecular weight known as Naegeli dextrin (ND). Objective of this study was to determine the structural characteristics of cassava, potato, sweet potato and Peruvian carrot starches by using acid hydrolysis. The starches were submitted to 15.3% H₂SO₄ at 38°C for up to 30 days and their ND were analyzed. Acid hydrolysis displayed two phases: the first one was attributed to faster degradation of amorphous areas of granules, whereas the second phase corresponded to slower hydrolysis of crystalline regions. Peruvian carrot starch was the most susceptible to hydrolysis, whereas potato and sweet potato starches were the most resistant. Potato and Peruvian carrot starches displayed B-type X-ray pattern and had larger proportions of long branch-chains of amylopectin ($DP \geq 37$) than cassava (C_A-type) and sweet potato (C-type) starches. Beyond the great proportion of long branch-chains, the Peruvian carrot starch also showed great proportion of short branch-chains (32.0%). Cassava starch also had great proportion of short branch-chains (30.5%). These starches displayed a shoulder at DP 17-21 on branch chain-length distribution of amylopectin indicating structural crystalline defects. These defects, in addition to the great amount of short branch-chains (DP 6-12), caused reduction of density and stability of crystalline lamellae, making cassava and Peruvian carrot starches less resistant to gelatinization and acid hydrolysis. Increasing hydrolysis time, the X-ray patterns of cassava, sweet potato and Peruvian carrot starches shifted to A, A and C_B, respectively, but it remained unchanged for potato starch. HPAEC-PAD analysis of ND and isoamylase debranched ND showed that the cassava starch had more branch points located within crystalline lamellae than did the B-type starches. However, Peruvian carrot starch had

significantly higher amount of branch points into crystalline lamellae than potato starch, probably due to larger proportion of short branch-chains of its amylopectin. Apparent amylose content decreased until the third day of hydrolysis and then increased for cassava and Peruvian carrot starches. The short branch-chains of amylopectin were mainly hydrolyzed during this period and then the proportion of long branch-chains increased. The long branch-chains can form complex with iodine resulting in increase of apparent amylose content, especially for cassava and Peruvian carrot starches. The results revealed that Peruvian carrot starch had singular structure characteristics when compared with the others starches.

Keywords: Starch. Acid hydrolysis. Structural characteristics. Naegeli dextrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura parcial das cadeias de (a) amilose, (b) amilopectina.....	20
Figura 1.2	Representação do modelo molecular do complexo amilose-lipídio, mostrando a inclusão da região alifática no interior da única hélice da amilose. Adaptado de Buléon et al. (1998).	23
Figura 1.3	Estrutura proposta para amilopectina de batata. 1 = área compacta; 2 = área menos compacta, rica em pontos de ramificação; Ø = extremidade redutora. Adaptado de Robin et al. (1974).	26
Figura 1.4	Diagrama esquemático dos <i>clusters</i> de cadeias laterais de amilopectina na lamela cristalina. C, lamela cristalina; A, lamela amorfa; a, regiões amorfas entre os <i>clusters</i> cristalinos. Adaptado de Gallant, Bouchet e Baldwin (1997).	27
Figura 1.5	Representação esquemática da estrutura do grânulo de amido. Adaptado de Gallant, Bouchet e Baldwin (1997).....	28
Figura 1.6	Conformação helicoidal dos componentes do amido: (A) hélice simples com seis anéis glicosídicos por ciclo (ciclo = 0,805nm); (B) dupla hélice invertida com sei anéis glicosídicos por ciclo (ciclo = 2,13nm); (C) dupla hélice entre duas cadeias curtas na amilopectina. A visão superior dos modelos revela uma cavidade no centro da hélice simples, ausente na dupla hélice. Adaptado de Buléon et al. (1998).	30
Figura 1.7	Empacotamento cristalino das duplas hélices de amilose tipo-A (A) e tipo-B (B). Projeção da estrutura no plano (<i>a</i> , <i>b</i>). Adaptado de Buléon et al. (1998).	31
Figura 1.8	Modelo proposto para os padrões de ramificação de (a) amido de milho ceroso, que apresenta padrão de raios-X tipo-A, e (b) amido de batata que apresenta padrão de raios-X tipo-B. ‘A’ representa as regiões amorfas e ‘C’ as regiões cristalinas. Adaptado de Jane, Wong e McPherson (1997).	32
Figura 1.9	Mecanismo de reação da hidrólise ácida de amido. Adaptado de Hoover (2000).	36
Figura 1.10	Hidrólise ácida heterogênea das moléculas de amilopectina no grânulo de amido. À esquerda, a amilopectina com os “clusters” de cadeias curtas	

	constituindo os cristais de amido, a hidrólise ocorre preferencialmente nas regiões intercristalinas originando os segmentos lineares ou ligeiramente ramificados, à direita, que permanecem cristalinos e ácido-resistentes. GP= grau de polimerização. Adaptado de Hoover (2000).	37
Figura 1.11	Possíveis estruturas para amidos lintnerizados. (a) cadeias lineares (GP 13-15); (b) cadeias uniramificadas (GP 25); (c) cadeias multi-ramificadas (GP > 35); (d) amilose retrogradada; (e) complexo amilose-lipídio. Adaptado de Jacobs et al. (1998).....	38
Figura 4.1	Micrografias dos grânulos dos amidos observados em microscópio eletrônico de varredura: (a) mandioca; (b) batata; (c) batata-doce; (d) mandioquinha-salsa.....	53
Figura 4.2	Perfis de eluição dos amidos nativos de tubérculos e raízes.	54
Figura 4.3	Difractogramas de raios-X dos amidos nativos com as respectivas cristalinidades relativas (%): (a) mandioca; (b) batata; (c) batata-doce; (d) mandioquinha-salsa.....	56
Figura 4.4	Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos desramificados por isoamilase.....	57
Figura 4.5	Perfil viscoamilográfico dos amido nativos de raízes e tubérculos.....	61
Figura 4.6	Perfil endotérmico dos amidos nativos, determinados por DSC; (a) mandioca, (b) batata, (c) batata-doce e (d) mandioquinha-salsa.....	62
Figura 4.7	Perfil da cinética da hidrólise ácida dos amidos em função do tempo de incubação.....	65
Figura 4.8	Porcentagem de hidrólise ácida dos amidos em função do tempo de incubação.....	66
Figura 4.9	Micrografias de (a) amido nativo de mandioca e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; e (f) 30 dias de hidrólise ácida.....	68
Figura 4.10	Micrografias de (a) amido nativo de batata e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; e (f) 30 dias de hidrólise ácida.....	68
Figura 4.11	Micrografias de (a) amido nativo de batata-doce e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; e (f) 30 dias de hidrólise ácida.....	69

Figura 4.12	Micrografias de (a) amido nativo de mandioquinha-salsa e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; e (f) 30 dias de hidrólise ácida.	69
Figura 4.13	Difractogramas de raios-X do (a) amido nativo de mandioca; e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias de hidrólise.....	71
Figura 4.14	Difractogramas de raios-X do (a) amido nativo de batata; e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias de hidrólise.....	71
Figura 4.15	Difractogramas de raios-X do (a) amido nativo de batata-doce; e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias de hidrólise.....	72
Figura 4.16	Difractogramas de raios-X do (a) amido nativo de mandioquinha-salsa; e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias de hidrólise.....	72
Figura 4.17	Distribuição do comprimento das cadeias laterais da (a) amilopectina do amido nativo de mandioca e das suas dextrinas Naegeli hidrolisadas por (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias; desramificados por isoamilase.	75
Figura 4.18	Distribuição do comprimento das cadeias laterais da (a) amilopectina do amido nativo de batata e das suas dextrinas Naegeli hidrolisadas por (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias; desramificados por isoamilase.	76
Figura 4.19	Distribuição do comprimento das cadeias laterais da (a) amilopectina do amido nativo de batata-doce e das suas dextrinas Naegeli hidrolisadas por (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias; desramificados por isoamilase.	77
Figura 4.20	Distribuição do comprimento das cadeias laterais da (a) amilopectina do amido nativo de mandioquinha-salsa e das suas dextrinas Naegeli hidrolisadas por (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias; desramificados por isoamilase.....	78

Figura 4.21	Cromatogramas de HPAEC-PAD das dextrinas Naegeli obtidas após 12 dias de hidrólise dos amidos (a) mandioca; (b) batata; (c) batata-doce; (d) mandioquinha-salsa.	81
Figura 4.22	Cromatogramas de HPAEC-PAD das dextrinas Naegeli desramificadas com isoamilase obtidas após 12 dias de hidrólise dos amidos (a) mandioca; (b) batata; (c) batata-doce; (d) mandioquinha-salsa.	82
Figura 4.23	Cromatogramas de HPAEC-PAD das dextrinas Naegeli obtidas após 6, 12 e 30 dias de hidrólise amidos de mandioca, batata, batata-doce e mandioquinha-salsa.	84
Figura 4.24	Gráficos do teor de amilose aparente em função do tempo de hidrólise dos amidos das diferentes fontes botânicas.	85
Figura 4.25	Perfil endotérmico observado por DSC dos amidos nativos e suas respectivas dextrinas Naegeli.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Umidade e rendimento da extração dos amidos.	51
Tabela 4.2	Composição química dos amidos das diferentes fontes botânicas (% em relação à matéria seca).	52
Tabela 4.3	Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos de diferentes fontes botânicas.	58
Tabela 4.4	Afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto de amidos de diferentes fontes botânicas.	59
Tabela 4.5	Propriedades de pasta dos amidos nativos.	60
Tabela 4.6	Propriedades de gelatinização dos amidos nativos.	63
Tabela 4.7	Propriedades térmicas dos amidos retrogradados.	64
Tabela 4.8	Cristalinidade relativa e padrões cristalinos dos amidos nativos e de suas respectivas dextrinas Naegeli.	73
Tabela 4.9	Distribuição do comprimento das cadeias laterais do amido nativo de mandioca e de suas dextrinas Naegeli, desramificados por isoamilase.	79
Tabela 4.10	Distribuição do comprimento das cadeias laterais do amido nativo de batata e de suas dextrinas Naegeli, desramificados por isoamilase.	79
Tabela 4.11	Distribuição do comprimento das cadeias laterais do amido nativo de batata-doce e de suas dextrinas Naegeli, desramificados por isoamilase.	79
Tabela 4.12	Distribuição do comprimento das cadeias laterais do amido nativo de mandioquinha-salsa e de suas dextrinas Naegeli, desramificados por isoamilase.	79
Tabela 4.13	Propriedades térmicas dos amidos nativos e suas dextrinas Naegeli.	88

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	16
1.2 FONTES DE AMIDOS TROPICAIS.....	17
1.3 ESTRUTURA GRANULAR	19
1.3.1 Amilose	22
1.3.2 Amilopectina	24
1.4 ESTRUTURA CRISTALINA	29
1.5 HIDRÓLISE ÁCIDA	34
2 OBJETIVO GERAL.....	40
2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 MATERIAL	41
3.2 MÉTODOS	41
3.2.1 Extração dos Amidos.....	41
3.2.2 Isolamento de Amilopectina	42
3.2.3 Caracterização dos Amidos.....	42
3.2.3.1 Composição Química	42
3.2.3.2 Morfologia dos Grânulos.....	43
3.2.3.3 Distribuição do Tamanho Molecular dos Componentes dos Amidos.....	43
3.2.3.3.1 Empacotamento da Coluna	43
3.2.3.3.2 Preparo de Amostras.....	44
3.2.3.3.3 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	44
3.2.3.4 Difração de Raios-X e Cristalinidade Relativa.....	44
3.2.3.5 Distribuição do Comprimento das Cadeias Laterais da Amilopectina	45
3.2.3.5.1 Desramificação dos Amidos	45
3.2.3.5.2 Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência com Detecção Amperométrica Pulsada (HPAEC-PAD).....	45
3.2.3.6 Afinidade por Iodo e Teor de Amilose.....	46

3.2.3.7 Propriedades de Pasta	47
3.2.3.8 Propriedades Térmicas	47
3.2.4 <i>Hidrólise Ácida</i>	48
3.2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	49
3.2.4.2 Difração de Raios-X e Cristalinidade Relativa.....	49
3.2.4.3 Distribuição do Comprimento das Cadeias das Dextrinas Naegeli	49
3.2.4.4 Teor de Amilose Aparente.....	49
3.2.4.5 Propriedades Térmicas	50
3.2.5 <i>Análise Estatística</i>	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 EXTRAÇÃO DOS AMIDOS	51
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS	51
4.2.1 <i>Composição Química</i>	51
4.2.2 <i>Morfologia dos Grânulos</i>	53
4.2.3 <i>Distribuição do Tamanho Molecular dos Componentes dos Amidos</i>	54
4.2.4 <i>Difração de raios-X e cristalinidade relativa</i>	55
4.2.5 <i>Distribuição do Comprimento das Cadeias Laterais da Amilopectina</i>	56
4.2.6 <i>Afinidade por Iodo e Teor de Amilose</i>	58
4.2.7 <i>Propriedades de Pasta</i>	60
4.2.8 <i>Propriedades Térmicas</i>	62
4.3 HIDRÓLISE ÁCIDA	64
4.3.1 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	67
4.3.2 <i>Difração de Raios-X e Cristalinidade Relativa</i>	70
4.3.3 <i>Comprimento das Cadeias das Dextrinas Naegeli</i>	74
4.3.4 <i>Teor de Amilose Aparente</i>	85
4.3.5 <i>Propriedades Térmicas</i>	86
5 CONCLUSÕES.....	89
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

O amido é produzido e armazenado em organelas celulares chamadas amiloplastos (TESTER, 1997) e constitui a maior reserva energética dos vegetais superiores. Consumido no mundo inteiro, o amido representa uma grande fonte de carboidratos para a alimentação humana fornecendo de 70 a 80% das calorias consumidas (GIDLEY; BOCIEK, 1985). Os depósitos permanentes de amido nas plantas ocorrem, principalmente, nos órgãos de reserva como é o caso de grãos em cereais (arroz, milho e trigo), tubérculos e raízes (batata, mandioca, taro, etc) e leguminosas (feijão, ervilha, entre outros) (PERERA et al. 2001; LEONEL; CEREDA, 2002).

Amidos de diferentes origens botânicas possuem diversas propriedades funcionais o que os torna úteis para aplicações em alimentos, produtos farmacêuticos, papel, plástico e outros setores industriais (WONG; JANE, 1995; SINGH; INOUCHI; NISHINARI, 2005; NWOKOCHA et al., 2009). O amido é uma matéria-prima abundante, renovável, biodegradável e não tóxica que pode ser extraído com elevada pureza por meio de processos industriais relativamente simples e ser facilmente convertido em várias substâncias por processos químicos e bioquímicos. Esses fatores somados determinam o imenso potencial agrícola e industrial do amido (HIZUKURI et al. 1997).

As indústrias alimentícias são as maiores consumidoras de amido, entretanto, este polímero é usado também em um grande número de processos industriais destacando-se seu uso pelas indústrias química e têxtil (ATICHOKUDOMCHAI; SHOBSNGOB; VARAVINIT, 2000). Apenas pequena porcentagem do amido produzido no mundo é usada em sua forma nativa, pois, para se ajustar a específicos processos industriais, a maior parte é quimicamente modificada. No entanto, com o crescente interesse na utilização de matérias-primas naturais, tanto da parte das indústrias como dos consumidores, surge a necessidade de buscar novas e não convencionais fontes de amidos nativos (SANTACRUZ, et al., 2002). Países tropicais, como o Brasil, apresentam enorme variedade de culturas amiláceas ainda pouco exploradas quanto as suas características estruturais e propriedades físico-químicas.

A hidrólise ácida do amido é uma técnica importante e vem sendo utilizada no estudo da estrutura cristalina dos grânulos. O tratamento do amido com solução de H₂SO₄ 15%

produz uma fração ácido-resistente, composta por dextrinas de baixa massa molar, conhecidas como dextrinas Naegeli. Durante a hidrólise ácida, as regiões amorfas dos grânulos de amido são rapidamente degradadas, enquanto que as regiões cristalinas são lentamente hidrolisadas pelo ácido. Com isso, a estrutura interna dos grânulos é revelada, auxiliando a compreensão das diversas propriedades físico-químicas de amidos de diferentes fontes botânicas.

1.2 FONTES DE AMIDOS TROPICAIS

As fontes comerciais de amido mais importantes são os grãos de cereais, apresentando de 40-90% do peso seco constituído por amido, os grãos de leguminosas, com 30-70% e os tubérculos e raízes de 65-85% (FRANCO et al., 2001). Atualmente, as fontes comerciais de amido no mundo são cinco: milho, mandioca, batata, trigo e arroz. As culturas de tubérculos e raízes são muito ricas em amido e constituem fontes aproveitáveis de carboidratos. Estudos das propriedades de diferentes amidos de tubérculos e raízes revelam a ampla variedade dessas propriedades, as quais não são encontradas em amidos de cereais (MOORTHY, 1996).

Dentre as culturas amiláceas tropicais mais comuns, a que merece destaque é a mandioca (*Manihot esculenta*), sendo o Brasil o segundo maior produtor, cuja produção comercial existe em grande escala nos países de clima tropical e subtropical, mas também existem outras fontes de amidos tropicais importantes, como a araruta (*Maranta arundinacea*), a mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) e a batata-doce (*Ipomoea batatas*) (LEONEL; CEREDA, 2002).

A batata (*Solanum tuberosum*) é originária dos Andes peruanos e bolivianos onde é cultivada há mais de 7.000 anos. A batata foi introduzida na Europa antes de 1520 e sua difusão em outros continentes ocorreu através da colonização realizada pelos países europeus, inclusive no Brasil. Atualmente a batata é o 4º alimento mais consumido no mundo, após arroz, trigo e milho (ABBA, 2009). O amido de batata é amplamente usado em alimentos e aplicações industriais, sendo de grande importância econômica nos Estados Unidos e Europa.

A batata-doce (*Ipomoea batatas*), planta originária da América tropical, é uma das tuberosas mais populares do Brasil, sendo consumida na forma assada ou cozida e industrializada na forma de doces (LEONEL; CEREDA, 2002). A batata-doce é a terceira tuberosa mais cultivada no mundo, com destaque para a Ásia, onde a batata-doce é utilizada em uma variedade de alimentos e aplicações industriais (MCPHERSON; JANE, 1999).

Originária dos Andes, a mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) é cultivada principalmente em áreas de elevada altitude e clima ameno como Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo e São Paulo, onde ocorrem condições climáticas similares ao seu local de origem (SANTOS, 1993). A mandioquinha-salsa ou batata-baroa é uma raiz de uso culinário no Brasil. A colheita é realizada, normalmente, aos 11-12 meses de plantio. A mandioquinha-salsa é considerada de fácil cozimento, sendo recomendada em dietas para crianças e idosos devido ao seu conteúdo de cálcio e fósforo (65 e 55 mg/100g material fresco) (LEONEL; CEREDA, 2002).

Plantações de raízes e tubérculos são cultivadas em todo planeta principalmente nas regiões tropicais, onde o clima é quente e úmido. Os tubérculos e raízes são eminentemente calóricos, razão pela qual são considerados alimentos de subsistência, capazes de proporcionar energia a populações carentes. São constituídos aproximadamente de 70-80% de água, 16-24% de amido e quantidades traços (< 4%) de proteínas e lipídios. Raízes e tubérculos são cultivados para fins alimentícios há muitos anos, por exemplo: batata (*Solanum tuberosum*), batata-doce (*Ipomea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), entre outras. Com isso as propriedades agronômicas e fenotípicas dessas culturas tropicais são bem documentadas. No entanto, a estrutura e as propriedades físico-químicas desses amidos ainda não foram totalmente estudadas. (HOOVER, 2001).

Para a introdução de uma nova matéria-prima nas indústrias produtoras de amido é preciso levar em conta a parte agrícola da cultura, a composição físico-química da porção a ser processada e os resíduos gerados. Sob o ponto de vista tecnológico, a presença de outros componentes, além do amido na matéria-prima, deve ser considerada. Estes compostos podem interferir no processo de extração do amido, alterando o rendimento final, como é o caso das fibras, proteínas e lipídeos (LEONEL; CEREDA, 2002)

A importância da cultura da mandioca está na extração de seu amido, que decanta rapidamente e proporciona bons rendimentos, sendo livres de impurezas e corantes, ao contrário do amido de outras fontes botânicas que contêm proteínas, lipídeos e pigmentos. Comparando com o amido de mandioca, o de batata-doce demora para decantar e seu rendimento é mais baixo, apresentando geralmente a cor mais escura devido à presença de compostos quinólicos produzidos pela oxidação de substâncias fenólicas presentes nas raízes. (MOORTHY, 1996).

Os grânulos de amido de mandioca são geralmente arredondados, alguns apresentam uma face plana contendo um carço cônico que se estende a um hilo excêntrico muito bem

definido. Sob a luz polarizada uma cruz bem definida é observada (MOORTHY, 1996). O diâmetro desses grânulos pode variar de 3-30 μ m (SANGUAPONG et al., 2003). O amido de mandioca apresenta padrão de raios X tipo-A (ATICHOKUDOMCHAI et al. 2001; FRANCO; CABRAL; TAVARES, 2002), entretanto relatos recentes mostram polimorfismo tipo-C_A (ROCHA, 2009). O teor de amilose é variável de 17-30% (NAKAZAWA; WANG, 2003; VERMEYLEN et al., 2004; SHARIFFA et al., 2009).

O amido de batata, já bem estudado, apresenta grânulos grandes característicos com formatos arredondados ou ovais e superfície lisa. O diâmetro desses grânulos varia de 10-100 μ m (YOO et al., 2009). É de conhecimento que o amido de batata possui polimorfismo tipo-B (MCPHERSON; JANE, 1999; VERMEYLEN et al., 2004; YOO et al., 2009), e o teor de amilose varia de 14-38%, dependendo da espécie, condições climáticas e de cultivo (MCPHERSON; JANE, 1999; VERMEYLEN et al., 2004; GUNARATNE; CORKE, 2007).

O amido da batata-doce apresenta grânulos com formato poligonal, quase redondo, variando de 2-42 μ m, com o hilo centrado e distinto (HIZUKURI, 1985; MCPHERSON; JANE, 1999; HOOVER, 2001;). O polimorfismo do amido de batata-doce varia de acordo com a variedade e condições climáticas (HIZUKURI, 1985) podendo apresentar padrões dos tipos A, C ou C_A (MCPHERSON; JANE, 1999; HOOVER, 2001; SHARIFFA et al., 2009). Os teores de amilose já relatados variam de 16-33% (MOORTHY, 1996; MCPHERSON; JANE, 1999; VIEIRA; SARMENTO, 2008).

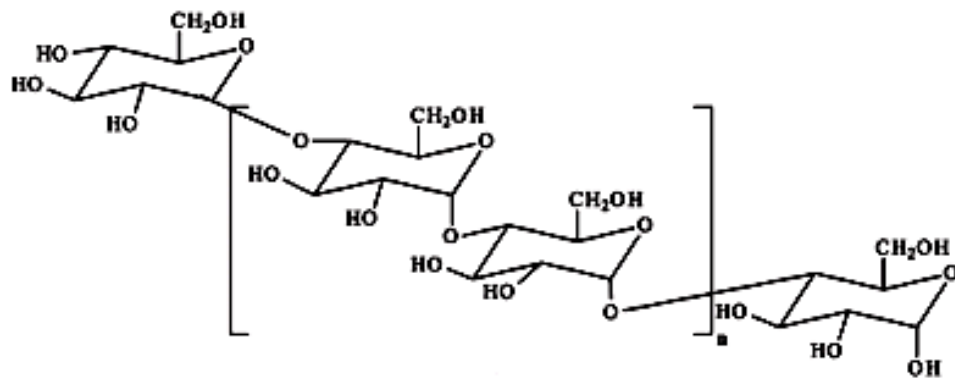
O amido de mandiocinha-salsa apresenta baixa temperatura de gelatinização e alta viscosidade de pico, sendo suscetível ao atrito mecânico. Também possui baixa tendência à retrogradação e sinérese, o que contribui para sua alta digestibilidade (ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008). Os grânulos desse amido são arredondados e irregulares, com diâmetro variando de 7-23 μ m (SANTACRUZ et al., 2002). Apresentam padrão de raios X tipo-B e teor de amilose variando de 18-22% dependendo da variedade (ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008; VIEIRA; SARMENTO, 2008).

1.3 ESTRUTURA GRANULAR

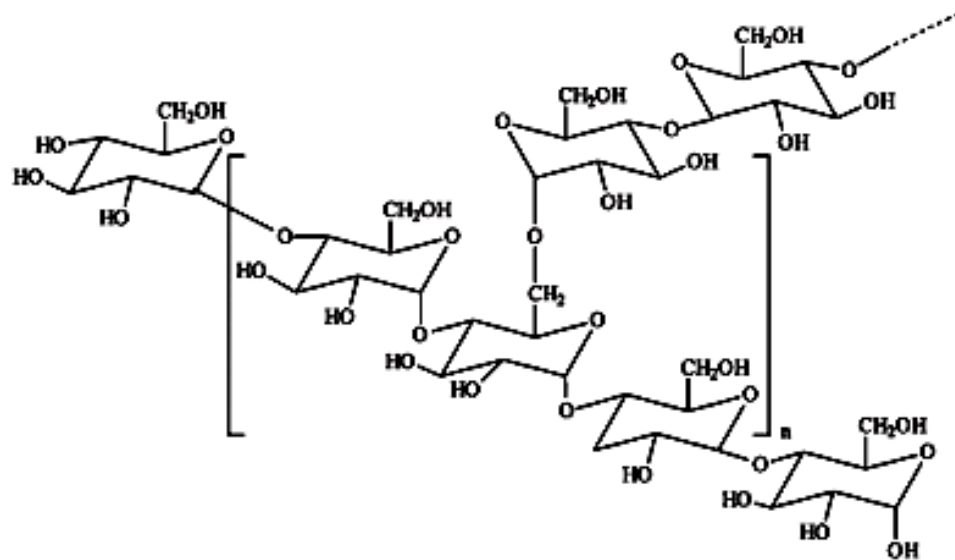
O amido ocorre naturalmente como grânulos insolúveis em água, cujo formato é característico da fonte botânica de origem (SINGH et al., 2003). Quando vistos sob luz polarizada, os grânulos são birrefringentes (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997). Como o índice de refração radial é maior do que o índice de refração tangencial, foi proposto

que as cadeias das moléculas apresentam preferencialmente orientação radial (MORRISON, 1995; BULÉON et al. 1998; PARKER; RING, 2000; JANE, 2006).

O amido é um polissacarídeo constituído apenas de resíduos de α -D-glicose, sendo assim considerado um homopolissacarídeo. Entretanto, sua estrutura primária é complexa e ainda não está totalmente entendida (BULÉON et al. 1998). As propriedades funcionais dos amidos diferem de uma fonte para outra, devido às diferenças em suas estruturas moleculares que afetam diretamente as estruturas maiores, como as camadas cristalinas e semicristalinas dos grânulos (HIZUKURI et al. 1997).



(a)



(b)

Figura 1.1 Estrutura parcial das cadeias de (a) amilose, (b) amilopectina.

Os dois principais componentes do amido, amilose e amilopectina, são formados por resíduos de D-glicose unidos por ligações α -(1→4) e ligações α -(1→6) nos pontos de ramificação (GIDLEY; BOCIEK, 1985; BULÉON et al. 1998), como apresentado na Figura 1.1. As ligações glicosídicas são numeradas de acordo com a cadeia carbônica do anel. A extremidade da cadeia polimérica que possui o carbono anomérico livre é denominada de extremidade redutora da molécula, a unidade de glicose da extremidade oposta, é denominada não-redutora.

A amilopectina é uma molécula altamente ramificada, enquanto que a amilose apresenta poucas ramificações (GIDLEY; BOCIEK, 1985; HIZUKURI et al. 1997; TESTER, 1997; BULÉON et al. 1998; JANE, 2006). A funcionalidade do amido assim como a organização física da estrutura granular é atribuída a estes dois polímeros. Em geral os amidos apresentam 15-30% de amilose, no entanto existem algumas variedades que podem produzir essencialmente 100% de amilopectina (ceroso) e outras mais de 75% de amilose (alta amilose) (GIDLEY; BOCIEK, 1985).

Nas células vegetais, os grânulos são formados dentro de estruturas especiais denominadas amiloplastos, envolvidos por uma matriz protéica, o estroma. Apresentam diversas formas tridimensionais e variam quanto ao tamanho, de menos de 1 μ m a mais de 100 μ m, dependendo da origem botânica. Os grânulos são compostos por um denso empacotamento dos polissacarídeos, amilose e amilopectina, e uma quantidade relativamente pequena de água. (GIDLEY; BOCIEK, 1985; TESTER, 1997).

À medida que a planta sintetiza as moléculas de amilose e amilopectina, estas se depositam em sucessivas camadas ao redor de um ponto central, chamado hilo, formando um grânulo compacto. Os anéis de crescimento, que podem ser observados nos amidos a partir de microscopia, compreendem camadas amorfas, relativamente largas e concêntricas, intercaladas com camadas mais ou menos densas, contendo lamelas alternadas de material cristalino e amorfo. Os anéis de crescimento representam o crescimento periódico dos grânulos dependente das variações na disponibilidade de carboidrato para a deposição de amido. Com um alto fornecimento de carboidrato o resultado é um denso empacotamento das moléculas de amido, enquanto que com baixa disponibilidade de carboidratos o empacotamento é menos denso (TESTER, 1997).

Estudos realizados por Singh et al. (2007) mostraram diferenças significativas na proporção de amilose, frações intermediárias, cadeias laterais curtas e cadeias laterais longas de amilopectina, entre amidos de arroz de diferentes espécies e que essas diferenças implicam

em variações em suas funcionalidades. Ressaltando, com isso a importância do conhecimento das características estruturais de amidos de diferentes fontes botânicas.

1.3.1 Amilose

A amilose é uma molécula predominantemente linear compreendendo ligações α - $(1\rightarrow4)$ com uma pequena quantidade de ligações α - $(1\rightarrow6)$ (BULÉON et al. 1998; HIZUKURI et al. 1997; TESTER, 1997). A amilose é uma molécula menor que a amilopectina com massa molar de cerca de 500.000 g/mol, apresentando grau de polimerização (GP) variável de acordo com a origem botânica e estágio de crescimento (TESTER, 1997). A amilose co-cristalizada com compostos como iodo, DMSO, alcoóis e ácidos graxos é denominada amilose-V (BULÉON et al. 1998). Quando complexada com iodo, a amilose apresenta coloração azul, portanto métodos colorimétricos podem ser empregados na sua determinação.

Alguns autores (HIZUKURI et al. 1997; BULÉON et al. 1998) acreditam que existam nos grânulos de amido algumas moléculas de amilose estritamente lineares e outras com ramificações. Hizukuri et al. (1997) encontraram de 2 a 8 pontos de ramificação por molécula, com cada ramificação podendo conter de 4 a mais de 100 unidades glicosídicas. Através do fracionamento das dextrinas β -limite, esses autores concluíram que a amilose ramificada possui alguns pequenos *clusters* de cadeias menores. As ramificações são separadas por grandes distâncias, permitindo às moléculas de amilose ramificadas agirem como se fossem essencialmente lineares, não alterando significativamente seu comportamento em solução em relação às moléculas de amilose lineares e apresentando a mesma reação com iodo, diferenciando-se da amilopectina. (BULÉON et al. 1998). O número de ramificações das moléculas de amilose depende do tamanho molecular e da fonte botânica do amido. Amidos de cereais possuem amilose com tamanhos moleculares menores do que amidos de raízes e tubérculos (JANE, 2006).

A molécula de amilose se apresenta na forma helicoidal cujo interior é lipofílico contendo predominantemente átomos de hidrogênio, enquanto as hidroxilas permanecem na parte externa da hélice. A amilose é considerada como sendo amorfa nos grânulos de amidos normais, no entanto em amidos com alto teor de amilose, esse polímero apresenta o potencial de desenvolver duplas hélices formando uma estrutura cristalina (TESTER, 1997; SINGH et al., 2003; JANE, 2006). Essas duplas hélices também podem ser observadas durante a retrogradação da amilose em soluções aquosas diluídas.

As proporções de amilose e lipídeo aumentam durante a deposição dos grânulos, criando um gradiente de concentração de amilose e lipídeo do hilo para a periferia do grânulo (TESTER, 1997). Amidos de cereais possuem duas formas amorfas de amilose: amilose livre de lipídeos e a amilose complexada com lipídeos. Na amilose complexada com lipídeos, a cadeia de amilose está enrolada aos monoacil lipídeos (TESTER, 1997). Durante a gelatinização de amidos granulares, acompanhada em Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC), observam-se duas endotermas. A primeira depende da cristalinidade do grânulo de amido e a segunda está relacionada com o complexo amilose-lipídeo (TANG; WATANABE; MITSUNAGA, 2002). A Figura 1.2, mostra a região alifática do ácido graxo, formando um núcleo hidrofóbico no interior da hélice da amilose (conformação-V) (BULÉON et al. 1998). A presença desses complexos de inclusão nos grânulos de amido afeta suas propriedades tecnológicas, protege os ácidos graxos insaturados da oxidação, assim como tornam a amilose menos suscetível à hidrólise por α -amilase (TESTER, 1997).

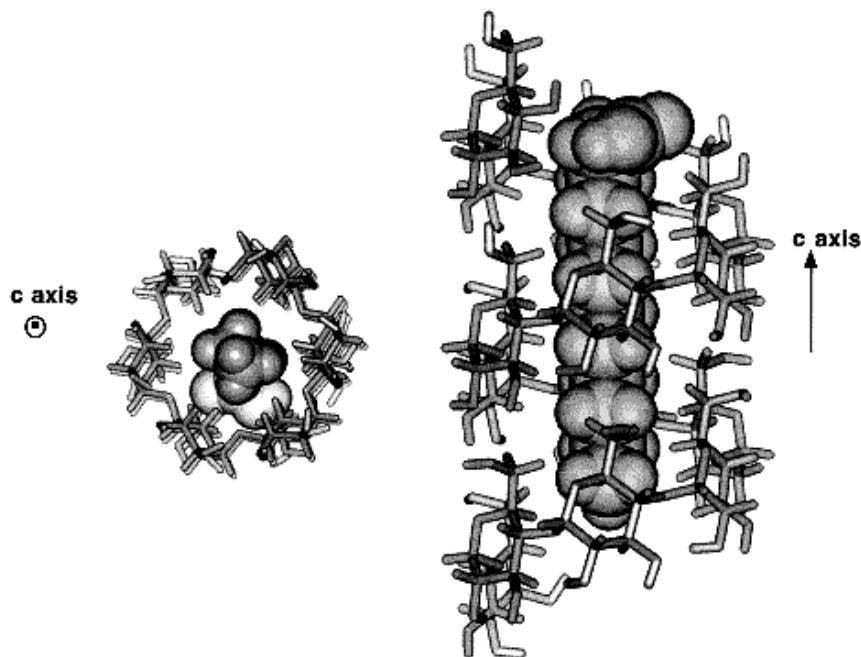


Figura 1.2 Representação do modelo molecular do complexo amilose-lipídeo, mostrando a inclusão da região alifática no interior da única hélice da amilose. Adaptado de Buléon et al. (1998).

Segundo Jane (2006), a amilose é comumente encontrada entremeada e entrelaçada com a amilopectina, mas pode também estar separada da amilopectina e se apresentar em feixes. No entanto, quando estão juntas, é a amilose que mantém as moléculas de

amilopectina unidas durante uma transição térmica, mantendo com isso a integridade dos grânulos de amido. Sobre a localização da amilose e da amilopectina no grânulo de amido, Jane (2006) observou que a amilose se encontra em maior concentração na periferia dos grânulos, enquanto a amilopectina está distribuída por todo o grânulo.

Assim como outros polímeros lineares, as moléculas de amilose possuem forte tendência à retrogradação. Em uma solução aquosa, as moléculas de amilose se associam e formam agregados moleculares que rapidamente excedem as dimensões coloidais e precipitam ou formam gel. Essa tendência apresenta dependência com tamanho molecular e concentração de amilose, temperatura, pH e a presença de outros compostos em solução (LU; JANE; KEELING, 1997).

A amilose retrogradada é uma mistura de regiões cristalinas e amorfas apresentando padrão de raios-X tipo-B. A região cristalina é resistente às hidrólises ácida e enzimática. Os cristais da amilose retrogradada apresentam conformação de duplas hélices, similares à estrutura cristalina no grânulo de amido nativo (LU; JANE; KEELING, 1997).

1.3.2 Amilopectina

A amilopectina é uma molécula de alta massa molar (10^8 a 10^9 g/mol) que se estende do hilo para a periferia do grânulo de amido e é formada por pequenas cadeias lineares de glucanas α -(1 \rightarrow 4) ligadas entre si nos chamados pontos de ramificação por ligações α -(1 \rightarrow 6) (HANASHIRO; ABE; HIZUKURI, 1996; HIZUKURI et al. 1997; TESTER, 1997; BULÉON et al. 1998; JANE, 2006). Em presença de iodo a amilopectina apresenta uma coloração avermelhada e é estável em soluções aquosas diluídas.

Uma molécula de amilopectina consiste de uma cadeia principal C, que carrega a única extremidade redutora desse polissacarídeo, e numerosas ramificações denominadas cadeias A e B (HIZUKURI et al. 1997), como mostra a Figura 1.3. As cadeias mais periféricas, que não carregam nenhuma ramificação, são chamadas de cadeias A. As cadeias B são ramificadas, apresentando uma ou mais cadeias A ou B ligadas a elas. As cadeias B podem ser classificadas como B₁-B₄ dependendo do número de *clusters* que a cadeia faz parte (Figura 1.3). O comprimento médio das cadeias A, B₁, B₂, B₃ e B₄ gira em torno de 12-16, 20-24, 42-48 e 69-75 respectivamente (TESTER, 1997).

A distribuição de comprimento de cadeias da amilopectina é um dos mais importantes parâmetros para o entendimento da relação entre a estrutura química e as propriedades

funcionais de amido (WONG; JANE, 1997). Enzimas desramificantes como isoamilase e pululanase são usadas para hidrolisar as ligações α -(1 \rightarrow 6) e fornecer pequenas cadeias lineares que são denominadas: S para as cadeias curtas, consistindo das cadeias A e B mais externas, com um GP variando de 14 a 18; L para as cadeias longas, consistindo das cadeias B mais internas de GP 45 a 55, e umas poucas cadeias B com GP acima de 60 (BULÉON et al., 1998).

Correlações significativas entre as características estruturais e as propriedades físico-químicas foram observadas por Kong et al. (2008). Esses autores verificaram que as distribuições do comprimento de cadeia das amilopectinas foram particularmente correlacionadas com as propriedades térmicas e de pasta dos amidos. No entanto, quando estudaram as características estruturais das dextrinas β -limite, verificaram que apenas as cadeias B₃ estavam correlacionadas com as propriedades físico-químicas dos amidos estudados.

As propriedades físico-químicas do amido são largamente governadas pela razão de amilose e amilopectina e pela distribuição das cadeias nessas moléculas (KOCH; ANDERSSON; ÅMAN, 1998). Muitas técnicas têm sido aplicadas para o estudo da distribuição do comprimento das cadeias da amilopectina, sendo as mais comuns: cromatografia de permeação em gel (GPC e HPSEC) (FRANCO; CIACCO; TAVARES, 1998; BERTOFT; KOCH, 2000; CROCHET et al., 2005; YOO et al., 2009), cromatografia de troca iônica de alta eficiência (HPAEC) (WONG; JANE, 1997; SONG; JANE, 2000; FRANCO et al. 2002; BERTOFT, 2007), e eletroforese capilar assistida por fluorescência (SRICHUWONG et al. 2005)

Robin et al. (1974) confirmando o modelo de *cluster* proposto por French (1972) através de estudo enzimático e cromatografia em gel de amido de batata lintnerizado, concluíram que a molécula de amilopectina possui uma estrutura organizada esquematizada na Figura 1.3. As cadeias B poderiam se estender por dois ou mais *clusters*, cada *cluster* seria formado pela associação de 2 ou 3 cadeias A. Em tal modelo, os *clusters* formados por cadeias A com 60 Å de comprimento, constituiriam uma camada cristalina com 60 Å de espessura na direção axial das cadeias. Os *clusters* de uma mesma camada estariam associados e compreenderiam a fração ácido-resistente dos grânulos de amido. As áreas entre os sucessivos *clusters* ou entre as camadas cristalinas conteriam a maioria das ligações α -(1 \rightarrow 6) e seriam mais suscetíveis ao ataque ácido. As ligações α -(1 \rightarrow 6) mais envolvidas nas camadas cristalinas seriam, portanto, menos suscetíveis ao ácido.

As cadeias A e as cadeias B menores da amilopectina são encontradas em discretos *clusters* dentro da molécula e estão unidas na base desses *clusters* por ligações α -(1 \rightarrow 6). As cadeias nos *clusters* durante a deposição do amido formam prontamente duplas hélices as quais são estabilizadas por ligações de hidrogênio intermoleculares. Quando essas duplas hélices se empacotam de forma ordenada formam lamelas cristalinas concêntricas, que são intercaladas com material amorfo formado por regiões de ramificações α -(1 \rightarrow 6) (TESTER, 1997).

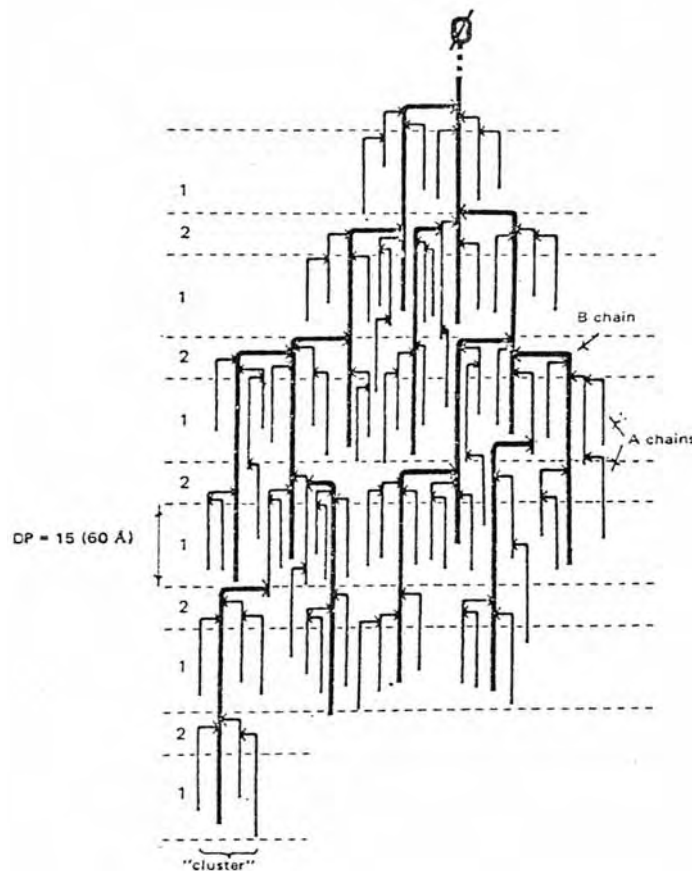


Figura 1.3 Estrutura proposta para amilopectina de batata. 1 = área compacta; 2 = área menos compacta, rica em pontos de ramificação; Ø = extremidade redutora. Adaptado de Robin et al. (1974).

Gallant, Bouchet e Baldwin (1997) através de estudos com microscopia de amidos lintnerizados sugeriram um novo modelo de *clusters* para a amilopectina e uma estrutura lamelar para o grânulo de amido. Observaram que as regiões cristalinas são predominantemente localizadas nas camadas mais compactas (120-400 nm de espessura) dos grânulos e são compostas por pilhas de lamelas cristalinas. Essas lamelas apresentam em

média 9-10 nm de espessura, embora nem sempre sejam retas, paralelas ou com espessura uniforme. Acredita-se que as lamelas cristalinas consistam de *clusters* formados pelas duplas hélices das cadeias laterais da amilopectina, alternados com lamelas amorfas formadas pelas regiões de ramificação da amilopectina. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das lamelas cristalinas indicam que as regiões entre os *clusters* sejam de natureza amorfa, portanto a lamela cristalina não é contínua (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997), como mostrado no esquema da Figura 1.4.

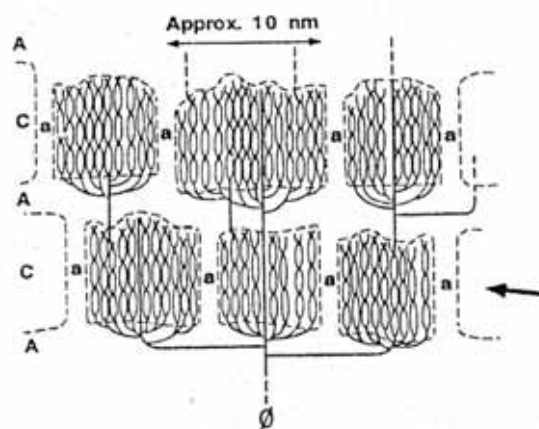


Figura 1.4 Diagrama esquemático dos *clusters* de cadeias laterais de amilopectina na lamela cristalina. C, lamela cristalina; A, lamela amorfa; a, regiões amorfas entre os *clusters* cristalinos. Adaptado de Gallant, Bouchet e Baldwin (1997).

Gidley e Bociek (1985) observaram através de estudos de RMN ^{13}C que a extensão da estrutura helicoidal da amilopectina é significativamente maior que a cristalinidade nos grânulos de amido, portanto parte das cadeias de amilopectina está na conformação helicoidal, mas não apresenta cristalinidade. Este fato demonstra que a camada cristalina do grânulo de amido consiste de lamelas amorfas e cristalinas alternadas (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

Partindo desse pressuposto, Gallant, Bouchet e Baldwin (1997) sugeriram que as lamelas amorfas e cristalinas da amilopectina são organizadas em estruturas maiores, mais ou menos esféricas, que são chamadas de bloquetes, representados na Figura 1.5. O diâmetro desses bloquetes varia de 20 a 500 nm dependendo da fonte botânica do amido e da sua localização no grânulo.

Na camada semicristalina a amilopectina se encontra predominantemente na conformação de dupla hélice; no entanto, sua cristalinidade é reduzida, possivelmente devido

ao aumento da sua interação com a amilose. Essa camada é formada pelos bloquetes de menor tamanho (20-50 nm de diâmetro) o que indica uma menor organização cristalina (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

As diversas localizações de frações amorfas apresentam diferentes funções no grânulo de amido. Acredita-se que a fração formada pela zona de ramificação que está localizada entre cada lamela cristalina, teria a função de promover coesão entre as pilhas de cristais, enquanto que a região amorfa localizada entre cada *cluster*, promoveria certa flexibilidade às lamelas cristalinas. Ao redor de cada bloquete tanto das camadas cristalinas quanto das semicristalinas, essa fração amorfa promoveria elasticidade ao sistema. Finalmente, teria a região amorfa dos canais radiais pelos quais a amilose seria lixiviada dos grânulos durante a gelatinização (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

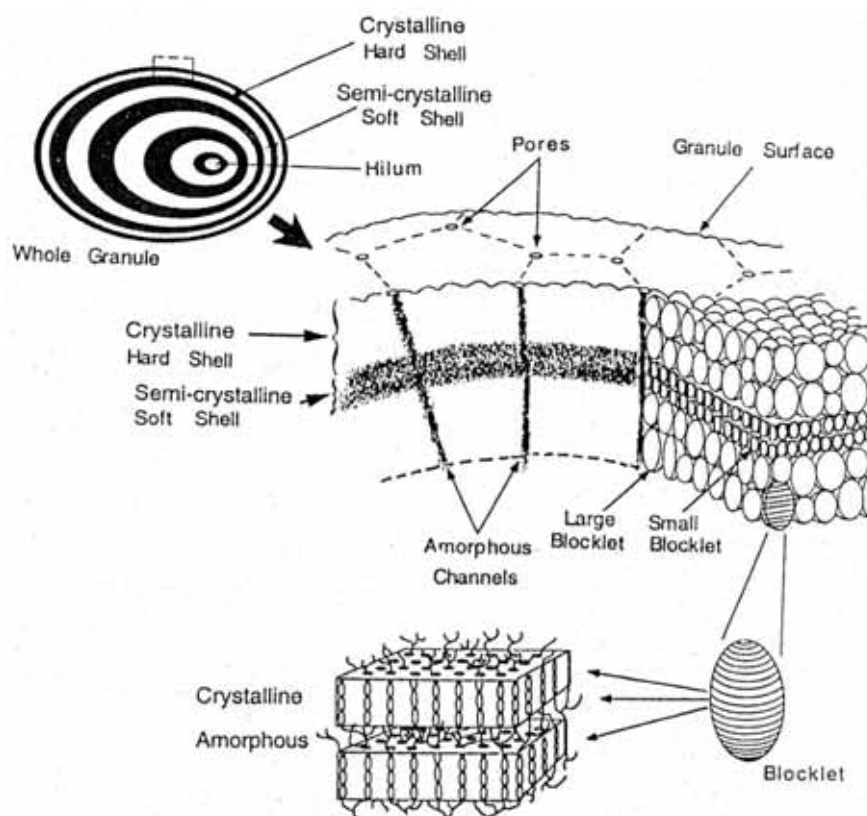


Figura 1.5 Representação esquemática da estrutura do grânulo de amido. Adaptado de Gallant, Bouchet e Baldwin (1997).

Estudos de gelatinização química da superfície dos grânulos de amidos mostraram que os grânulos remanescentes obtidos após extensiva gelatinização apresentaram maior

cristalinidade relativa e maiores temperaturas de gelatinização, sugerindo que a estrutura das amilopectinas do núcleo é diferente da estrutura das amilopectinas encontradas na periferia do grânulo de amidos (HUANG et al., 2010).

Todas essas teorias a respeito da estrutura interna dos grânulos de amido partem do princípio de que somente a molécula de amilopectina estaria envolvida no componente cristalino. E está claro que, para um melhor entendimento do empacotamento nos grânulos é necessário um maior detalhamento sobre a arquitetura da molécula de amilopectina e do papel dela e da amilose na estrutura granular.

1.4 ESTRUTURA CRISTALINA

Grânulos de amido apresentam estruturas cristalinas com padrões de difração de raios-X específicos, sendo classificados como dos tipos A, B ou C. O padrão cristalino do tipo C é provavelmente a mistura dos tipos A e B em diversas proporções, podendo ser classificada como C_A, C_B e C de acordo com sua proximidade com os padrões A ou B. (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997; HIZUKURI et al. 1997). Estes padrões de cristalinidade são variáveis com as fontes vegetais. O padrão A é característico do amido de cereais, o padrão B do amido de tubérculos, frutas, milho com alto teor de amilose e dos amidos retrogradados, e o padrão C do amido de leguminosas (TESTER, 1997).

As partes lineares das cadeias de amilose e amilopectina formam hélices com seis moléculas de glicose em cada ciclo, como mostrado na Figura 1.6.

Tanto as cadeias de amilose quanto as cadeias exteriores da amilopectina podem formar duplas hélices, que podem se associar e formar regiões cristalinas (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). As ligações α -(1→6) são pontos de ruptura para a formação da dupla hélice e somente duplas hélices curtas podem ser formadas com as partes lineares da molécula de amilopectina. No entanto, os pontos de ramificação não induzem defeitos extensos na estrutura de dupla hélice (Figura 1.6C). Por outro lado na amilose, constituída principalmente de cadeias lineares, as hélices podem estar constituídas de 120 unidades de glicose, apresentando conformação de hélice simples inversa com 6 unidades de glicose por ciclo (BULÉON et al., 1998).

Os padrões de difração de amidos nativos são difíceis de interpretar devido à pobre cristalinidade e à complexidade da estrutura molecular. Por esse fato muitos modelos estruturais de amidos são estabelecidos a partir de estudos com amilose recristalizada

(BULÉON et al., 1998). A utilização de dados de difração de raios-X de cadeias de amilose contribuiu, portanto, para a interpretação dos espectros de difração de amidos nativos.

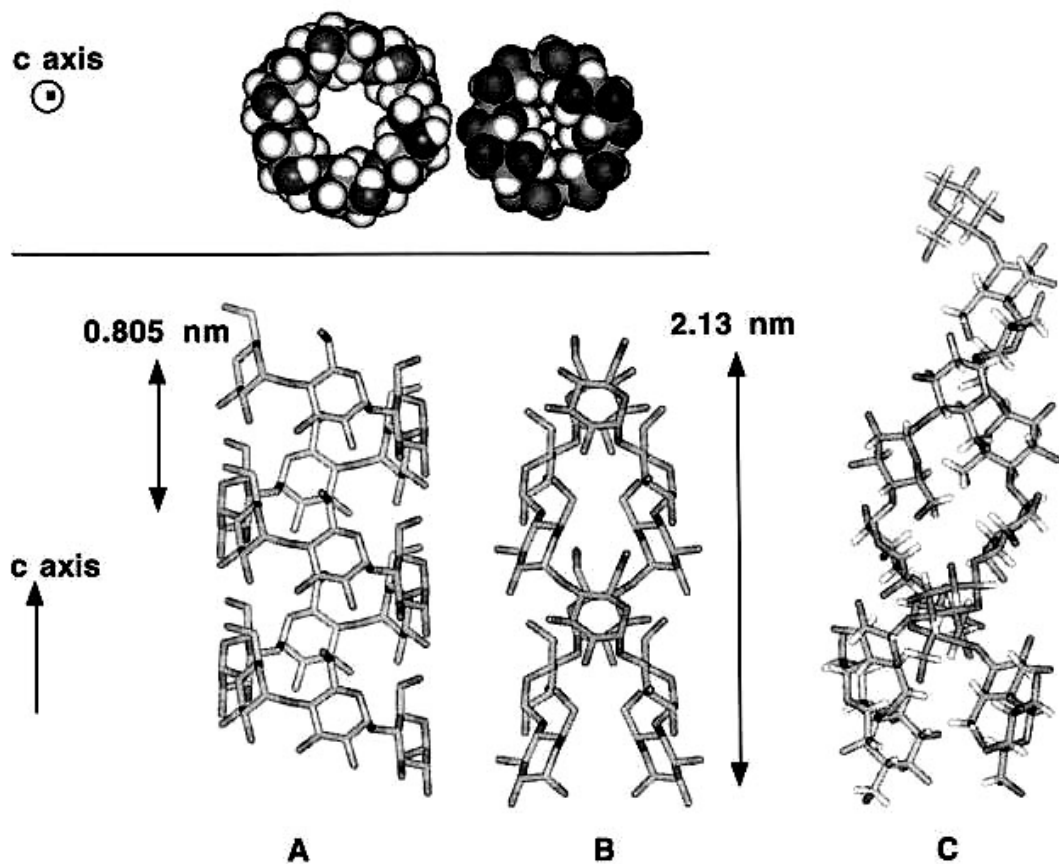


Figura 1.6 Conformação helicoidal dos componentes do amido: (A) hélice simples com seis anéis glicosídicos por ciclo (ciclo = 0,805nm); (B) dupla hélice invertida com sei anéis glicosídicos por ciclo (ciclo = 2,13nm); (C) dupla hélice entre duas cadeias curtas na amilopectina. A visão superior dos modelos revela uma cavidade no centro da hélice simples, ausente na dupla hélice. Adaptado de Buléon et al. (1998).

Wu e Sarko (1978) citados por Gidley e Bociek (1985) demonstraram, a partir de estudos de difração de raios-X, que as estruturas cristalinas tipo A e B contêm arranjos ordenados de duplas hélices formadas por ramificações da amilopectina adjacentes. Essas duas estruturas diferem quanto ao empacotamento cristalino dessas duplas hélices e à quantidade de água. Na estrutura tipo A, essas duplas hélices empacotam apresentando grupo espacial B_2 com célula unitária monoclínica ($a=2,124\text{nm}$, $b=1,172\text{nm}$, $c=1,069\text{nm}$, $\gamma=123,5^\circ$) e oito moléculas de água por célula unitária (Figura 1.7A). Na estrutura tipo B, as duplas hélices empacotam apresentando grupo espacial $P6_1$ com célula unitária hexagonal

($a=b=1,85\text{nm}$, $c=1,04\text{nm}$) e 36 moléculas de água por célula unitária (Figura 1.7B) (BULÉON et al., 1998).

Gidley e Bociek (1985) mostraram que a conformação das duplas hélices não envolve os pontos de ramificação, portanto existem dois tipos de estrutura na amilopectina, cadeias simples (região amorfa) e duplas hélices (região cristalina) e essa conformação é a mesma para os padrões de difração tipos A e B.

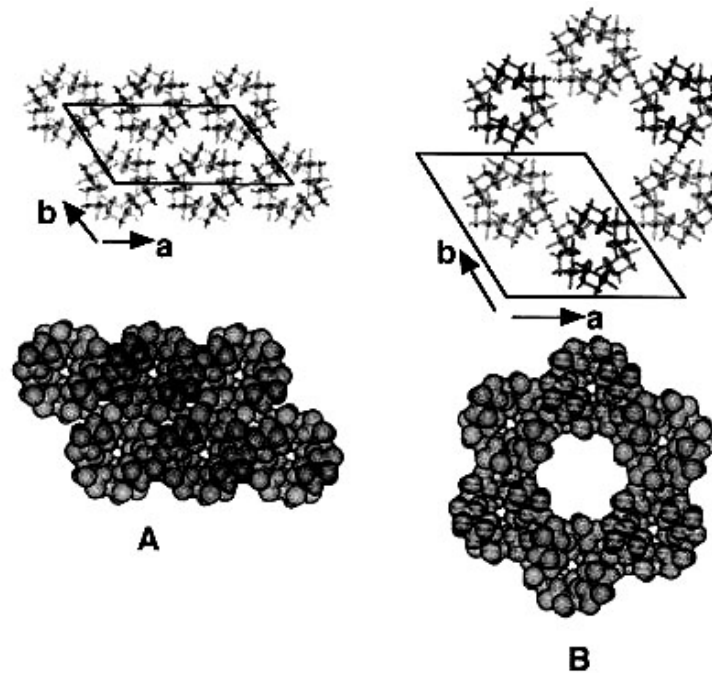


Figura 1.7 Empacotamento cristalino das duplas hélices de amilose tipo-A (A) e tipo-B (B). Projeção da estrutura no plano (a , b). Adaptado de Buléon et al. (1998).

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

Existem diferenças na distribuição do comprimento de cadeia de amilopectinas de diferentes origens botânicas, sugerindo que um mecanismo de controle, que difere ligeiramente entre as espécies, esteja envolvido na biosíntese da amilopectina (HANASHIRO; ABE; HIZUKURI, 1996). A formação dessas estruturas cristalinas é determinada primariamente pelo comprimento médio de cadeia da amilopectina e sofre influência da temperatura ambiental (HIZUKURI et al. 1997).

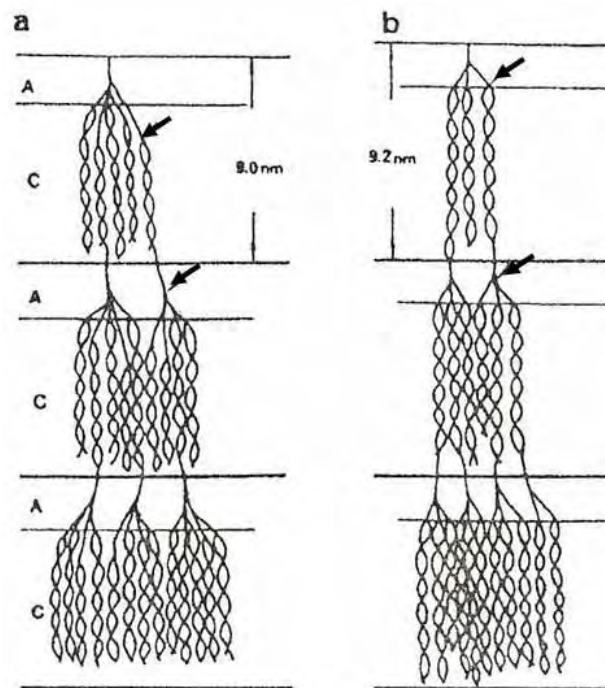


Figura 1.8 Modelo proposto para os padrões de ramificação de (a) amido de milho ceroso, que apresenta padrão de raios-X tipo-A, e (b) amido de batata que apresenta padrão de raios-X tipo-B. 'A' representa as regiões amorfas e 'C' as regiões cristalinas. Adaptado de Jane, Wong e McPherson (1997).

O comprimento da cadeia de amilopectina é um fator intrínseco que determina a estrutura cristalina dos grânulos de amido. As moléculas de amilopectina dos amidos com polimorfismo tipo-B possuem maior comprimento de cadeia, tanto na fração de cadeias longas quanto na de cadeias curtas, do que os amidos com polimorfismo tipo-A (CHEETHAM; TAO, 1997). Os dois tipos apresentam uma maior resistência à variações de temperatura durante o desenvolvimento da planta, ou seja, suas estruturas cristalinas são mantidas. Já amidos do tipo-C que apresentam comprimentos de cadeias intermediários são

bem mais sensíveis a essas variações de temperatura, podendo ter sua estrutura cristalina alterada (HIZUKURI, 1985).

Os amidos com padrão tipo A apresentam as ramificações mais dispersas; e algumas ramificações estão localizadas na região cristalina, enquanto que outras na região amorfa. As ramificações encontradas na região cristalina ficam protegidas durante a hidrólise ácida. Com as ramificações dispersas, os amidos com padrão tipo A apresentam distâncias mais curtas entre os pontos de ramificação do que os amidos com padrão tipo B, como representado pelas setas na Figura 1.8. Esse fato sugere que a estrutura tipo A possua as cadeias-A mais curtas, derivadas das ramificações localizadas na região cristalina, formando uma estrutura cristalina inferior. Essa estrutura, contendo os pontos de ramificações e as duplas hélices de cadeias curtas, é, portanto, mais susceptível à hidrólise enzimática devido aos “pontos fracos” dos grânulos de amido com padrão A (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; JANE, 2006).

Além da alta razão entre cadeias curtas e longas, os amidos com padrão tipo A apresentam maior número de ramificações (HIZUKURI, 1985). Se todos os pontos de ramificação fossem aglomerados, essa estrutura formaria uma grande área amorfa. A dispersão dessas ramificações reduz a região amorfa dos grânulos com esse padrão de difração. A estrutura com ramificações dispersas do amido com padrão tipo A também promove mais flexibilidade ao empacotamento das duplas hélices e menor barreira entrópica para o arranjo das duplas hélices, que podem com isso, formar uma célula unitária monoclinica mais densa (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; JANE, 2006).

Nos amidos com padrão tipo B, a maioria das ramificações está aglomerada na região amorfa, sendo mais suscetíveis à hidrólise ácida. Essas estruturas, com ramificações aglomeradas e relativamente menos cadeias curtas, são capazes de desenvolver uma estrutura cristalina mais estável, semelhante à estrutura derivada de moléculas de amilose retrogradada. Deste modo, os cristais de amido do tipo B são mais resistentes à hidrólise enzimática e apresentam a superfície granular lisa e não porosa (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; JANE, 2006). Com razão relativamente pequena entre cadeias curtas e longas, e menor número de ramificações (HIZUKURI, 1985), o amido com padrão tipo B pode apresentar as ramificações aglomeradas sem que uma grande região amorfa seja formada (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; JANE, 2006).

Segundo Srichuwong et al. (2005b), as duplas hélices, formadas por cadeias lineares com GP aproximado de 14, 16 e 15 dos amidos do tipo A, B e C, respectivamente, poderiam alcançar toda a extensão da lamela cristalina. Por esse motivo, a proporção de cadeias

uniramificadas com GP 25, protegidas durante a hidrólise ácida, é maior para os amidos do tipo A do que para os amidos do tipo B e C. Os cristais do tipo A são mais solúveis do que os do tipo B, indicando que a solubilidade é inversamente proporcional ao comprimento das cadeias de amilopectina (CROCHET et al., 2005).

Através de estudos sobre a hidrólise ácida de amidos com padrão de difração tipo B e C, Jiping et al. (2007) e Wang, Yu e Yu (2008) verificaram que o tipo cristalino B não se altera com a hidrólise, enquanto que os grânulos tipo C mudam para o tipo A, com o tempo de tratamento ácido. Segundo esses autores, os cristais com padrão B, presentes nos grânulos tipo C, localizam-se basicamente no centro do grânulo cercado por regiões com maior cristalinidade compostas principalmente pelo polimorfismo A. Thys et al. (2008), verificaram que o tratamento alcalino dos grânulos tipo C também degrada preferencialmente o polimorfismo B.

O tratamento térmico com baixa umidade de amidos também pode causar a alteração do tipo cristalino dos grânulos, com o padrão tipo B mudando para o tipo A (VIEIRA; SARMENTO, 2008). Este tratamento promove o rearranjo das regiões cristalinas do grânulo através da ruptura e recristalização das duplas hélices. Durante essa recristalização, as duplas hélices se movem lateralmente nas lamelas com alta densidade, causando o aumento do eixo helicoidal, promovendo a mudança do tipo cristalino B para A.

1.5 HIDRÓLISE ÁCIDA

A hidrólise ácida é usada para modificar a estrutura granular do amido e produzir amido solúvel. Na indústria, amidos modificados por ácido (milho, milho ceroso, trigo e mandioca) são preparados através do tratamento da pasta de amido (40%, p/v) com HCl ou H₂SO₄ diluídos, a 22-55°C, por vários períodos de tempo (HOOVER, 2000).

Amidos hidrolisados são empregados em diversas indústrias, incluindo os setores de alimentos e têxteis. Mas também são freqüentemente usados em estudos da estrutura dos grânulos de amido (ATICHOKUDOMCHAI; SHOBSNGOB; VARAVINIT, 2000; NAKAZAWA; WANG, 2003; SRICHUWONG et al., 2005; WANG; YU; YU, 2008). Os tratamentos ácidos propostos por Naegeli (1874) e Lintner (1886), citados por Hoover (2000), têm o propósito de dissolver as regiões amorfas, que seriam responsáveis pela insolubilidade do amido em água, revelando a estrutura concêntrica lamelar dos grânulos (ANGELLIER et al., 2004).

Naegeli (1874), citado por Hoover (2000), propôs um tratamento de amido em solução de H_2SO_4 15%, por 30 dias, à temperatura ambiente, obtendo uma fração ácido-resistente que é prontamente solúvel em água quente. Essa fração é conhecida como dextrina Naegeli, uma mistura de dextrinas lineares e ramificadas de baixa massa molar, com grau de polimerização médio de 25-30 (JAYAKODY; HOOVER, 2001).

Lintner (1886), citado por Hoover (2000), descreveu uma modificação ácida em que o amido em suspensão aquosa é tratado com HCl 7,5%, por 7 dias, à temperatura ambiente, produzindo o amido lintnerizado com alta massa molar, que forma uma límpida solução em água quente (JAYAKODY; HOOVER, 2001).

A Figura 1.9 mostra o mecanismo de reação da hidrólise ácida de amidos. O íon hidroxônio (H_3O^+) promove um ataque eletrofílico ao oxigênio da ligação glicosídica α - $(1\rightarrow4)$ (Figura 1.9a). Em seguida, um par de elétrons de uma das ligações carbono-oxigênio se desloca para o átomo de oxigênio (Figura 1.9b) gerando um carbocátion intermediário instável e altamente energético (Figura 1.9c). O carbocátion é um ácido de Lewis, então, conseqüentemente irá reagir com a água, uma base de Lewis (Figura 1.9d), conduzindo à formação de um grupo hidroxila (Figura 1.9e) (HOOVER, 2000).

Através de estudos de raios-X de amidos submetidos à hidrólise ácida, Kainuma e French (1971) e Robin et al. (1974) mostraram que o ataque ácido ocorre preferencialmente na região amorfa do amido, causando o aumento da cristalinidade. A hidrólise da região amorfa dos grânulos de amido seria o primeiro estágio da hidrólise, devido à menor organização das moléculas nessas áreas (CHUNG; LAI, 2006), enquanto que um segundo estágio seria caracterizado por uma lenta hidrólise da região cristalina desses grânulos. Os GPs constantes das cadeias das populações formadas pela lintnerização podem ser explicados pela ausência da degradação do interior dos cristais, sugerindo que a água ou o íon H_3O^+ não pudessem penetrar na camada cristalina, portanto, a erosão da superfície dos cristais ocorreria numa velocidade muito baixa (ROBIN et al., 1974; JACOBS et al., 1998). Muitos fatores podem contribuir para a proteção das regiões cristalinas. O denso empacotamento das cadeias nos cristais não permite a penetração dos íons hidroxônios, independentemente dos efeitos de solvatação. Além disso, as ligações glicosídicas estão localizadas no interior da dupla hélice onde os íons de hidrogênio não podem alcançá-las. Finalmente, para ser hidrolisada, a unidade de glicose precisa sofrer uma mudança em sua conformação de cadeira para meia-cadeira. Essa mudança conformacional requer alta energia de ativação e ocorre muito

lentamente devido à imobilização das unidades glicosídicas na matriz cristalina (ROBIN et al., 1974).

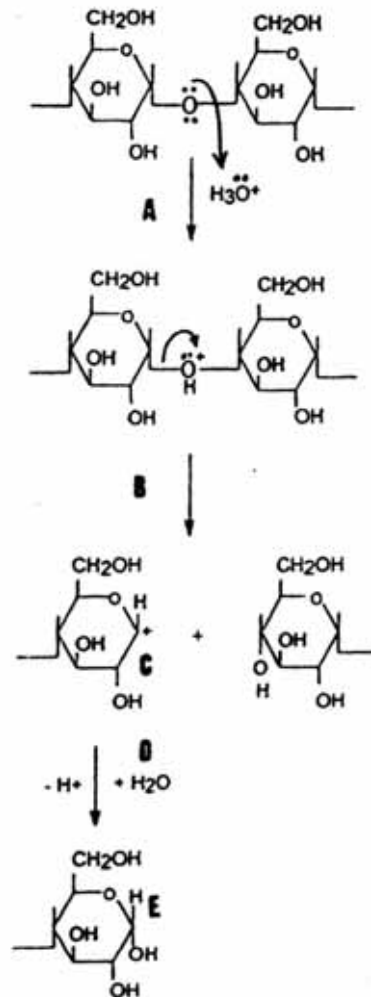


Figura 1.9 Mecanismo de reação da hidrólise ácida de amido. Adaptado de Hoover (2000).

As diferenças nas taxas e extensão de hidrólises entre os amidos são atribuídas a diferenças no tamanho granular, extensão das interações entre as cadeias da região amorfa e cristalina, e composição do amido (teor de fósforo, amilose e complexos amilose-lípido) (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; HOOVER, 2000; JANE, 2006).

Acredita-se que o resíduo, depois de prolongada hidrólise ácida, consista de parte da amilopectina ácido-resistente (ROBIN et al., 1974; JACOBS et al., 1998). Robin et al. (1974), através do estudo enzimático e de cromatografia de permeação em gel, com amido de batata lintnerizado, verificaram duas populações de cadeias distintas, uma delas composta de cadeias essencialmente lineares que apresentam $\overline{\text{GP}} 15$ e a outra de cadeias uniramificadas com $\overline{\text{GP}}$

25. Ambas as populações são produzidas progressivamente durante a hidrólise ácida a partir da amilose e da amilopectina, e a população de cadeias lineares aumenta com o aumento da extensão da hidrólise, sugerindo que a quebra causada pelo ácido ocorre próximo ao ponto de ramificação, como mostrado na Figura 1.10.

Estudos recentes com cromatografia de troca iônica acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) confirmam que, geralmente, amidos hidrolisados com ácido apresentam duas populações de cadeias principais. A primeira corresponde a cadeias lineares com GP 13-15 que, provavelmente, se originam das duplas hélices, enquanto que a segunda população consiste, principalmente, de cadeias uniramificadas com GP 23-27, cuja ligação α -(1 \rightarrow 6) estaria protegida da ação do ácido (NAKAZAWA; WANG, 2003; VERMEYLEN et al., 2004; YOO et al., 2009).

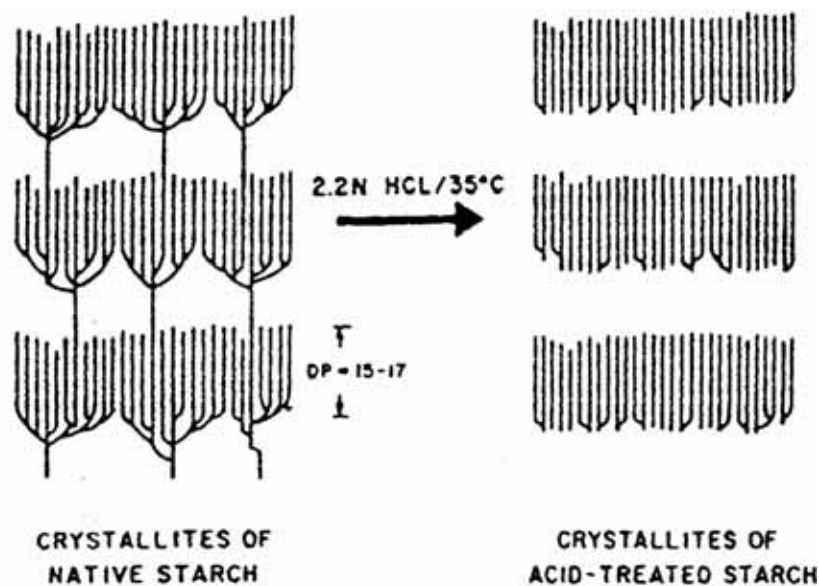


Figura 1.10 Hidrólise ácida heterogênea das moléculas de amilopectina no grânulo de amido. À esquerda, a amilopectina com os “clusters” de cadeias curtas constituindo os cristais de amido, a hidrólise ocorre preferencialmente nas regiões intercristalinas originando os segmentos lineares ou ligeiramente ramificados, à direita, que permanecem cristalinos e ácido-resistentes. GP= grau de polimerização. Adaptado de Hoover (2000).

Watanabe e French (1980) citado por Jacobs et al. (1998) identificaram ainda uma terceira fração, de maior massa molar, com cadeias multiramificadas. Estruturas semelhantes foram encontradas nas dextrinas Naegeli produzidas pela hidrólise dos grânulos de amido (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997).

Jacobs et al. (1998) observaram que, além dos resíduos lineares e ramificados provenientes da hidrólise da região amorfa da amilopectina, também estão presentes nos resíduos: um material intermediário (GP<120), formado nos primeiros estágios da lintnerização pela hidrólise parcial da amilose amorfa, que retrograda em duplas hélices (apresentando cristalinidade tipo-B) e são ácido-resistentes; e resíduos de cadeias longas, provenientes de segmentos dos complexos amilose-lipídio, que também são resistentes à hidrólise ácida. As possíveis estruturas reportadas por Jacobs et al. (1998) estão representadas na Figura 1.11.

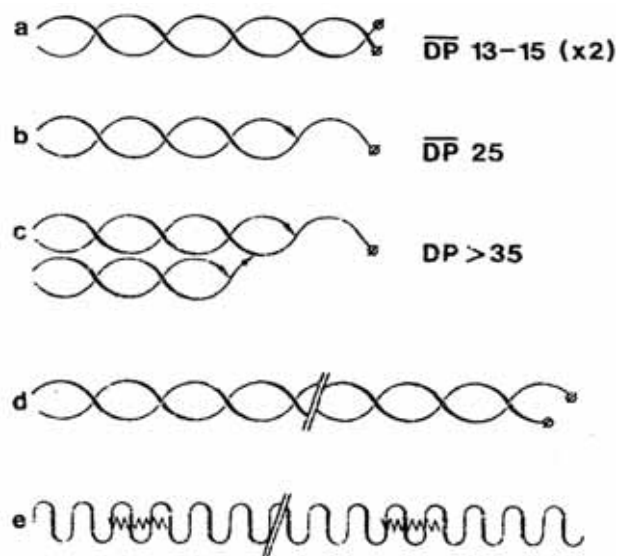


Figura 1.11 Possíveis estruturas para amidos lintnerizados. (a) cadeias lineares (GP 13-15); (b) cadeias uniramificadas (GP 25); (c) cadeias multi-ramificadas (GP > 35); (d) amilose retrogradada; (e) complexo amilose-lipídio. Adaptado de Jacobs et al. (1998).

Através de microscopia eletrônica de varredura, Atichokudomchai, Shobsngob e Varavinit (2000) verificaram que a hidrólise ácida do amido de mandioca atacou os grânulos através de erosão da superfície, com aparente formação de poros. A cristalinidade do amido aumentou enquanto o teor de amilose foi reduzido, sugerindo que este polímero foi degradado a partir do interior dos grânulos de amido.

Srichunwong et al. (2005b), através do estudo da hidrólise ácida de amidos de inhame e batata, verificaram uma redução na proporção de cadeias com GP 6, sugerindo que as cadeias curtas são rapidamente degradadas pelo ácido junto com o material amorfo, já que elas não são longas o suficiente para formar duplas hélices estáveis.

O ácido provoca a rápida hidrólise da região amorfa do grânulo, enquanto que a região de maior ordem molecular é degradada lentamente. Essa propriedade da hidrólise ácida se

mostra como uma ferramenta importante para revelar a estrutura dos grânulos de amido, auxiliando a compreensão das diversas propriedades físico-químicas desse carboidrato (FRANCO; CABRAL; TAVARES, 2002).

Chung e Lai (2006) verificaram que a temperatura da hidrólise não apenas influencia a reatividade da hidrólise das ligações glicosídicas, mas também facilita a difusão da solução ácida através da matriz do grânulo de amido. Alguns autores observaram a redução do teor de amilose com o tempo de hidrólise (SANDHU; SINGH; LIM, 2007), enquanto que outros autores verificaram que o teor de amilose aumenta com a hidrólise, refletindo a produção de mais segmentos lineares durante a modificação ácida provenientes, provavelmente, da clivagem dos pontos de ramificação da amilopectina. Tal clivagem facilitaria o realinhamento e a associação das cadeias nos grânulos de amido afetando as propriedades de pasta, de gelatinização e de retrogradação (GUNARATNE; CORKE, 2007).

2 OBJETIVO GERAL

Estudar as características estruturais dos amidos de raízes e tubérculos a partir de suas dextrinas Naegeli.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar os amidos nativos de mandioca, batata, batata-doce e mandioquinha-salsa.
- Estudar o efeito do ácido sobre a estrutura granular dos amidos.
- Determinar as características estruturais das dextrinas Naegeli.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

As matérias-primas utilizadas neste projeto foram raízes de mandioca (*Manihot esculenta*) da variedade Fécula Branca, adquiridas na cidade de Cedral-SP e colhidas após 12 meses de plantio; tubérculos de batatas (*Solanum tuberosum*) da variedade Ágata, adquiridas na região de Ribeirão Preto-SP e colhidas após 4 meses de plantio; raízes de batata-doce (*Ipomoea batatas*) da variedade Brazlândia Branca, adquiridas na cidade de Bady Bassit-SP e colhidas com 5 meses de plantio; e raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) da variedade Amarela de Senador Amaral, adquiridas na cidade de Tapirai-SP e colhidas após 9 meses de plantio. Todos os reagentes utilizados foram puros para análise.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração dos Amidos

As raízes e tubérculos foram lavados para retirada das impurezas. Em seguida, foram descascados e cortados em cubos pequenos, moídos com água na proporção de 1:1 (v:v), num liquidificador industrial de aço inox com capacidade para 4 litros. O tempo de moagem foi de 60 segundos para todas as matérias-primas, exceto para a mandioquinha-salsa que foi de 30 segundos devido à fragilidade dos grânulos deste amido. Para a remoção do bagaço, a suspensão obtida com a moagem foi passada através de peneiras de abertura de 80 mesh (0,177 mm) e 150 mesh (0,105 mm), para todas as raízes, e de 80 e 100 mesh (0,149 mm) para os tubérculos de batata, devido ao maior tamanho dos grânulos desse amido.

O bagaço retido na peneira de 80 mesh foi misturado com água destilada, na proporção de 1:1 (v:v), e moído por 20 segundos para retirada do amido residual. A suspensão de amido recuperada do bagaço foi misturada à primeira suspensão e mantida em câmara fria a 5 °C durante 12 horas, para decantação do amido.

Com o objetivo de se retirar maior quantidade de impurezas, o amido foi lavado com água destilada, até que o sobrenadante estivesse limpo. Então, foi recuperado por centrifugação e seco em estufa com circulação de ar e temperatura de 40 °C, por 8 a 12 horas.

3.2.2 Isolamento de Amilopectina

As amilopectinas dos amidos estudados foram isoladas segundo Jane e Chen (1992), com modificações. Amostras de 1 g de cada amido foram dispersas em 100 mL de DMSO 90%, em seguida agitadas em banho de água fervente por 1 hora e depois por mais 16 horas, à temperatura ambiente. O amido foi precipitado com 400 mL de etanol absoluto e centrifugado a 12000xg, por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 200 mL de água deionizada quente e o pH ajustado para 5,9-6,3 utilizando tampão fosfato (16,4% de KH_2PO_4 e 3,6% K_2HPO_4).

Em seguida, a suspensão foi colocada em banho de água fervente com refluxo por 1 hora, 15-20% de n-butanol foi adicionado e a suspensão deixada em refluxo por mais 30 minutos. A mistura foi transferida para uma garrafa térmica pré-aquecida e, com isso, lentamente resfriada por 24-36 horas. O complexo amilose-butanol foi separado por centrifugação a 12000xg, por 15 minutos. O sobrenadante foi separado, evaporado até metade do volume inicial em um rotaevaporador e colocado novamente em refluxo. Essa etapa foi repetida 6 vezes para cada amido.

A amilopectina foi precipitada com a lenta adição de metanol e recuperada por centrifugação a 12000xg, por 10 minutos. A amilopectina precipitada foi lavada duas vezes com etanol absoluto, recuperada por filtração à vácuo e seca em estufa com circulação forçada de ar a 40°C por 24 horas.

3.2.3 Caracterização dos Amidos

3.2.3.1 Composição Química

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

3.2.3.2 Morfologia dos Grânulos

Uma alíquota das amostras de amidos, previamente desidratada com etanol absoluto, foi colocada em fita adesiva de carbono aderida a um disco metálico, conduzida a um metalizador (modelo SCD 050, Balzers, Liechtenstein) para aplicação de uma camada de 20 nm de ouro e, em seguida, observada em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960 – ZEISS, Oberkochen, Alemanha). Imagens com aumento de 1000x foram obtidas.

3.2.3.3 Distribuição do Tamanho Molecular dos Componentes dos Amidos

3.2.3.3.1 Empacotamento da Coluna

Uma coluna de 100 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro foi devidamente empacotada com gel Sepharose CL-2B. Esse gel é adquirido pré-inchado, pronto para o uso, em suspensão contendo 20% de etanol. Aproximadamente 250 mL dessa suspensão foi deixada em repouso para a decantação do gel. O sobrenadante foi sifonado e o gel ressuspenso em eluente (NaCl/25mM e NaOH/1mM) numa proporção de 4:1 (v:v). A nova suspensão do gel foi degaseificada com vácuo por aproximadamente 24 horas e equilibrada a 22°C (temperatura da sala onde a coluna foi empacotada).

Após o preparo do gel, a coluna foi montada sobre uma bancada firme e adequada, sem vibrações, luz solar e variações bruscas na temperatura, para evitar a formação de bolhas de ar no gel empacotado. A parte inferior da coluna foi selada com um adaptador próprio para esse fim. A suspensão de gel foi misturada e colocada na abertura superior da coluna de maneira contínua, para evitar zonas de empacotamento que comprometeriam a resolução. A etapa seguinte envolveu o fechamento da coluna através de um segundo adaptador que foi devidamente colocado na parte superior, evitando o aprisionamento de bolhas de ar dentro da coluna.

Uma bomba peristáltica foi conectada à coluna permitindo um fluxo descendente de eluente, devidamente degaseificado, por no mínimo dois dias. Após esse período, uma alíquota de Blue Dextrana foi passada através da coluna para verificar a qualidade do empacotamento. O fluxo de eluente foi, então, mudado para o sentido ascendente e ajustado para 0,5mL/min.

3.2.3.3.2 Preparo de Amostras

A amostra foi preparada seguindo o procedimento descrito por Song e Jane (2000), com algumas adaptações.

Uma suspensão contendo 0,1 g de amostra (b. s.) e 10 mL de DMSO 90% foi colocada sob agitação constante em banho de fervura por 1 hora e, em seguida, por mais 16 horas, à temperatura ambiente. Uma alíquota de 3 mL da mistura, contendo 30 mg de amido, foi retirada e adicionada de 12 mL de etanol absoluto. O amido precipitado foi recuperado por centrifugação a 4000xg, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 10 mL de eluente e 1,0 mg de glicose. A mistura permaneceu sob agitação em banho fervente por 30 min e foi resfriada antes de ser aplicada à coluna.

3.2.3.3.3 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A análise de distribuição de tamanho molecular dos componentes dos amidos estudados foi realizada por GPC seguindo o procedimento descrito por Wang et al. (1993). Uma alíquota de 3 mL de amostra, contendo 9 mg de amido, preparada conforme o item 3.2.3.3.2, foi aplicada em coluna (1,0x70,0 cm) empacotada com gel Sepharose CL-2B, conforme descrito no item 3.2.3.3.1, e eluída de forma ascendente, com fluxo de 0,5mL/min. O eluente utilizado foi NaCl 25mM e NaOH 1mM. Frações de 2,5 mL foram coletadas e analisadas quanto ao teor de açúcares totais, pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), e de “blue value”, através de reação de coloração com iodo (JULIANO, 1971), ambos métodos modificados para leitura em microleitora de absorvância segundo procedimento descrito por Fox e Robyt (1991).

3.2.3.4 Difração de Raios-X e Cristalinidade Relativa

As umidades dos amidos foram equilibradas em dessecador contendo solução de BaCl₂ saturada (25°C, a_w = 0,9) durante 10 dias. Os padrões de difração de raios-X destes amidos foram determinados utilizando-se uma unidade RINT2000 Wide Angle Goniometer, com radiação de Cu, linha K, L = 1,542 Å. A velocidade de varredura foi de 1° por minuto e as condições de uso foram de 50 Kv e 100 mA. A cristalinidade relativa foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e área total dos difractogramas seguindo o

método de Nara e Komiya (1983) utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA). Os difractogramas foram suavizados utilizando a ferramenta 'Smooth'.

3.2.3.5 Distribuição do Comprimento das Cadeias Laterais da Amilopectina

3.2.3.5.1 Desramificação dos Amidos

Os amidos foram desramificados utilizando isoamilase (EC 3.2.1.68) obtida de *Pseudomonas* sp., da marca Megazyme International Ireland Ltd. (Wicklow, Irlanda), seguindo o procedimento de Wong e Jane (1995), com modificações. Os amidos foram inicialmente desengordurados segundo o procedimento descrito por Jane e Chen (1992), com modificações. Uma dispersão de 5 mL de amido em DMSO 90% (10 mg/mL) foi agitada em banho de fervura por 1 hora e depois por mais 16 horas, à temperatura ambiente.

Uma alíquota de 0,5 mL da dispersão de amido foi misturada a 2 mL de etanol absoluto e o amido precipitado foi recuperado por centrifugação a 12000g por 10 min. O amido recuperado foi suspenso em 1,8 mL de água ultra pura (18 MΩ.cm) e mantido em banho de água fervente por 30 min com agitação.

Após resfriamento, 0,2 mL de tampão acetato 0,1 M pH 3,5, 6 µL de solução de azida 10% (p/v) e 3 µL de isoamilase (Megazyme, 3U), foram adicionados e a suspensão foi incubada a 40°C por 16h sob agitação de 100 rpm. Após este período, o pH foi ajustado para 6,5-7,0 com NaOH 1M e a suspensão colocada em banho de água fervente por 15min, para inativação da enzima. Imediatamente antes da injeção no cromatógrafo as amostras foram filtradas em membranas de teflon de 0,22µm.

3.2.3.5.2 Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência com Detecção Amperométrica Pulsada (HPAEC-PAD)

A distribuição do comprimento de cadeia das amilopectinas foi analisada usando o HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40.

Várias condições de trabalho foram inicialmente testadas (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; KOCH; ANDERSSON; ÅMAN, 1998; PERERA et al., 2001; YOO et al., 2009) para a escolha da melhor condição de trabalho. A condição escolhida foi baseada no

método de Koch, Andersson e Åman (1998), a partir do qual foram feitos os testes de otimização e com isso encontrada a condição ótima descrita abaixo.

Amostras (20 μ L) preparadas de acordo com o método descrito no item 3.2.3.5.1, foram automaticamente injetadas no sistema HPAEC-PAD constituído por uma coluna de troca aniônica CarboPac PA-100 (250x4 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-100. A forma de onda empregada foi a “standard quadruple” com os seguintes potenciais de pulso e durações: $E_1 = 0,10$ V ($t_1 = 0,40$ s); $E_2 = -2,00$ V ($t_2 = 0,02$ s); $E_3 = 0,60$ V ($t_3 = 0,01$ s); $E_4 = -0,10$ V ($t_4 = 0,06$ s). A fase móvel utilizada para a separação era constituída pelo eluente A (150 mM NaOH) e eluente B (500 mM acetato de sódio e 150 mM NaOH) com fluxo de 0,8 mL/min e temperatura de 40°C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 M Ω .cm) e degaseificados com N₂. O gradiente ótimo encontrado foi: 0-15 min, gradiente linear de 28 a 40% de eluente B; e 15-95 min, gradiente linear terminando com 72% de eluente B. Uma mistura de maltodextrinas (GP 1-7), contendo diferentes concentrações (31, 42, 23, 42, 39, 33 e 48 μ g/mL, respectivamente) de cada açúcar, foi usada para identificação da série homóloga de comprimento de cadeias. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

3.2.3.6 Afinidade por Iodo e Teor de Amilose

Os amidos nativos foram previamente desengordurados conforme descrito por Franco et al. (2002), com modificações. Amostras de 0,5 g foram dispersas em 25 mL de DMSO 90%, colocadas sob agitação em banho de água fervente por 1 hora e, em seguida, agitadas por mais 16 horas, à temperatura ambiente. Os amidos foram recuperados através de precipitação com aproximadamente 75 mL de etanol absoluto, centrifugação a 4000xg, por 10 minutos, e filtração à vácuo do precipitado. Os amidos desengordurados foram secos em estufa com circulação forçada de ar a 38°C, por 24 horas.

As afinidades por iodo (AIs) dos amidos integrais desengordurados e das amilopectinas isoladas como descrito no item 3.2.2 foram determinadas usando um autotituladores potenciométrico (716 DMS Titrimo, Metrohm, Suíça). Os teores de amilose aparente e absoluta foram determinados usando os métodos de Schoch (1964) e Kasemsuwan et al. (1995), respectivamente. Todas as determinações foram realizadas, no mínimo, em

triplicata. O teor de amilose aparente foi calculado segundo a equação 1, e para o teor de amilose absoluto foi utilizada a equação 2:

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

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

Onde,

AM_{ap} = teor de amilose aparente

AM_{abs} = teor de amilose absoluta

AI_A = afinidade por iodo do amido integral

AI_{AP} = afinidade por iodo da amilopectina isolada

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

3.2.3.7 Propriedades de Pasta

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

3.2.3.8 Propriedades Térmicas

As propriedades térmicas dos amidos nativos foram determinadas utilizando um Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC-Pyris 1, Perkin Elmer, EUA) de acordo com método descrito por Franco et al. (2002), com modificações. Amostras de 4 mg (b. s.) dos amidos foram pesadas em pequenos recipientes de alumínio, próprios para o equipamento.

Água deionizada (12 µL) foi adicionada e os recipientes foram selados em prensa universal (Perkin Elmer, EUA). Após selados, os recipientes foram mantidos por 2 horas em temperatura ambiente, e aquecidos a uma razão de 5 °C/minuto de 25 a 110 °C. Um recipiente de alumínio vazio foi utilizado como referência.

Cada recipiente de alumínio contendo a amostra gelatinizada foi armazenado durante 14 dias a uma temperatura de 5 °C. As amostras foram então analisadas quanto às propriedades térmicas de retrogradação usando o mesmo aparelho e parâmetros. As temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia (ΔH) dos amidos nativos e retrogradados foram determinadas utilizando o software Pyris 1 (Perkin Elmer, EUA). Todas as análises foram realizadas em, no mínimo, triplicata.

3.2.4 Hidrólise Ácida

Os amidos nativos foram hidrolisados seguindo procedimento de Nakazawa e Wang (2003), com modificações.

A cinética da hidrólise ácida foi realizada com o objetivo de determinar os melhores tempos para recuperação das dextrinas. Porções de 2 g (b. s.) dos amidos foram suspensas em solução de H₂SO₄ 15,3% (5% p/v) e incubadas a 38°C por 30 dias, sendo gentilmente agitadas a cada 24 horas. Alíquotas da suspensão (0,5 mL) foram retiradas diariamente e centrifugadas (12000xg, 10 min) e os carboidratos solubilizados foram determinados pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) modificado para leitura em microleitora de absorvância segundo procedimento descrito por Fox e Robyt (1991). A extensão da hidrólise foi determinada através da razão entre os carboidratos totais solubilizados e o peso total de amido. A cinética foi realizada em duplicata.

As quantidades de amidos, a serem hidrolisadas, foram determinadas de acordo com a extensão da hidrólise obtida com a cinética. A hidrólise ácida definitiva para obtenção das dextrinas Naegeli foi realizada. Suspensões de amido (5% p/v) em H₂SO₄ 15,3% foram incubadas na mesma condição anterior, sendo gentilmente agitadas a cada 24 horas. Após 1, 3, 6, 9, 12, 15 e 30 dias, os resíduos insolúveis foram recuperados por centrifugação a 12000g por 10 min; alíquotas do sobrenadante (10 mL) foram retiradas e os carboidratos solubilizados foram determinados pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), para a exata determinação da porcentagem de hidrólise de cada resíduo. As dextrinas foram por duas vezes suspensas em água deionizada na proporção de 1:3 (v:v), neutralizadas com 0,1M de NaOH e

centrifugadas a 12000xg, por 10 min. Então foram suspensas mais duas vezes em água deionizada na proporção de 1:3 (v:v), e finalmente suspensas em etanol absoluto e secas em estufa com circulação forçada de ar a 32 °C, por 12 horas.

3.2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura das Dextrinas Naegeli

As dextrinas Naegeli obtidas com a hidrólise ácida por 1, 3, 6, 12 e 30 dias foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960 – ZEISS, Oberkochen, Alemanha). As amostras foram preparadas conforme o procedimento descrito no item 3.2.3.2. Imagens com aumento de 1000x foram obtidas.

3.2.4.2 Difração de Raios-X e Cristalinidade Relativa das Dextrinas Naegeli

Os padrões de difração de raios-X das dextrinas Naegeli foram determinados segundo o procedimento descrito no item 3.2.3.4. As cristalinidades relativas foram quantitativamente estimadas baseadas na relação entre a área dos picos e área total dos difractogramas seguindo o método de Nara e Komiya (1983) utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA). Os difractogramas foram suavizados utilizando a ferramenta ‘Smooth’.

3.2.4.3 Distribuição do Comprimento das Cadeias das Dextrinas Naegeli

A distribuição do comprimento de cadeias das dextrinas Naegeli antes e depois da desramificação com isoamilase foi analisada usando um HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40, seguindo o procedimento descrito no item 3.2.3.5

3.2.4.4 Teor de Amilose Aparente das Dextrinas Naegeli

As afinidades por iodo das dextrinas Naegeli foram obtidas utilizando um autotituladores potenciométrico (716 DMS Titrino, Metrohm, Suíça). Os teores de amilose aparente foram determinados usando os métodos de Schoch (1964). O preparo das amostras e os cálculos utilizados foram os mesmos descritos anteriormente no item 3.2.3.6.

3.2.4.5 Propriedades Térmicas das Dextrinas Naegeli

As propriedades térmicas das dextrinas Naegeli foram determinadas de acordo com o método descrito por Franco et al. (2002) como citado no item 3.2.3.8 deste trabalho.

3.2.5 Análise Estatística

O delineamento experimental adotado para os experimentos foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por duas ou três repetições. Os dados foram avaliados pelo emprego do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0 (KRONKA; BANZATTO, 2004), abrangendo a análise de comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DOS AMIDOS

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

Os valores de umidade (Tabela 4.1) dos produtos finais apresentaram-se dentro da faixa de 10-15%, considerada ótima para amidos (TESTER, 1997), evitando-se amidos muito secos e com provável degradação estrutural, ou amidos com alta atividade de água, o que poderia favorecer a proliferação de microrganismos.

Tabela 4.1 Umidade e rendimento da extração dos amidos.

Matéria Prima	Umidade (%)*	Rendimento (%)**
<i>Mandioca</i>	10,42 (0,14)	10,7
<i>Batata</i>	10,90 (0,11)	6,5
<i>Batata-doce</i>	10,51 (0,39)	12,6
<i>Mandioquinha-salsa</i>	13,35 (0,26)	10,8

* Os valores representam a média de no mínimo três determinações;

** Rendimento calculado considerando base seca.

Os rendimentos obtidos (Tabela 4.1) foram os esperados para todas as espécies de matéria-prima. A batata da variedade Ágata apresentou o menor rendimento na extração. Esse fato pode ser atribuído ao teor muito baixo de matéria seca presente na variedade utilizada (Associação Brasileira da Batata – ABBA).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS

4.2.1 Composição Química

O amido é constituído principalmente de carboidratos, no entanto, substâncias como lipídios, proteínas e cinzas estão presentes em sua composição. A quantidade destas substâncias no amido depende da planta e do método de extração. A pureza dos amidos está relacionada com o teor desses constituintes menores, em que baixos teores de lipídeos e cinzas e ausência de proteína aderida ao grânulo são desejáveis.

Os teores de carboidratos obtidos para todos os amidos foram elevados, variando de 98,94% para o amido de batata a 99,38% para o amido de mandioca, conforme apresentado na Tabela 4.2. Estes resultados indicam que os amidos apresentaram alto grau de pureza e que o processo de extração, em nível de bancada, foi eficiente. Segundo Franco et al. (2001) é importante que a matéria-prima apresente baixos teores de constituintes menores e, dentre eles, as frações de lipídeos e fósforo são as mais importantes, pois influenciam nas propriedades funcionais dos amidos.

Tabela 4.2 Composição química dos amidos das diferentes fontes botânicas (% em relação à matéria seca).

Teor	Amidos ^a			
	Mandioca	Batata	Batata-doce	Mand.-salsa
<i>Carboidratos Totais*</i>	99,38	98,92	99,17	99,34
<i>Fibras</i>	0,15 (0,03) ^c	0,15 (0,01) ^c	0,62 (0,05) ^a	0,24 (0,03) ^b
<i>Lipídeos</i>	0,25 (0,05) ^b	0,47 (0,06) ^a	0,49 (0,01) ^a	0,30 (0,02) ^b
<i>Proteínas</i>	0,12 (0,00) ^b	0,24 (0,01) ^a	0,23 (0,02) ^a	0,23 (0,03) ^a
<i>Cinzas</i>	0,25 (0,00) ^b	0,37 (0,01) ^a	0,12 (0,01) ^d	0,13 (0,01) ^c
<i>Fósforo</i>	0,013 (0,001) ^c	0,077 (0,001) ^a	0,016 (0,002) ^{bc}	0,020 (0,003) ^b

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

^{*} Determinado por diferença.

O teor de lipídeos dos amidos estudados variou de 0,25 a 0,49%, sendo o menor valor apresentado pelo amido de mandioca. Estes valores estão de acordo com os observados por Moorthy (2001) que relata que os amidos de raízes e tubérculos são geralmente caracterizados pelo seu baixo teor de lipídeos (<1%), não tendo efeito pronunciado nas propriedades funcionais comparados aos amidos de cereais (HOOVER, 2001).

O método utilizado na determinação do teor de fósforo é baseado na destruição da matéria orgânica por incineração e pela conversão do fósforo para sua forma inorgânica fornecendo o teor de fósforo total (KASEMSUWAN; JANE, 1996). O fósforo pode ser encontrado nos amidos em três formas principais: fosfato monoéster, lisofosfolipídeos e fosfatos inorgânicos. Em tubérculos e raízes, o fósforo é encontrado, principalmente, na forma de fosfatos monoéster ligados covalentemente ao amido (KASEMSUWAN; JANE, 1996; HOOVER, 2001).

O amido que apresentou maior teor de fósforo foi o de batata (0,077%), valor próximo ao encontrado por McPherson e Jane (1999) (0,075%) e menor do que o observado por Kasemsuwan e Jane (1996) (0,090%). O amido de mandioca apresentou maior valor que o encontrado por Kasemsuwan e Jane (1996) (0,007%) e o amido de batata-doce apresentou menor valor que McPherson e Jane (1999) (0,020%). O amido de mandioquinha-salsa

apresentou valor intermediário àqueles relatados por Rocha, Demiate e Franco (2008) e Rocha (2009) (0,017% e 0,032%, respectivamente). Essas variações podem estar relacionadas às características ambientais no desenvolvimento da planta e à sua variedade. Segundo Tester et al. (1997), em amidos de batata, o teor de fósforo é inversamente proporcional à temperatura de desenvolvimento da planta.

O fósforo desempenha papel importante nas propriedades funcionais dos amidos. Por exemplo, o fosfato monoéster no amido de batata contribui para a claridade de pasta, alta viscosidade, baixa temperatura de gelatinização e lenta taxa de retrogradação (KASEMSUWAN; JANE, 1996), sendo uma vantagem para muitas aplicações industriais.

4.2.2 Morfologia dos Grânulos

Na Figura 4.1 estão apresentadas as micrografias dos grânulos de amidos nativos de raízes e tubérculos. A forma e o tamanho dos grânulos variaram com a fonte botânica.

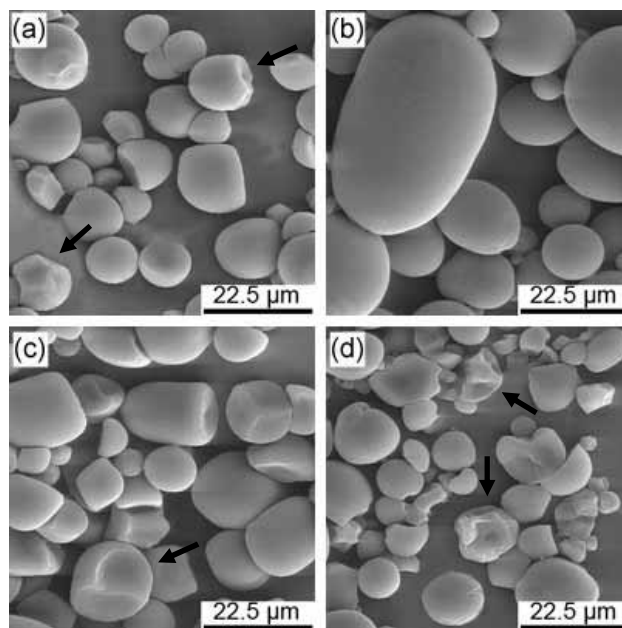


Figura 4.1 Micrografias dos grânulos dos amidos observados em microscópio eletrônico de varredura: (a) mandioca; (b) batata; (c) batata-doce; (d) mandiocinha-salsa.

Os grânulos de amido de mandioca apresentaram superfície predominantemente lisa, formatos circulares e com uma ou mais extremidades truncadas (Figura 4.1a↓). O amido de batata mostrou grânulos essencialmente maiores que os outros amidos, com formatos ovais e superfície lisa (Figura 4.1b). Os grânulos do amido de batata-doce apresentaram formatos

cilíndricos e esféricos com extremidades convexas e angulares (Figura 4.1c↓). Imagens próximas às encontradas nesse trabalho foram relatadas na literatura (MCPHERSON; JANE, 1999; SANGUAPONG et al., 2003; YOO et al., 2009) para os grânulos de amidos de mandioca, batata e batata-doce, respectivamente. O amido de mandioquinha-salsa apresentou grânulos com formatos circulares e truncados, com depressões e irregularidades na superfície granular (Figura 4.1d↓). Tais irregularidades também foram observadas por Rocha, Demiate e Franco (2008) e Vieira e Sarmento (2008).

4.2.3 Distribuição do Tamanho Molecular dos Componentes dos Amidos

Os cromatogramas de permeação em gel dos amidos nativos estão apresentados na Figura 4.2. Os perfis de distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos apresentaram dois picos distintos representando amilopectina (primeiro pico), e amilose (segundo pico) que apresentou alta resposta de *blue value*. O último pico eluído foi glicose usada como marcador do final da eluição.

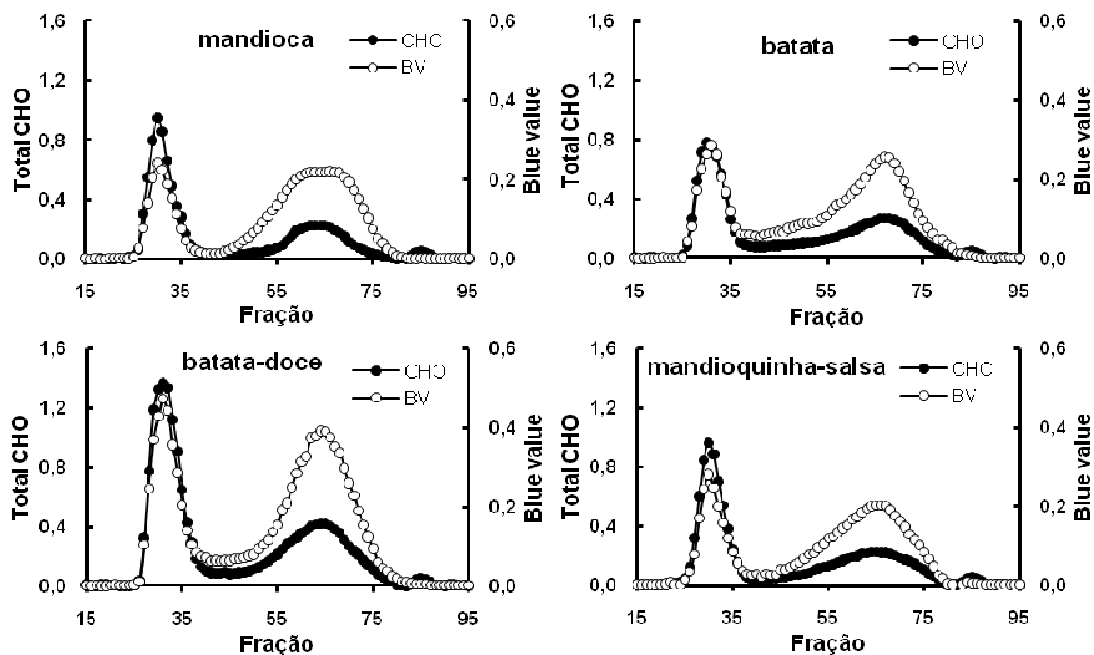


Figura 4.2 Perfis de eluição dos amidos nativos de tubérculos e raízes.

A amilopectina, devido ao seu grande peso molecular, não interage com o gel e elui no volume vazio da coluna. Esse fato foi observado para as amilopectinas de todos os amidos e

os picos referentes a essa molécula eluíram na fração 31. As relações entre *blue value* e açúcares totais (BV/CHO), nos picos da amilopectina foram de 0,25, 0,37, 0,35 e 0,29, para os amidos de mandioca, batata, batata-doce e mandioquinha-salsa, nessa ordem. Maiores razões de BV/CHO sugerem que a amilopectina apresenta cadeias laterais mais longas (PAN; JANE, 2000), favorecendo a formação de complexos com iodo. Os amidos de mandioca e mandioquinha-salsa mostraram menores valores de *blue value* nos picos de amilopectina, sugerindo cadeias mais curtas para essa molécula.

Os picos de *blue value* na fração em que a amilose foi eluída ocorreram nas frações 65, 67, 64 e 65, para os amidos de mandioca, batata, batata-doce e mandioquinha-salsa, respectivamente, indicando não haver muita diferença no peso molecular das moléculas de amilose desses amidos. O amido de mandioca apresentou o pico da amilose mais estreito enquanto o amido de batata mostrou esse pico mais largo do que os outros amidos. Um segundo pico muito largo indica que a amilose tem uma ampla distribuição no tamanho molecular. (SONG; JANE, 2000).

4.2.4 Difração de raios-X e cristalinidade relativa

Os difractogramas de raios-X dos amidos nativos e suas respectivas cristalinidades relativas (C_{rel}) estão apresentados na Figura 4.3. A C_{rel} dos amidos aumenta significativamente com o aumento no teor de umidade, apesar de apresentarem o mesmo perfil de difração de raios-X (CHEETHAM; TAO, 1998), portanto para a realização dessa análise as amostras foram previamente equilibradas por 10 dias em umidade relativa de 90% como descrito anteriormente no item 3.2.3.4.

Os amidos de batata e mandioquinha-salsa apresentaram padrão cristalino tipicamente do tipo B, assim como observado por Yoo et al. (2009) e Santacruz et al. (2002), respectivamente. O padrão B é caracterizado por picos singletos em $5,6^\circ$ e 17° e um dubleto em 22° e 24° em 2θ , enquanto que um dubleto em 17° e 18° e um pico singleto em 23° são picos característicos do padrão A (BÚLEON et al., 1998; THYS et al., 2008). O amido de batata-doce apresentou um pico por volta de $5,6^\circ$ em 2θ , característico do tipo B, e picos em 17° e 18° , e em 23° , característicos do tipo A, apresentando portanto padrão cristalino tipo C, observado também por McPherson e Jane (1999). O amido de mandioca apresentou picos similares ao amido de batata-doce, no entanto foi considerado como sendo tipo C_A , pois seu padrão cristalino estava mais próximo do tipo A do que do tipo B. Muitos pesquisadores têm

reportado padrão tipo A para o amido de mandioca (CAVALLINI; FRANCO, 2010; SHARIFFA et al., 2009; ATICHOKUDOMCHAI et al., 2002). O tipo C é uma mistura dos padrões A e B (BÚLEON et al., 1998). Nos amidos com padrão cristalino tipo A, as moléculas de amilopectina apresentam empacotamento mais denso e com maiores proporções de cadeias curtas do que amidos com padrão cristalino tipo B (JAYAKODY; HOOVER, 2002).

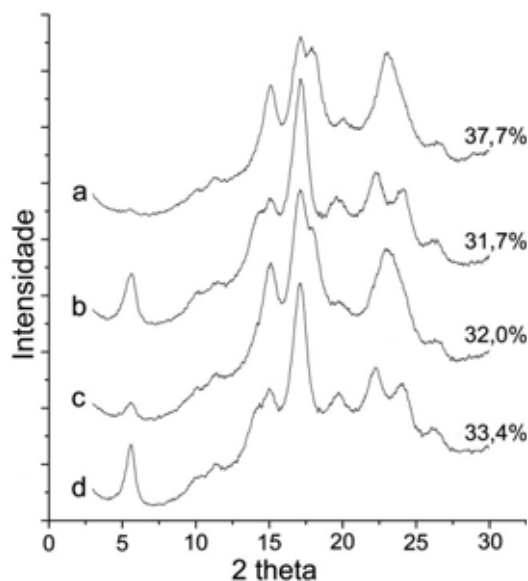


Figura 4.3 Diffractogramas de raios-X dos amidos nativos com as respectivas cristalinidades relativas (%): (a) mandioca; (b) batata; (c) batata-doce; (d) mandioquinha-salsa.

A C_{rel} foi maior para o amido de mandioca (37,7%) e menor para o amido de batata (31,7%). Os valores encontrados na literatura estão próximos aos observados nesse trabalho para os amidos de mandioca e batata (ROCHA, 2009), batata-doce e mandioquinha-salsa (VIEIRA; SARMENTO, 2008).

4.2.5 Distribuição do Comprimento das Cadeias Laterais da Amilopectina

As distribuições normalizadas do comprimento de cadeias laterais resultantes da desramificação dos amidos nativos estão apresentadas na Figura 4.4 e os resultados resumidos na Tabela 4.3. Todos os amidos apresentaram distribuição bimodal e dois picos puderam ser observados. O primeiro pico ocorreu no GP 11 para os amidos de mandioca e mandioquinha-

salsa e nos GP 13 e 12 para os amidos de batata e batata-doce, respectivamente. O segundo pico ocorreu no GP 40 para o amido de mandioca e no GP 43 para os demais amidos.

Um declive no GP 8, que é característico de amidos de batata e alguns amidos de raízes (KOIZUMI; FUKUDA; HIZUKURI, 1991), foi observado na distribuição dos amidos de batata e batata-doce. Entre os quatro amidos, o de batata apresentou o maior comprimento médio de cadeia (\overline{GP}) 20,5. O de mandioca mostrou \overline{GP} 19,5, e os de batata-doce e mandioquinha-salsa apresentaram \overline{GP} 19,9.

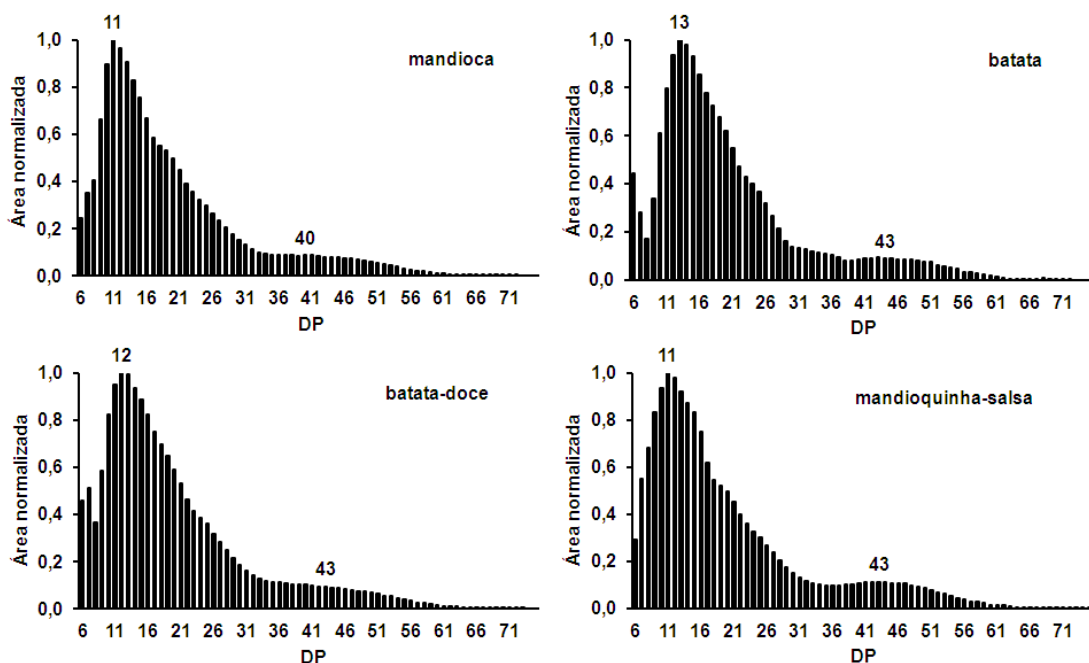


Figura 4.4 Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos desramificados por isoamilase.

Os amidos de mandioca e mandioquinha-salsa apresentaram um ombro em GP 17-21, também observado por Jane et al. (1999) para o amido de mandioca e Santacruz et al. (2002) para o amido de mandioquinha-salsa. Segundo Jane et al. (1999), o comprimento das cadeias com GP 18-21 seria de 6,3-7,4 nm, tomando como base 0,35 nm como o comprimento de cada unidade de glicose anidra. Essa faixa de comprimento seria próxima à espessura da lamela cristalina da amilopectina, portanto as cadeias com GP 18-21 representariam a total extensão da lamela cristalina, e a razão entre o pico de distribuição e o ombro indicaria a proporção de cadeias curtas que resulta em defeitos nos cristais. É provável que a grande quantidade de cadeias curtas encontrada nos amidos de mandioca e mandioquinha-salsa,

cause uma redução da densidade e estabilidade das lamelas cristalinas desses amidos (GENKINA et al., 2007).

Amidos do tipo B geralmente apresentam menores porcentagens de cadeias curtas (GP 6-12) e maiores de cadeias longas (GP \geq 37) (HANASHIRO; HIZUKURI, 1996; JANE et al., 1999). Como era esperado, o amido de batata (tipo B) apresentou a menor proporção (22,6%) de cadeias curtas (GP 6-12) (Tabela 4.3), concordando com os resultados observados por McPherson e Jane (1999), e Yoo et al. (2009). Entretanto, o amido de mandioca-salsa, que também apresentou padrão cristalino tipo B (Figura 4.3), apresentou as maiores proporções de cadeias curtas (32,3%) e cadeias longas (12,1%) entre os amidos estudados. Santacruz et al. (2002) também encontraram grandes proporções de cadeias curtas para o amido de mandioca-salsa. O amido de mandioca (tipo C_A) apresentou maior porcentagem de cadeias curtas (30,6%) e menor de cadeias longas (9,9%) do que o amido de batata-doce (tipo C), confirmando a maior proximidade do amido de mandioca com amidos com padrão cristalino tipo A.

Tabela 4.3 Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos de diferentes fontes botânicas.

	Comprimento de cadeia (%) ^a				$\overline{\text{GP}}$	Maior GP detectado
	GP 6-12	GP 13-24	GP 25-36	GP \geq 37		
<i>Mandioca</i>	30,6 (0,0) ^b	46,3 (0,1) ^c	13,2 (0,1) ^c	9,9 (0,1) ^d	19,5	72
<i>Batata</i>	22,6 (0,0) ^d	53,1 (0,0) ^a	13,7 (0,1) ^b	10,7 (0,1) ^b	20,5	72
<i>Batata-doce</i>	27,7 (0,1) ^c	48,0 (0,1) ^b	14,1 (0,0) ^a	10,2 (0,0) ^c	19,9	73
<i>Mand.-salsa</i>	32,3 (0,0) ^a	43,4 (0,1) ^d	12,2 (0,0) ^d	12,1 (0,1) ^a	19,9	75

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

Os amidos nativos apresentaram os maiores GPs detectados variando entre 72 e 75. A detecção de cadeias muito longas é limitada, pois mesmo em pH elevado, as mesmas são dificilmente oxidadas, e assim as cadeias muito longas não são eficientemente detectadas pelo detector amperométrico do sistema HPAEC-PAD.

4.2.6 Afinidade por Iodo e Teor de Amilose

A molécula de amilose se apresenta na forma helicoidal, sendo assim capaz de formar complexos com diversos compostos. Quando complexada com iodo, a amilose apresenta coloração azul, portanto métodos colorimétricos podem ser empregados na sua determinação. No entanto, durante a titulação potenciométrica, as amilopectinas com cadeias longas, assim

como a amilose, formam complexos com iodo, superestimando a afinidade por iodo e o teor de amilose aparente dos amidos (JANE et al., 1999). Por esse motivo, as frações de amilose e amilopectina de cada amido foram separadas e os teores de amilose aparente e absoluto foram determinados e os resultados apresentados na Tabela 4.4.

O amido de batata apresentou maior teor de amilose aparente (32,6%) do que os amidos de batata-doce, mandioca e mandioquinha-salsa. Esses resultados estão próximos aos valores encontrados na literatura, 32,7% para o amido de batata (TESTER et al., 1999), 24,7% para o amido de mandioca (GUNARATNE; CORKE, 2007), 21,35% para o amido de batata-doce (SHARIFFA et al., 2009), e 17,2% para o amido de mandioquinha-salsa (VIEIRA; SARMENTO, 2008). Após a determinação das afinidades por iodo das moléculas de amilopectinas isoladas, os teores de amilose absolutos encontrados para os amidos foram: mandioca, 17,4%; batata, 17,2%; batata-doce, 16,3%; e mandioquinha-salsa, 7,6% (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto de amidos de diferentes fontes botânicas.

Fonte	Afinidade por Iodo ^a (%)		Teor de Amilose ^b (%)	
	Amido	Amilopectina	Aparente ^c	Absoluto ^d
<i>Mandioca</i>	4,72 (0,13) ^b	1,25 (0,06) ^d	23,6	17,4
<i>Batata</i>	6,51 (0,09) ^a	3,07 (0,07) ^a	32,6	17,2
<i>Batata-doce</i>	4,95 (0,12) ^b	1,69 (0,06) ^c	24,8	16,3
<i>Mand.-salsa</i>	3,50 (0,09) ^c	1,98 (0,05) ^b	17,5	7,6

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

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

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

^d % amilose absoluto = $(AI_A - AI_{AP})/[0,2 - (AI_{AP}/100)]$, onde AI_{AP} é a afinidade por iodo da amilopectina isolada.

Amilopectinas com altas afinidades por iodo possuem maiores proporções de cadeias longas do que as amilopectinas com baixa afinidade por iodo (YOO et al., 2009). A amilopectina de batata apresentou a maior afinidade por iodo (3,07%) e a maior relação BV/CHO (0,37, Figura 4.2), confirmando a alta proporção de cadeias ramificadas longas encontrada para a amilopectina desse amido (Tabela 4.3). Desta forma, as maiores proporções de cadeias ramificadas curtas (GP 6-12) e longas ($GP \geq 37$) encontradas para o amido de mandioquinha-salsa (Tabela 4.3) justificam a afinidade por iodo (1,98%) e a relação BV/CHO (0,29, Figura 4.2) obtidas para a amilopectina desse amido.

4.2.7 Propriedades de Pasta

As propriedades de pasta dos amidos em sistemas aquosos dependem de suas características físicas e químicas, tais como: teores de amilose, lipídeos e fósforo; distribuição dos comprimentos das cadeias ramificadas da amilopectina; razão entre amilose e amilopectina; e tamanho médio e distribuição de tamanho dos grânulos. A amilopectina favorece o inchamento dos grânulos de amido, enquanto a amilose e lipídeos o inibem. (JANE et al., 1999; SINGH et al., 2003; YOO et al., 2009). Além disso, o comprimento da cadeia de amilopectina e o tamanho molecular da amilose produzem um efeito sinérgico na viscosidade de pasta dos amidos (JANE; CHEN, 1992). Portanto, os efeitos das características estruturais nas propriedades de pasta são muito complexos (YOO et al., 2009).

As propriedades de pasta dos amidos nativos, incluindo: temperatura de pasta, viscosidade de pico, viscosidade de quebra, viscosidade final e *setback*, determinadas através de RVA, estão mostradas na Tabela 4.5. O perfil viscoamilográfico de cada um dos amidos está apresentado na Figura 4.5.

Em geral, amidos de tubérculos e raízes apresentam menores temperaturas de pasta, menor resistência ao cisalhamento e menores viscosidades de *setback*, do que os amidos de cereais, o que é atribuído, principalmente, ao baixo teor de lipídeos e à presença de fosfatos monoésteres (LIM; KASEMSUWAN; JANE, 1994).

Tabela 4.5 Propriedades de pasta dos amidos nativos.

Amidos	Temperatura de Pasta (°C) ^a	Viscosidades (RVU) ^a			
		Pico	Quebra	Final	Setback
<i>Mandioca</i>	65,0 (0,3) ^b	343 (5) ^c	247 (5) ^c	196 (2) ^c	100 (2) ^a
<i>Batata</i>	65,2 (0,0) ^b	852 (2) ^a	629 (4) ^a	278 (1) ^a	55 (3) ^c
<i>Batata-doce</i>	69,4 (0,3) ^a	387 (5) ^b	259 (5) ^c	203 (0) ^b	75 (0) ^b
<i>Mand.-salsa</i>	61,0 (0,3) ^c	372 (4) ^b	323 (4) ^b	73 (0) ^d	23 (0) ^d

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

As temperaturas de pasta dos amidos de mandioca e batata (65,0 e 65,2 °C, respectivamente) não diferiram significativamente, apresentando valores intermediários entre o amido de batata-doce com o maior valor (69,4 °C) e o amido de mandioquinha-salsa com o menor (61,0 °C). A temperatura de pasta determina o início do inchamento dos grânulos, quando a viscosidade aumenta e o aparelho detecta a primeira resistência para manter a agitação constante. Quanto menor esta temperatura, maior a facilidade de cozimento do amido. Altas temperaturas de pasta refletem uma maior resistência do amido a gelatinização

causada por uma maior estabilidade estrutural dos grânulos (TESTER; MORRISON, 1990), observada, neste caso, principalmente para o amido de batata-doce.

Entre os amidos estudados, o amido de batata apresentou a mais alta viscosidade de pico, devido à repulsão física dos grupos fosfato monoésteres e à maior proporção de cadeias laterais longas de amilopectina (Figura 4.4 e Tabela 4.3), encontrados para esse amido. Todos os amidos apresentaram alta fragilidade frente à agitação mecânica e ao aquecimento, sendo que o amido de batata apresentou a maior viscosidade de quebra, e os amidos de mandioca e batata-doce, as menores.

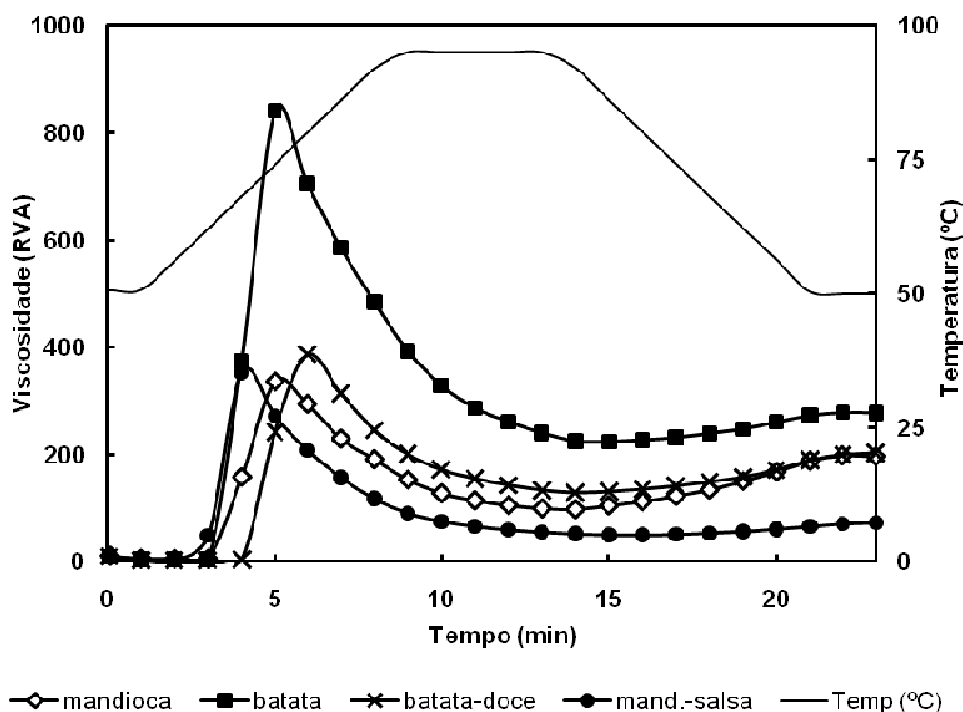


Figura 4.5 Perfil viscoamilográfico dos amido nativos de raízes e tubérculos.

A maior tendência a retrogradação (*setback*) foi apresentada pelo amido de mandioca (100 RVU), e o amido de mandioquinha-salsa apresentou o menor valor de *setback* (23 RVU). A tendência à retrogradação está relacionada à capacidade da amilose em se reorganizar com o resfriamento da pasta formando um gel. Este resultado concorda com os teores de amilose absolutos encontrados (Tabela 4.4) para estes amidos. Outro fator que influencia a tendência a retrogradação é a presença de moléculas de fosfato monoéster ligadas covalentemente à amilopectina formando grupamentos iônicos que se repelem fisicamente

dificultando a reorganização das cadeias e formação de gel (HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003), explicando o menor valor de *setback* encontrado para o amido de batata do que o de batata-doce.

4.2.8 Propriedades Térmicas

Os perfis endotérmicos estão apresentados na Figura 4.6 e as propriedades de gelatinização dos amidos nativos, determinadas por DSC, estão apresentadas na Tabela 4.6. Os amidos nativos apresentaram picos bem definidos, sendo os picos dos amidos de batata e mandioca os mais estreitos, sugerindo cristais mais homogêneos. O pico mais largo e, em maiores temperaturas, do amido de batata-doce, indicou maior heterogeneidade e maior estabilidade estrutural dos grânulos, confirmando o perfil de RVA observado para esse amido (Figura 4.5).

As temperaturas iniciais de gelatinização, determinadas por DSC, de todos os amidos estudados foram menores do que suas temperaturas de pasta, obtidas com o RVA. A temperatura de pasta é determinada com os primeiros acréscimos na viscosidade da pasta de amido, enquanto que o DSC é sensível a ponto de detectar quando os primeiros grânulos de amido começam a se desorganizar, determinando a temperatura inicial de gelatinização (JANE et al., 1999).

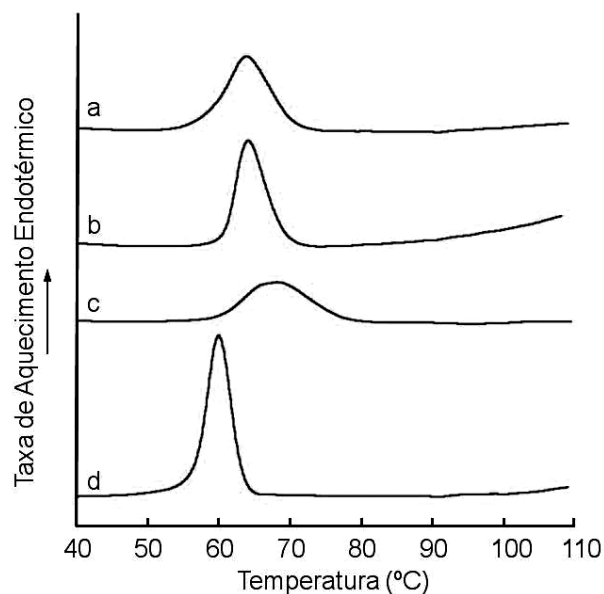


Figura 4.6 Perfil endotérmico dos amidos nativos, determinados por DSC; (a) mandioca, (b) batata, (c) batata-doce e (d) mandioca-salsa.

Os amidos de batata e mandioquinha-salsa apresentaram as mais altas entalpias de gelatinização (ΔH_{gel}), 15,7 J/g e 15,6 J/g, respectivamente, enquanto que os amidos de mandioca e batata-doce exibiram os menores valores de ΔH_{gel} . Altas proporções de cadeias ramificadas longas da amilopectina indicam maiores extensões da lamela cristalina (YOO et al., 2009). ΔH_{gel} é a energia necessária para o rompimento das ligações de hidrogênio de regiões amorfas e das duplas hélices da amilopectina (TESTER; KARKALAS, 2004). Para a completa dissociação, as longas duplas hélices requerem mais energia do que as cadeias mais curtas (SINGH et al., 2003; SINGH et al., 2007), o que contribuiu para os maiores valores de ΔH_{gel} dos amidos de batata e mandioquinha-salsa.

O amido de batata apresentou maior temperatura inicial (T_o) (61,9°C), seguido pelo amido de batata-doce (59,7°C), enquanto que o amido mandioquinha-salsa exibiu o menor valor (57,7°C) para esse parâmetro. As temperaturas de pico (T_p) e de conclusão (T_c) dos amidos nativos variaram de 60,9-66,8°C e 64,2-74,8°C, respectivamente. O amido de batata-doce apresentou os maiores valores de T_p e T_c . Altas temperaturas de gelatinização estão relacionadas a estruturas cristalinas fortes e maior ordem molecular (SRICHUWONG et al., 2005a). De acordo com Tester (1997), a extensão da perfeição cristalina é refletida nas temperaturas de gelatinização. O amido de mandioquinha-salsa apresentou os menores valores de temperaturas de gelatinização (T_o , T_p e T_c), seguido pelo amido de mandioca, que podem ser atribuídos à imperfeições existentes nos cristais dos grânulos desses amidos, observados por HPAEC-PAD (Figura 4.4).

Tabela 4.6 Propriedades de gelatinização dos amidos nativos^a.

Amidos	T_o^* (°C)	T_p^* (°C)	T_c^* (°C)	ΔT^* (°C)	ΔH_{gel}^* (J/g)
<i>Mandioca</i>	59,0 (0,1) ^c	64,7 (0,1) ^b	71,2 (0,1) ^b	12,2	12,8 (0,3) ^b
<i>Batata</i>	61,9 (0,1) ^a	65,1 (0,1) ^b	69,9 (0,2) ^c	8,1	15,7 (0,4) ^a
<i>Batata-doce</i>	59,7 (0,0) ^b	66,8 (0,1) ^a	74,8 (0,1) ^a	15,1	12,3 (0,4) ^b
<i>Mandioquinha-salsa</i>	57,7 (0,3) ^d	60,9 (0,3) ^c	64,2 (0,3) ^d	6,5	15,6 (0,1) ^a

^a Média de três replicatas, com o respectivo desvio-padrão apresentado entre parênteses. Valores seguidos pela mesma letra, numa mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

* T_o , T_p , T_c = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; ΔT = faixa de temperatura ($T_c - T_o$); ΔH_{gel} = variação de entalpia de gelatinização.

Segundo Nwokocha et al. (2009), a faixa de temperatura (ΔT) é influenciada pelo grau de heterogeneidade dos cristais nos grânulos dos amidos. Deste modo, as amplas ΔT encontradas para os amidos de mandioca e batata-doce (12,2 e 15,1°C, respectivamente) indicam uma maior heterogeneidade dos cristais. O amido de mandioquinha-salsa exibiu menor faixa de temperatura (6,5°C), encontrado também por Rocha, Demiate e Franco (2008), sugerindo que esse amido apresenta cristais mais homogêneos.

Tabela 4.7 Propriedades térmicas dos amidos retrogradados^a.

Amidos	T _o * (°C)	T _p * (°C)	T _c * (°C)	ΔH _{ret} * (J/g)	%R*
<i>Mandioca</i>	40,0 (0,7) ^{ab}	52,1 (0,1) ^c	59,2 (0,4) ^d	2,3 (0,4) ^c	17,9
<i>Batata</i>	41,2 (0,4) ^a	56,4 (0,0) ^a	68,1 (0,1) ^a	7,9 (0,2) ^a	50,3
<i>Batata-doce</i>	38,6 (0,5) ^b	52,4 (0,5) ^c	63,6 (0,1) ^b	7,2 (0,2) ^b	58,5
<i>Mandioquinha-salsa</i>	41,4 (0,7) ^a	54,8 (0,1) ^b	62,3 (0,3) ^c	2,0 (0,2) ^c	12,8

^a Média de três replicatas, com o respectivo desvio-padrão apresentado entre parênteses. Valores seguidos pela mesma letra, numa mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05);

* T_o, T_p, T_c = temperatura inicial, de pico e final, respectivamente; ΔH_{ret} = variação de entalpia de retrogradação; %R = percentagem de retrogradação [(ΔH_{ret}/ ΔH_{gel}) x 100].

Depois de gelatinizado, as moléculas do amido se reorganizam, fenômeno esse conhecido como retrogradação. A recristalização dos géis de amido que ocorre durante longos períodos de estocagem dos géis de amido é atribuída às frações da amilopectina (SRICHUWONG et al., 2005a). As propriedades dos amidos retrogradados estão apresentadas na Tabela 4.7. Os picos endotérmicos de todos os amidos retrogradados ocorreram em menores temperaturas (38,6 - 68,1°C) do que as temperaturas de gelatinização (57,7 - 74,8°C) de seus respectivos amidos nativos. A entalpia de retrogradação (ΔH_{ret}) caiu significativamente em relação ao ΔH_{gel}. Esta redução ocorre devido a um alinhamento impróprio das cadeias de amilopectina durante a recristalização, causando formação de estruturas cristalinas menos organizadas e menos estáveis do que aquelas existentes no amido nativo (SRICHUWONG et al., 2005a). Deste modo menor energia é requerida para fundir os cristais reestruturados.

A percentagem de retrogradação (%R) do amido de batata-doce (58,5%) indicou uma alta tendência à retrogradação, que foi menor para os amidos de mandioca e mandioquinha-salsa (17,9 e 12,8%, respectivamente).

4.3 HIDRÓLISE ÁCIDA

O perfil da cinética da hidrólise ácida dos amidos nativos (Figura 4.7) permitiu a definição dos tempos de hidrólise para a recuperação das dextrinas Naegeli. Segundo esse perfil, os amidos de mandioca, batata e batata-doce atingiram o patamar por volta do 9º dia de hidrólise, enquanto que para o amido de mandioquinha-salsa o patamar foi alcançado desde o 3º dia de hidrólise. Assim, os tempos de hidrólise para obtenção das dextrinas Naegeli foram definidos: 1, 3, 6, 9, 12, 15 e 30 dias, para os amidos de mandioca, batata e batata-doce; 1, 3, 6, 12 e 30 dias, para o amido de mandioquinha-salsa.

Foram duas as razões para um menor número de amostras de dextrinas recuperadas para o amido de mandioquinha-salsa; a extensão da hidrólise para o amido de mandioquinha-

salsa implicaria num rendimento muito baixo dos resíduos recuperados, sendo que nesse caso a quantidade de matéria-prima foi um fator limitante na escolha dos tempos de hidrólise e segundo o perfil obtido com a cinética, as amostras de 9 e 15 dias não apresentariam diferenças significativas daquelas amostras de 6 e 12 dias de hidrólise.

As porcentagens de hidrólise ácida dos amidos estão apresentadas na Figura 4.8. Duas fases puderam ser claramente observadas. A primeira fase, representada pelos três primeiros dias de hidrólise para o amido de mandioca-salsa, e pelos primeiros seis dias de tratamento para os outros amidos, foi atribuída à rápida degradação das regiões amorfas dos grânulos, enquanto que a segunda fase correspondeu à lenta hidrólise das lamelas cristalinas (JACOBS et al., 1998; SRICHUWONG et al., 2005b).

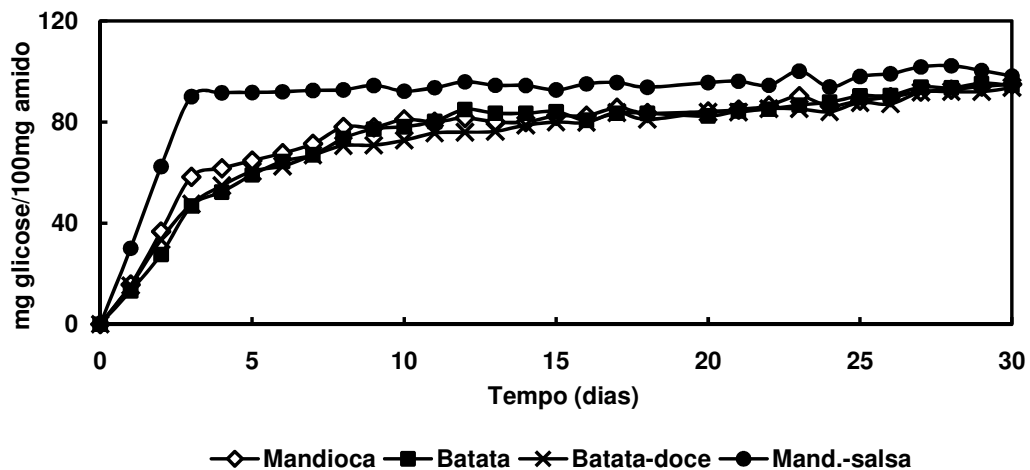


Figura 4.7 Perfil da cinética da hidrólise ácida dos amidos em função do tempo de incubação.

A hidrólise ácida do amido envolve um ataque eletrofílico unilateral aos prótons das ligações glicosídicas. Devido à arquitetura do grânulo de amido, o empacotamento menos organizado das moléculas de amilose e amilopectina nas camadas amorfas é mais suscetível ao ataque, enquanto que nas regiões cristalinas o denso empacotamento das cadeias moleculares impede tanto a penetração dos íons de hidrogênio quanto a mudança na conformação do anel de cadeira para meia-cadeira, necessária para a ruptura da ligação glicosídica (SANGUANPONG et al. 2003; HOOVER, 2001).

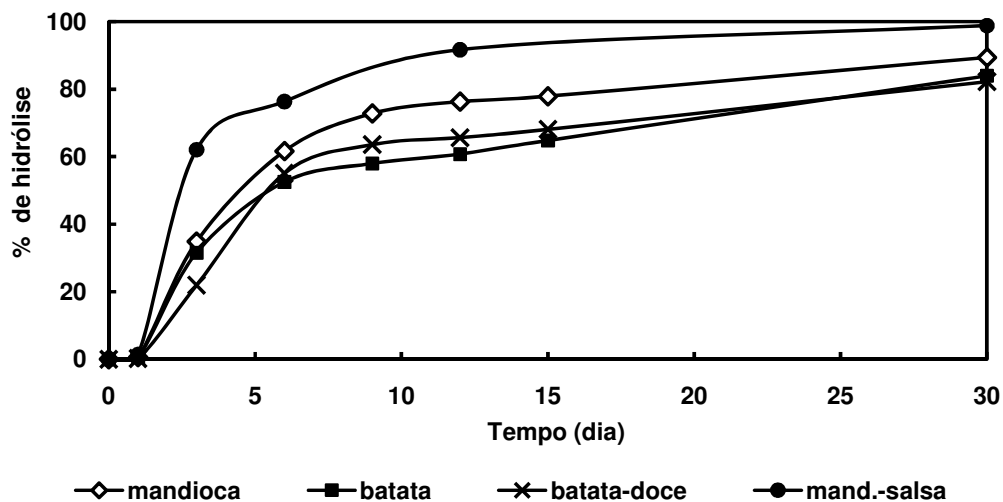


Figura 4.8 Porcentagem de hidrólise ácida dos amidos em função do tempo de incubação.

A porcentagem de hidrólise dos grânulos variou com as diferentes fontes botânicas, como mostra a Figura 4.8. O amido de mandioca foi o mais suscetível à hidrólise ácida seguido pelo amido de mandioquinha-salsa. Os amidos de batata e batata-doce mostraram maior resistência ao ataque ácido e apresentaram porcentagens de hidrólise similares durante o tratamento. No entanto, no primeiro estágio de hidrólise (até 6 dias), o amido de batata foi ligeiramente mais susceptível ao ácido do que o amido de batata-doce. Segundo Jayakody e Hoover (2002) as diferenças na hidrólise entre os amidos podem ser atribuídas à estrutura da amilopectina (extensão da distribuição das ramificações entre as regiões cristalinas e amorfas da amilopectina e grau de empacotamento das duplas hélices na região cristalina) e composição do amido (teor de amilose). Os resultados obtidos com a hidrólise ácida dos amidos de mandioca e mandioquinha-salsa reforçam a hipótese, sugerida anteriormente, de que esses amidos apresentam imperfeições em sua estrutura cristalina (Figura 4.4), causando conseqüentemente uma menor estabilidade estrutural, tornando os grânulos menos resistentes à gelatinização (Tabela 4.6) e ao ataque ácido.

A resistência dos amidos nativos à hidrólise ácida ocorreu na seguinte ordem: batata > batata-doce > mandioca > mandioquinha-salsa. As temperaturas iniciais de gelatinização (T_0) desses amidos também obedeceram esta ordem (Tabela 4.6), fato que também pode ter contribuído para as diferentes suscetibilidades desses amidos ao ácido, uma vez que quanto mais próxima a temperatura de hidrólise (38°C) for da T_0 maior será a energia vibracional das moléculas do amido, facilitando o ataque do íon hidroxônio às ligações glicosídicas.

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura das Dextrinas Naegeli

As micrografias dos grânulos dos amidos nativos e dos resíduos obtidos em diferentes tempos de hidrólise, observados em microscópio eletrônico de varredura, estão apresentadas nas Figuras 4.9-4.12.

Todos os amidos nativos apresentaram grânulos com superfície lisa e homogênea (Figuras 4.9-4.12a). O formato granular foi preservado para todos os amidos (Figuras 4.9-4.12b) após um dia de hidrólise. No entanto, o amido de mandioquinha-salsa, nesse momento, já apresentou grande degradação das regiões amorfas dos grânulos (Figura 4.12b↓), confirmando sua maior susceptibilidade ao ataque do ácido (Figura 4.8). Foram observadas erosões na superfície dos grânulos de todos os amidos (Figuras 4.9-4.12b↓), confirmando que a hidrólise ocorre primeiramente na superfície e, em seguida, as regiões amorfas são preferencialmente degradadas (TANG; BRUN; HILLS, 2001). Os amidos de batata e batata-doce, que foram os mais resistentes à hidrólise ácida (Figura 4.8), apresentaram grânulos que não foram totalmente degradados, mesmo após 3 dias de tratamento (Figuras 4.10c e 4.11c↓), enquanto que, nesse mesmo período, os resíduos dos amidos de mandioca e mandioquinha-salsa apresentaram total degradação das regiões amorfas (Figuras 4.9c e 4.12c). A partir de 6 dias de hidrólise, como mostrado nas Figuras 4.9-4.12d-f, a aglomeração das partículas, seguida de formação de resíduos pontiagudos e estruturas facetadas, características do material cristalino mais resistente à degradação ácida, foi observada.

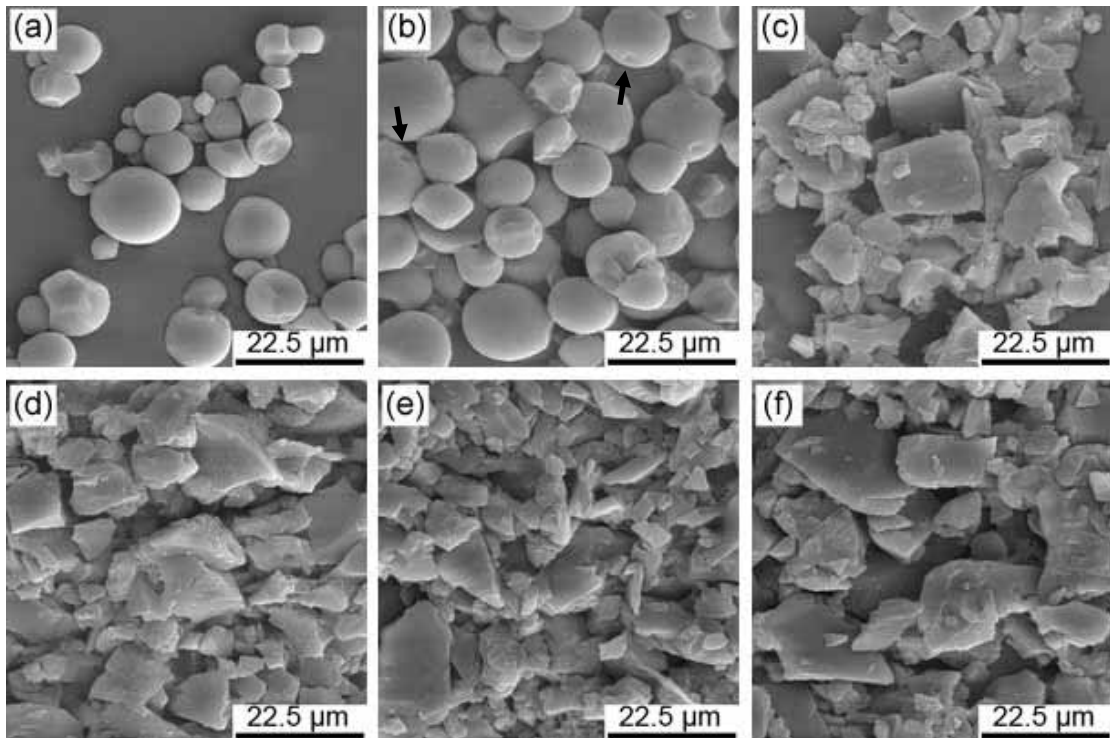


Figura 4.9 Micrografias de (a) amido nativo de mandioca e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; e (f) 30 dias de hidrólise ácida.

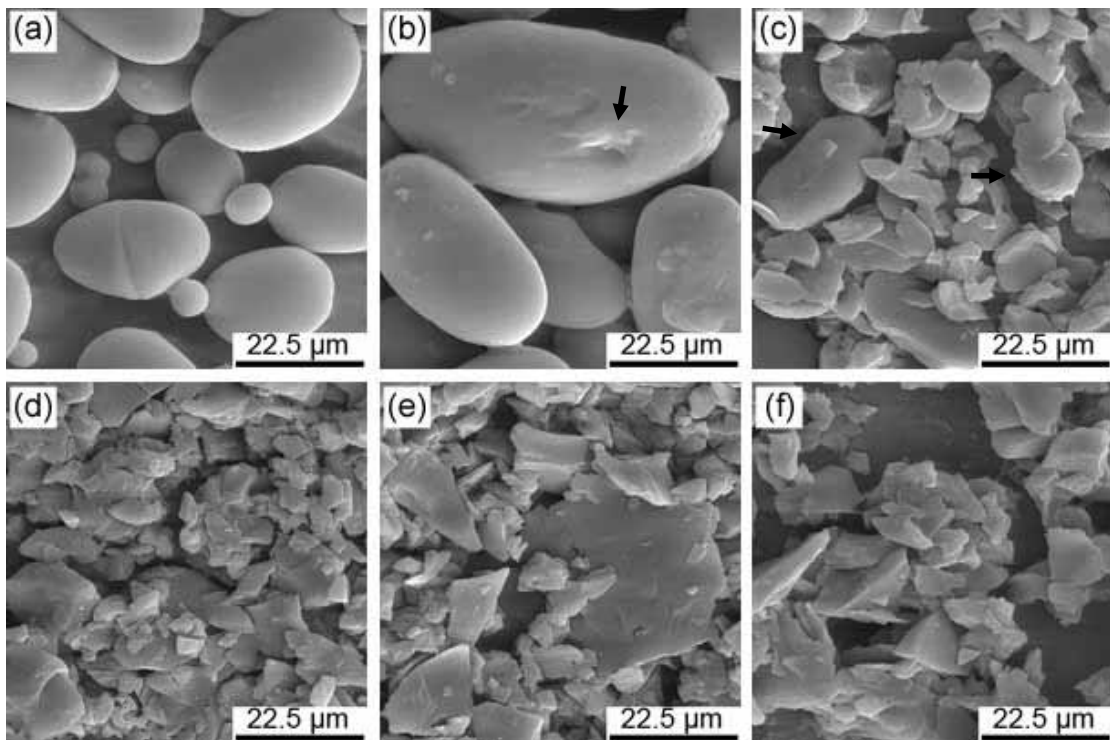


Figura 4.10 Micrografias de (a) amido nativo de batata e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; e (f) 30 dias de hidrólise ácida.

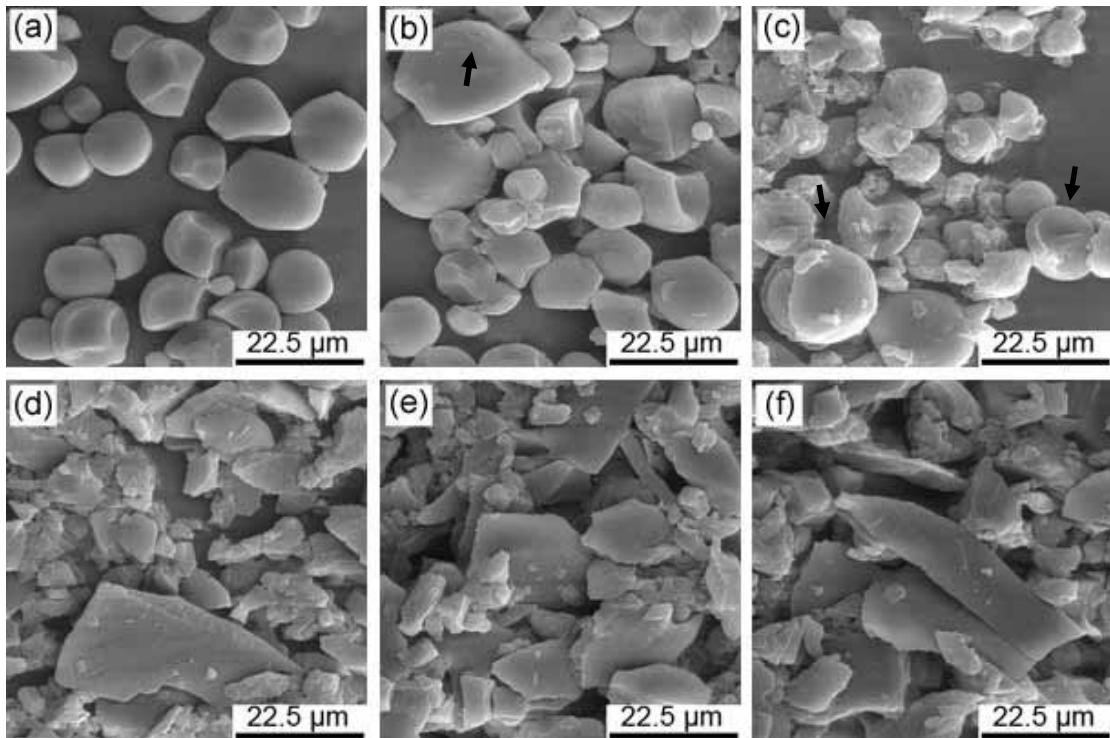


Figura 4.11 Micrografias de (a) amido nativo de batata-doce e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; e (f) 30 dias de hidrólise ácida.

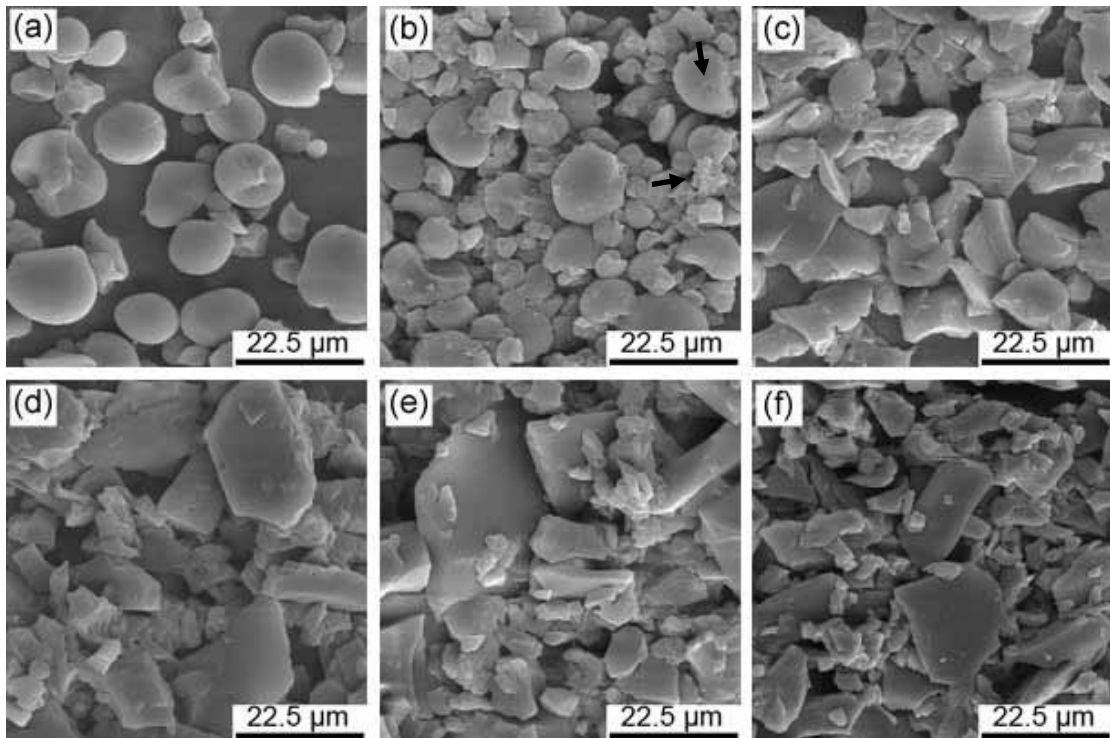


Figura 4.12 Micrografias de (a) amido nativo de mandioca-salsa e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; e (f) 30 dias de hidrólise.

4.3.2 Difração de Raios-X e Cristalinidade Relativa das Dextrinas Naegeli

A difração de raios-X é normalmente utilizada na caracterização estrutural de amidos nativos, mas pode também detectar mudanças na cristalinidade dos grânulos causadas por tratamentos físicos ou químicos no amido. Os difractogramas de raios-X dos amidos nativos e das dextrinas Naegeli de mandioca, batata, batata-doce e mandioquinha-salsa, estão apresentados nas Figuras 4.13-4.16, respectivamente. Na Tabela 4.8, estão representados as cristalinidades relativas (C_{rel}) e os padrões de raios-X dos quatro amidos nativos e suas respectivas dextrinas Naegeli.

As dextrinas Naegeli obtidas dos amidos de mandioca e batata-doce (Figuras 4.13 e 4.15) apresentaram aumento gradual na intensidade e definição dos picos característicos do padrão de difração tipo A, com o aumento do tempo de hidrólise, observado principalmente no duplete em 17° e 18° em 2θ . Ao mesmo tempo, observou-se um decréscimo na intensidade do pico em $5,6^\circ$ em 2θ , que desapareceu após 3 e 6 dias de hidrólise respectivamente para os amidos de mandioca e batata-doce, sugerindo a degradação dos cristais tipo B, presentes nos grânulos desses amidos. O desaparecimento das características do padrão cristalino B e o incremento do pico típico do padrão tipo A mostraram que os tipos cristalinos dos amidos nativos de mandioca e batata-doce mudaram de C_A e C, respectivamente, para o padrão tipo A (Figuras 4.13 e 4.15). Como padrão de difração C é uma combinação dos padrões A e B, esses resultados sugerem que, nos amidos de mandioca e batata-doce, os cristais com padrão tipo B foram primeiro ou preferencialmente atacados pelo ácido. Esse comportamento do padrão C também foi observado por Wang, Yu e Yu (2008) e Jiping et al. (2007). Shujun et al. (2008) sugeriram que os cristais tipo B, presente nos grânulos de amidos tipo C, estariam localizados principalmente no núcleo desses grânulos, enquanto que na periferia dos mesmos estariam as áreas cristalinas compostas essencialmente pelos cristais tipo A. McPherson e Jane (1999) observaram maior birrefringência na periferia dos grânulos tratados com ácido, indicando maior cristalinidade nessa região dos grânulos. Mais estudos são necessários para revelar se realmente os cristais tipo B estão localizados no centro dos grânulos de amidos com padrão cristalino tipo C e porque eles são preferencialmente hidrolisados pelo ácido.

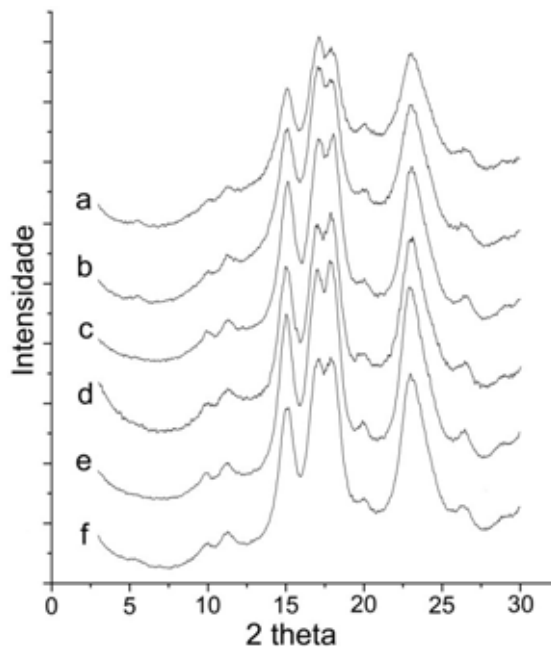


Figura 4.13 Difractogramas de raios-X do (a) amido nativo de mandioca; e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias de hidrólise.

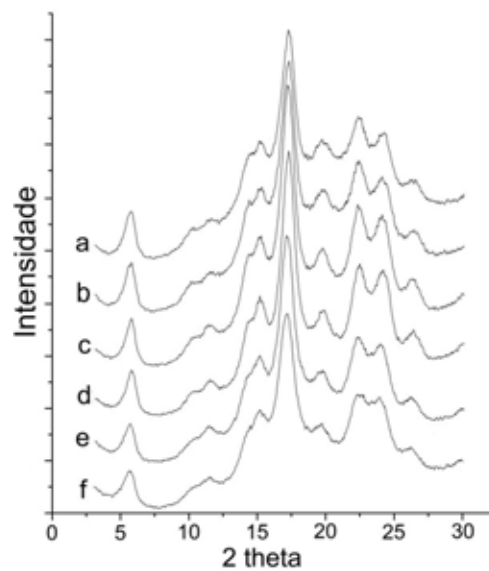


Figura 4.14 Difractogramas de raios-X do (a) amido nativo de batata; e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias de hidrólise.

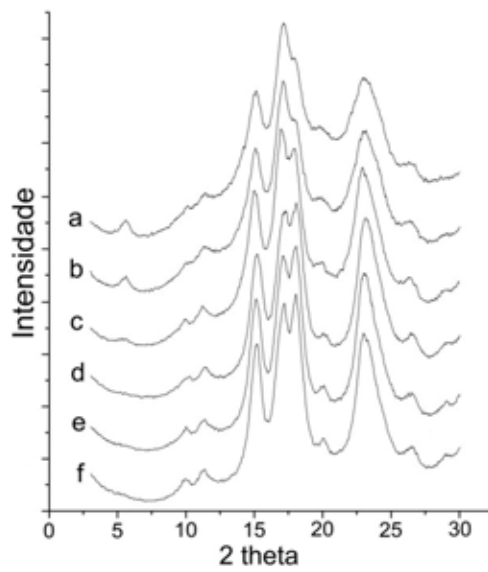


Figura 4.15 Difractogramas de raios-X do (a) amido nativo de batata-doce; e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias de hidrólise.

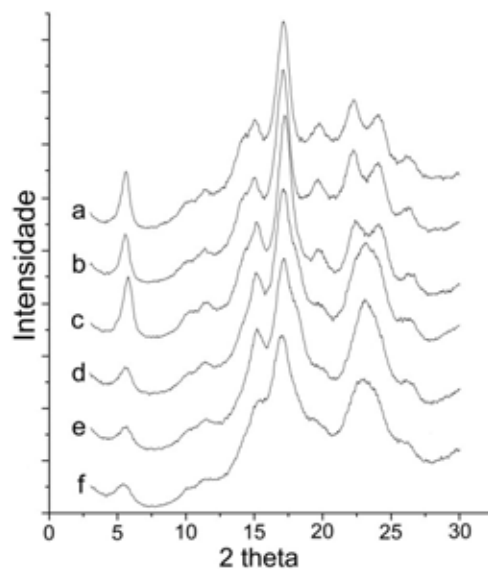


Figura 4.16 Difractogramas de raios-X do (a) amido nativo de mandioca-salsa; e de suas dextrinas Naegeli obtidas após (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias de hidrólise.

As análises de difração de raios-X das dextrinas Naegeli obtidas a partir do amido de batata (Figura 4.14) revelaram que o padrão cristalino deste amido permaneceu inalterado mesmo após 30 dias de hidrólise. Este comportamento era esperado para amidos com padrão de difração puramente tipo B, conforme relatado por Jiping et al. (2007) e Srichuwong et al. (2005b). No entanto, os difractogramas das dextrinas Naegeli obtidas do amido de mandioquinha-salsa (Figura 4.16) mostraram uma redução na intensidade do pico em $5,6^\circ$ em 2θ com o tempo de hidrólise e, após 6 dias de hidrólise, o pico dubleto em 22° e 24° em 2θ foi substituído por um pico singlete em 23° em 2θ , que é um pico característico do padrão cristalino tipo A. Os resultados sugeriram que, com a hidrólise ácida, o padrão cristalino do amido de mandioquinha-salsa mudou do tipo B para C_B . Esse comportamento só seria possível se os grânulos do amido de mandioquinha-salsa apresentassem, além dos cristais empacotados na forma B, estruturas cristalinas com padrão tipo A, que não foram visualizadas nos difractogramas do amido nativo. Mais estudos são necessários para determinar a causa da mudança do padrão cristalino do amido de mandioquinha-salsa.

As dextrinas Naegeli, de uma maneira geral, apresentaram aumento na cristalinidade relativa em relação aos seus respectivos amidos nativos (Tabela 4.8), confirmando a hidrólise preferencial das regiões amorfas, assim como observado por Sanguanpong et al. (2003). Mesmo após 30 dias de hidrólise ácida as dextrinas Naegeli apresentaram C_{rel} maiores do que os amidos nativos, com exceção das dextrinas do amido de mandioquinha-salsa que com 30 dias apresentaram C_{rel} de 28,4%, indicando que as áreas cristalinas desse amido, nesse momento, tinham sido intensamente degradadas pelo ácido.

Tabela 4.8 Cristalinidade relativa e padrões cristalinos dos amidos nativos e de suas respectivas dextrinas Naegeli.

Tempo de Hidrólise	Mandioca		Batata		Batata-doce		Mand.-salsa	
	C_{rel} (%)	Padrão	C_{rel} (%)	Padrão	C_{rel} (%)	Padrão	C_{rel} (%)	Padrão
<i>Nativo</i>	37,7	C_A	31,7	B	31,2	C	33,4	B
<i>1 dia</i>	37,4	C_A	33,8	B	36,3	C	37,1	B
<i>3 dias</i>	47,8	A	39,6	B	44,4	C_A	41,5	B
<i>6 dias</i>	51,6	A	45,1	B	53,9	A	37,6	C
<i>12 dias</i>	54,8	A	38,6	B	54,4	A	36,9	C
<i>30 dias</i>	51,6	A	35,7	B	53,2	A	28,4	C

O aumento na C_{rel} foi observado até um valor máximo ser atingido em tempos de hidrólise variáveis para cada amido. Os amidos de mandioca e batata-doce apresentaram valores máximos de C_{rel} com 12 dias de hidrólise (54,8 e 54,4%, respectivamente), enquanto

para os amidos de batata e mandioquinha-salsa estes valores foram observados com 6 e 3 dias de tratamento, respectivamente. Após esses períodos, a C_{rel} reduziu, evidenciando a degradação das regiões cristalinas que foi mais expressiva para os amidos de batata e mandioquinha-salsa (Tabela 4.8), ambos com padrão cristalino tipo B.

O empacotamento dos cristais na forma cristalina B é menos denso do que dos cristais na forma A (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; JANE, 2006), o que facilita, durante a hidrólise ácida, a penetração dos íons hidroxônios nas estruturas cristalinas com padrão tipo B, explicando a maior degradação das áreas cristalinas dos amidos de batata e mandioquinha-salsa e as mudanças no padrão cristalino observadas para os amidos de mandioca e batata-doce.

4.3.3 Comprimento das Cadeias das Dextrinas Naegeli

As distribuições normalizadas do comprimento de cadeias laterais da amilopectina dos amidos nativos e das suas dextrinas Naegeli desramificados estão apresentadas nas Figuras 4.17-4.20. Os amidos nativos apresentaram distribuição bimodal, onde dois picos foram observados (Figuras 4.17-4.20a). De maneira geral, com o tempo de hidrólise, foi observada a degradação do segundo pico e o estreitamento nas distribuições das dextrinas Naegeli desramificadas, o que, segundo Jane et al. (1997), indica uma melhora na cristalinidade, concordando com os valores de cristalinidade relativa (Tabela 4.8) obtidos com as análises de difração de raios-X.

O amido de mandioca apresentou GP 1 somente após 12 dias de hidrólise (Figura 4.17e), enquanto que, para os outros amidos, no primeiro dia de hidrólise o GP 1 já era visível (Figuras 4.17-4.20b). O declive no GP 8, típico das distribuições dos amidos nativos de batata e batata-doce (Figuras 4.18a e 4.19a), foi observado até 6 e 3 dias de hidrólise, respectivamente (Figuras 4.18d e 4.19c). Os amidos nativos de mandioca e mandioquinha-salsa apresentaram um ombro em GP 17-21 (Figuras 4.17a e 4.20a), que desapareceu completamente após 3 dias de hidrólise, para os dois amidos (Figuras 4.17c e 4.20c).

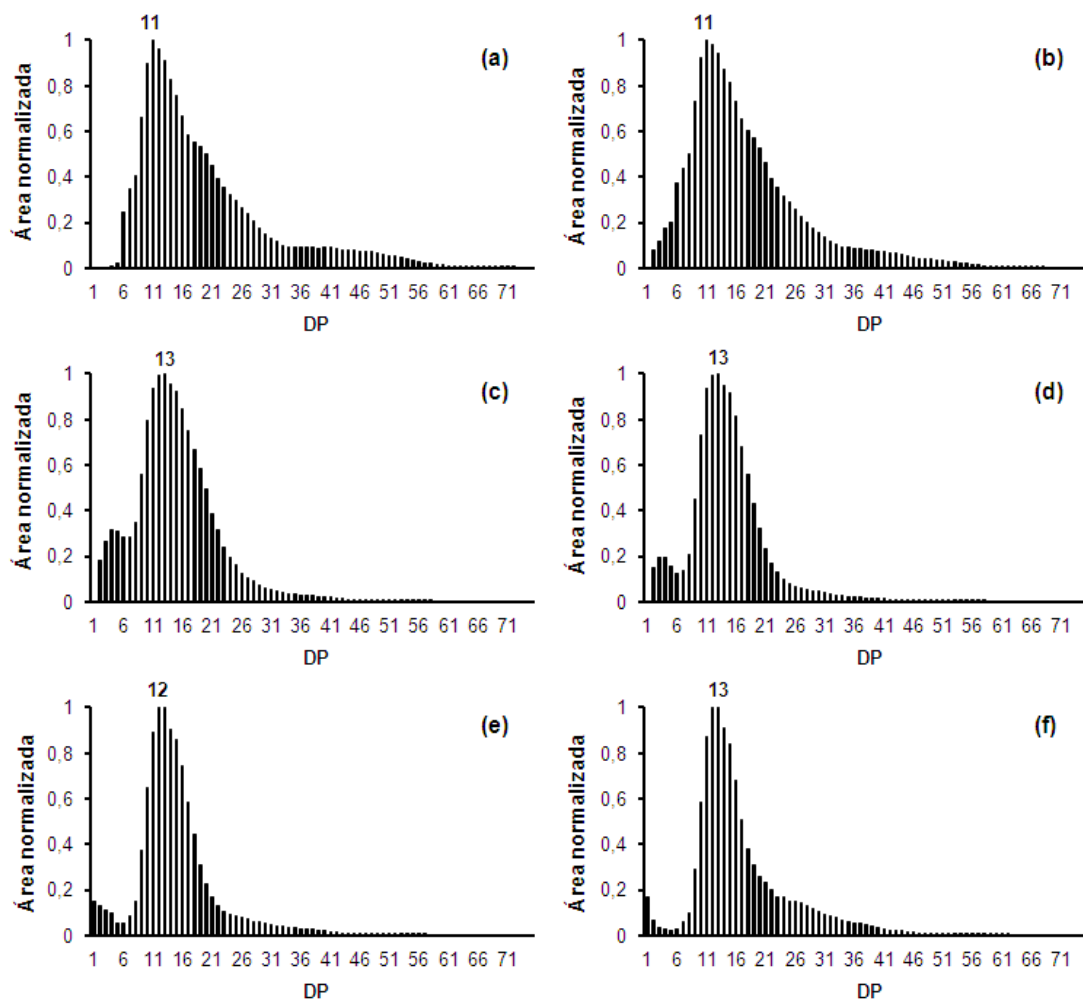


Figura 4.17 Distribuição do comprimento das cadeias laterais da (a) amilopectina do amido nativo de mandioca e das suas dextrinas Naegeli hidrolisadas por (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias; desramificados por isoamilase.

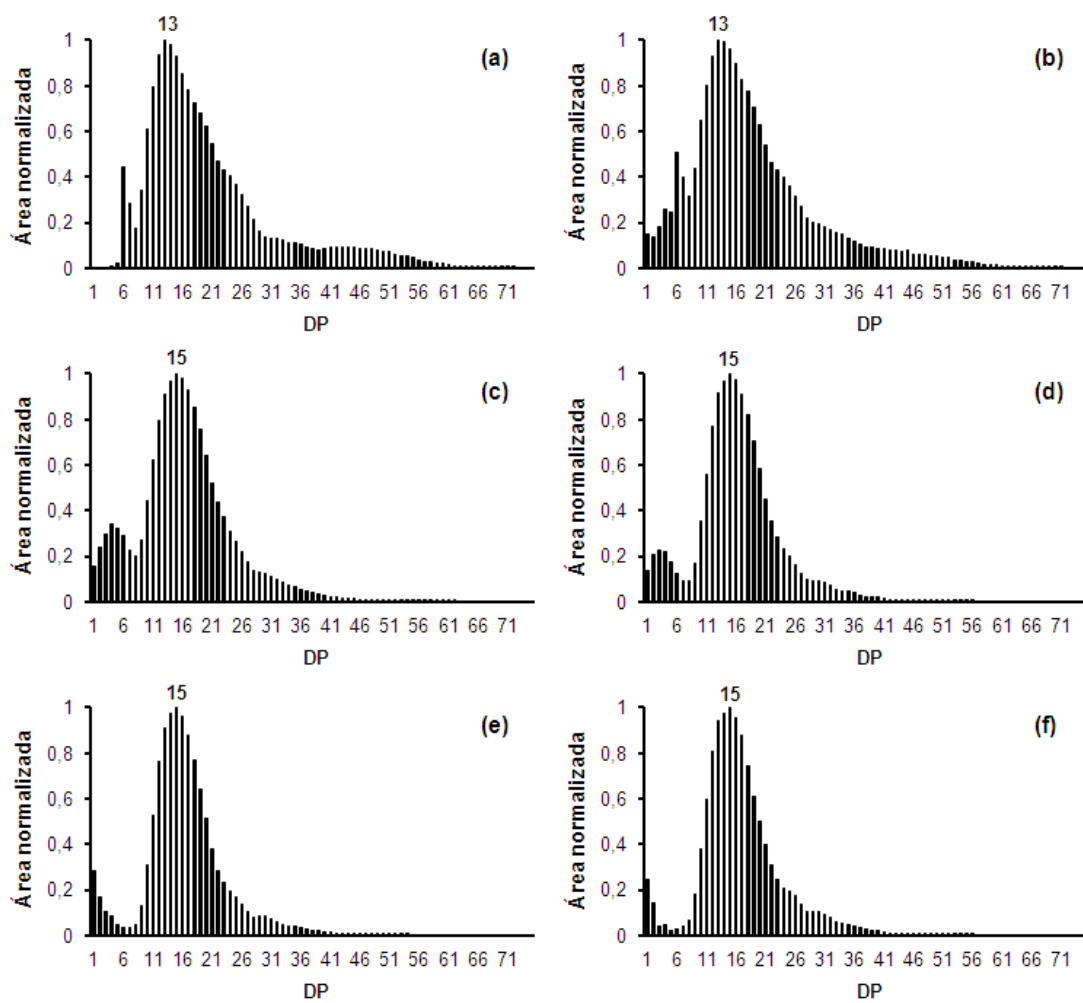


Figura 4.18 Distribuição do comprimento das cadeias laterais da (a) amilopectina do amido nativo de batata e das suas dextrinas Naegeli hidrolisadas por (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias; desramificados por isoamilase.

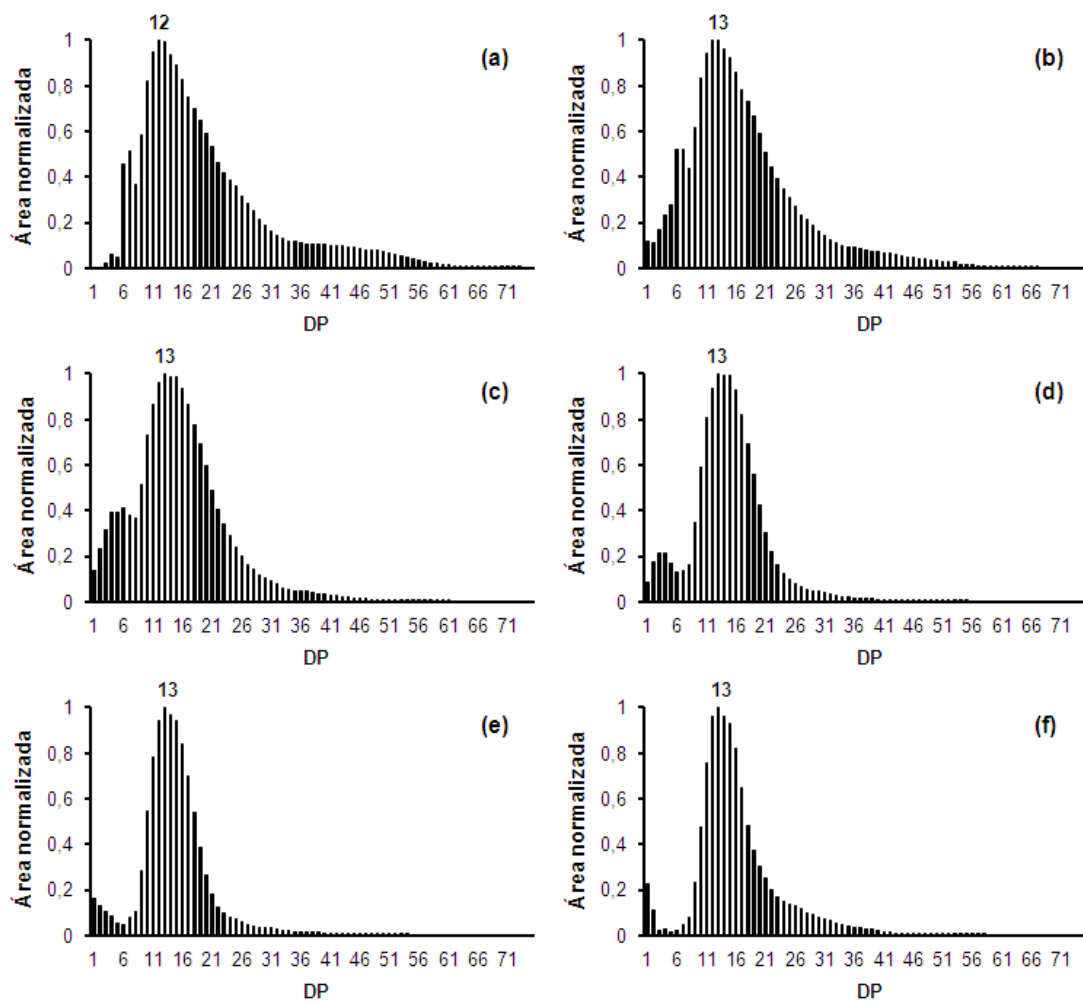


Figura 4.19 Distribuição do comprimento das cadeias laterais da (a) amilopectina do amido nativo de batata-doce e das suas dextrinas Naegeli hidrolisadas por (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias; desramificados por isoamilase.

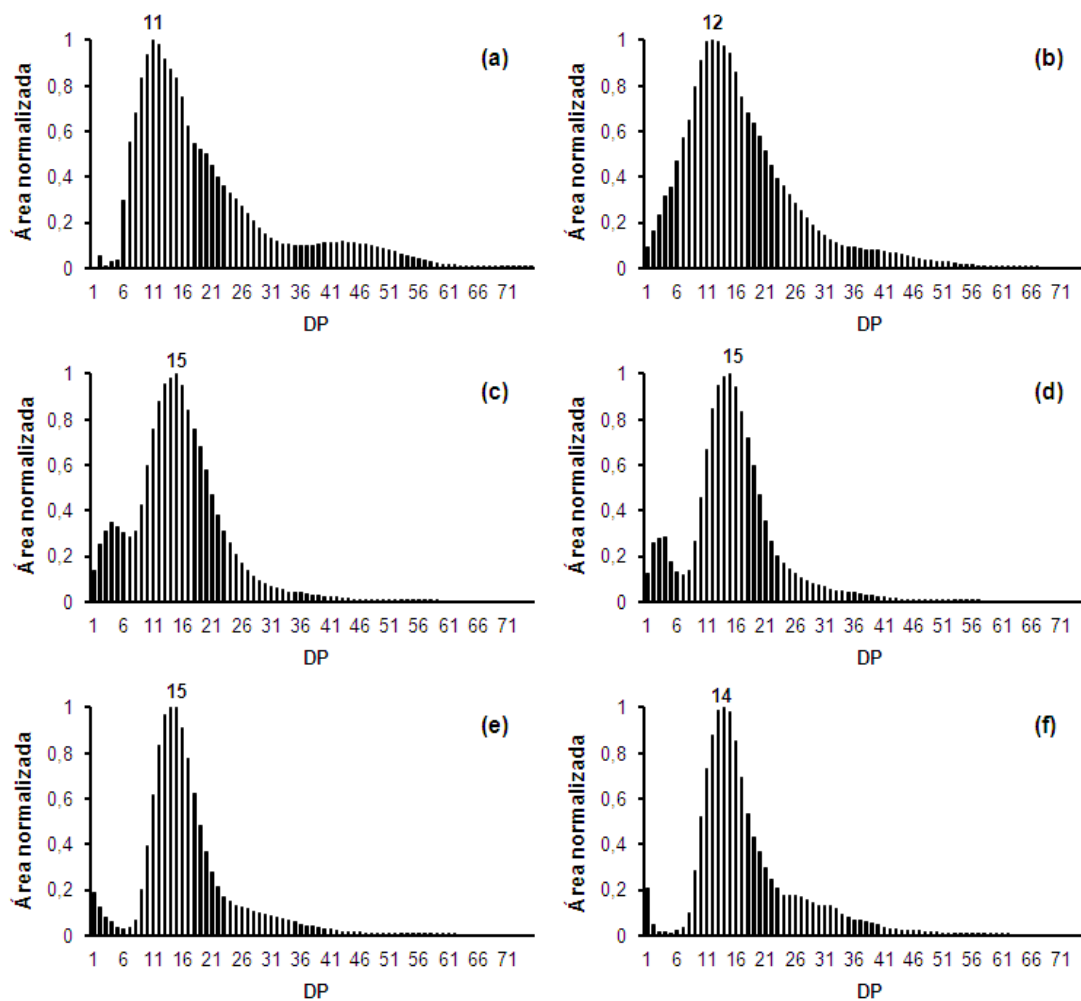


Figura 4.20 Distribuição do comprimento das cadeias laterais da (a) amilopectina do amido nativo de mandioquinha-salsa e das suas dextrinas Naegeli hidrolisadas por (b) 1 dia; (c) 3 dias; (d) 6 dias; (e) 12 dias; (f) 30 dias; desramificados por isoamilase.

Nas Tabelas 4.9-4.12, estão apresentadas as porcentagens de distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina dos amidos nativos e das suas dextrinas Naegeli desramificados por isoamilase.

Para todos os amidos, as cadeias muito curtas (GP 1-5) apresentaram maiores proporções até 3 dias de hidrólise. Essas cadeias são provenientes da hidrólise parcial das cadeias laterais que se encontram na superfície dos cristais ou nos defeitos de estrutura (pontos fracos) cristalina como sugerido por Jane et al. (1997). Após extensiva hidrólise, as proporções dessas cadeias diminuíram.

Tabela 4.9 Distribuição do comprimento das cadeias laterais do amido nativo de mandioca e de suas dextrinas Naegeli, desramificados por isoamilase.

	Comprimento de cadeia (%)					\overline{GP}	Maior GP detectado
	GP 1-5	GP 6-12	GP 13-24	GP 25-36	GP \geq 37		
<i>Nativo</i>	0,2	30,5	46,2	13,2	9,9	19,5	72
<i>1 dia</i>	3,6	31,5	46,0	12,3	6,6	17,7	68
<i>3 dias</i>	7,8	30,6	53,8	6,2	1,5	14,9	58
<i>6 dias</i>	6,2	31,9	56,0	4,6	1,3	14,6	58
<i>12 dias</i>	5,4	31,6	54,9	6,2	1,9	14,9	57
<i>30 dias</i>	3,0	27,9	53,8	11,8	3,5	16,8	62

Tabela 4.10 Distribuição do comprimento das cadeias laterais do amido nativo de batata e de suas dextrinas Naegeli, desramificados por isoamilase.

	Comprimento de cadeia (%)					\overline{GP}	Maior GP detectado
	GP 1-5	GP 6-12	GP 13-24	GP 25-36	GP \geq 37		
<i>Nativo</i>	0,1	22,6	53,0	13,7	10,6	20,5	72
<i>1 dia</i>	5,6	23,1	49,4	14,1	7,9	18,8	71
<i>3 dias</i>	9,2	19,3	59,1	10,4	2,0	16,3	62
<i>6 dias</i>	7,7	17,2	65,1	8,8	1,4	16,3	56
<i>12 dias</i>	6,1	16,2	68,1	8,4	1,3	16,4	54
<i>30 dias</i>	4,2	17,8	66,3	10,1	1,5	16,8	56

Tabela 4.11 Distribuição do comprimento das cadeias laterais do amido nativo de batata-doce e de suas dextrinas Naegeli, desramificados por isoamilase.

	Comprimento de cadeia (%)					\overline{GP}	Maior GP detectado
	GP 1-5	GP 6-12	GP 13-24	GP 25-36	GP \geq 37		
<i>Nativo</i>	2,0	27,2	47,0	13,8	10,0	19,6	73
<i>1 dia</i>	5,3	28,7	48,2	11,9	5,9	17,4	67
<i>3 dias</i>	9,3	26,8	53,1	8,5	2,2	15,5	61
<i>6 dias</i>	7,2	26,3	61,0	4,7	0,8	14,8	55
<i>12 dias</i>	5,4	28,0	61,5	4,2	0,9	14,7	54
<i>30 dias</i>	3,8	24,8	60,3	9,2	1,9	16,1	58

Tabela 4.12 Distribuição do comprimento das cadeias laterais do amido nativo de mandioquinha-salsa e de suas dextrinas Naegeli, desramificados por isoamilase.

	Comprimento de cadeia (%)					\overline{GP}	Maior GP detectado
	GP 1-5	GP 6-12	GP 13-24	GP 25-36	GP \geq 37		
<i>Nativo</i>	0,8	32,0	43,0	12,1	12,1	19,7	75
<i>1 dia</i>	6,5	30,4	45,9	11,7	5,5	17,0	67
<i>3 dias</i>	9,5	24,6	56,6	7,6	1,7	15,4	59
<i>6 dias</i>	9,0	21,2	60,6	7,4	1,8	15,6	57
<i>12 dias</i>	4,3	19,8	63,2	9,7	2,8	16,8	62
<i>30 dias</i>	2,6	22,0	58,0	13,3	4,2	17,8	62

A proporção das cadeias com GP 13-24 aumentou com o tempo de hidrólise. As cadeias com $GP \geq 25$, os \overline{GP} s e os maiores GPs detectados apresentaram comportamento semelhante para as dextrinas Naegeli desramificadas de todos os amidos, ou seja, seus valores reduziram até certo tempo de hidrólise, variável com a fonte botânica, depois aumentaram até 30 dias de hidrólise. Esses resultados sugerem que as cadeias curtas da amilopectina dos amidos estudados são mais externas e, portanto, mais susceptíveis ao ataque eletrofílico do ácido, enquanto que as cadeias longas e mais internas ficam protegidas durante o tratamento, causando o aumento das cadeias com $GP \geq 25$, do \overline{GP} e do maior GP detectado após extensiva hidrólise.

Os cromatogramas obtidos por HPAEC-PAD das dextrinas Naegeli obtidas após 12 dias de hidrólise estão apresentados na Figura 4.21. Os cromatogramas apresentaram perfil bimodal em que dois picos, referentes provavelmente a duas populações distintas de cadeias, foram evidentes para as dextrinas Naegeli de mandioca, batata-doce e mandioquinha-salsa (Figuras 4.21a, c e d). A dextrina Naegeli de batata apresentou apenas o primeiro pico e a segunda população de cadeias apareceu como um discreto ombro no cromatograma (Figura 4.21b).

As dextrinas Naegeli de mandioca, batata, batata-doce e mandioquinha-salsa apresentaram o primeiro pico em GP 13, 15, 14 e 14, respectivamente. O segundo pico que apareceu em GP 24, 24 e 25 respectivamente para as dextrinas Naegeli de mandioca, batata-doce e mandioquinha-salsa, e o ombro observado para a dextrina de batata desapareceram após a desramificação com isoamilase (Figura 4.22), comprovando que a segunda população era composta por cadeias uniramificadas cuja ligação α -(1 \rightarrow 6) estava localizada na lamela cristalina e ficou protegida durante a hidrólise ácida. As cadeias uniramificadas foram hidrolisadas pela isoamilase formando cadeias lineares, com isso a intensidade do primeiro pico aumentou, concordando com os resultados publicados de Perera et al. (2001), Vermeylen et al. (2004) e Yoo et al. (2009).

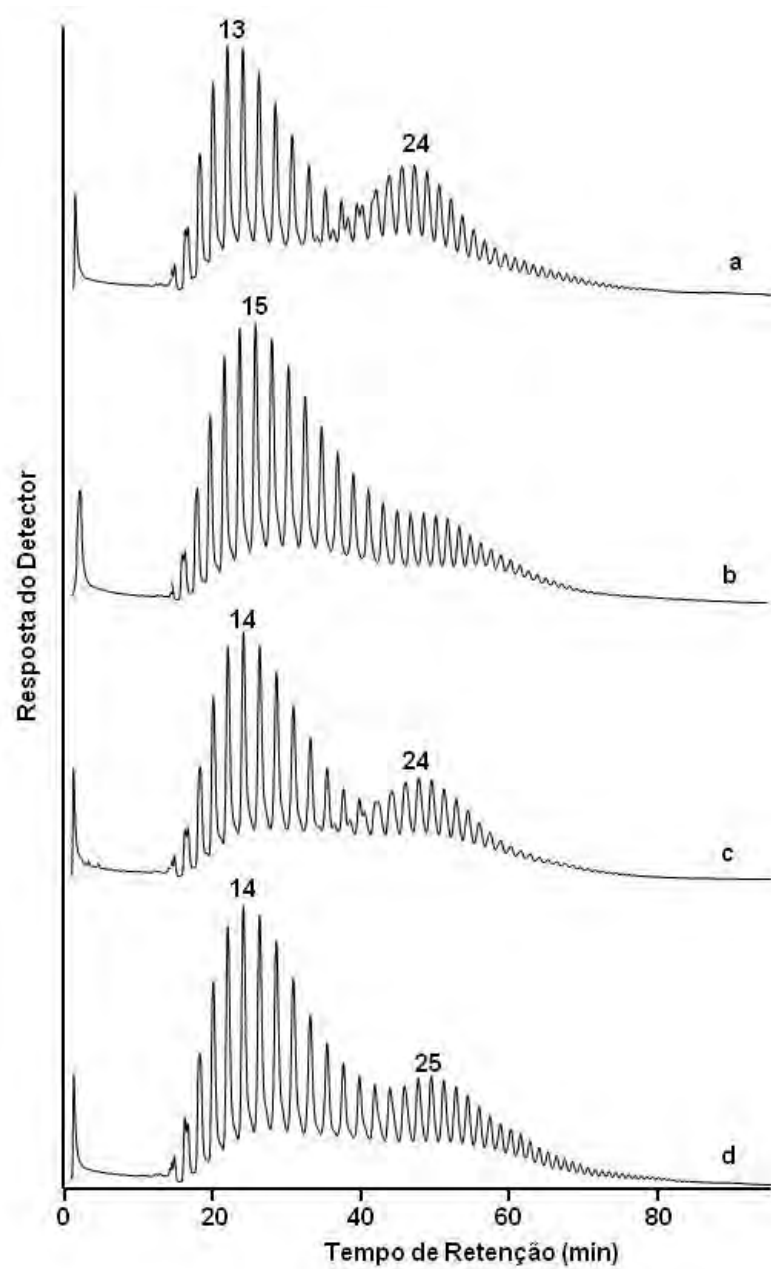


Figura 4.21 Cromatogramas de HPAEC-PAD das dextrinas Naegeli obtidas após 12 dias de hidrólise dos amidos (a) mandioca; (b) batata; (c) batata-doce; (d) mandioquinhas.

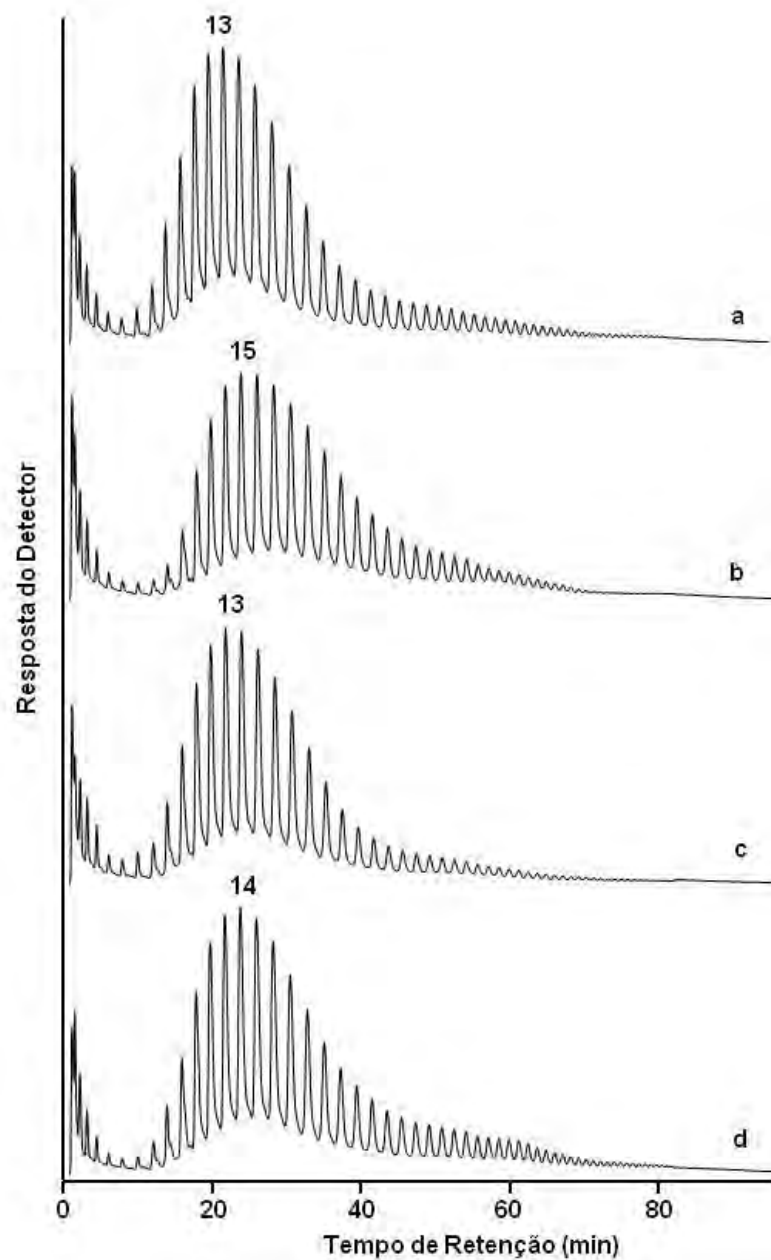


Figura 4.22 Cromatogramas de HPAEC-PAD das dextrinas Naegeli desramificadas com isoamilase obtidas após 12 dias de hidrólise dos amidos (a) mandioca; (b) batata; (c) batata-doce; (d) mandioquinha-salsa.

A razão entre as áreas relativas das cadeias uniramificadas e das cadeias lineares foram 0,50, 0,21, 0,32 e 0,33 para as dextrinas Naegeli de mandioca, batata, batata-doce e mandioquinha-salsa, respectivamente, indicando que mais cadeias ramificadas estavam presentes nas dextrinas Naegeli do amido de mandioca, enquanto que as dextrinas Naegeli de

batata consistiam principalmente de cadeias lineares. Segundo o modelo proposto por Jane et al. (1997), os pontos de ramificação dos amidos tipo A estão dispersos pelas regiões amorfas e cristalinas. As ligações α -(1→6) presentes nas lamelas cristalinas são preservadas nas dextrinas Naegeli dos amidos tipo A. Nos amidos tipo B, a maioria dos pontos de ramificação estão mais concentrados nas regiões amorfas, que são mais susceptíveis à hidrólise ácida. Por isso, poucas ramificações foram encontradas nas dextrinas do amido de batata que apresentou padrão de difração de raios-X tipo B. Entretanto, as dextrinas Naegeli do amido de mandioca-salsa (tipo B), apresentaram quantidade significativa de cadeias ramificadas, provavelmente devido a grande proporção de cadeias curtas (GP 6-12) encontrada para esse amido (Tabela 4.3).

Na Figura 4.23 estão apresentados os cromatogramas obtidos por HPAEC-PAD das dextrinas Naegeli obtidas após 6, 12 e 30 dias de hidrólise dos amidos de mandioca, batata, batata-doce e mandioca-salsa.

A razão entre as áreas relativas das cadeias uniramificadas e das cadeias lineares das dextrinas Naegeli respectivamente obtidas após 6, 12 e 30 dias de hidrólise dos amidos de mandioca (0,55, 0,50 e 0,45), batata (0,23, 0,21 e 0,20), batata-doce (0,41, 0,32 e 0,28) e mandioca-salsa (0,36, 0,33 e 0,27), reduziram com o tempo de hidrólise para todos os amidos, confirmando novamente a degradação das regiões cristalinas na segunda fase da hidrólise, e que os pontos de ramificação presentes nas lamelas cristalinas representam pontos fracos na estrutura cristalina.

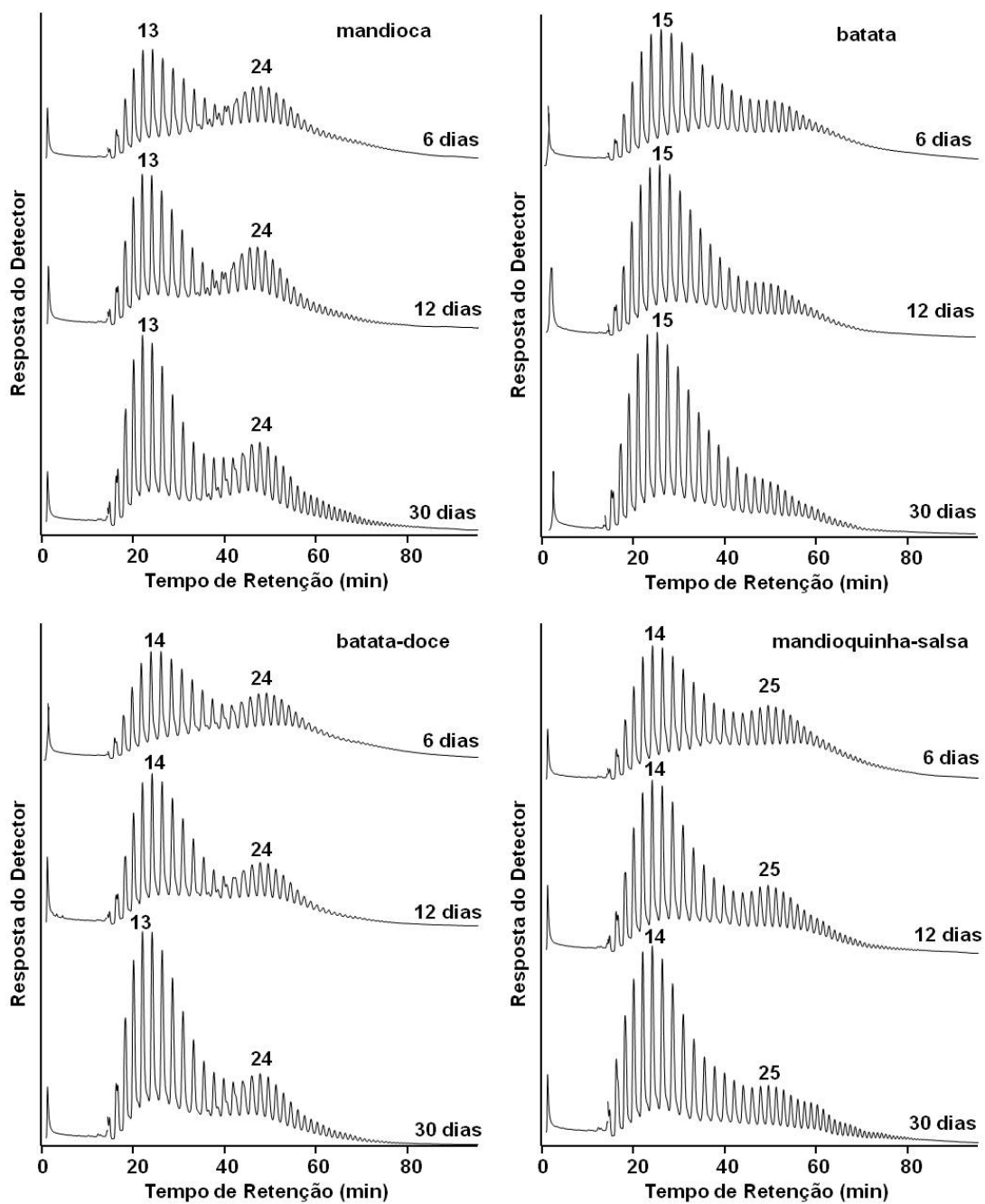


Figura 4.23 Cromatogramas de HPAEC-PAD das dextrinas Naegeli obtidas após 6, 12 e 30 dias de hidrólise amidos de mandioca, batata, batata-doce e mandioquinha-salsa.

4.3.4 Teor de Amilose Aparente das Dextrinas Naegeli

Os perfis de teor de amilose aparente em função do tempo de hidrólise dos amidos das diferentes fontes botânicas estão apresentados na Figura 4.24.

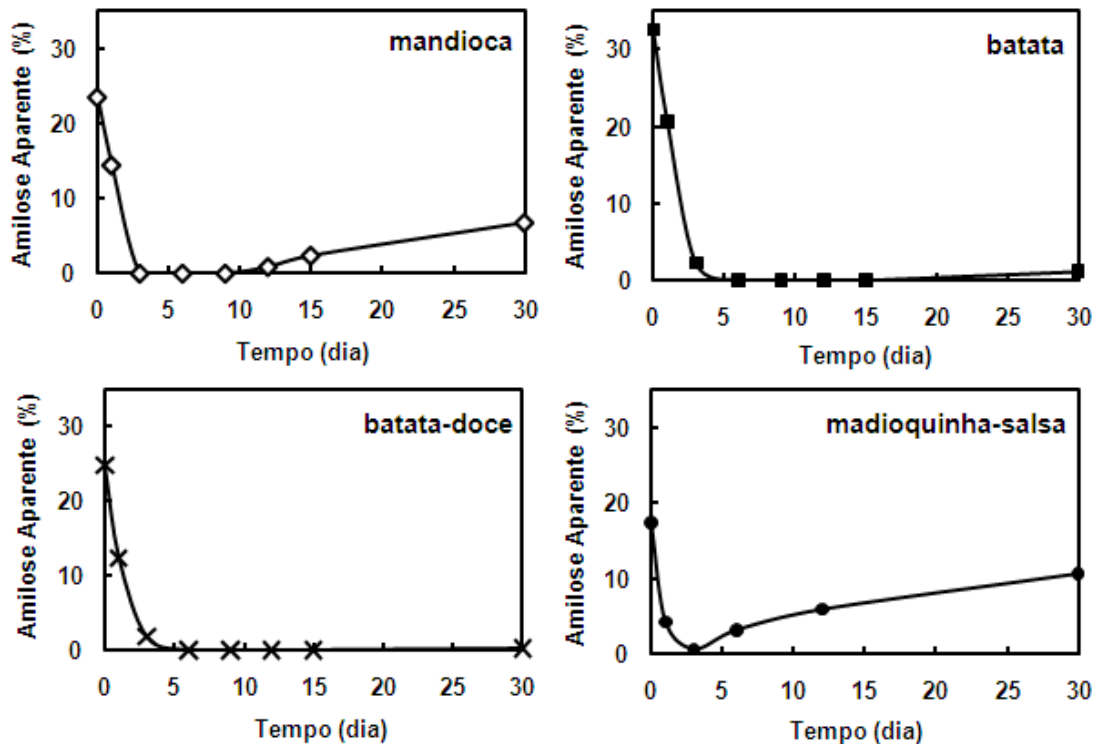


Figura 4.24 Gráficos do teor de amilose aparente em função do tempo de hidrólise dos amidos das diferentes fontes botânicas.

O teor de amilose aparente caiu significativamente até 3 dias de hidrólise para todos os amidos, confirmando, mais uma vez, que nesse período o ataque eletrofílico do ácido se concentrou nas regiões amorfas dos grânulos, onde as moléculas de amilose estão principalmente localizadas (TESTER; KARKALAS; QI, 2004; JANE, 2006). Após a completa degradação das moléculas de amilose e das regiões amorfas dos grânulos, as cadeias laterais mais externas de amilopectina, que se encontram na superfície dos cristais (JANE et al., 1997) passaram a ser preferencialmente hidrolisadas. Com isso, a proporção de cadeias curtas diminuiu e aumentando a proporção de cadeias de $GP \geq 37$ (Tabelas 4.9-4.12) que possuem maior capacidade para formar complexos com iodo, provocando o aumento nos teores de amilose aparente, claramente observados para os amidos de mandioca e

mandioquinha-salsa (Figura 4.24), que foram os amidos mais suscetíveis à hidrólise ácida (Figura 4.8).

4.3.5 Propriedades Térmicas das Dextrinas Naegeli

Os perfis endotérmicos dos amidos nativos e suas dextrinas Naegeli estão representados na Figura 4.25. Os picos observados para os amidos nativos mostraram-se melhor resolvidos do que aqueles observados para as dextrinas Naegeli. De maneira geral, houve uma progressiva redução na altura e um alargamento dos picos com o aumento do tempo de hidrólise além do deslocamento desses picos para maiores temperaturas.

De acordo com a teoria de Donovan (1979), citado por Jacobs et al. (1998), em excesso de água as regiões amorfas dos grânulos absorvem água e incham, aumentando a tensão nas cadeias e provocando um efeito desestabilizador nos cristais. Como o ácido ataca preferencialmente as áreas amorfas dos grânulos, os cristais isolados não são mais desestabilizados. Como resultado, a fusão dos cristais ocorre em temperatura mais alta e a transição é mais ampla em função das diferenças na estabilidade dos cristais no grânulo de amido (ROBIN et al., 1974; JACOBS et al., 1998; CROCHET et al., 2005).

As propriedades térmicas dos amidos nativos e de suas respectivas dextrinas Naegeli estão apresentadas na Tabela 4.13. Os amidos de batata e batata-doce apresentaram redução na temperatura inicial de gelatinização (T_0) no terceiro dia de hidrólise, enquanto que para os amidos de mandioca e mandioquinha-salsa a T_0 reduziu desde o primeiro dia. Essa redução, observada na primeira fase da hidrólise ácida, foi causada pelo isolamento de cristais com estabilidade inferior ou com defeitos, como no caso dos amidos de mandioca e mandioquinha-salsa (Figura 4.4), e que se fundiram a menores temperaturas. Esses cristais com defeitos ou menos estáveis foram preferencialmente atacados na segunda fase da hidrólise, provocando o aumento da T_0 a partir de 6 dias de hidrólise observado para todos os amidos.

A temperatura de pico (T_p) fornece a medida da qualidade dos cristais (SINGH et al., 2003). Portanto, o aumento da T_p com o tempo de tratamento, observado para todos os amidos (Tabela 4.13), indicou que a maioria dos cristais remanescentes da hidrólise apresentou estrutura mais perfeita e estável, por isso a fusão ocorreu a maiores temperaturas e esses cristais foram mais resistentes ao ataque eletrofílico dos íons hidroxônio.

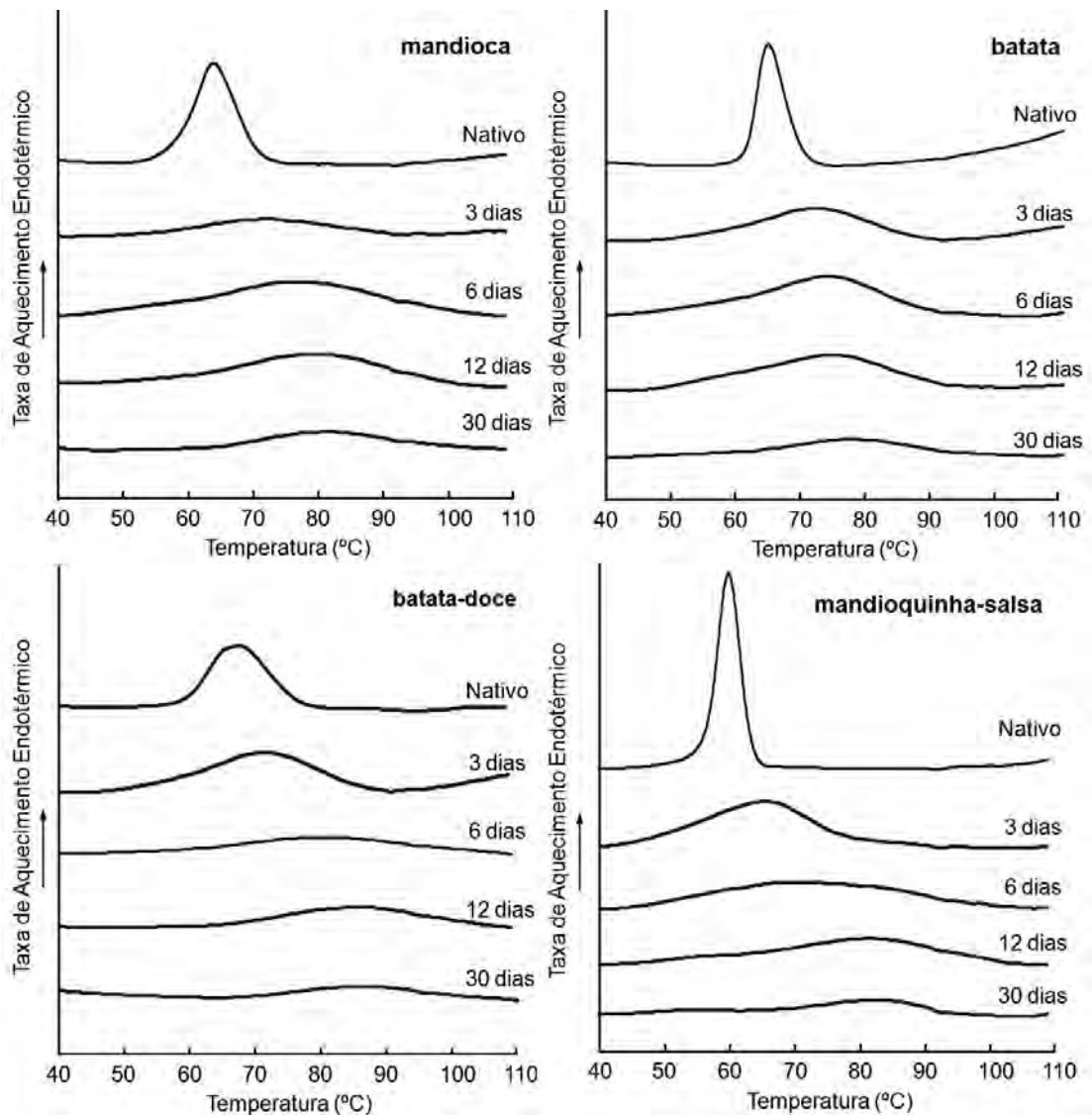


Figura 4.25 Perfil endotérmico observado por DSC dos amidos nativos e suas respectivas dextrinas Naegeli.

A hidrólise provocou o alargamento dos picos endotérmicos causado pelas diferenças nas estabilidades térmicas dos cristais isolados pela degradação das regiões amorfas durante a primeira fase da hidrólise (Figura 4.8), e essas diferenças são refletidas na faixa de temperatura (ΔT) do evento endotérmico. Durante a segunda fase da hidrólise, caracterizada pela degradação das regiões cristalinas, essas diferenças foram diminuindo causando a formação de cristais mais homogêneos e reduzindo a faixa de temperatura (ΔT) nos últimos dias de hidrólise (Tabela 4.13).

A redução da variação de entalpia (ΔH), observada na primeira fase do tratamento ácido dos amidos de mandioca e mandioca-salsa, indicou a menor ordem molecular causada provavelmente pelo isolamento dos cristais com defeitos, presentes na estrutura desses amidos (Figura 4.4), que necessitam de temperaturas mais baixas (T_o) e menor energia para fundir (ΔH). Na segunda fase da hidrólise, a redução no ΔH foi observada para todos os amidos, confirmando novamente a degradação das áreas cristalinas nessa etapa do tratamento ácido.

Tabela 4.13 Propriedades térmicas dos amidos nativos e suas dextrinas Naegeli^a.

	T_o^* (°C)	T_p^* (°C)	T_c^* (°C)	ΔT^* (°C)	ΔH^* (J/g)
Mandioca					
<i>Nativo</i>	59,0 (0,1) ^b	64,7 (0,1) ^c	71,2 (0,1) ^c	12,2	12,8 (0,3) ^{ab}
<i>1 dia</i>	56,5 (0,3) ^c	70,2 (0,7) ^d	84,5 (0,1) ^d	28,0	10,8 (1,3) ^c
<i>3 dias</i>	56,3 (0,5) ^c	72,7 (0,2) ^c	91,7 (0,5) ^c	35,3	6,8 (0,6) ^d
<i>6 dias</i>	58,8 (0,2) ^b	77,5 (0,5) ^b	95,8 (0,2) ^a	37,1	12,9 (0,1) ^{ab}
<i>12 dias</i>	60,0 (0,7) ^b	81,0 (0,2) ^a	94,5 (0,3) ^{ab}	34,5	11,7 (0,1) ^{bc}
<i>30 dias</i>	66,2 (0,5) ^a	81,2 (0,3) ^a	92,8 (0,5) ^{bc}	26,6	4,3 (0,1) ^d
Batata					
<i>Nativo</i>	61,9 (0,1) ^a	65,1 (0,1) ^e	69,9 (0,2) ^d	8,1	15,7 (0,4) ^b
<i>1 dia</i>	61,6 (1,0) ^a	77,0 (0,2) ^a	88,9 (0,3) ^b	27,3	18,4 (1,3) ^a
<i>3 dias</i>	54,0 (2,1) ^d	72,8 (0,1) ^d	87,7 (0,4) ^c	33,8	15,1 (1,4) ^b
<i>6 dias</i>	57,4 (0,4) ^c	73,8 (0,0) ^c	88,0 (0,4) ^c	30,7	15,4 (0,2) ^b
<i>12 dias</i>	59,0 (0,4) ^b	76,1 (0,4) ^b	89,9 (0,8) ^b	30,9	11,4 (0,6) ^c
<i>30 dias</i>	62,1 (0,1) ^a	77,2 (0,1) ^a	92,7 (0,4) ^a	30,7	6,8 (0,4) ^d
Batata-doce					
<i>Nativo</i>	59,7 (0,0) ^c	66,8 (0,1) ^f	74,8 (0,1) ^c	15,1	12,3 (0,4) ^b
<i>1 dia</i>	58,5 (0,9) ^c	68,5 (0,3) ^e	91,8 (0,5) ^b	33,3	12,7 (0,2) ^b
<i>3 dias</i>	49,8 (0,5) ^d	77,0 (0,2) ^d	94,8 (0,9) ^a	45,0	11,4 (0,4) ^b
<i>6 dias</i>	58,9 (0,3) ^c	80,5 (0,3) ^c	95,1 (0,3) ^a	36,2	14,3 (0,4) ^a
<i>12 dias</i>	66,2 (0,1) ^b	82,2 (0,5) ^b	97,2 (0,6) ^a	31,0	9,8 (0,9) ^c
<i>30 dias</i>	69,2 (0,5) ^a	85,9 (0,1) ^a	96,7 (0,8) ^a	27,5	8,3 (0,2) ^d
Mand.-salsa					
<i>Nativo</i>	57,7 (0,3) ^c	60,9 (0,3) ^d	64,2 (0,3) ^a	6,5	15,6 (0,1) ^a
<i>1 dia</i>	49,7 (0,4) ^e	60,2 (0,4) ^d	70,3 (0,5) ^d	20,6	15,7 (0,5) ^a
<i>3 dias</i>	49,3 (0,3) ^e	65,7 (0,1) ^c	78,4 (0,4) ^c	29,0	12,2 (0,5) ^b
<i>6 dias</i>	54,5 (1,3) ^d	72,6 (0,2) ^b	91,5 (1,0) ^b	37,0	6,5 (0,3) ^d
<i>12 dias</i>	60,9 (0,4) ^b	81,3 (0,3) ^a	94,2 (0,7) ^a	33,3	9,9 (0,2) ^c
<i>30 dias</i>	66,6 (0,5) ^a	81,8 (0,1) ^a	92,6 (0,5) ^{ab}	26,0	4,9 (0,2) ^c

^a Média de três replicatas, com o respectivo desvio-padrão apresentado entre parênteses. Valores seguidos pela mesma letra, para cada amido, numa mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* T_o , T_p , T_c = temperatura inicial, de pico e conclusão, respectivamente; ΔT = faixa de temperatura ($T_c - T_o$); ΔH = variação de entalpia.

5 CONCLUSÕES

O modo e velocidade de degradação ácida foram dependentes da estrutura de cada amido. A hidrólise ácida ocorreu em duas fases: a primeira, caracterizada pela rápida degradação das moléculas de amilose e das regiões amorfas dos grânulos, e a segunda, atribuída à lenta hidrólise das áreas cristalinas.

Nos grânulos com padrão cristalino C, os cristais do tipo B foram mais susceptíveis à hidrólise ácida, devido, provavelmente, ao empacotamento menos denso desse padrão cristalino.

O comprimento das cadeias laterais da amilopectina teve enorme influência na estabilidade estrutural dos grânulos. As cadeias curtas e os pontos de ramificações localizados nas lamelas cristalinas foram os pontos fracos (provocaram a maior degradação) das estruturas cristalinas durante a hidrólise ácida.

Entre os amidos estudados, o de mandioquinha-salsa apresentou maiores singularidades em suas características estruturais, pois, apesar do padrão cristalino tipo B observado, os resultados sugeriram que os grânulos desse amido continham pequenas proporções de cristais organizados na forma A.

As diferenças encontradas na composição química, tamanho molecular da amilose e amilopectina, padrão cristalino, comprimento de cadeias laterais de amilopectina, localização dos pontos de ramificação da amilopectina e teor de amilose absoluto dos amidos estudados influenciaram os teores de amilose aparente, as propriedades térmicas e de pasta, a susceptibilidade à hidrólise ácida e as características estruturais das dextrinas Naegeli formadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC – Approved methods of the American association of cereal chemists. 7 ed.; 2 v.; St, Paul, Minnesota, 2000.
- ANGELLIER, H.; CHOISNARD, L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; OZIL, P.; DUFRESNE, A. Optimization of the Preparation of aqueous Suspensions of Waxy Maize Starch Nanocrystals Using a Response surface Methodology. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1545-1551, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA. *Variedades*. Disponível em: <http://www.abbatatabrasileira.com.br/abatata_variedades.htm>. Acesso em: jul. 2008.
- ATICHOKUDOMCHAI, N.; SHOBSNGOB, S.; CHINACHOTI, P.; VARAVINIT, S. A study of some physicochemical properties of high-crystalline tapioca starch. **Starch/Stärke**, v. 53, p.577-581, 2001.
- ATICHOKUDOMCHAI, N.; SHOBSNGOB, S.; VARAVINIT, S. Morphological properties of acid-modified tapioca starch. **Starch/Stärke**, v. 52, n. 8-9, p. 283-289, 2000.
- ATICHOKUDOMCHAI, N.; VARAVINIT, S.; CHINACHOTI, P. Gelatinization transitions of acid-modified tapioca starches by differential scanning calorimetry (DSC). **Starch/Stärke**, v. 54, p. 296-302, 2002.
- BERTOFT, E.; KOCH, K. Composition of chains in waxy-rice starch and its structural units. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 121-132, 2000.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis – Mini review. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.
- CAVALLINI, C. M.; FRANCO, C. M. L. Effect of acid-ethanol treatment followed by Ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava starch. **Starch/Stärke**, v. 62, p. 236-245, 2010.
- CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. The effects of amylose content on the molecular size of amylose, and on the distribution of amylopectin chain length in maize starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 4, p. 251-261, 1997.
- CHUNG, Y.; LAI, H. Molecular and granular characteristics of corn starch modified by HCl-methanol at different temperatures. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 527-534, 2006.
- CROCHET, P.; LAGRAVE, T. –B.; NOEL, T. R.; PARKER, R.; RING, S. G. Starch solubility and starch granule gelatinisation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 107-113, 2005.
- DONOVAN, J. W. **Biopolymers**, v. 18, p. 263-275, 1979 *apud* JACOBS, H.; EERLINGEN, R. C.; ROUSEU, N.; COLONNA, P.; DELCOUR, J. A. Acid hydrolysis of native and annealed wheat, potato and pea starches – DSC melting features and chain length distributions of lintnerised starches. **Carbohydrate Research**, v. 308, n. 3-4, p. 359-371, 1998.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. R.; ROBERTS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-354, 1956.
- FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 195, n. 1, p. 93-96, 1991.
- FRANCO, C. M. L.; CABRAL, R. A. F.; TAVARES, D. Q. Structural and physicochemical characteristics of lintnerized native and sour cassava starches. **Starch/Stärke**, v. 54, p. 469-475, 2002.
- FRANCO, C. M. L.; WONG, K. S.; YOO, S.; JANE, J. Structural and functional characteristics of selected soft

wheat starches. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 243-248, 2002.

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

FRENCH, D. **Journal of Japan Society Starch Science**, v. 19, 1972 *apud* ROBIN, J. P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starches. Gel Filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 389-406, 1974.

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

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

GIDLEY, M. J.; BOCIEK, S. M. Molecular organization in starches: A C¹³ CP/MAS NMR study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 24, p. 7040-7044, 1985.

GURANATNE, A.; CORKE, H. Influence of prior acid treatment on acetylation of wheat, potato and maize starches. **Food Chemistry**, v. 105, p. 917-925, 2007.

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

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

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

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

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

HUANG, J.; ZHANG, P.; CHEN, Z.; LI, H. Characterization of remaining granules of acetylated starch after chemical surface gelatinization. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 215-221, 2010.

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

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

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

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

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

- JAYAKODY, L.; HOOVER, R. The effect of lintnerization on cereal starch granules. **Food Research International**, v. 35, p. 665-680, 2002.
- JIPING, P.; SHUJUN, W.; JINGLIN, Y.; HONGYAN, L.; JIUGAO, Y.; WENYUAN, G. Comparative studies on morphological and crystalline properties of B-type and C-type starches by acid hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 105, p. 989-995, 2007.
- JULIANO, B. O. A simplified assay for milled-rice amylose. **Cereal Science Today**, v. 16, n. 10, p. 334-340, 1971.
- KASEMSUWAM, T.; JANE, J.; SCHNABLE, P.; ROBERTSON, D. Characterization of the dominant mutant amylose-extender (Ae1-5180) maize starch. **Cereal Chemistry**, v. 72, n. 5, p. 457-464, 1995.
- KASEMSUWAM, T.; JANE, J. Quantitative method for the survey of starch phosphate derivatives and starch phospholipids by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 702-707, 1996.
- KAINUMA, K.; FRENCH, D. **Biopolymers**, v. 10, p. 1673-1680, 1971 *apud* ROBIN, J. P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starches. Gel Filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 389-406, 1974.
- KOCH, K.; ANDERSSON, R.; ÅMAN, P. Quantitative analysis of amylopectin unit chains by means of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 199-206, 1998.
- KOIZUMI, K.; FUKUDA, M.; HIZUKURI, S. Estimation of the distributions of chain length of amylopectins by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography**, v. 585, p. 233-238, 1991.
- KONG, X.; BERTOFT, E.; BAO, J.; CORKE, H. Molecular structure of amylopectin from amaranth starch and its effect on physicochemical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 377-382, 2008.
- KRONKA, S. N.; BANZATTO, D. A. Estatística aplicada à engenharia de alimentos. Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 110p. 2004.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Características físico-químicas de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2002.
- LINTNER, C. J. **J. Prakt Chem**, v. 34, p. 378-386, 1886 *apud* HOOVER, R. Acid-treated starches. **Food Reviews International**, v. 16, n. 3, p. 369-392, 2000
- LU, T. -J.; JANE, J. -L.; KEELING, P. L. Temperature effect on retrogradation rate and crystalline structure of amylose. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 19-26, 1997.
- MCPHERSON, A. E.; JANE, J. Comparison of waxy potato with other root and tuber starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 1, p. 57-70, 1999.
- MOORTHY, S. N. **Tuber Crop Starches**. Cotton Hill: St. Joseph's Press. 1996. 40p.
- MORRISON, W. R. Starch lipids and how they related to starch granule structure and functionality. **Cereal Foods World**, v. 40, p. 437-445, 1995.
- MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal amylases – An overview. **Carbohydrate Polymers**. v. 60, p. 163-173, 2005.
- NÄGELI, C. W. **Annalen der Chemie**, v. 173, p. 218-227, 1874 *apud* HOOVER, R. Acid-treated starches. **Food Reviews International**, v. 16, n. 3, p. 369-392, 2000.

- NAKAZAWA, Y.; WANG, Y. J. Acid hydrolysis of native and annealed starches and branch-structure of their Naegeli dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 24, p. 2871-2882, 2003.
- NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch/Stärke**, v. 35, n. 12, p. 407-410, 1983.
- NWOKOCHA, L. M.; AVIARA, N. A.; SENAN, C.; WILLIAMS, P. A. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 362-367, 2009.
- PAN, D. D.; JANE, J. Internal structure of normal maize starch granules revealed by chemical surface gelatinization. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 126-132, 2000.
- PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, p. 1-17, 2001.
- PERERA, C.; LU, Z.; SELL, J.; JANE, J. –L. Comparison of physicochemical properties and structures of sugary-2 cornstarch with normal and waxy cultivars. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 249-256, 2001.
- PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 6, p. 505-513, 2006.
- ROBIN, J. P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starches. Gel Filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 389-406, 1974.
- ROCHA, T. S. **Estudo das características estruturais de amidos: efeito do ‘annealing’, da hidrólise ácida e da hidrólise enzimática**. São José do Rio Preto, 2009. Qualificação – (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), IBILCE – UNESP.
- ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 620-628, 2008.
- SANDHU, K. S.; SINGH, N.; LIM, S. A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. **LWT**, v. 40, p. 1527-1536, 2007.
- SANGUANPONG, V.; CHOTINEERANAT, S.; PIYACHOMKWAN, K.; OATES, C. G.; CHINACHOTI, P.; SRIROTH, K. Preparation and structural properties of small-particle cassava starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 760-768, 2003.
- SANTACRUZ, S.; KOCH, K.; SVENSSON, E.; RUALES, J.; ELIASSON, A. –C. Three underutilized sources of starch from the Andean region in Ecuador. Part 1. Physico-chemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 1, p. 63-70, 2002.
- SANTOS, F. F. Características sócio-econômicas no processo de produção de mandioca-salsa no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 95, 1993.
- SCHOCH, T. J. Potentiometric titration: Standard method. In: WHISTLER, R. L.; SMITH, R. J.; BEMILLER, J. N.; WOLFORMM, M. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry: Starch**. London: Academic Press. 1964. p. 157-160.
- SHARIFFA, Y. N.; KARIM, A. A.; FAZILAH, A.; ZAIDUL, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 434-440, 2009.
- SHUJUN, W.; JINGLIN, Y.; JIUGAO, Y.; JIPING, P.; HONGYAN, L. Structure characterization of C-type starch granule by acid hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1283-1290, 2008.

- SINGH, N.; INOUCHI, N.; NISHINARI, K. Morphological, structural, thermal, and rheological characteristics of starches separated from apples of different cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 10193-10199, 2005.
- SINGH, N.; NAKAURA, Y.; INOUCHI, N.; NISHINARI, K. Fine structure, thermal and viscoelastic properties of starches separated from *Indica* rice cultivars. **Starch/Stärke**, v. 59, p. 10-20, 2007.
- SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.
- SMITH, A. R.; CARUSO, T. E. Determination of phosphorous content. In: WHISTLER, R. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**; Starch. New York: Academic Press. 1964. v. 4; p. 43-47.
- SONG, Y.; JANE, J. –L. Characterization of barley starches of waxy, normal and high amylose varieties. **Carbohydrate Research**, v. 41, n. 4, p. 365-377, 2000.
- SRICHUWONG, S.; SUNARTI, T. C.; MISHIMA, T.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 529-538, 2005a.
- SRICHUWONG, S.; ISONOTO, N.; MISHIMA, T.; HISAMATSU, M. Structure of lintnerized starch is related to X-ray diffraction pattern and susceptibility to acid and enzyme hydrolysis of starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 3, p. 115-121, 2005b.
- TAKEDA, Y.; HIZUKURI, S. Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. **Carbohydrate Research**, v. 168, p. 79-88, 1987.
- TANG, H. –R.; BRUN, A.; HILLS, B. A proton NMR relaxation study of the gelatinization and acid hydrolysis of native potato starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 7-18, 2001.
- TANG, H.; WATANABE, K.; MITSUNAGA, T. Structure and functionality of large, medium and small granule starches in normal and waxy barley endosperms. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 217-224, 2002.
- TESTER, R. F. Starch: The polysaccharide fractions. In: FRAZIER, P. J.; RICHMOND, P.; DONALD, A. M. **Starch: Structure and Functionality**. London: Royal Society of Chemistry. 1997. p. 163-171.
- TESTER, R. F.; DEBON, S. J. J.; DAVIES, H. V.; GIDLEY, M. J. Effect of temperature on the synthesis, composition and physical properties of potato starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 2045-2051, 1999.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.
- THYS, R. C. S.; WESTFAHL, H. J.; NOREÑA, C. P. Z.; MARCZAK, L. D. F.; SILVEIRA, N. P.; CARDOSO, M. B. Effect of the alkaline treatment on the ultrastructure of C-type starch granules. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1894-1901, 2008.
- VERMEYLEN, R.; GODERIS, B.; REYNAERS, H.; DELCOUR, J. A. Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granule starch. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1775-1786, 2004.
- VIEIRA, F. C.; SARMENTO, S. B. S. Heat-moisture treatment and enzymatic digestibility of Peruvian carrot, sweet potato and ginger starches. **Starch/Stärke**, v. 60, p. 223-232, 2008.
- WANG, L.; WANG, Y. J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 291-296, 2004.
- WANG, Y. J.; WHITE, P.; POLLAK, L.; JANE, J. –L. Amylopectin and intermediate materials in starches from mutant genotypes of inbred line. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 521-525, 1993.

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

WATANABE, T.; FRENCH, D. **Carbohydrate Research**, v. 84, p. 115-123, 1980 *apud* JACOBS, H.; EERLINGEN, R. C.; ROUSEU, N.; COLONNA, P.; DELCOUR, J. A. Acid hydrolysis of native and annealed wheat, potato and pea starches – DSC melting features and chain length distributions of lintnerised starches. **Carbohydrate Research**, v. 308, n. 3-4, p. 359-371, 1998.

WONG, K. S.; JANE, J. Quantitative analysis of debranched amylopectin by HPAEC-PAD with a portcolumn enzyme reactor. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 20, n. 2, p. 297-310, 1997.

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

WU, H. C. H.; SARKO, A. **Carbohydrate Research**, v. 61, p. 7-25, 27-40, 1978 *apud* GIDLEY, M. J.; BOCIEK, S. M. Molecular organization in starches: A C¹³ CP/MAS NMR study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 24, p. 7040-7044, 1985.

YOKOBAYASHI, K.; MISAKI, A.; HARATA, T. Purification and properties of pseudomonas isoamylase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 212, p. 458-469, 1970.

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