

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos



Tese

**Pré-tratamentos na produção de nanocristais de amido de pinhão e
feijão**

Vânia Zanella Pinto
Engenheira de Alimentos

Pelotas, 2014

Vânia Zanella Pinto

**Pré-tratamentos na produção de nanocristais de amido de pinhão e
feijão**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos da Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial à obtenção
do Título de Doutor em Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

Comissão de Orientação

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias

Prof. Dr. Loong-Tak Lim

Prof^a Dr^a Elessandra da Rosa Zavareze

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P659p Pinto, Vânia Zanella

Pré-tratamentos na produção de nanocristais de amido de pinhão e feijão / Vânia Zanella Pinto ; Alvaro Renato Guerreiro Dias, orientador ; Elessandra da Rosa Zavareze, Loong-Tak Lim, coorientadores. — Pelotas, 2014.

124 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Amido. 2. Nanocristais de amido. 3. Pinhão. 4. Feijão carioca. 5. Hidrólise ácida. I. Dias, Alvaro Renato Guerreiro, orient. II. Zavareze, Elessandra da Rosa, coorient. III. Lim, Loong-Tak, coorient. IV. Título.

CDD : 664.2

Branca examinadora:

Prof. Dr. Manoel Artigas Schirmer (UFPel-FAEM)

Prof. Dr. Maurício de Oliveira (UFPel-FAEM)

Prof^a Dr^a Ana Paula Wally Vallim (IFSul)

Prof^a Dr^a Bruna Klein (UERGS)

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias (UFPEL - FAEM)

Agradecimentos

A Deus, por tudo o que tenho, pelas oportunidades, pelas conquistas pela família e amigos maravilhosos que tenho.

À minha família, que, apesar da distância, sempre esteve presente na minha vida e sempre compartilhou todos meus momentos felizes e tristes. Não tenho palavras para descrever o quanto amo minha família, a qual sempre apoiou todas as minhas decisões. À minha mãe, Clademilde, minha maior incentivadora; ao meu pai, Alberto, que sempre apoiou e me deu forças nas escolhas que fiz, sem questionar ou contrariar; ao meu irmão, Douglas, pelo carinho, amizade e compreensão.

Ao Vinícius, meu marido, pelo apoio, companheirismo e compreensão, uma pessoa muito especial que sempre esteve do meu lado e disposto a encarar novos desafios ao meu lado.

Aos meus padrinhos, Clademir e Dilvanete e aos meus afilhados Thierry e Kauly, pelo apoio constante, pela amizade e pelo carinho. Tenho grande amor e amizade por eles.

Ao Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias, pela orientação e pela participação integral deste trabalho. Sou imensamente grata pelo incentivo, pelo apoio, pela confiança e pela amizade. Tenho grande admiração pela forma que trabalha, demonstrando entusiasmo e amor pela pesquisa.

Ao Prof. Dr. Loong-Tak Lim, pela orientação e pela calorosa recepção na University of Guelph. Sou imensamente grata pela oportunidade, pelo incentivo, e pelo apoio durante a minha estadia no Canadá.

Aos meus colegas de laboratório e amigos Ana Clara Veiga-Lugo, Gloria Wang, Solmaz Alborzi, Suramya Mihindukulasuriya, Xiuju Wang, muito obrigada pelo apoio e amizade.

Aos colegas do departamento de Food Science Varatharajan Vamadevam, George Annor e Jonathan Andrade, muito obrigada pela ajuda com as análises, pela amizade e carinho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Food Science da University of Guelph pela disponibilidade dos laboratórios e assistência técnica dispensada para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Eleessandra da Rosa Zavareze, pela orientação e pela amizade. Tenho grande admiração pela pessoa e pela profissional que és.

Aos professores do DCTA, Cesar Valmor Rombaldi, Fábio Clasen Chaves, Leonardo Nora, Maurício de Oliveira, Manoel Artigas Schirmer e Moacir Cardoso Elias pelas contribuições e ensinamentos ao longo de período de doutorado no programa.

Às minhas grandes amigas, Ana Claudia, Jarine e Rosana que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando.

Ao meu grande amigo Nathan Vanier, não tenho palavras para descrever a admiração e carinho que tenho por ele, como amigo e profissional. Obrigada pela amizade e pelo apoio.

Ao meu grande amigo Khalid Moomand, que me auxiliou, incentivou e não mediu esforços para que nossa (Vinícius e eu) estadia no Canadá fosse mais fácil, divertida e inesquecível.

Aos meus amigos e amigas de longa data, Aline, Ana Lucia, Caroline, Deize, Franciele, Francine, Graziela, Isabel, Joice, Lucia, Luciane, Morgana, Luiz Fernando e Juliano que sempre me apoiaram e incentivaram para a realização deste sonho.

Aos queridos amigos Alexandra, Bruna, Daniel, Joana, Flávia, Juliane, Lucia, Rafael e Ricardo Pondorf. Obrigada pela amizade e pelo apoio.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Grãos Angélica, Cristiano, Franciene, Magda, Ricardo Paraginski, Shanise, obrigada pela amizade, apoio e ajuda durante o nosso convívio.

À Universidade Federal de Pelotas, à Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), a SCT-RS (Secretaria da Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul), ao Polo de Inovação Tecnológica em Alimentos da Região Sul e ao programa Ciência sem fronteiras (CsF) agradeço pelas bolsas de estudados e pelo apoio financeiro ao projeto.

Dedicatória

Aos meus pais Alberto e Clademilde

Ao meu esposo Vinícius

Aos demais familiares e amigos

RESUMO

Pinto, Vânia Zanella. **Pré-tratamentos na produção de nanocristais de amido de pinhão e feijão**. 2014, 124f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

Os amidos mais comumente utilizados industrialmente, são o amido de milho, o de trigo, o de batata e o de mandioca. No entanto, amidos oriundos de fontes não convencionais têm despertado grande interesse de indústrias e cientistas. Isso, associado a possibilidade de expandir e modificar as propriedades do amido por tratamentos físicos, conferem aos amidos de pinhão e de feijão vantagens para o uso na indústria de alimentos. Outra possibilidade para a aplicação de amidos é a utilização destes como matéria-prima alternativa na produção de embalagens e compósitos poliméricos, bem como a produção de nanocristais (SNCs). O estudo foi composto da modificação (pré-tratamentos) e caracterização dos amidos de pinhão e feijão Carioca e subsequente hidrólise dos mesmos para a produção de nanocristais. Os pré-tratamentos com tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN) ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ) empregados objetivaram diminuir o tempo e/ou aumentar o rendimento de hidrólise, bem como alterar e/ou melhorar as propriedades dos nanocristais a serem produzidos. Os amidos apresentaram alterações nas propriedades de pasta, térmicas e mudança no padrão de difração de raio-X, variando conforme a modificação aplicada. Os nanocristais foram produzidos através de hidrólise ácida (H_2SO_4 3,0 M) por 5 e 7 dias à 40°C. O rendimento após a hidrólise variou entre 10,2-14,7 % para o amido de pinhão e 35,2-42,3 % para o amido de feijão o que aumentou a cristalinidade relativa. O TTBU e o SNT aumentam o rendimento dos SNCs mas promovem perdas na cristalinidade relativa dos mesmos, enquanto que, o ANN promove melhor estabilidade térmica dos SNCs. O amido de feijão se mostrou promissor para a produção de SNCs, principalmente pelo elevado rendimento após 5 dias de hidrólise com ácido sulfúrico.

Palavras chaves: Amido, ANN, cristalinidade, feijão Carioca, hidrólise enzimática, hidrólise ácida, nanocristais de amido, pinhão, propriedades térmicas, TTBU, ultrassom

ABSTRACT

Pinto, Vânia Zanella. **Pretreatments for starch nanocrystals production from pinhão and Carioca beans.** 2014, 124f. Thesis (PhD) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.

The most common industrially used starches come from corn, wheat, potato, and cassava. Nevertheless, starches from non-conventional botanical origins are receiving more attention of industries and researchers. Associated with this interest, the possibility of expand and modify the starch properties through physical modifications provide for pinhão and Carioca beans advantages in food industry purposes. The use of these starches as an alternative to raw materials derived from petroleum for packaging and polymer composites is another possible application. Also included in this possibility, there is the production of starch nanoparticles and nanocrystals (SNCs). This study consisted in modifications (pretreatment), characterization and subsequent hydrolysis of pinhão and Carioca bean starches to produce starch nanocrystals. The starch pretreatments of heat-moisture-treatment (HMT), annealing (ANN), sonication (SNT) and mild enzymatic hydrolysis (ENZ) were used to improve the starch nanocrystals characteristics, as well as decrease the acid hydrolysis time and/or increase the hydrolysis final yield. The pretreatments changed the paste, thermal, and crystallinity properties of the starches, which changed according to the modification applied (HMT, ANN, SNT and ENZ). The SNCs were made by 3 M H₂SO₄ at 5 and 7 days at 40°C and obtained from the resulted removal of the amorphous lamella from the starch granules, what increased the relative crystallinity. The achieved hydrolysis yields were between 10.2 to 14.7% for pinhão starch and 35.2 to 42.3% for Carioca bean. HMT and SNT pretreatments increased the SNCs yield, but they promote a decrease on the SNCs relative crystallinity, whereas the ANN promotes a better thermal stability, mainly due to the high yield after 5 days of sulfuric acid hydrolysis.

Keywords: Acid hydrolysis, ANN, Carioca beans, crystallinity, enzymatic hydrolysis, pinhão, starch, starch nanocrystals, thermal properties, TTBU, ultrasound

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática dos diferentes níveis da estrutura de um grânulo de amido.....	19
Figura 2 Representação esquemática da organização das duplas hélices da amilopectina na formação estrutural dos amidos tipo-A (2.1) e tipo-B (2.2). Representação esquemática da disposição das frações tipo-A (no centro) e tipo-B (na região periférica) na formação dos grânulo de amido tipo-C (2.3).	20
Figura 3 (A) Vista externa e (B) vista interna da sementes de pinhão com casca. ...	22
Figura 4 Grão de feijão Carioca recém colhidos (a) e envelhecidos (b)	25
Figura 5 Esquema de propagação das ondas de ultrassom em um meio.....	28
Figura 6 Mecanismo da hidrólise ácida do amido	32
Figura 7 Representação do grânulo de amido em múltiplas escalas (a) grânulo de amido de milho normal (30 μm), (b) anéis de crescimento da região amorfa e semicristalina (120-500 nm), (c) lamelas cristalina e amorfa (9 nm), ampliação dos detalhes dos anéis de crescimento da região semicristalina, (d) blocklets (20-50 nm) constituindo uma unidade dos anéis de crescimento, (e) duplas hélices da amilopectina formando a lamela cristalina dos blocklets, (f) nanocristais: fração da lamela cristalina quando separados por hidrólise ácida (g) estrutura molecular da amilopectina (h) estrutura molecular da amilose (0.1-1 nm).....	33
Figura 8 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 2B CL dos amidos de pinhão nativo e modificados por (a) tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), (b) annealing (ANN), (c) ultrassom (SNT) e (d) hidrólise enzimática (ENZ).....	48
Figura 9 Perfil de hidrólise dos amidos de pinhão com enzima α -amilase por 2h	50
Figura 10 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL dos amidos de pinhão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), desramificados com pululanase e isoamilase.	51
Figura 11 Propriedades de pasta dos amidos nativo e modificados de pinhão por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).	53

Figura 12 Difratogramas de raio-X dos amidos de pinhão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).	58
Figura 13 Curvas de DSC dos amidos de pinhão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).....	60
Figura 14 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel Sepharose CL 2B CL (GPC) dos amidos de feijão nativo e modificados por (a) tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), (b) annealing (ANN), (c) ultrassom (SNT) e (d) hidrólise enzimática (ENZ).....	67
Figura 15 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL dos amidos de feijão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), desramificados com pullulanase e isoamilase.....	68
Figura 16 Perfil de hidrólise dos amidos de feijão Carioca com enzima α -amilase por 2h	70
Figura 17 Propriedades de pasta dos amidos de feijão Carioca nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).	71
Figura 18 Difratogramas de raio-X dos amidos de feijão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).	76
Figura 19 Curvas de DSC dos amidos de feijão Carioca nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ)	78
Figura 20 Curvas de hidrólise ácida dos amidos de pinhão nativo e pré-tratado com tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).	84
Figura 21 Modelo das cadeias de amilopectina que formam os clusters. Cadeias tipo A, B1; B2 e B3; ϕ terminal redutor; - cadeias D-glicose α , (1-4) e $\rightarrow$ ligações α , (1-6). 87	
Figura 22 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL (GPC) dos amidos de pinhão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática	

(ENZ), após hidrólise ácida de 5 dias, após a desramificação com pululanase e isoamilase.	89
Figura 23 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL (GPC) dos amidos de pinhão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 7 dias, após adesramificação com pululanase e isoamilase.	90
Figura 24 Difrátogramas de raio-X dos nanocristais de amidos de pinhão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ) hidrolisados por 7 dias.....	92
Figura 25 Nanocristais obtidos após hidrólise ácida por 5 dias do amido nativo de pinhão.....	94
Figura 26 DSC dos amidos de pinhão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 7 dias.....	95
Figura 27 Curvas de hidrólise ácida dos amidos de feijão nativo e pré-tratado com tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).	99
Figura 28 Cromatografia de exclusão de tamanho em (GPC) gel Sepharose CL 6B CL dos amidos de feijão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 5 dias, desramificados com pululanase e isoamilase.	101
Figura 29 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL dos amidos de feijão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 7 dias, desramificados com pululanase e isoamilase.	101
Figura 30 Difrátogramas de raio-X dos nanocristais de amidos de feijão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ) hidrolisados por 7 dias.....	104
Figura 31 (a) Aglomerados e (b) nanocristais obtidos após hidrólise ácida por 7 dias do amido nativo de feijão.....	105
Figura 32 DSC dos amidos de feijão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 7 dias.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Delineamento experimental dos pré-tratamentos nos amidos de pinhão e de feijão carioca	39
Tabela 2 Delineamento experimental da produção de nanocristais de amidos de pinhão e de feijão carioca.....	41
Tabela 3 Frações moleculares (FM) do amido de pinhão desramificado nativo e modificados	50
Tabela 4 Propriedades de pasta dos amidos de pinhão nativo e modificados	52
Tabela 5 Cristalinidade relativa (CR) dos amidos de pinhão nativo e modificados ...	56
Tabela 6 Temperatura inicial (T_o), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_c), diferença de temperaturas ($T_c - T_o$) e entalpia (ΔH) de fusão dos amidos de pinhão nativo e modificados	61
Tabela 7 Temperatura inicial (T_o), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_c), diferença de temperaturas ($T_c - T_o$) e entalpia (ΔH) de gelatinização dos amidos de pinhão nativo e modificados	65
Tabela 8 Frações moleculares (FM) do amido de feijão Carioca desramificado nativo e modificados	69
Tabela 9 Propriedades de pasta dos amidos de feijão nativo e modificados	72
Tabela 10 Cristalinidade relativa dos amidos de feijão nativo e modificados	75
Tabela 11 Temperatura inicial (T_o), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_c), diferença de temperaturas ($T_c - T_o$) e entalpia (ΔH) de fusão dos amidos de feijão nativo e modificados	80
Tabela 12 Temperatura inicial (T_o), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_c), diferença de temperaturas ($T_c - T_o$) e entalpia (ΔH) de gelatinização dos amidos de feijão nativo e modificados	81
Tabela 13 Rendimento da hidrólise ácida nos amidos nativo de pinhão e com pré-tratamentos.	85
Tabela 14 Frações moleculares dos nanocristais de pinhão desramificados com 5 e 7 dias de hidrólise	88
Tabela 15 Cristalinidade relativa (CR) dos nanocristais obtidos a partir de amido de pinhão com hidrólise ácida de 7 dias de hidrólise	91

Tabela 16 Temperatura inicial (T_o), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_c), diferença de temperaturas ($T_c - T_o$) e entalpia (ΔH) dos amidos de pinhão nativo e modificados após a hidrólise de 7 dias.....	97
Tabela 17 Rendimento de hidrólise das amostras de amido de feijão nativo e com pré-tratamento.....	100
Tabela 18 Frações moleculares dos nanocristais de feijão desramificados com 5 e 7 dias de hidrólise	102
Tabela 19 Cristalinidade relativa dos amidos de feijão Carioca nativo e modificados após a hidrólise de 7 dias.....	103
Tabela 20 Temperatura inicial (T_o), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_c), diferença de temperaturas ($T_c - T_o$) e entalpia (ΔH) dos amidos de feijão nativo e modificados após a hidrólise de 7 dias.....	107

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Material.....	38
3.2 Desenho experimental.....	38
3.3 Avaliações	41
3.3.1 Estudo 1 Pré-tratamentos nos amidos de pinhão e Estudo 2 Pré-tratamentos nos amidos de feijão Carioca	41
3.3.2 Estudo 3 Produção dos nanocristais de amido de pinhão e Estudo 4 Produção dos nanocristais de amido de feijão Carioca	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1 Estudo 1 - Pré-tratamentos nos amidos de pinhão	46
4.2 Estudo 2 - Pré-tratamentos nos amidos de feijão Carioca	66
4.3 Estudo 3 - Produção dos nanocristais de amido de pinhão.....	82
4.4 Estudo 4 - Produção dos nanocristais de amido de feijão Carioca	98
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
6 REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

O amido é um polissacarídeo de origem vegetal, com ampla utilização na indústria de alimentos, têxtil e papelreira. Os amidos mais comuns utilizados por estas indústrias são o amido de milho, o de trigo, o de batata e o de mandioca.

No entanto, amidos oriundos de fontes não convencionais, como amido de pinhão e de feijão, têm despertado interesse de indústrias e de pesquisadores, em função da possibilidade de se obter propriedades tecnológicas diferenciadas em relação às já utilizadas.

O pinhão é a semente do pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) e cresce em florestas nativas da América Latina. A semente é composta por aproximadamente 68-72% de amido e apresenta 26-27% de amilose. O amido de pinhão apresenta padrão de cristalinidade tipo C, elevada viscosidade e retrogradação.

Além do pinhão, outras fontes de amido alternativas apresentam propriedades específicas que podem apresentar interesse industrial, como as fabaceas. Esta família é representada pelos feijões, ervilhas, grão de bico, entre outros.

O Brasil encontra-se entre os maiores produtores mundiais de feijão, com cerca de 3,990 milhões de toneladas (FAO, 2012) e o feijão Carioca representa aproximadamente 60% do total de feijão produzido e consumido no nosso país (RUPOLLO et al., 2011). Esta grande produção necessita ser armazenada por longos períodos, para posterior comercialização, muitas vezes sob condições ambientais adversas.

As condições de estocagem não adequadas influenciam a qualidade dos grãos e favorecem o aparecimento do defeito HTC (*hard-to-cook*). Os grãos HTC necessitam de longo tempo de cocção, permanecendo ainda com a película (casca) que reveste os cotilédones dura e proporcionando caldo com qualidade culinária e sensorial indesejáveis. Além disso, durante a colheita e o processamento, muitos grãos são quebrados, reduzindo valor comercial destes grãos com defeitos.

O grão de feijão apresenta aproximadamente 60% de carboidratos, baixo poder de inchamento e solubilidade, elevada viscosidade e retrogradação, conteúdo de amilose entre 35-40%, além de um padrão de cristalinidade tipo C.

Uma das possibilidades para a aplicação de amidos de diferentes fontes botânicas é a produção de nanocristais. Esta tecnologia está despertando grande atenção nas últimas décadas, por se tratar de um material biodegradável, versátil e com boas propriedades mecânicas quando aplicado como fase dispersa em compósitos poliméricos.

A preparação de nanocristais se baseia na remoção da região amorfa dos grânulos de amido através de hidrólise ácida com ácido sulfúrico ou ácido clorídrico por um determinado tempo (entre 5 e 50 dias). Após o período de hidrólise, o residual é recolhido por centrifugação, lavado e neutralizado para posterior secagem ou liofilização.

A utilização de nanocristais de amido como fase dispersa já ocorre, de maneira experimental, na produção de pneus, como substituto de carbono e sílica, em matrizes poliméricas, sintéticas e naturais e também como melhorador das propriedades mecânicas de filmes biodegradáveis.

Os fatores que dificultam a produção de nanocristais é o tempo de hidrólise prolongado e baixo rendimento dos mesmos. O uso de pré-tratamentos que modificam a estrutura nativa do amido pode ser uma alternativa para contornar estes fatores, como evidenciado em estudo conduzido por LeCorre, et al., (2012) onde obtiveram nanocristais de amido de milho ceroso com pré-tratamento enzimático de 2h (glucoamilose) depois de 1 dia de hidrólise ácida.

Algumas modificações físicas, químicas e enzimáticas utilizadas como pré-tratamentos, antes da hidrólise modificam as características originais do amido, possibilitando a ação diferenciada do ácido na etapa de hidrólise.

As modificações físicas mais estudadas são o tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), o annealing (ANN) e recentemente a sonicação (SNT). No TTBU, emprega-se temperaturas elevadas, acima da temperatura de gelatinização do amido e umidade reduzida (<30%). Por outro lado, o ANN utiliza temperaturas abaixo das temperaturas de transição vítrea e umidades elevadas (> 60%). Enquanto que, a SNT é o emprego de ultrassom, que é o som acima da capacidade do ouvido humano (18kHz). O ultrassom é gerado com transdutores piezoelétricos ou magnetostrictivos que amplificam e transmitem as vibrações de alta energia. Estas vibrações promovem a formação de cavidades cheias de gás ou de vapor, no sistema, que diminuem a pressão e quando entram em colapso, aumentam a pressão novamente, chamado de cavitação.

A modificação enzimática de amidos é um processamento muito utilizado na indústria de alimentos. A hidrólise enzimática (ENZ) basicamente é o resultado da ação específica de enzimas que podem ser divididas em duas categorias, as amilases e as transferases. A hidrólise enzimática utilizando amilases ocorre em duas fases. A primeira fase, rápida, preferencialmente na região amorfa, enquanto que a fase lenta é o ataque na região cristalina, diminuindo o grau de polimerização (DP) das moléculas.

O emprego de pré-tratamentos físicos e enzimáticos na obtenção de nanocristais de amido pode ser um procedimento eficaz que viabilize a produção em maior escala dos mesmos, tornando-os industrialmente viáveis.

Acredita-se que os amidos com cristalinidade tipo-C, de diferentes fontes, apresentam respostas distintas às modificações físicas e enzimáticas e que os pré-tratamentos influenciam no tempo e rendimento de hidrólise, na estrutura molecular, na cristalinidade e nas propriedades térmicas dos nanocristais de amido.

Neste estudo, objetivou-se modificar os amidos de pinhão e feijão Carioca com TTBU, ANN, SNT e ENZ e utilizá-los (nativos e modificados) como pré-tratamentos na produção de nanocristais de amido de pinhão e feijão Carioca.

1.1 Objetivos

Avaliar a estrutura molecular, propriedades de pasta e térmicas e cristalinidade dos amidos de pinhão e feijão Carioca modificados com tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).

Produzir nanocristais de amido de pinhão e feijão nativos e pré-tratados por TTBU, ANN, SNT e ENZ, através de hidrólise com ácido sulfúrico.

Avaliar o efeito dos pré-tratamentos no rendimento, no tempo de hidrólise e nas propriedades dos nanocristais de amido de pinhão e de feijão Carioca.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura do amido

O amido é um polissacarídeo sintetizado a partir de glicoses produzidas nas folhas e armazenado nos amiloplastos presentes em tubérculos, caules, raízes e grãos, (SMITH, 2001). A conformação estrutural do amido permite o empacotamento das moléculas de glicose em estruturas muito densas, insolúveis, e fisiologicamente inertes chamados grânulos (HANNAH; JAMES, 2008), sendo a principal forma de reserva de carbono em plantas superiores (DENYER; SMITH, 2003).

As moléculas de glicose formam dois polímeros que compõem a estrutura do amido; a amilose (AM) e a amilopectina (AP). A amilose se acumula entre 15% - 35% na maioria das plantas e é um polissacarídeo essencialmente linear, com ligações α ,(1–4) entre as unidades de D-glicose. Algumas espécies vegetais mutantes como trigo, batata e milho apresentam quantidade elevada de amilose, entre 50 e 80% ou ausência da mesma, sendo conhecidos como amidos cerosos (ITOH et al., 2003). Algumas moléculas de amilose, em particular, as de elevado peso molecular, apresentam até dez ou mais ramificações, com ligações α ,(1–6). O tamanho médio da cadeia de amilose é de aproximadamente 10^3 g.mol^{-1} e sua forma quase linear resulta na formação de hélices com interior hidrofóbico, podendo acomodar moléculas pequenas como ácidos graxos, álcoois e iodo (BULÉON et al., 1998; GÉRARD et al., 2001; PÉREZ; BERTOFT, 2010)

Enquanto que, a amilopectina é uma molécula ramificada com ligações α ,(1–4) entre as unidades de D-glicose na *espinha dorsal* ou cadeia principal e exibe aproximadamente 5% de ligações α ,(1–6) nas ramificações, o que exerce um profundo efeito nas propriedades físicas e biológicas (GÉRARD et al., 2001; PÉREZ; BERTOFT, 2010). O tamanho médio da cadeia de amilopectina é de aproximadamente 10^8 g.mol^{-1} e em geral, as ramificações apresentam aproximadamente 20 ou 30 unidades de glicose, sendo esta a fração majoritária nos grânulos de amido (BULÉON et al., 1998; GÉRARD et al., 2001; PÉREZ; BERTOFT, 2010)

Os grânulos de amido apresentam tamanhos variados (1-100 μm) e uma estrutura hierárquica complexa. A maioria dos grânulos são compostos de regiões cristalinas e amorfas, dispostas alternadamente, que apresentam uma espessura

entre 120–400 nm. Estas estruturas são conhecidas como anéis de crescimento (Figura 1) (PÉREZ; BERTOFT, 2010; VAMADEVAN, 2013). A disposição radial da amilopectina dentro de tais estruturas é considerado o responsável pela formação de polarização ótica, uma vez que a polarização ótica visível é da ordem do comprimento da luz visível (100-1000 nm).

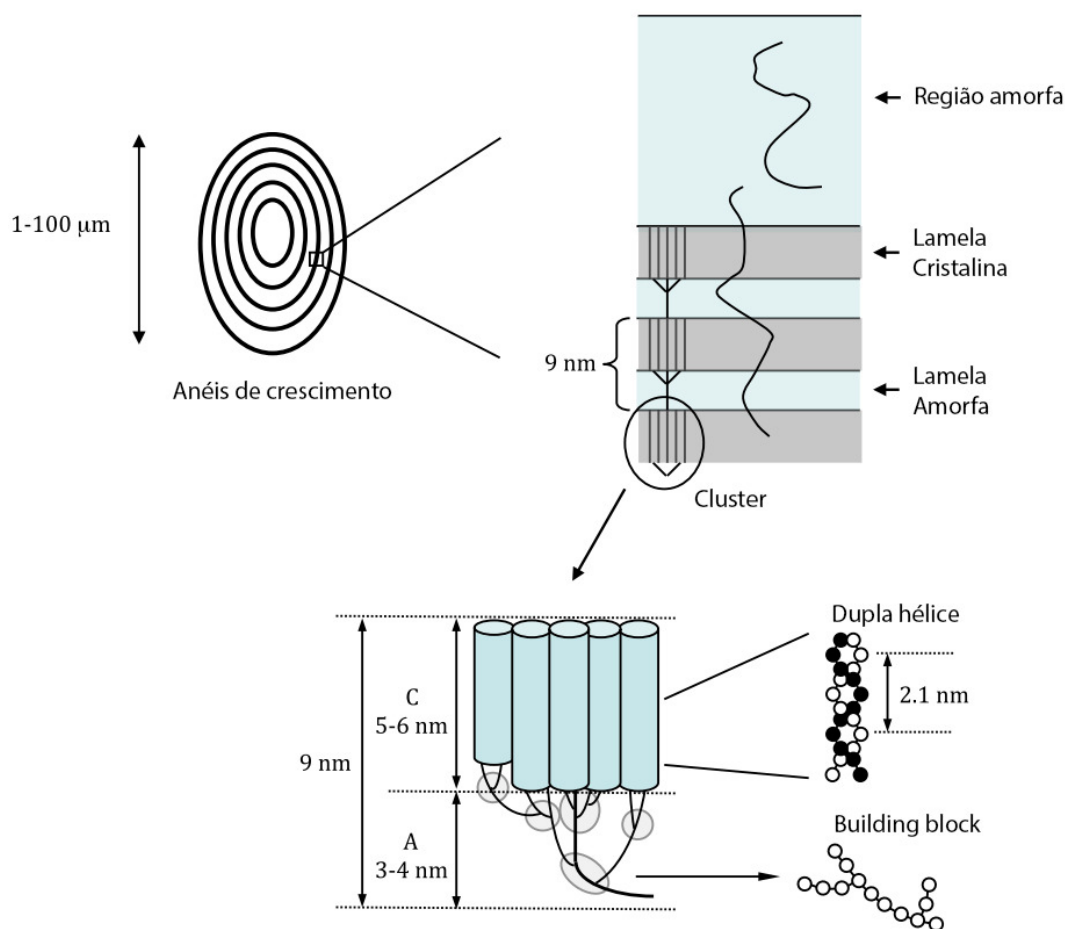


Figura 1 Representação esquemática dos diferentes níveis da estrutura de um grânulo de amido. Fonte: Vamadevan, (2013)

Dentro dos anéis semicristalinos as ramificações (pontos de intercepção α , (1–6)) encontram-se agregadas na lamelas amorfa, a partir do qual as cadeias externas curtas (cadeias A com comprimento médio de 12 glicoses) se prolongam dispostas radialmente. Estas cadeias externas formam duplas hélices na região da lamela cristalina, com uma espessura de 4-6 nm (Figura 1) (BERTOFT et al., 2010). As investigações dos grânulos a nível molecular utilizando raio-X indicaram a

presença de lamelas cristalina e amorfa, periódicas (9-10 nm) resultando em padrões de cristalinidade dos amidos (A, B e C) (PÉREZ; BERTOFT, 2010).

Imberty; Perez, (1988); Imberty et al., (1987) propuseram um modelo de empacotamento das duplas hélices com diferença na configuração para explicar as diferenças entre amidos tipo-A e tipo-B. As estruturas tipo-A são empacotadas de forma compactada com moléculas de água entre cada dupla hélice, enquanto que a estrutura tipo-B é mais aberta com moléculas de água localizadas na cavidade central formada por seis duplas hélices, conforme mostrado na Figura 2a. O padrão de difração tipo-C foi considerado como a mistura entre os tipo-A e tipo-B, uma vez que o padrão de raio-X revela a combinação dos dois tipos (CAI et al., 2014).

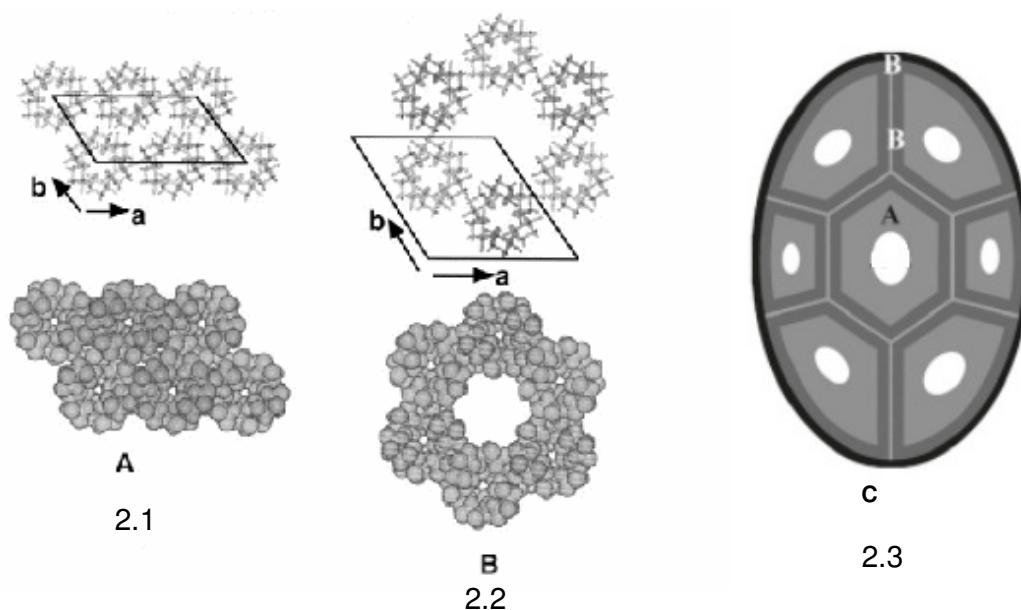


Figura 2 Representação esquemática da organização das duplas hélices da amilopectina na formação estrutural dos amidos tipo-A (2.1) e tipo-B (2.2). Representação esquemática da disposição das frações tipo-A (no centro) e tipo-B (na região periférica) na formação dos grânulo de amido tipo-C (2.3). Fonte: Buléon et al., (1998), Wei et al., (2010).

Em geral, a maioria dos cereais apresenta um padrão de difração de raio-X tipo A, alguns tubérculos como batata e inhame, rizomas como canna e mandioca e cereais com elevado conteúdo de amilose apresentam um padrão tipo-B e as

leguminosas geralmente apresentam um padrão de difração de raio-X tipo C (PARKER; RING, 2001; PÉREZ; BERTOFT, 2010).

Wei et al., (2010) apresentaram uma teoria da formação dos grânulos tipo-C durante o desenvolvimento dos grânulos no amiloplasto (Figura 2b). Estes autores propuseram que ocorre a formação de subgrânulos dentro da organela, sendo que pequenos grânulos tipo-A se formam primeiro, ficando localizados no centro do amiloplasto. Na sequência subgrânulos tipo-B vão aumentando de tamanho nas regiões periféricas e todos os subgrânulos aumentam de tamanho até preencher os espaços dos amiloplastos e formar os grânulos tipo-C.

2.2 Fontes alternativas para obtenção de amido

Os amidos mais aplicados industrialmente são os de milho, de trigo, de batata e o de mandioca devido a sua facilidade de extração e elevada produção. No entanto, amidos oriundos de fontes não convencionais tem despertado interesse pela possibilidade de diversificação de aplicações industriais.

2.2.1 Amido de pinhão

O pinhão é a semente do pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) a qual pertence aos grupo das Coníferas e cresce em florestas nativas da América Latina (CONFORTI; LUPANO, 2007).

As populações naturais ou plantações desta árvore têm importância comercial como fonte de madeira para móveis, construção de casas e produção de celulose. Devido à sua extração irracional para fins comerciais e o desmatamento indevido a araucária está em risco de extinção (WOSIACKI, CEREDA, 1985).

As sementes de pinhão (Figura 3) são consumidas durante outono e o inverno no sul do Brasil, cozidas ou tostadas e descascadas ou ainda na forma de farinhas em pratos regionais (CLADERA-OLIVERA et al., 2008; CORDENUNSI et al., 2004). A semente é composta de aproximadamente 68-72% de amido (BELLO-PÉREZ et al., 2006) e apresenta 26-27% de amilose (PINTO et al., 2012; STAHL et al., 2007). O amido de pinhão apresenta padrão de cristalinidade tipo C, (BELLO-PÉREZ et al., 2006; STAHL et al., 2007), elevada viscosidade e retrogradação (PINTO et al., 2012).



Figura 3 (A) Vista externa e (B) vista interna da sementes de pinhão com casca.

Fonte: Cordenunsi et al., (2004)

Tendo como exemplo a preservação das castanheiras nativas na região amazônica, que promoveu a conservação das áreas florestais pela coleta extrativista das castanhas-do-Brasil (SOUZA, 2013), acredita-se que, com o aumento da utilização das sementes de pinhão, seja possível promover a preservação da araucária (PINTO et al., 2012), bem como incentivar o plantio comercial do pinhão.

Com objetivo de contribuir com o conhecimento sobre o comportamento do amido desta matéria prima regional, alguns trabalhos foram desenvolvidos. Conforti, Lupano, (2007, 2008) caracterizaram o amido da *Araucaria angustifolia* e da *Araucaria araucana*, bem como a digestibilidade *in vitro* das suas farinhas. Os grânulos de amido apresentaram-se arredondados e levemente ovais. Ambas as espécies apresentaram picos de difração de raio-X em 15°, 17° e 23°, além de um conteúdo de amilose de 17,3 (*A. araucana*) e 22,4% (*A. angustifolia*). Já as farinhas apresentaram uma digestibilidade *in vitro* elevada após a cocção das sementes. Tal comportamento foi atribuído pela ruptura e colapso dos grânulos de amido depois da cocção, sendo que o amido proveniente da *A. angustifolia* apresentou digestibilidade maior.

Bello-Pérez et al., (2006) extraíram amido de pinhão utilizando apenas água como solvente, e concluíram que a facilidade na extração do amido de pinhão, bem como o alto rendimento de extração, são características atrativas para produções em escala piloto e também comercial deste amido. Os mesmos autores também avaliaram as propriedades de pasta do amido de pinhão e compararam com amido de milho comercial. Assim, verificaram que o amido de pinhão apresentou temperaturas de pasta inferiores ao amido de milho, desenvolvendo viscosidades mais elevadas. Estas características são desejadas para produtos que requerem alta viscosidade e baixas temperaturas de processamento e também no desenvolvimento de produtos com ingredientes termoestáveis.

A modificação de amidos é uma prática muito comum nas indústrias papelerias, têxteis e de alimentos. Diferentes tratamentos são empregadas para modificar, melhorar ou adequar as propriedades dos amidos empregados na indústria. As principais modificações são químicas, físicas e enzimáticas e as características resultantes são dependentes dos tratamentos aplicados e da origem botânica dos amidos empregados no processo (ABBAS; KHALIL; HUSSIN, 2010).

No entanto, poucos trabalhos sobre modificação e utilização de amido de pinhão são encontrados na literatura. Thys, Aires, Marczak, Noreña, (2013) estudaram o efeito da hidrólise ácida nas propriedades tecnológicas e funcionais do amido de pinhão e encontraram baixa tendência à retrogradação e elevada sinérese, comparados ao amido nativo.

Após o tratamento térmico de baixa umidade (TTBU) o amido de pinhão diminui o poder de inchamento e solubilidade, cristalinidade relativa e aumenta a retrogradação e temperatura de gelatinização (KLEIN et al., 2013; PINTO et al., 2012). O TTBU promove diminuição no poder de inchamento e aumento na retrogradação no amido de pinhão. Estas características são importantes para elaboração de massas alimentícias com boa aparência e textura (CHAM; SUWANNAPORN, 2010).

Gonçalves, Pelayo, Noreña, Pesce, Brandelli, (2014) modificaram o amido de pinhão utilizando ultrassom (100 W) por 30 min e por hidrólise ácida (HCl, 2%) por 50 dias. Após as modificações com HCl e ultrassom, foram obtidas partículas entre 22 e 453 nm, respectivamente. As amostras hidrolisadas com HCl apresentaram elevada solubilidade, higroscopicidade e claridade de pasta. Os

autores concluíram que as nanopartículas obtidas podem ser empregadas no desenvolvimento de compósitos biodegradáveis com propriedades melhoradas.

Spada et al., (2012a, 2012b) estudaram o microencapsulamento de β -caroteno com amido de pinhão nativo, hidrolisado e a mistura destes com gelatina como material de parede. Os autores sugeriram que amido de pinhão modificado pode ser considerado um material de parede potencial para encapsulamento de β -caroteno, pois as capsulas elaboradas com amido hidrolisado apresentaram elevada estabilidade.

Daudt, Kùlkamp-Guerreiro, Cladera-Olivera, Thys, Marczak, (2014) caracterizaram o amido de pinhão extraídos de sementes cruas e cozidas, e avaliaram a aplicabilidade destes amidos como excipiente em fármacos. Os autores concluíram que as propriedades físico-químicas e morfológicas do amido de pinhão demonstraram a aplicação do amido na indústria farmacêutica.

2.2.2 Amido de feijão

Os feijões (*Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*) são culturas anuais da família das Fabaceae e com grande importância econômica mundial. São o maior grupo entre as leguminosas destinadas a alimentos, no qual desempenham uma importante e diversificada função no sistema de cultivo e na dieta da população mundial (RANI et al., 2013).

O feijão pinto (semelhante ao feijão Carioca) é amplamente consumido no Canadá, Estados Unidos e em muitos países africanos e na Índia. Na forma seca, é considerados como a melhor fonte de proteínas livre de ácidos graxos pela Organização Mundial da Saúde, com um potencial energético de 347 kcal por 100g com 21,42% de proteína (USDA, 2014).

O Brasil encontra-se entre os maiores produtores mundiais de feijão, cerca de 3,99 milhões de toneladas (FAO, 2012) e o feijão carioca (Figura 4) (*Phaseolus vulgaris*) representa aproximadamente 60% do total de feijão produzido e consumido no nosso país (RUPOLLO et al., 2011). Esta grande produção necessita ser armazenada por longos períodos para suprir as necessidades de entre safra. O armazenamento de feijão em condições desfavoráveis reduz a capacidade de absorção de água dos grãos durante a cocção, o que dificulta a separação celular, a gelatinização do amido e promove desnaturação proteica (YOUSIF; KATO; DEETH,

2007). Assim, a qualidade tecnológica dos grãos de feijão pode estar associada com as condições de estocagem.



Figura 4 Grãos de feijão Carioca recém colhidos (a) e envelhecidos (b) Fonte: Vanier, (2012)

O principal problema tecnológico de feijões é conhecido como defeito HTC (*hard-to-cook*). Os grãos HTC necessitam de longo tempo de preparo, continuando duros após a cocção, resultando em caldo com qualidade culinária e sensorial indesejáveis. Em função disso, os feijões HTC perdem valor comercial, pois os consumidores os consideram produtos de baixa qualidade (RUPOLLO et al., 2011). Com isso, o isolamento e a utilização do amido como um coproduto pode ser uma alternativa para agregar valor aos grãos de feijão envelhecidos e também incentivar a cadeia produtiva.

O amido de feijão apresenta baixo poder de inchamento e solubilidade, elevada viscosidade e retrogradação, elevado conteúdo de amilose (cerca de 40%), além de um padrão de cristalinidade tipo C (HOOVER; RATNAYAKE, 2002; RUPOLLO et al., 2011; VANIER et al., 2012). Sob efeito do TTBU, o amido de feijão pinto apresenta uma diminuição do poder de inchamento e solubilidade, cristalinidade relativa e aumento nas temperaturas de gelatinização e a susceptibilidade à hidrólise ácida (HOOVER; MANUEL, 1996a). De acordo com Hughes et al., (2009) amidos de leguminosas tem despertado o interesse de indústrias processadoras e também de nutricionistas, pois apresentam

funcionalidades únicas que atendem às demandas dos consumidores, devido a sua composição em carboidrato não digerível (amido resistente). Estes carboidratos atuam como fibras nas dietas, implicando em respostas fisiológicas, tais como, fermentação no cólon, glicemia pós prandial, tempo de trânsito intestinal e aumento do volume fecal (KUMARI; UROOJ; PRASAD, 2007). Isto, combinado com a possibilidade de expandir e modificar as propriedades do amido por tratamentos físicos, conferem ao amido de feijão vantagens para o uso na indústria de alimentos.

2.3 Modificações físicas e hidrólises em amidos

As modificações em amidos, são empregadas com o objetivo de promover alterações em suas propriedades, tais como físicas, de pasta, térmicas e também na cristalinidade dos grânulos (BEMILLER, 1997; CHIU; SOLAREK, 2009; HOOVER, 2000, 2010; HOOVER et al., 2010; JAYAKODY; HOOVER, 2008; JOBLING, 2004; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2010; LIN et al., 2011; SINGH; ALI, 2000; WANG; COPELAND, 2013; ZAVAREZE; DIAS, 2011), ampliando assim as possibilidade de aplicação dos mesmos. Cada modificação promove mudanças, tanto estruturais como nas propriedades dos amidos, de forma específica, variando conforme o tratamento e as condições aplicadas, bem como a origem botânica dos amidos empregados.

2.3.1 Tratamento térmico de baixa umidade (TTBU) e Annealing (ANN)

As principais modificações físicas que são empregadas são a extrusão, a pré-gelatinização e os tratamentos hidrotérmicos, TTBU e ANN (CHIU; SOLAREK, 2009; HOOVER, 2010; VAN SOEST et al., 1996; VARATHARAJAN et al., 2011; ZAVAREZE; DIAS, 2011; ZHANG et al., 2007). Outras modificações físicas, tais como, o emprego de ultrassom, de irradiação e de alta voltagem já foram estudados.

O tratamento térmicos de baixa umidade envolve a presença de baixos conteúdos de água (<35% de umidade v/v) e aquecimento a temperaturas acima da temperatura de transição vítrea e acima da temperatura de gelatinização, variando de 84 a 120°C, durante um período de tempo que pode ser de 15 minutos a 16 horas. Esta modificação apresenta como parâmetros críticos de controle o teor de umidade, a temperatura e o tempo de aquecimento (HOOVER, 2010; ZAVAREZE;

DIAS, 2011). De forma geral, o TTBU não promove alterações na estrutura molecular, mas reduz a viscosidade e a retrogradação dos amidos, o poder de inchamento e a lixiviação da amilose dos grânulos, aumento na faixa de temperatura de gelatinização, susceptibilidade enzimática e formação de amido resistente em algumas fontes botânicas.

O annealing também é uma modificação física onde o amido é incubado em excesso de água (<65% v/v) ou em quantidade intermediária (<40-55% v/v) durante determinado período (4 à 168 h), a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização, mas acima da temperatura de transição vítrea (TESTER; DEBON; KARKALAS, 1998; TESTER; DEBON; SOMMERVILLE, 2000; TESTER; DEBON, 2000; ZAVAREZE; DIAS, 2011), permitindo uma discreta reorganização molecular, levando as duplas hélices da amilopectina adquirirem uma configuração mais organizada (VAMADEVAN et al., 2013). Esta modificação hidrotérmica, de forma geral, também promove alterações na viscosidade sem alterar a estrutura molecular, reduz a viscosidade e a retrogradação, o poder de inchamento e a lixiviação da amilose dos grânulos, aumento na faixa de temperatura de gelatinização, susceptibilidade enzimática e formação de amido resistente em algumas fontes botânicas.

Ambas as modificações apresentam respostas distintas relacionadas a origem botânica do amido empregado (CHIU; SOLAREK, 2009). Inúmeras pesquisas avaliaram estes efeitos e recomendam a aplicação destes amidos para o uso em produtos alimentícios, por se tratar de um ingrediente livre de resíduos químicos, seguro e não é limitado pela legislação como ingrediente (BEMILLER, 1997; KLEIN et al., 2013; ZAVAREZE et al., 2010).

2.3.2 Sonicação (SNT)

A sonicação é o emprego de ultrassom, através de banhos ou sondas. O ultrassom é a audiofrequência acima da capacidade do ouvido humano (18kHz). Esta audiofrequência é dividida em três regiões de frequência. O ultrassom de potência, entre as regiões de 16 a 100 kHz (1 Hz é 1 ciclo.s⁻¹), ultrassom de alta frequência, entre 100 kHz e 1 MHz e ainda ultrassom de diagnóstico, entre 1 e 10 MHz (JAMBRAK et al., 2010) (Figura 5). Ele é gerado com transdutores piezoelétricos ou magnetostrictivos que criam vibrações com alta energia

vibracional. Estas vibrações são amplificadas e transmitidas para sonotrodes ou probes, os quais entram em contato direto com o fluido (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011; JAMBRAK et al., 2010). Estas vibrações promovem a formação de cavidades cheias de gás ou de vapor, no sistema, que diminuem a pressão e quando entram em colapso, aumentam a pressão novamente. Este comportamento é chamado de cavitação.

Durante o colapso cavitacional ocorre um forte aquecimento nas bolhas. Estes pontos quentes localizados têm temperaturas de cerca de 5000 °C, pressões de cerca de 500 atmosferas, e tempos de vida de alguns microssegundos (SUSLICK, 1990), promovendo a quebra de ligações moleculares C-C e a formação de radicais com cadeias longas, devido ao efeito da cavitação.

O uso de ultrassom é amplamente empregado para melhorar processos de extração, tanto de óleos essenciais quanto de lipídios em geral, além de auxiliar a separação de amido e proteínas na extração de amido (ADAM et al., 2012; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; CRAVOTTO et al., 2008; DA PORTO; PORRETTO; DECORTI, 2013; FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011; GOULA, 2013; MASON; PANIWNKY; LORIMER, 1996; PATIST; BATES, 2008; VEILLET; TOMAO; CHEMAT, 2010; ZENKER; HEINZ; KNORR, 2003).

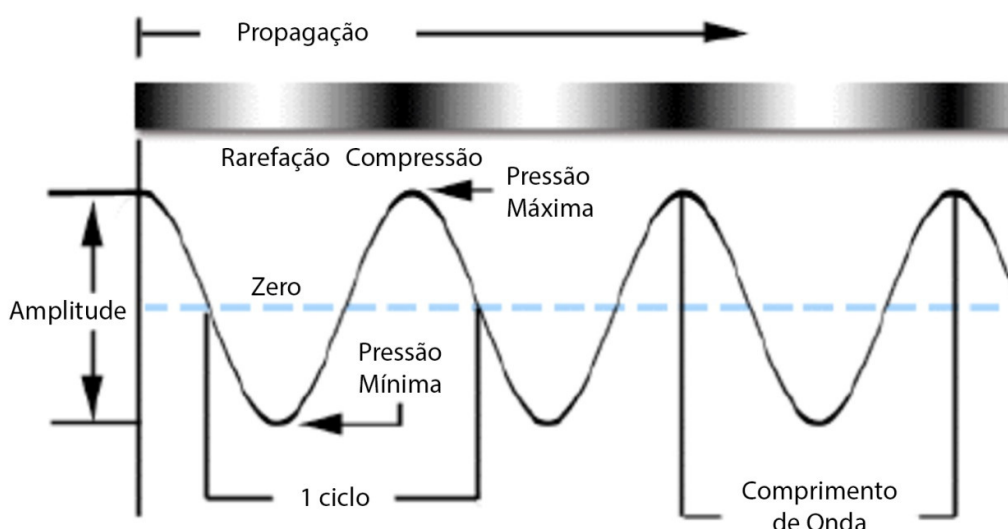


Figura 5 Esquema de propagação das ondas de ultrassom em um meio

Ainda são restritas as pesquisas sobre o efeito do ultrassom como modificação em amidos. No entanto, estudos comprovaram que o ultrassom

promovem a degradação de polímeros (ALIYU; HEPHER, 2000; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2005), aumento de temperatura durante a modificação (JAMBRAK et al., 2010), fissuras e rupturas nos grânulos de amido (ZUO et al., 2012), formação de nanopartículas (BEL HAAJ et al., 2013), redução da viscosidade de géis (CHENG et al., 2010; IIDA et al., 2008; JAMBRAK et al., 2010), auxilia na fragmentação dos grânulos associado a outros tratamentos, como hidrólise enzimática (KIM; PARK; LIM, 2008; WU et al., 2011), entre outros efeitos

2.3.3 Hidrólise enzimática (ENZ) e hidrólise ácida

A hidrólise dos grânulos de amido pode ser realizada através da ação de enzimas ou por emprego de ácidos.

A hidrólise enzimática basicamente é o resultado da ação específica de enzimas que podem ser divididas em duas categorias: as amilases, que hidrolisam as ligações glicosídicas e as transferases, que são enzimas que catalisam a transferência de grupos entre duas moléculas (entre doador e acceptor). As amilases são enzimas que apresentam interesse comercial e com maior aplicação na modificação de amidos, sendo divididas em três grupos: as endo-amilases, os quais hidrolisam as ligações α ,(1,4) entre as moléculas de glicose, internas, resultando em produtos α -anoméricos; as exo-amilases, as quais hidrolisam as ligações α ,(1,4) e/ou α ,(1,6) das moléculas de glicose a partir da extremidade não redutora, resultando em produtos α - ou β - anoméricos; e por fim, as enzimas desramificadoras, as quais incluem a isoamilase e a pululanase, que atacam exclusivamente as ligações α ,(1,6), deixando as cadeias polissacarídicas lineares (NITSCHKE et al., 2007).

A hidrólise enzimática utilizando amilases é a modificação mais utilizada para alterar as propriedades de solubilidade dos amidos, bem como a viscosidade e o grau de polimerização (DP) das moléculas. As amilases produzidas por cereais germinados, fungos, bactérias e órgãos de animais são as mais empregadas na indústria de alimentos (FRENCH, 1973; LECORRE et al., 2012b).

As α -amilases, produzidas pela maioria dos animais, fungos e bactérias, geralmente são descritas como endo-enzimas e podem atacar randomicamente o interior das cadeias lineares, reduzindo o comprimento das cadeias por completo (LECORRE et al., 2012b).

Em contra partida, a hidrólise ácida é a modificação mais antiga já utilizada que visava produzir amidos solúveis. Nägeli em 1874, descreveu o tratamento de amido de batata nativo com H_2SO_4 15% por 30 dias. Ele obteve uma fração de amido ácido-resistente, que facilmente era solubilizada em água quente. Esta fração apresentou baixo peso molecular, dextrinas ramificadas e com um DP médio de 25-30, sendo conhecidas hoje como dextrinas de Nägeli (HOOVER, 2000; NAKAZAWA; WANG, 2003).

Subsequentemente, Lintner em 1886, descreveu uma modificação ácida em amido de batata nativo onde os grânulos foram tratados com uma solução aquosa de 7,5% de HCl por 7 dias a temperatura ambiente. Os produtos obtidos deste tratamento apresentaram elevado peso molecular e formavam uma solução clara em água quente. Este produto é amplamente utilizado como indicador em titulações iodométricas e análises enzimáticas (GÉRARD et al., 2002; HOOVER, 2000; JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; WANG; COPELAND, 2013).

Industrialmente, amidos ácido-modificados (milho, milho ceroso, trigo e mandioca) são preparados pelo tratamento das suspensões de amido (40%) com HCl e H_2SO_4 diluídos a 22-55 °C durante determinado período de tempo, com posterior neutralização, lavagem, centrifugação e secagem. Esta modificação é empregada como pré-tratamento na produção de amidos catiônicos, gomas, aglutinantes em paredes secas na construção civil e como cobertura na fabricação de papel (HOOVER, 2000).

2.4 Nanocristais de amido

Na ciência dos materiais, os pesquisadores estão procurando cada vez mais matérias-primas renováveis e eficientes, a fim de enfrentar possível escassez de matérias-primas, principalmente o petróleo, indo ao encontro das preocupações sócio-ambientais. A denominação *nano* se deve ao tamanho das partículas obtidas, que devem apresentar pelo menos uma das dimensões (comprimento x largura x espessura) com no máximo 500 nm (ADEOSUN SUNDAY et al., 2012).

O amido é um dos materiais mais abundantes produzidos pela natureza e este polissacarídeo já tem numerosas aplicações industriais (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012a).

Os nanocristais de amido, também denominados de SNCs (*starch nanocrystals*), são plaquetas cristalinas insolúveis, resultantes da hidrólise ácida do amido. Em geral este resíduo insolúvel é separado por centrifugação e lavado com água para a completa remoção do ácido e das frações solúveis (ANGELLIER et al., 2004; KRISTO; BILIADERIS, 2007).

O rendimento desta hidrólise ácida varia de 5 a 15%, enquanto que o diâmetro médio das partículas obtidas varia de 20 a 450 nm (GONÇALVES et al., 2014; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2010; LIN et al., 2011).

Dufresne, (2010) menciona em sua revisão, que nanocristais de celulose apresentam capacidade de reforço em compósitos poliméricos, aumentando o módulo Young e pela sua superfície de contato elevada, sendo possível utilizar uma quantidade de recheio (nanopartícula) menor. Além do tamanho, o aumento da cristalinidade das partículas obtidas é um fator importante para a obtenção dos nanocristais. Segundo Callister; Rethwisch, (2010) e Askeland; Fulay, Pradeep; Wright, Wendelin, (2010), a cristalinidade, em polímeros, interfere na deformação plástica e elástica, bem como propriedades ópticas dos mesmos. Além disso, aumenta a densidade, resistência ao ataque químico e nas propriedades mecânicas, tais como resistência à tração e dureza em temperaturas elevadas (ASKELAND; FULAY, PRADEEP; WRIGHT, WENDELIN, 2010).

Um fator limitante para a sua utilização mais difundidos nanocristais de amido é o elevado tempo de preparação (LECORRE et al., 2012b). No entanto, a produção de nanocristais vem recebendo grande atenção nas últimas décadas, por serem provenientes de material biodegradável, versátil e com boas propriedades mecânicas quando aplicado como fase dispersa em compósitos poliméricos.

Na hidrólise ácida o íon hidrônio (H_3O^+) realiza um ataque eletrofílico sobre o átomo de oxigênio na ligação glicosídica $\alpha,(1-4)$ (Figura 6a). No próximo passo, os elétrons da ligação carbono-oxigênio movem-se para o átomo de oxigênio (Figura 6b) para gerar um carbocátion intermediário instável (Figura 6c).

O carbocátion intermediário (Figura 6c) é um ácido de Lewis, por isso, subsequentemente reagem com a água (Figura 6d), uma base de Lewis, levando à reorganização de um grupo hidroxílico (Figura 6e) (HOOVER, 2000).

A hidrólise ácida remove as regiões com pouca organização, bem como as fases amorfas dos grânulos de amido, enquanto que as lamelas cristalinas

insolúveis em água permanecem após a reação (HOOVER, 2000; KONG et al., 2012; LIN et al., 2011; WANG et al., 2001).

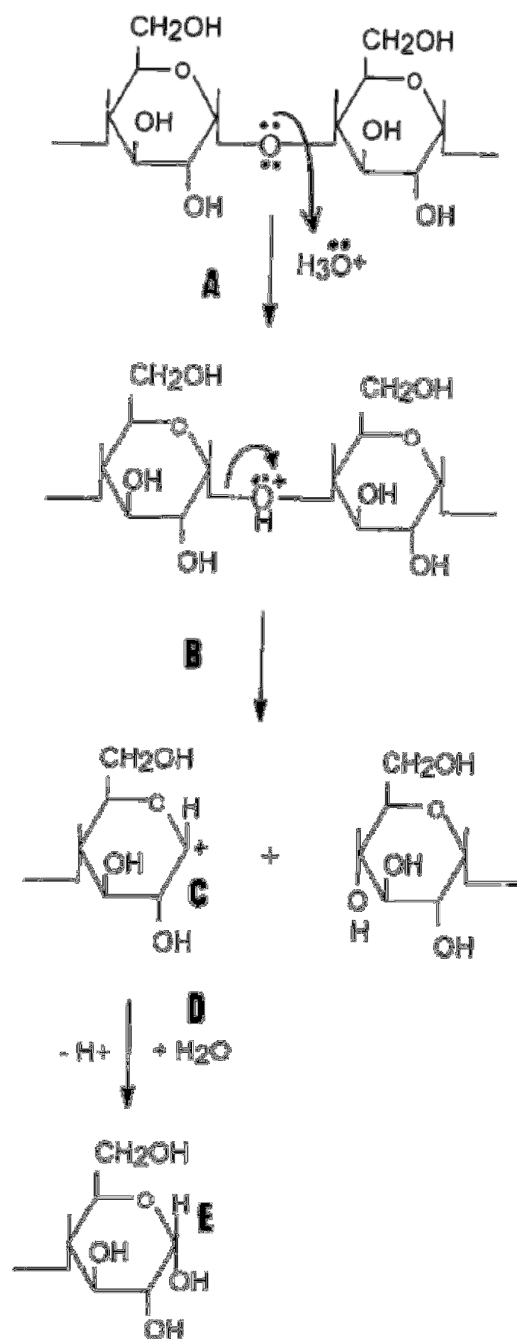


Figura 6 Mecanismo da hidrólise ácida do amido. Fonte: Hoover, (2000)

A origem botânica do amido, ou seja, o tipo de cristalinidade e a proporção relativa de amilose e amilopectina determinam a estrutura e a morfologia dos SNCs resultantes (GÉRARD et al., 2002; HOOVER, 2000; JANE; WONG; MCPHERSON,

1997; JAYAKODY; HOOVER, 2002; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011, 2012b; MIAO et al., 2011; WANG; COPELAND, 2013). As condições de hidrólise durante o processo (como o tipo e a concentração de ácido, temperatura e tempo de reação) afetam o tamanho e o rendimento dos nanocristais de amido (LIN et al., 2011). Na Figura 7 está uma representação detalhada do amido e a possível região de onde os nanocristais (f) se originam.

A produção de SNCs vem sendo desenvolvida (DUFRESNE; CAVAILLE, 1996) e otimizada (ANGELLIER et al., 2004) desde 1996.

Dufresne; Cavaille, (1996) publicaram uma nota técnica sobre a produção de microcristais de amido através de hidrólise ácida (HCl, 2,2 N) a 35 °C por 15 dias.

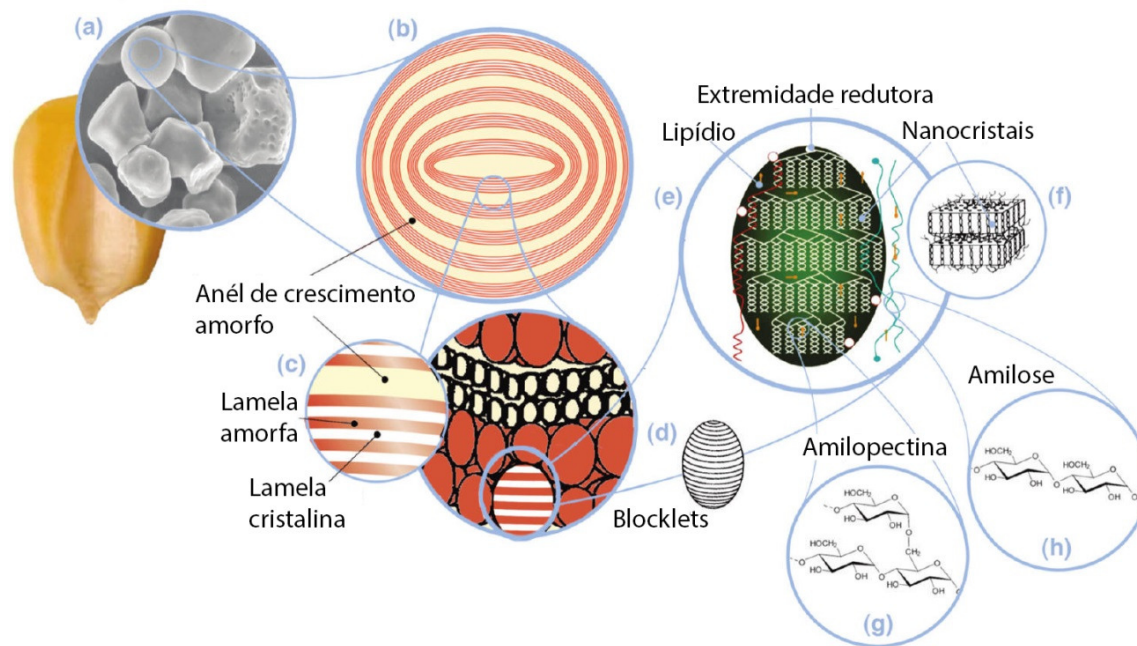


Figura 7 Representação do grânulo de amido em múltiplas escalas (a) grânulo de amido de milho normal (30 µm), (b) anéis de crescimento da região amorfa e semicristalina (120-500 nm), (c) lamelas cristalina e amorfa (9 nm), ampliação dos detalhes dos anéis de crescimento da região semicristalina, (d) blocklets (20-50 nm) constituindo uma unidade dos anéis de crescimento, (e) duplas hélices da amilopectina formando a lamela cristalina dos blocklets, (f) nanocristais: fração da lamela cristalina quando separados por hidrólise ácida (g) estrutura molecular da amilopectina (h) estrutura molecular da amilose (0.1-1 nm). Fonte: Le Corre; Bras; Dufresne, (2010)

Após o período de hidrólise o resíduo insolúvel foi lavado e centrifugado para a remoção do ácido. Os autores verificaram que o uso de ultrassom no preparo das amostras para microscopia eletrônica favorecia a dispersão dos aglomerados. Analisando os resultados de MEV eles verificaram que os fragmentos eram formados por microcristais não sendo possível identificá-los claramente e concluíram que o diâmetro não era maior que 10 nm.

Kristo; Biliaderis, (2007) produziram SNCs de amido ceroso de milho pelo mesmo método de hidrólise ácida (HCl, 2,2 N) a 35 °C durante 30 dias. Os autores verificaram que os nanocristais preservaram o padrão de raio-X do amido nativo (tipo A) e ainda apresentaram picos mais nítidos em relação ao amido nativo. Neste mesmo estudo, os autores utilizaram os nanocristais de amido em filmes de pululana em diferentes concentrações (0-40%) e avaliaram as propriedades dos filmes formados. Os autores verificaram uma redução na permeabilidade de vapor de água (de 30 e 40% SNCs), na elongação até a ruptura e um aumento no módulo de tensão com o aumento da concentração de SNCs nos filmes.

Angellier et al., (2004) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para investigar o efeito de cinco fatores (temperatura, concentração do ácido, concentração do amido, velocidade de agitação e tempo de hidrólise) na hidrólise ácida com H_2SO_4 em grânulos de amidos de milho ceroso. O principal objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de preparação de nanocristais de amido, determinando as principais condições de operação para a obtenção de partículas com as menores dimensões no menor tempo de hidrólise e com o maior rendimento possível. Os autores concluíram que é possível produzir nanocristais de amido após 5 dias de hidrólise com ácido sulfúrico (3,16 M, 40°C), obtendo-se um rendimento de 15% em peso, com partículas do mesmo tamanho que os obtidos pelos métodos tradicionais com 40 dias de hidrólise com HCl e 0.5% de rendimento.

Os autores Lecorre; Bras; Dufresne, (2011, 2012a, 2012b) estudaram o efeito de diferentes origens botânicas, conteúdo de amilose e morfologia dos grânulos na formação de nanocristais, propriedades térmicas, cristalinidade, bem como propriedades reológicas dos amidos. Em 2011, foram estudados os amidos de batata, trigo, amidos de milho (normal – 25% amilose; ceroso – 0% de amilose e com alto teor de amilose – 70%). Os autores concluíram que as amostras com o conteúdo de amilose semelhante mas de origem botânica diferente (batata, trigo e

milho) resultaram em cristalinidade e tamanho de partícula relativamente semelhantes, provando que a origem botânica não tem grande influência na formação dos nanocristais (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011).

Já num dos estudo em 2012 sobre a estabilidade térmica dos nanocristais de amido, os mesmos autores relataram que a morfologia das partículas formadas é dependente da origem botânica dos amidos utilizados. Neste mesmo estudo, os autores verificaram dois picos endotérmicos quando os nanocristais foram analisados por calorimetria diferencial de varredura(DSC) (em excesso de água e amostras secas) e concluíram que não houve correlação entre a temperatura de fusão das amostras antes e depois da hidrólise. Os autores concluíram que os nanocristais de amido podem ser utilizados em processos úmidos com temperaturas inferiores a 100 °C e em processos secos abaixo de 150 e 200 °C para evitar a gelatinização e fusão dos mesmos (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012a).

Por fim, os autores estudaram o efeito da aplicação dos nanocristais em borracha natural e avaliaram o efeito da capacidade de reforço destas nanopartículas no material. Os resultados indicaram que quanto maior o conteúdo de amilose do amido nativo utilizado na preparação dos nanocristais, menor foi a capacidade de absorção de água e o efeito de reforço, com exceção do amido de batata. Com isso, os autores propõem que os nanocristais preparados a partir de amido com elevado teor de amilose pode liberar cadeias de amilose fracamente ligadas durante a preparação e/ou a imersão em água e, assim, evitar a participação das nanopartículas na formação de uma rede de reforço (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012b).

Kim et al., (2012) utilizaram diferentes matérias-primas com origens botânicas e conteúdo de amilose variados, tais como, amido de milho ceroso, normal e com alta amilose, bem como amido de batata e feijão Mung, para a produção de nanocristais. Os amidos foram hidrolisados com H_2SO_4 (3.16 M) a 40°C por 7 dias e as partículas insolúveis foram recuperadas por centrifugação. Depois de 5 dias de reação o grau de hidrólise dos diferentes amidos testados foi de 90,9% para o amido de milho ceroso, 85,3% para o amido de milho normal, 61,4% amido de milho com alta amilose, 89,8% para o amido de batata e 73,9% para o amido de feijão Mung. Os autores verificaram que os amidos tipo-A foram mais resistentes à hidrólise ácida que os amidos tipo-B. Os resultados de raio-X revelaram que as partículas dos amidos com cristalinidade tipo-B exibiram um decréscimo na intensidade dos picos.

Além disso, Kim et al., (2012), constataram através de análises de DSC, que os cristais remanescentes das partículas tipo-B foram rapidamente rompidos na presença de água e que o pico endotérmico de fusão não apareceu. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmou que as partículas apresentaram forma oval ou arredondada, com diâmetros entre 40 e 70 nm. Os autores concluíram que estas partículas possivelmente são os *blocklets* dos grânulos dos amidos. Os autores também verificaram um aumento na proporção de cadeias curtas depois da hidrólise ácida dos amidos.

Com isso, acredita-se que os fatores que limitam a produção de nanocristais são o tempo de hidrólise e o baixo rendimento dos mesmos. O uso de pré-tratamentos pode ser uma alternativa para contornar estes fatores.

LeCorre, et al., (2012) estudaram a produção de nanocristais de amido de milho ceroso com pré-tratamento enzimático de 2 h. Este pré-tratamento promoveu o aparecimento de nanocristais com apenas 6h de hidrólise ácida. Como resultado dos pré-tratamentos com as enzimas α -amilase, β -amilase e glucoamilase (com diferentes concentrações de enzimas), as glucoamilases foram mais eficiente para a produção de grânulos microporoso, mantendo intacta a estrutura semicristalina destes amidos. Os autores ainda verificaram um rendimento igual ao obtido em 5 dias, com apenas 45 horas de hidrólise, quando utilizaram pré-tratamento enzimático.

O uso de pré-tratamentos físicos, como tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN) e a modificação com ultrassom (SNT) na produção de nanocristais de amido não é relatado na literatura, mas pode ser uma alternativa para a redução no tempo de reação e aumento no rendimento.

2.5 Utilização de nanopartículas e nanomateriais

Os biomateriais são promissores por serem provenientes de matérias-primas renováveis e que podem ser compostáveis ou recicláveis, além do processo produtivo ser mais eficiente em, termos energéticos, quando comparado com a produção de plástico à base de petróleo (HANNAH; JAMES, 2008).

Os nanocompósitos são uma classe de compósitos relativamente nova e consistem na utilização de polímeros recheados com partículas que apresentam pelo menos uma dimensão em escala nanométrica (até 500 nm) (ADEOSUN

SUNDAY et al., 2012). Em função da elevada razão entre a superfície de contato e o volume de material utilizado, a incorporação das nanopartículas nas matrizes poliméricas confere aos compósitos propriedades diferenciadas, tais como, propriedades mecânicas, elétricas, ópticas e térmicas, em comparação aos compósitos convencionais (ANGELLIER et al., 2004; CHAPMAN; MULVANEY, 2001; SCHMIDT; MALWITZ, 2003; SMITH; BEDROV; SMITH, 2003).

A biocompatibilidade dos polímeros biodegradáveis oriundos de materiais sintéticos usados na preparação de nanocompósitos apresentam mais limitações que os polímeros naturais (SMITH; BEDROV; SMITH, 2003). Aliado a esta característica, a crescente conscientização da necessidade em preservar o meio ambiente, as tecnologias mais sustentáveis concentraram a atenção no uso de materiais denominados ecologicamente corretos ou ecoprodutos (*ecofriendly*), de baixo custo e com alto desempenho (MA; YU; KENNEDY, 2005).

Neste contexto, as pesquisas têm focado o uso de nanopartículas para a utilização como recheio e enchimento nas matrizes poliméricas. Entre os materiais mais utilizados para a elaboração de nanopartículas provenientes de recursos renováveis, as fibras de celulose (DUFRESNE, 2006; SIQUEIRA et al., 2009), a argila (ASHAMOL et al., 2013; CHIOU et al., 2007), a quitosana (JANES et al., 2001; QI et al., 2004) e o amido (ANGELLIER-COUSSY et al., 2009; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012a; LI; SUN; YANG, 2012) são os materiais que mais se destacam.

O amido como matéria-prima renovável, de baixo custo e de fácil obtenção não serve apenas como fonte energética para plantas, animais e seres humanos, mas também como uma alternativa ecológica aos derivados de petróleo (HANNAH; JAMES, 2008).

A utilização de nanocristais de amido como fase dispersa em filmes e compósitos foi estudada por alguns autores (ANGELLIER; MOLINA-BOISSEAU; DUFRESNE, 2005; KRISTO; BILIADERIS, 2007; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012b; YAI, 2013), apresentando resultados promissores quanto a diminuição na permeabilidade ao vapor de água e melhora nas propriedades mecânicas e térmicas. O uso de SNCs já ocorre na produção de pneus pela Good Year pneus e borrachas (US) como substituto de carbono e sílica (LIN et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pós Colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil e no Laboratório Packaging Biomaterials no Departamento de Food Science da University of Guelph, Ontário, Canadá.

3.1 Material

As sementes de pinhão e os grãos de feijão Carioca, provenientes da safra de 2012, foram adquiridas em comércio local da cidade de Pelotas, RS, Brasil.

A enzima α -amilase de origem pancreática foi adquirida da Megazyme (150.000 U.g^{-1}), bem como a pululanase (29 U.mg^{-1}) e a isoamilase (260 U.mg^{-1}) (Megazyme International, Bray, Ireland).

Todos os demais reagentes empregados na pesquisa foram de grau analítico (ACS).

3.2 Desenho experimental

As amostras de pinhão e feijão Carioca foram armazenadas à $16^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ até a extração do amido. A extração do amido de pinhão foi realizado conforme descrito por Pinto et al., (2012) e a extração do amido de feijão foi realizada conforme descrito por Rupollo et al., (2011). Após a extração, os amidos foram secos em estufa a 40°C , moídos e armazenados para posterior utilização.

A pesquisa foi estruturada em quatro estudos, conforme descritos na Tabela 1 e na Tabela 2. No Estudo 1 e no Estudo 2 foram realizados os pré-tratamentos de TTBU, ANN, SNT e ENZ no amido de pinhão e no amido de feijão, respectivamente (Tabela 1). Realizou-se a caracterização destes amidos nativos e dos amidos modificados para posterior utilização dos mesmos como pré-tratamentos na produção dos nanocristais por hidrólise ácida.

Tabela 1 Delineamento experimental dos pré-tratamentos nos amidos de pinhão e de feijão carioca

Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes
Nativo	Estrutura molecular (GPC)
TTBU	Propriedades de pasta (RVA)
ANN	Difração de raio-X
SNT	Propriedades térmicas (DSC)
ENZ	

O tratamento térmico de baixa umidade foi conduzido com o ajuste da umidade do amido para $22\% \pm 0,5\%$ com o auxílio de uma bureta e com o emprego de batedeira planetária (para promover uma mistura homogênea). As amostras foram deixadas em repouso por 4 dias a 4°C para equalização da umidade. Após o período de equalização as amostras foram transferidas para vidros com capacidade de 500mL, hermeticamente fechados, e submetidos a aquecimento em autoclave por 1h à 100°C . Após o aquecimento, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, removidas dos vidros, colocadas em bandejas, secas em estufa à 40°C e na sequência moídas e armazenadas.

O annealing foi realizado através da dispersão do amido em um becker com capacidade de 2L, com água deionizada em excesso e aquecidos a $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara com controle de temperatura e agitação magnética constante por 16 h. Após o período de incubação as amostras foram filtradas em papel filtro de média porosidade com o emprego de funil de Büncher e bomba de vácuo. As amostras foram lavadas com água de deionizada, colocadas em bandejas, secas em estufa a 40°C e na sequência moídas e armazenadas.

O tratamento com ultrassom foi realizado com a dispersão do amido em água deionizada (1:4 p/v) em becker de 1L e o emprego de um processador ultrassônico (Vibra - cell VC 505; Sonics and Material Inc., Newtown, Conn., U.S.A.) com probe com 5 mm de diâmetro (modelo CV33) por 90 min (ciclos de 30s on e 5s off e com 50% de amplitude e 20 kHz de frequência). Os tratamentos com ultrassom foram realizado com uso de banho de gelo, para evitar modificações térmicas ou gelatinização do amido. Após a modificação, as amostras foram filtradas em papel filtro de média porosidade, com o emprego de funil de Büncher e bomba de vácuo.

As amostras foram lavadas com água deionizada, colocadas em bandejas, secas em estufa a 40 °C e na sequência moídas e armazenadas.

A hidrólise enzimática foi conduzida com o emprego da enzima α -amilase de origem pancreática, conforme descrito por Kim, Park, Lim, (2008), com modificações. A quantidade de material utilizado foi adaptado para manter a mesma razão da atividade enzimática/amido (804 U.g^{-1} de amido) proposto por Kim et al., (2008) e também empregado por LeCorre et al., (2012b). A enzima α -amilase foi dissolvida em tampão fosfato 20 mM (pH 6,9) contendo NaCl 6,7 mM. O amido (100 g, base seca (bs)) foi disperso na solução contendo a enzima (3000 mL) e a suspensão foi incubada a 37 °C por 2h com agitação constante. Ao final da hidrólise foi adicionado etanol (1:2 v/v) para inativar a enzima e parar a reação. O amido hidrolisado foi recolhido por filtração utilizando papel filtro de média porosidade com o auxílio de funil de Büncher e bomba de vácuo. O amido recuperado foi lavado duas vezes com etanol 50% (500 mL), colocado em bandejas, seco a 40 °C e na sequência moído e armazenado. O sobrenadante foi analisado para quantificar os carboidratos solúveis resultantes da hidrólise, a cada 30 min. e a quantificação foi realizada utilizando o método de fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

No Estudo 3 e no Estudo 4 foram realizados as hidrólises ácidas para a produção dos nanocristais dos amidos de pinhão e feijão Carioca, respectivamente (Tabela 2). Realizou-se também a caracterização dos nanocristais oriundos da hidrólise ácida dos amidos nativos e dos amidos com pré-tratamento de pinhão e feijão Carioca.

A produção dos nanocristais de amido foi conduzida através da hidrólise com ácido sulfúrico, conforme descrito por Angellier et al., (2004), com adaptações. As amostras de amido (15 g) foram dispersas em H_2SO_4 3 M (200 mL) e incubadas a 40 °C com agitação magnética constante durante 5 e 7 dias. Após o tempo determinado de hidrólise as amostras foram centrifugadas para a remoção do H_2SO_4 e recuperação do resíduo da hidrólise.

O resíduo foi disperso em água deionizada, deixado sob agitação durante meia hora e centrifugado (lavagem do amido) para a remoção do ácido. Essa operação foi realizada por pelo menos quatro vezes, e posteriormente neutralizado com NaOH 0,01 M e novamente lavado, por mais duas vezes para a remoção dos sais formados após a neutralização. Durante a hidrólise com H_2SO_4 a suspensão foi coletada, a cada 24 h, centrifugada e os carboidratos solúveis resultantes da

hidrólise foram quantificados pelo método de fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

Tabela 2 Delineamento experimental da produção de nanocristais de amidos de pinhão e de feijão carioca

Variáveis Independentes		
Pré-Tratamento	Tempo de hidrólise (dias)	Variáveis Dependentes
Nativo	5	Rendimento e cinética da hidrólise
TTBU	7	Estrutura molecular (GPC)
ANN		Difração de raio-X
SNT		Morfologia (MEV)
ENZ		Propriedades térmicas (DSC)

3.3 Avaliações

3.3.1 Estudo 1 Pré-tratamentos nos amidos de pinhão e Estudo 2 Pré-tratamentos nos amidos de feijão Carioca

3.3.1.1 Estrutura molecular

A estrutura molecular foi realizada através da cromatografia de permeação em gel (GPC) Sepharose CL-2B. As amostras foram preparadas conforme descrito por Bertoft et al., (2008) com algumas modificações. Os grânulos de amido (8 mg) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 90% (0,3 mL) por agitação suave e aquecimento por 5 minutos, em seguida foram deixadas à temperatura ambiente durante 16 h. Após o período de agitação, as amostras foram aquecidas durante 2 a 5 min e diluídas com água quente (0,7 mL). A distribuição de tamanho das cadeias do amido foi obtido por cromatografia com o emprego de uma coluna contendo gel de agarose Sepharose CL-2B (1,6 x 32 cm) (Pharmacia, Uppsala, Suécia). Uma fração de amido dissolvido (0,3 mL) foi eluída através da coluna com NaOH a 0,01 M como eluente, a uma taxa de 0,5 mL.min⁻¹. As frações de 1 mL foram recolhidas e o teor de carboidratos totais foi determinado pela reação de fenol-ácido sulfúrico

(DUBOIS et al., 1956). O comprimento de onda máxima ($\lambda_{\max}$) do complexo de iodo-amido foi examinado usando 0,1 mL de soluções I_2 (0,1 M) / KI (0,01 M), posterior a neutralização das amostras com HCl 0,01 M.

Para a análise molecular dos amidos desramificados as amostras foram dissolvidos em 90% de DMSO, como descrito acima, e desramificada com pululanase e isoamilase (específicas para α , (1,6)) como descrito por Bertoft et al., (2008). A distribuição do comprimento da cadeia de amido desramificado foi submetido a cromatografia em uma coluna contendo gel de agarose Sepharose CL-6B (1,6 x 90 cm) (Pharmacia, Uppsala, Suécia), eluindo-se 1 mL da amostra com NaOH 0,5 M a uma taxa de 1 mL.min⁻¹. As frações pares (1 mL) foram recolhidas e o teor de carboidratos totais foi analisado, utilizando a reação de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O teor de amilose (AM) das amostras de amido foi definida de acordo com Sargeant; Wycombe, (1982). A quantificação das frações F1 – cadeias glicose lineares longas, F2 – material intermediário e F3 – cadeias de glicose lineares curtas, foi realizada pela soma das fações equivalentes que formam os picos.

3.3.1.2 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta dos amidos nativos e modificados foram determinadas com o analisador rápido de viscosidade (Rapid Visco Analyser – RVA – 4, Newport Scientific, Australia) com o auxílio do software Thermocline for Windows (Versão 3). As amostras de amido (3,0 g, umidade corrigida para 14%) foram pesadas diretamente no canister e 25 mL de água deionizada foi adicionada. Na sequência, as amostras foram aquecidas a 50°C e misturadas a uma velocidade de 160 rpm por 10s para completa dispersão. A amostra foi mantida a 50°C por 1 min e então aquecida a 95°C por 7,3 min, onde se manteve esta temperatura por 5 min, resfriada a 50°C em 7,4 min e mantida a esta temperatura por 2 min. Os parâmetros avaliados foram o pico de viscosidade, viscosidade mínima, quebra de viscosidade, viscosidade final, tendência a retrogradação e temperatura de pasta.

3.3.1.3 Difração de raio-X

Os padrões de difração de raio-X dos amidos foram obtidas com difrattômetro de raios-X (Rigaku Powder Diffractometer, Rigaku Co., Tokyo, Japan). A região de varredura variou de 5° até 30°, com uma tensão de voltagem de 30 kV, corrente de 30 mA e velocidade de 1°.min⁻¹ utilizando CuK α 1 (λ = 1,54 Å) como fonte de radiação e o ângulo de difração 2 theta. A cristalinidade relativa dos grânulos de amido foi calculada pela seguinte equação: $RC (\%) = (Ac / (Ac + Aa)) * 100$, onde Ac é a área cristalina, Aa é a área amorfa dos difratogramas de raio-X.

3.3.1.4 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos nativos e submetidos aos pré-tratamentos foram determinadas utilizando um calorímetro diferencial de varredura (TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras de amido foram avaliadas quanto aos parâmetros de fusão e de gelatinização. Para avaliação das temperaturas e entalpia de fusão as amostras (aproximadamente 2,5 mg b.s.) foram pesadas diretamente nas placas de alumínio (Mettler, ME-27331), posteriormente seladas hermeticamente e submetidas ao aquecimento a uma temperatura de 40°C até 200°C a uma razão de 10°C min⁻¹. A temperatura inicial de fusão (To), o pico de temperatura (Tp), a temperatura de conclusão (Tc) e a entalpia requerida para a fusão dos amidos (ΔH) foram determinadas. A variação de temperatura (Tc-To) foi calculada pela subtração das temperaturas de conclusão pelas temperaturas de início.

Para a verificação das temperaturas e a entalpia de gelatinização as amostras (aproximadamente 3 mg) foram adicionadas de água destilada (3 vezes o peso da amostra) para a obtenção de uma suspensão de amido. As placas foram seladas hermeticamente e equilibradas por 1h antes da análise. As amostras foram aquecidas a uma temperatura de 40°C até 120°C a uma razão de 10°C min⁻¹. Uma placa vazia foi utilizada como referência em ambas as análises. A temperatura inicial de gelatinização (To), o pico de temperatura (Tp), a temperatura de conclusão (Tc) e a entalpia requerida para a gelatinização dos amidos (ΔH) foram determinadas. A variação de temperatura (Tc-To) foi calculada pela subtração das temperaturas de conclusão pelas temperaturas de início.

3.3.2 Estudo 3 Produção dos nanocristais de amido de pinhão e Estudo 4 Produção dos nanocristais de amido de feijão Carioca

3.3.2.1 Rendimento e cinética da hidrólise

O rendimento da hidrólise foi calculado pela diferença entre a amostra inicial (b.s.) e o resíduo insolúvel recolhido após a hidrólise, lavagens e liofilização.

O percentual de hidrólise foi determinada pela quantificação dos carboidratos solúveis, durante a reação. A cada 24h foram coletados 20 μ L de amostra e diluídas em 15 mL de água mili-q e centrifugadas a 13.000 g por 10 min. Na sequência, 1 mL do sobrenadante foi utilizado para quantificar o teor de carboidratos totais (solubilizados na hidrólise), pela reação de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

3.3.2.2 Estrutura molecular

A cromatografia de permeação em gel Sepharose CL-6B das amostras desramificadas, foi realizada conforme descrito por Bertoft et al., (2008), com algumas modificações. O resíduo insolúvel das hidrolises (4 mg) foram dissolvidos em DMSO a 90% (0,2 mL) por agitação suave e aquecimento por 5 minutos, em seguida foram deixadas agitando a temperatura ambiente durante 16 h. Após este período, 750 μ L de água e 100 μ L de tampão acetato de sódio 0.01 M (pH 5.5) foi adicionado. As enzimas pululanase e isoamilase (1 μ L) foram adicionadas, a suspensão foi agitada e encubada overnight com agitação suave. No final da encubação as amostras foram aquecidas por 5 min para inativação das enzimas, 50 μ L de NaOH 5 M foi adicionado e o volume completado para 1,5 mL.

A distribuição do comprimento da cadeia do resíduo insolúvel das hidrolises depois de desramificado (1 mL) foi submetido a cromatografia em uma coluna contendo gel de agarose Sepharose CL-6B (1,6 x 90 cm) (Pharmacia, Uppsala, Suécia), eluindo-se com NaOH 0,5 M a 1 mL.min⁻¹. As frações pares (1 mL) foram recolhidas e o teor de carboidratos totais foi analisado, utilizando a reação de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

A quantificação das frações F1 – cadeias glicose lineares longas, F2 – material intermediário e F3 – cadeias de glicose lineares curtas, foi realizada pela soma das frações equivalentes que formam os picos.

3.3.2.3 Difração de raio-X

Os padrões de difração de raio-X do resíduo insolúvel das hidrolises foram obtidas com difratômetro de raios-X (Rigaku Powder Diffractometer, Rigaku Co., Tokyo, Japan). A região de varredura variou de 5° até 35°, com uma tensão de voltagem de 30 kV, corrente de 30 mA e velocidade de 1°.min⁻¹, utilizando CuKα1 (λ = 1,54 Å) como fonte de radiação e o ângulo de difração 2 theta. A cristalinidade relativa das amostras foi calculada pela seguinte equação: $RC (\%) = (Ac / (Ac + Aa)) * 100$, onde Ac é a área cristalina, Aa é a área amorfa dos difratogramas de raio-X.

3.3.2.4 Morfologia

As amostras do resíduo insolúvel das hidrolises foram suspensas em acetona (1% p/v) e mantidas em banho ultrassom por 15 min para eliminar a presença de bolhas de ar. Uma pequena quantidade de amostra foi depositada diretamente na superfície do suporte (*stub*) e então secas em estufa à 32°C. Na sequência, todas as amostras foram recobertas com uma camada de ouro (20 nm) utilizando um metalizador (Model K550, Emitech, Ashford, Kent, UK). O tamanho das partículas foi examinado utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu SSX-550, Brazil) com a aceleração de voltagem de 15 kV.

3.3.2.5 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas do resíduo insolúvel das hidrolises foram determinadas utilizando um calorímetro diferencial de varredura (TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japan). As amostras (aproximadamente 3,5 mg b.s.) foram pesadas diretamente nas placas de alumínio (Mettler, ME-27331) e as mesmas foram seladas hermeticamente antes da análise. Uma placa vazia foi utilizada como referência. As amostras foram aquecidas a uma temperatura de 40°C até

200°C a uma razão de 10°C min⁻¹. A temperatura inicial de fusão (T_o), o pico de temperatura (T_p), a temperatura de conclusão (T_c) e a entalpia requerida o processo (ΔH) foram determinadas. A variação de temperatura ($T_c - T_o$) foi calculada pela subtração das temperaturas de conclusão pelas temperaturas de início.

3.3.2.6 Estatística

Os resultados do rendimento hidrólise dos amidos de pinhão e de feijão Carioca foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste Tukey de comparação de médias, bem como analisados pelo teste t, ambos com 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudo 1 - Pré-tratamentos nos amidos de pinhão

4.1.1 Estrutura molecular

Os amidos de pinhão nativo e modificados foram avaliados quanto a estrutura molecular por separação de tamanho em gel (GPC) de agarose (Sheparose 2B CL). A distribuição do peso molecular das frações expressa pelo conteúdo de carboidratos (eixo principal) e o comprimento de onda máximo (λ_{max}) (eixo secundário) referente a ligação com iodo foram analisados e estão representadas na Figura 8 a-d.

Na Figura 8a estão representados o amidos de pinhão nativo e amido modificado por TTBU. Pode-se verificar que o TTBU não causou alterações na estrutura molecular do amido, quando comparado ao amido nativo, pois não se observou alterações no perfil de eluição das cadeias e nem no λ_{max} . Pinto et al., (2014) verificaram uma diminuição no λ_{max} em amidos de pinhão submetidos ao TTBU sob diferentes umidades e temperaturas. Os autores relataram que condições de umidade (20 e 25%) e temperaturas (110 e 120°C) mais elevadas favoreceram a parcial abertura das alfa hélices das cadeias de amilose e das duplas hélices das cadeias adjacentes da amilopectina, diminuindo assim a afinidade das interações com o iodo (λ_{max}). Os resultados indicam que as condições de TTBU empregada não

foram suficientemente drásticas para promover uma alteração na conformação das cadeias adjacentes da amilopectina.

As amostras de pinhão modificadas com ANN também não apresentaram alterações no perfil de eluição quando comparadas ao amido nativo (Figura 8b). Alterações na distribuição das cadeias de amilopectina e amilose não são esperadas após tratamentos com ANN, uma vez que o tratamento térmico não causa modificações na estrutura química dos grânulos de amido (ROCHA et al., 2011) e utiliza temperaturas mais brandas de tratamento que não promoveram alterações suficientes para serem detectadas pelo método de análise empregado.

Após o tratamento com SNT é possível verificar um leve deslocamento para a direita na distribuição das cadeias, além de uma redução no $\lambda_{\max}$, quando comparada ao amido nativo (Figura 8c). Este efeito pode estar relacionado com o processo de cavitação, composto pela rápida formação, crescimento e colapso de microbolhas gerado pelo ultrassom. Como resultado da cavitação, as cadeias poliméricas próximas as microbolhas em colapso são cavitadas com um elevado gradiente de cisalhamento, podendo destruir as α -hélices (representadas pelas frações entre 48 e 60 da Figura 8c) formadas pelas moléculas de amilose, diminuindo o $\lambda_{\max}$ da ligação com iodo, além de promover rupturas em algumas ligações C-C.

Durante o colapso cavitacional ocorre um forte aquecimento nas bolhas. Estes pontos quentes localizados têm temperaturas de cerca de 5000 °C, pressões de cerca de 500 atmosferas, e tempos de vida de alguns microssegundos podendo destruir ligações C-C (SUSLICK, 1990), bem como ligações α -(1,4) e α -(1,6) aleatoriamente. Em função disso, no tratamento com ultrassom, se utilizou banho de gelo para evitar o aumento da temperatura e possível gelatinização ou degradação do amido. Algumas pesquisas constataram que o tratamento com ultrassom promove destruição das cadeias poliméricas de amidos de diferentes origens botânicas e teores de amilose, resultando em mais frações lineares (ZHENG et al., 2013; ZUO et al., 2009).

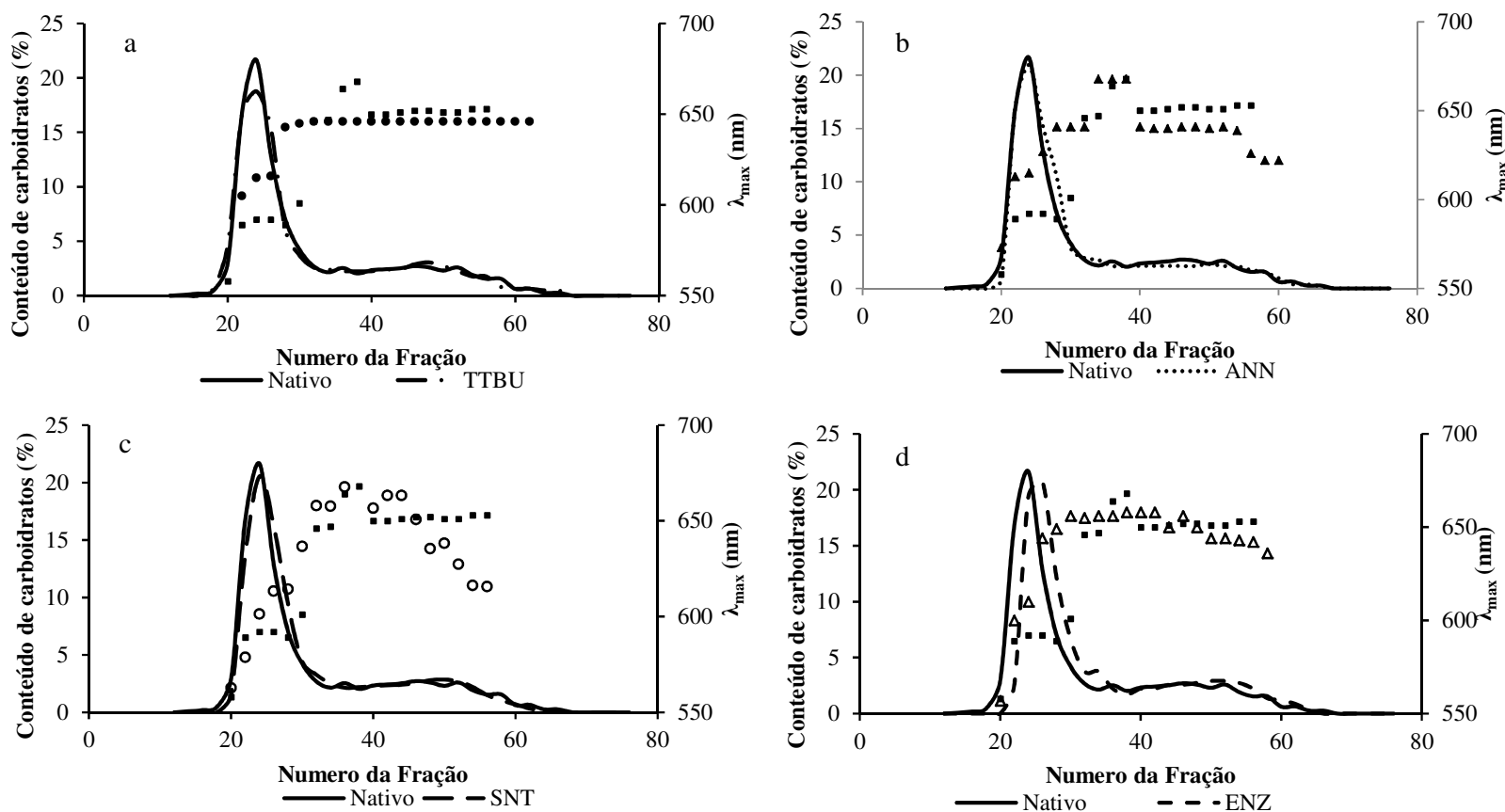


Figura 8 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 2B CL dos amidos de pinhão nativo e modificados por (a) tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), (b) annealing (ANN), (c) ultrassom (SNT) e (d) hidrólise enzimática (ENZ). No eixo principal o conteúdo total de carboidratos (linhas contínua, pontilhada e tracejada) e no eixo secundário o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\max}$) (■ nativo, ● TTBU, ▲ ANN, ○ SNT, Δ ENZ).

Na Figura 8d pode-se verificar um deslocamento para a direita da amostra modificada por hidrólise enzimática com α -amilase, quando comparada ao amido nativo. A hidrólise enzimática com α -amilase por duas horas a 37°C apresentou um percentual de hidrólise de aproximadamente 7% para o amido de pinhão (Figura 9). Este comportamento é esperado ao se observar o perfil de hidrólise (Figura 9), bem como o grau de hidrólise (7%) sofrido pelo amido de pinhão quando submetido a ação da enzima. Esta enzima promove a hidrólise das moléculas de amido aleatoriamente nas ligações α ,(1,4). O deslocamento da curva de GPC da amostra ENZ (Figura 8d) é mais acentuado do que a curva GPC da amostra submetida ao SNT (Figura 8c). Este comportamento indica que a hidrólise enzimática promoveu uma redução no peso molecular das cadeias de amilopectina e de amilose de maneira mais acentuada que o tratamento com ultrassom.

As amostras de amido de pinhão nativo e modificado foram desramificadas e após a incubação, as frações foram eluídas em coluna GPC (Sephacrose CL 6B CL). As curvas de exclusão de tamanho estão representadas na Figura 10. A separação por GPC revelou a presença de três frações que incluem longas cadeias lineares (F1), materiais intermediários (F2) e cadeias curtas de glicose (F3). Após a desramificação as cadeias longas representam a amilose e as cadeias curtas são as cadeias laterais das ramificações da amilopectina (VAMADEVAN et al., 2014).

É possível verificar que as modificações não alteraram o padrão de distribuição das frações F1, F2 e F3, no entanto promoveram alterações na porcentagem de carboidratos presentes das frações F1 e F2, nos tratamentos SNT e ENZ (Tabela 3).

Pinto et al., (2014) avaliaram o efeito do TTBU na estrutura molecular do amido de pinhão e concluíram que nas condições estudadas o TTBU não promoveu rompimento nas ligações α ,(1,4). A modificação com ANN apenas promove uma correção dos defeitos das hélices da região cristalina, não alterando o tamanho das cadeias (VAMADEVAN, 2013).

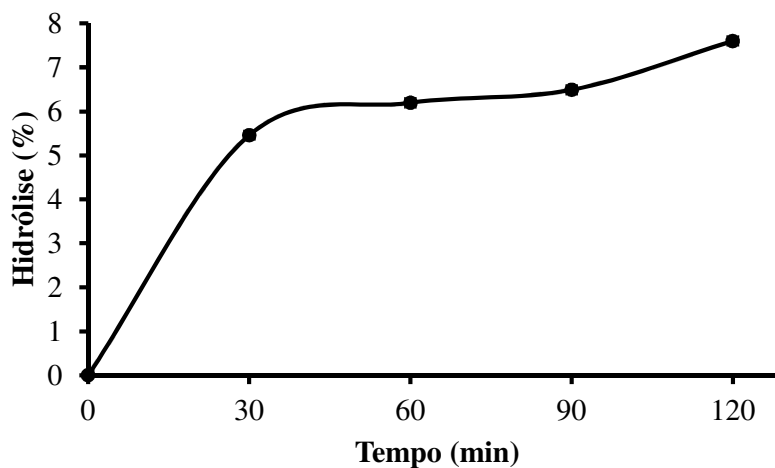


Figura 9 Perfil de hidrólise dos amidos de pinhão com enzima α -amilase por 2h

A cavitação gerada durante o tratamento com SNT promove quebra nas ligações C-C (SUSLICK, 1990), fazendo com que as moléculas de amilose (F1) apresentem um tamanho intermediário (F2).

A desramificação do amido de pinhão submetido ao tratamento ENZ (Figura 10c) apresentou uma pequena alteração na fração F2, quando comparado ao amido nativo (Tabela 3), indicando que o tratamento promoveu rompimento nas ligações α ,(1,4) das moléculas de amilose.

Tabela 3 Frações moleculares (FM) do amido de pinhão desramificado nativo e modificados

Tratamentos	Frações moleculares do amido desramificado		
	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Nativo	15	11	74
TTBU	15	11	74
ANN	15	11	74
SNT	14	12	74
ENZ	14	12	74

F1 - cadeias lineares longas de glicose, F2 – materiais intermediários e F3 – cadeias curtas de glicose.

Kim; Park; Lim, (2008) estudaram a fragmentação dos grânulos de amido de arroz ceroso após hidrólise com α -amilase. Eles verificaram que na fase rápida, a hidrólise ocorreu preferencialmente na região amorfa (0 a 9h de reação) dos grânulos de amido e na fase mais lenta, a enzima promove erosões na região cristalina, causando alterações nas cristalinidade, propriedades térmicas dos cristais e a presença de poros dos grânulos. Esse resultados então em conformidade com a Figura 9, que mostra uma baixa taxa de hidrólise e com a Tabela 3, que demonstra uma redução da fração F1 e aumento da F2.

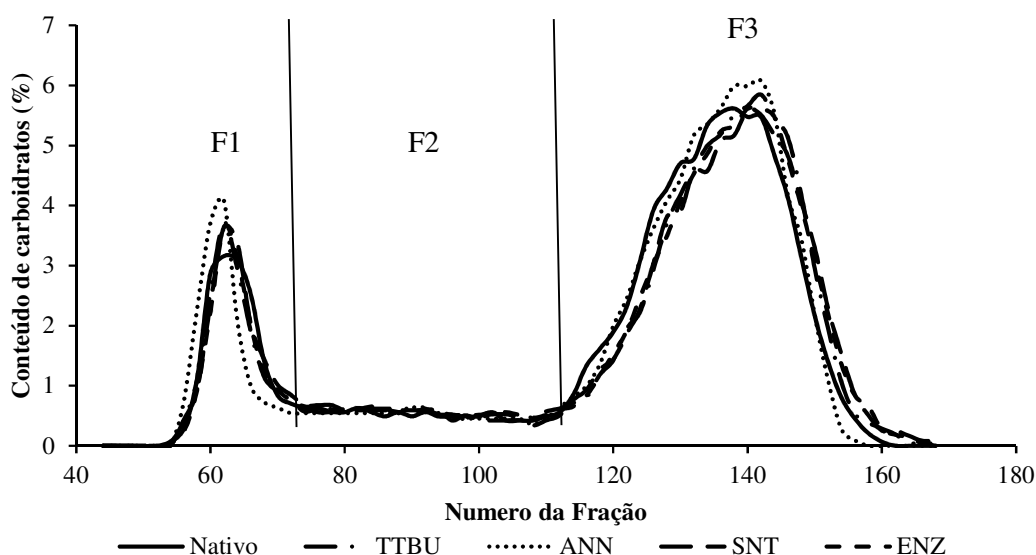


Figura 10 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL dos amidos de pinhão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), desramificados com pululanase e isoamilase. No eixo principal o conteúdo total de carboidratos. F1 – cadeias de glicose lineares longas; F2 - materiais intermediários; F3 - cadeias de glicose lineares curtas

4.1.2 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta, tais como pico de viscosidade, viscosidade mínima, quebra, viscosidade final, tendência a retrogradação e temperatura de pasta

dos amidos de pinhão nativo e modificados estão representadas na Figura 11 e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Propriedades de pasta dos amidos de pinhão nativo e modificados

Tratamentos	Nativo	TTBU	ANN	SNT	ENZ
TP (°C)	60,7±0,07	70,2±0,1	65,0±0,07	60,8±0,1	62,9± 0,12
PV (cP)	4761,0±17	3142,0±39	3701,3±29	5347,5±8,5	2528,0±41
VM (cP)	2105,0±13	1740,0±45	2793,6±43	2289,0±6	1110,5±13
QB (cP)	2656,0±4	1402,0±4	907,6± 19	3058,5±14	1417,5±27
VF (cP)	3861,5±93	5277,0±95	4678,6±30	3618,5±9	2469,5±23
RT (cP)	1675,0 ±26	3537,0±52	1885,0±16	1329,0±3	1350,0±9

PV- pico de viscosidade; VM- viscosidade mínima; QB- Quebra; VF- viscosidade final; RT- Tendência a retrogradação; TP- Temperatura de pasta. *Os resultados são a média de três determinações.

O pico de viscosidade é o aumento da viscosidade durante o processo de aquecimento de uma suspensão de amido e ocorre, em parte, pelo inchamento desuniforme dos grânulos de amido e a quebra da viscosidade é causada pela ruptura dos grânulos inchados (VANDEPUTTE et al., 2003), sendo quantificada pela diferença entre o pico de viscosidade e a viscosidade mínima durante o processo. A diminuição da quebra indica uma elevada estabilidade dos amidos quando submetidos a processos de aquecimento e agitação mecânica (KARIM et al., 2008).

O TTBU promoveu redução do pico de viscosidade, viscosidade mínima e da quebra e aumentou a temperatura de pasta, viscosidade final e a tendência a retrogradação, em relação ao amido nativo (Tabela 4). As modificações físicas em amido de pinhão encontradas na literatura foram apenas utilizando TTBU que relata que o efeito nos parâmetros de viscosidade é dependente das condições de tratamento, tais como umidade, tempo e temperatura utilizados na modificação. O comportamento do TTBU verificado nas propriedades de pasta do amido de pinhão

foi semelhante ao encontrado por outros autores (KLEIN et al., 2013; PINTO et al., 2012).

Zavareze; Dias, (2011) em sua revisão sobre o impacto de tratamentos hidrotérmicos em amidos, descreveram que o TTBU resulta no aumento da temperatura de pasta e no decréscimo do pico de viscosidade, viscosidade final, quebra e tendência a retrogradação, dependendo da origem botânica do amido estudado. Os autores explicam que as mudanças ocorrem nos amidos com TTBU devido a associação entre as cadeias nas regiões amorfas dos grânulos. Também, as alterações que ocorrem na região cristalina durante o processo hidrotérmico são dependentes dos conteúdos de umidade utilizados nas modificações.

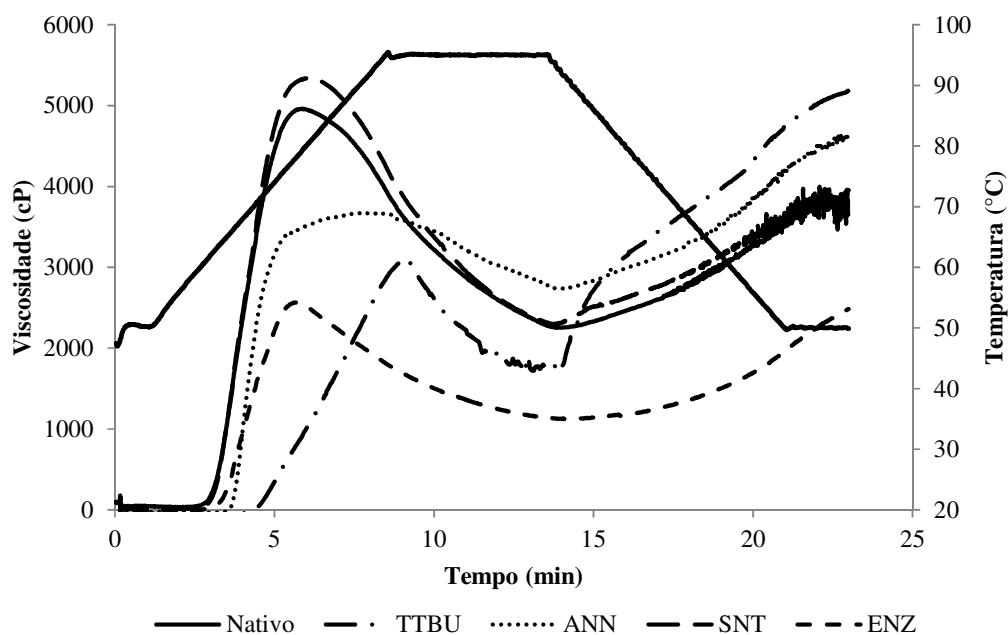


Figura 11 Propriedades de pasta dos amidos nativo e modificados de pinhão por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).

Klein et al., (2013) e Pinto et al., (2012) verificaram um aumento na tendência a retrogradação dos amidos submetidos ao TTBU e concluíram que este fenômeno pode estar associado com a diminuição da solubilidade observado no amido de pinhão após o TTBU. Segundo Lan et al., (2008) a tendência a retrogradação é

influenciada pela lixiviação da amilose e pela presença de grânulos inchados e não fragmentados na suspensão de amido.

No tratamento por ANN, os resultados também indicam elevada estabilidade do amido de pinhão, devido ao decréscimo da quebra (Tabela 4).

Segundo Vamadevan et al., (2013) o tratamento hidrotérmico de annealing promove uma organização nas cadeias adjacentes da amilopectina (cadeias curtas e cadeias longas), permitindo uma correção nos defeitos físicos das duplas hélices e o alinhamento destas duplas hélices. Este comportamento depois do ANN, torna as moléculas mais estáveis e pode ser o responsável pelas alterações nas propriedades de pasta.

O tratamento com SNT, promoveu um efeito contrário ao TTBU e ANN, aumentando o pico de viscosidade, viscosidade mínima e quebra diminuindo a viscosidade final e a tendência a retrogradação comparados ao amido nativo. Não ocorreu alteração na temperatura de pasta (Tabela 4).

O uso do ultrassom como método complementar na extração de amidos, bem como o seu efeito nas propriedades de pasta também foram demonstrados por Zhang et al., (2005) e Zuo et al., (2009). Ambos os autores concluíram que a funcionalidade dos amidos é influenciada pela intensidade do ultrassom e da temperatura das suspensões durante o tratamento.

Zhang et al., (2005) na aplicação de ultrassom durante a extração de amido de milho verificou aumento do pico de viscosidade e viscosidade final. As alterações nas propriedades de pasta foram dependentes das condições empregadas. Estas alterações foram explicadas pela solubilização dos grânulos de amido inchados e formação de agregados induzidos pelo ultrassom, além de conduzir modificações na configuração da estrutura granular, que poderia ser uma erosão difusa ou a presença de sulcos nos grânulos de amido após o emprego do ultrassom.

Zuo et al., (2009) estudaram os efeitos do ultrassom sob diferentes intensidades (0,11 e 0,18 W) e temperaturas de 25 e 70 °C. Os autores verificaram que o pico de viscosidade e a viscosidade final das dispersões de amido modificadas a 70 °C foram menores que as amostras não tratadas.

Os resultados obtidos neste trabalhos demonstram que as alterações de pastas promovidas pelo SNT não foram intensas, com exceção do pico de viscosidade, que teve uma elevação. Estes resultados devem-se a reduzida temperatura de sonicação, entre 10- 20°C e a aplicação de uma frequência baixa

(MASON; LORIMER, 2002; ZUO et al., 2009), promovendo um pequeno afrouxamento da estrutura granular, contribuindo assim, para o aumento da absorção de água pelos grânulos, conseqüentemente, aumentando o pico de viscosidade.

Kim et al., (2013), relataram que o uso uma amplitude maior aumenta a intensidade do colapso das bolhas e conseqüentemente a degradação dos clúters das nanopartículas formados foi mais eficiente.

As propriedades de pastas dos amidos submetidos a hidrólise enzimática com α -amilase (Figura 11 e Tabela 4) demonstram que ocorreu reduções em todos os parâmetros avaliados com exceção da temperatura de pasta. Verifica-se que a hidrólise de apenas 7% reduziu 47% o pico de viscosidade em relação ao amido nativo.

Lee; Lee; Lee, (2010) modificaram amido de arroz com a enzima pululanase em diferentes concentrações (81, 810, 1,620, 3,240 NUPN/g de amido seco) e avaliaram as propriedades físico-químicas dos amidos modificados em função do grau de hidrólise (0,9-10,2%). Os autores sugerem que as alterações na estrutura molecular dos grânulos de amido durante a modificação enzimática afetaram as propriedades de pasta dos amidos de arroz.

Uthumporn; Zaidul; Karim, (2010) avaliaram a hidrólise enzimática em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização em amido de milho, mandioca, sago e feijão Mung. Os autores verificaram uma redução no pico de viscosidade nos amidos de milho e de mandioca. Eles atribuíram este comportamento pela desintegração de alguns grânulos de amido mais frágeis, diminuindo assim a capacidade dos grânulos de formar gel com a água. Os resultados verificados neste estudo estão de acordo com o verificado pelo autores citados anteriormente, sendo que a hidrólise de 7% que as cadeias de amilose sofreram (Tabela 3) foram suficientes para alterar as propriedades de pasta do amido de pinhão.

4.1.3 Cristalinidade

A cristalinidade relativa (CR) dos amidos de pinhão nativo e modificados foi determinada pela difração de raio-X das amostras. O amido de pinhão modificado pelo ENZ apresentou a maior cristalinidade relativa seguido pelo amido nativo e os modificados ANN> TTBU>SNT (Tabela 5).

A diminuição da CR sob TTBU, em geral, é atribuída pelo rompimento dos cristalitos da amilopectina, o qual é evidenciada também, pelo decréscimo da entalpia de gelatinização (CHUNG; HOOVER; LIU, 2009). Em amidos com cristalinidade tipo-B, as duplas hélices, quando submetidos ao TTBU, apresentam movimento lateral e adjacente, na lamela com alta densidade cristalina e também ao longo do eixo axial. Este movimento das duplas hélices tem sido demonstrado como a causa do rompimento dos cristalitos em amidos que apresentam cristais tipo-B (HOOVER, 2010; VERMEYLEN; GODERIS; DELCOUR, 2006).

Neste estudo foi verificada uma distribuição constante das cadeias de amilopectina (Figura 8 e Figura 10), sugerindo que não houve rompimento da estrutura molecular, mas sim uma organização da região cristalina (alinhamento e espessura da lamela cristalina) e como reflexo disso, diminuição da CR (Tabela 5).

Tabela 5 Cristalinidade relativa (CR) dos amidos de pinhão nativo e modificados

Tratamentos	CR (%)
Nativo	22,09
TTBU	19,50
ANN	21,89
SNT	18,87
ENZ	22,95

O ANN não promoveu alterações na CR dos amidos de pinhão, quando comparada a CR do amido nativo (Tabela 5). A manutenção ou pequeno aumento na cristalinidade é um comportamento que foi verificado na maioria das pesquisas que envolvem ANN. Conforme a teoria proposta por Vamadevan et al., (2013) o ANN promove uma correção nos defeitos das duplas hélices das cadeias de amilopectina, favorecendo a manutenção ou aumento da estrutura cristalina. Adebowale et al., (2009) também sugerem que a região cristalina tende a aumentar com a reorganização dos grânulos de amido.

O SNT promoveu uma diminuição da CR em relação ao amido nativo de pinhão (Tabela 5). Este comportamento pode estar relacionado com ação não seletiva do ultrassom, sendo que, a erosão causada pelo processo de cavitação

promove alterações tanto na região cristalina quanto na região amorfa dos grânulo de amido (KIM et al., 2013).

A hidrólise enzimática aumentou a CR do amido de pinhão, resultado da ação da enzima que ocorre em duas etapas. Na fase rápida a hidrólise ocorre preferencialmente na região amorfa (0 a 9h de reação) dos grânulos de amido, favorecendo a cristalinidade do amido. Por outro lado, na fase mais lenta, a enzima promove erosões na região cristalina, causando alterações nas propriedades térmicas dos cristais, pela facilidade de acesso pela água através dos poros formados nos grânulos (KIM; PARK; LIM, 2008). O'Brien; Wang, (2008) propuseram que o elevado conteúdo de amylose provavelmente dificulta a ação enzimática, pela interação amilose-amilose e amilose-amilopectina.

Zhang; Ao; Hamaker, (2006) analisaram o resíduo da hidrólise de amidos de cereais, depois de diferentes tempos de hidrólise. Os autores propuseram um mecanismo de hidrólise "lado-a-lado" nas camadas concêntricas da organização semicristalina dos grânulos, produzindo um alargamento de canais (anéis de crescimento semicristalinos), a fragmentação dos grânulos, e resíduos piramidais.

Em um estudo subsequente, Zhang; Venkatachalam; Hamaker, (2006) reportaram que a digestibilidade lenta dos amidos de cereal é determinada pela estrutura supramolecular da estrutura cristalina tipo-A, incluindo a distribuição e a perfeição nas regiões cristalinas.

Além disso, Vermeylen et al., (2004) mostraram que existe uma diferença menor entre a densidade na lamela amorfa e cristalina dos amidos tipo-A, quando comparado aos amidos tipo-B. Ainda, a lamela amorfa dos amidos tipo-A apresentam um grande número de ramificações (α , (1,6)) (GÉRARD et al., 2000). A presença das ramificações da amilopectina na região amorfa, pode explicar o aumento na cristalinidade do amido de pinhão após a hidrólise enzimática (Tabela 5).

Este comportamento também pode ser confirmado pelo deslocamento da curva de distribuição GPC em gel 2B CL para a direita (Figura 10) e pela diminuição das cadeias de amilose (F1) após a hidrólise enzimática (Tabela 3), levando a conclusão de que o ataque enzimático ocorreu principalmente na região amorfa e com pouca intensidade nas cadeias laterais da amilopectina.

Na Figura 12 estão representadas os difratogramas de raio-X dos amidos de pinhão. Verifica-se que a presença de fortes picos no ângulo de difração 2θ em 15° ,

17°, e 23° e um leve pico em 5,7° no amido de pinhão nativo. Segundo Cai et al., (2014) e Cheetham e Tao, (1998) o amido tipo-A é caracterizado pela presença de picos no ângulo de difração 2θ e, 15°, 17°, 18° e 23° enquanto que o amido tipo-B se caracteriza pela presença de picos em 5,6°, 15°, 20°, 22° e 24°. O amido tipo-C é caracterizado pela mistura dos tipos A e B, com picos nas mesmas regiões que foi verificado para o amido de pinhão em 5,7°, 15°, 17°, e 23°.

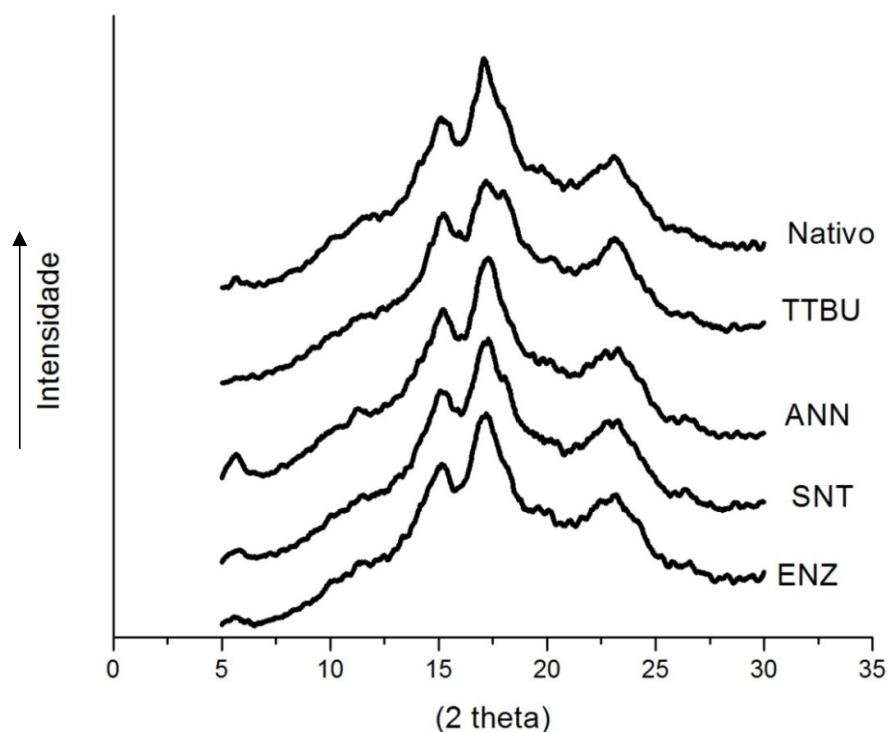


Figura 12 Difrátogramas de raio-X dos amidos de pinhão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ)

Após a modificação com TTBU foi possível verificar o desaparecimento do pico no ângulo de difração 2θ em 5,7° e a intensificação de um pico em 18°, alterando assim a cristalinidade do amido de tipo-C para tipo-A. Esta mudança no padrão de difração foi verificado em alguns amidos quando submetido ao TTBU (KLEIN et al., 2013; VERMEYLEN; GODERIS; DELCOUR, 2006).

Devido ao movimento lateral e adjacente na lamela cristalina quando os amidos são submetidos aos TTBU, mencionado por Vermeylen; Goderis; Delcour,

(2006), acredita-se que este fenômeno promoveu a perda do pico inicial em $5,7^\circ$, alterando a cristalinidade do amido de pinhão.

Nos demais tratamentos ocorreu uma manutenção dos picos, sendo que o ANN favoreceu o pico em $5,7^\circ$ (Figura 12). Este comportamento indica uma estrutura cristalina mais organizada, após o tratamento, conforme a teoria proposta por Vamadevan et al., (2013).

Diante do exposto acima, é possível destacar que as modificações promovem diferentes mudanças estruturais na região cristalina do amido de pinhão. O ANN melhorou a lamela cristalina e o TTBU, o SNT e a ENZ perturbaram a organização lamelar.

4.1.4 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos nativo e modificados de pinhão estão apresentados na Figura 13 e nas Tabela 6 e 7. As amostras foram submetidas ao aquecimento sem presença de água, com o objetivo de verificar as temperaturas de fusão dos amidos e a entalpia envolvida no processo (Tabela 6) e na presença de água (3 vezes o peso da amostra) para verificar as temperaturas de gelatinização, bem como a entalpia envolvida no processo (Tabela 7).

A gelatinização do amido é geralmente considerada quando ocorre em excesso de água (mais que 100% de água em relação ao peso de amido em base seca), enquanto que a fusão corresponde ao desaparecimento da cristalinidade do amido em condições de hidratação restrita. A designação de fusão do amido inclui a perda da cristalinidade e estrutura granular (COLONNA; BULEON, 2010).

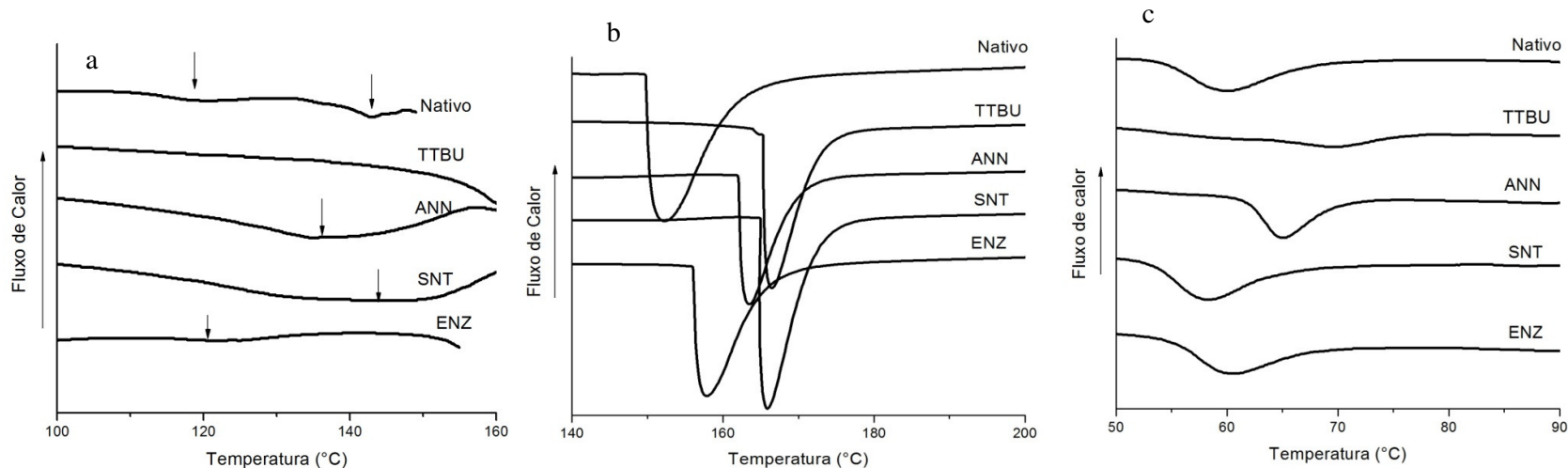


Figura 13 Curvas de DSC dos amidos de pinhão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), (a) com destaque entre as temperaturas 120-160 °C nas curvas de fusão, (b) entre as temperaturas de fusão 140-200 °C e (c) as curvas de gelatinização do amido entre 50-90 °C.

Tabela 6 Temperatura inicial (To), temperatura de pico (Tp), temperatura final (Tc), diferença de temperaturas (Tc-To) e entalpia (ΔH) de fusão dos amidos de pinhão nativo e modificados

Tratamentos	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔH (J/g)
<i>Nativo</i>				
1° pico	111,70	120,75	128,65	1,20
2° pico	139,78	143,02	148,10	1,14
3° pico	149,77	152,18	161,91	218,70
<i>TTBU</i>				
1° pico	-	-	-	-
2° pico	-	-	-	-
3° pico	165,26	166,40	172,88	160,63
<i>ANN</i>				
1° pico	-	-	-	-
2° pico	121,33	134,87	155,74	24,45
3° pico	161,98	163,53	169,63	165,28
<i>SNT</i>				
1° pico	-	-	-	-
2° pico	121,60	145,87	160,58	16,75
3° pico	164,20	165,90	172,42	156,64
<i>ENZ</i>				
1° pico	111,94	121,94	135,42	0,98
2° pico	-	-	-	-
3° pico	156,04	157,91	165,48	147,76

As mudanças endotérmicas e exotérmicas expressas pelas curvas de DSC indicam eventos ou reações tais como transição vítrea, fusão ou gelatinização que ocorrem durante a análise. As análises de DSC também podem prover informações sobre as interações do amido com outro componentes, o efeito da água e de outros plastificantes e as propriedades relacionadas com estes eventos (HABITANTE et al., 2008; SCHLEMMER; OLIVEIRA; SALES, 2007; WASSERMAN et al., 2007; ZHONG; SUN, 2005).

Na avaliação das propriedades térmicas com umidade restrita (aproximadamente 10%), o amido nativo de pinhão apresentou três picos endotérmicos quando submetido ao aquecimento pelo DSC, já os amidos modificados por ANN, SNT e ENZ apresentaram dois picos endotérmicos e o amido modificado com TTBU apresentou apenas um pico endotérmico (Figura 13a-b).

Pesquisas sobre o comportamento térmico do amido sob diferentes proporções de água (11-50%) verificaram diferentes picos endotérmicos. Estes foram atribuídos a fusão dos cristais de amilopectina (150-200°C em amido com 11% de umidade), o pico entre 90-120°C foi considerado resultado da transição de fase do complexo amilose-lipídio (LIU et al., 2006; SHOGREN, 1992). O pico entre 100-140°C, denominado endoterma Z foi atribuído ao anelamento dos cristais de amilopectina durante a análise (LIU et al., 2006; SHOGREN, 1992).

Com base na posição dos picos, pode-se inferir que o primeiro pico em 120,75°C no amido nativo de pinhão se refere ao complexo amilose-lipídio (ΔH 1,20 J/g) e o segundo pico em 143,02 °C pode ser atribuído ao anelamento dos cristais de amilopectina durante a análise (ΔH 1,14 J/g) (Figura 13a), sendo estes pouco significativos. O terceiro pico que aparece em 152,18 °C pode ser atribuído a completa fusão dos cristais de amilopectina e requer uma elevada energia (ΔH 218,70 J/g) (Figura 13b).

Analisando a amostra modificada por TTBU, pode-se verificar somente o pico da fusão da amilopectina foi detectado (Figura 13b), apresentando uma entalpia de fusão dos cristais menor que o amido nativo. Pinto et al., (2014) verificaram que o TTBU promoveu a abertura parcial das duplas hélices das cadeias laterais de amilopectina e as α -hélices das cadeias de amilose. Este comportamento pode promover uma menor interação com os lipídeos presentes na amostra de amido de pinhão, promovendo o desaparecimento do pico endotérmico (Tabela 6).

Este resultado confirma o efeito do TTBU na região cristalina do amido de pinhão verificado pela cristalinidade relativa (Tabela 5) e pela conformação do padrão de raio-X (Figura 12).

Após a modificação do amido de pinhão com ANN observou-se apenas dois picos, sendo que o pico referente ao anelamento dos cristais de amilopectina apresentou entalpia maior que o referido pico no amido nativo (Tabela 6). Este comportamento pode ser decorrente da organização molecular que ocorre durante a modificação, aumentando assim a entalpia requerida durante a análise de DSC. Este

comportamento foi verificado anteriormente por Liu et al., (2006) constatou que a temperatura do pico diminuiu e a entalpia do processo aumentou, pelo aumento na organização da região cristalina após o ANN (169,63°C).

A amostra submetido ao tratamento com SNT apresentou dois picos endotérmicos. O primeiro pico, referente ao anelamento dos cristais de amilopectina (ΔH 16,75 J/g) foi mais intenso que o respectivo pico presente no amido nativo e menos intenso quando comparado ao ANN. O segundo pico, referente a fusão dos cristais da amilopectina, apresentou temperaturas de fusão semelhante ao TTBU e o ANN e a entalpia requerida no processo foi menor que o amido nativo, o TTBU e o ANN, sugerindo que com este tratamento os cristais apresentaram menor estabilidade térmica (Tabela 6).

Ao avaliar a amostra modificada por ENZ, pode-se verificar dois picos, sendo o primeiro referente a transição de fase do complexo amilose-lipídio, que se manteve após a modificação e o pico referente a fusão dos cristais de amilopectina. A endoterma referente a fusão dos cristais, foi o que apresentou menor efeito após a modificação (T_c , T_p e T_c), quando comparado aos demais amidos modificados e a entalpia foi a menor verificada dentre todas as amostras (Tabela 6). Não foi detectado o pico referente ao anelamento dos cristais de amilopectina nesta amostra.

Este comportamento da amostra modificada por ENZ pode estar relacionada com as mudanças estruturais causadas pela ação enzimática e a possível formação de poros nos grânulos, alterando a absorção de água e a energia necessárias para as mudanças de estado físicos que ocorrem durante a análise.

O aumento nas temperaturas de fusão T_o , T_p e T_c após o TTBU pode ser atribuído as mudanças estruturais com os grânulos de amidos após as modificações, que envolvem interações amilose-amilose e amilose-lipídios, diminuindo a mobilidade das cadeias na lamela amorfa (HOOVER, 2010). O efeito do TTBU e do ANN nos grânulos de amido é verificado pelo aumento das temperaturas de gelatinização e diminuição da entalpia (HOOVER, 2010).

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir que as temperaturas de fusão dos cristais de amilopectina seguem padrão semelhante ao da gelatinização do amido (Tabela 7), discutidas na sequência.

A análise térmica dos amidos em excesso de água (gelatinização) demonstrou um aumento nas T_o , T_p e T_c dos amidos modificados, exceto no

tratamento com SNT (Tabela 7). Além disso, é possível verificar na Figura 13c que o TTBU e o ANN promoveram um deslocamento do pico endotérmico para a direita, de forma mais acentuada, quando comparados com o amido nativo e as demais modificações (SNT e ENZ).

O aumento nas temperaturas de gelatinização T_o , T_p e T_c é atribuído as mudanças estruturais com os grânulos de amidos, que envolvem interações amilose-amilose, amilose-amilopectina, diminuindo a mobilidade das cadeias na lamela amorfa, fusão/gelatinização dos cristais, sendo mais intensos após o TTBU (HOOVER, 2010; PERERA; HOOVER; MARTIN, 1997).

Vamadevan; Bertoft; Seetharaman, (2013) e Vamadevan et al., (2013) avaliaram 16 amostras de amidos classificados em 4 grupos de amilopectina (grupo 1 cereais como cevada e aveia, grupo 2 arroz, arroz ceroso, sago, grupo 3 mandioca, raízes e feijão Mung e grupo 4 batata, batata ceroso, inhame e canna). Estes autores verificaram que os parâmetros de gelatinização dos amidos nativos foram influenciados pela organização interna e alinhamento das duplas hélices da amilopectina, sendo que a densidade dos cristais, a espessura da lamela e a energia livre na face cristalina (cristais com defeitos) são os principais fatores que influenciam as temperaturas envolvidas no processo e fusão e gelatinização dos grânulos de amido.

Varatharajan et al., (2010) atribuíram o aumento nas temperaturas T_o , T_p e T_c em amidos de batata como a fusão dos cristalitos tipo-B presentes nos grânulos nativos, formação de cristalitos tipo-A, sendo que a formação dos cristalitos ocorreu pela interação entre as cadeias amilose-amilose, amilose-amilopectina e amilopectina-amilopectina durante a modificação com TTBU. Já para o amido ceroso de batata o aumento das temperaturas foi atribuído pela fusão dos cristalitos tipo-B e alguns cristalitos tipo-A presentes no amido nativa, formação de cristalitos tipo-A durante o TTBU e os cristalitos resultantes da interação amilopectina-amilopectina.

O efeito do ANN sobre as propriedades térmicas, bem como a teoria do efeito do ANN na correção dos defeitos físicos na estrutura cristalina foi proposta por Vamadevan et al., (2013). Estes autores concluíram que as condições de equilíbrio durante o ANN podem facilitar a reorientação das duplas hélices não empacotadas na região cristalina, possibilitando a redução da heterogeneidade dos cristais depois da modificação. O elevado T_c-T_o é um indicativo de que o TTBU permitiu a formação de cristalitos com diferentes estabilidades térmicas (ADEBOWALE;

AFOLABI; OLU-OWOLABI, 2005; KLEIN et al., 2013). Pode-se observar que o ANN apresentou o menor Tc-To (Tabela 6), confirmando o efeito do ANN no amido de pinhão.

Tabela 7 Temperatura inicial (To), temperatura de pico (Tp), temperatura final (Tc), diferença de temperaturas (Tc-To) e entalpia (ΔH) de gelatinização dos amidos de pinhão nativo e modificados

Tratamentos	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc-To (°C)	ΔH (J/g)
Nativo	54,25	60,15	68,22	14,67	11,60
TTBU	64,89	69,69	76,07	11,18	2,84
ANN	61,87	64,99	69,71	7,84	7,20
SNT	53,17	58,36	65,18	12,01	11,73
ENZ	55,23	63,43	67,15	11,92	11,20

É possível verificar também, que o SNT diminuiu o Tp e o Tc do amido de pinhão. Este comportamento sugere um efeito leve do ultrassom, devido as condições brandas empregadas durante o processo, não promovendo alterações na entalpia necessária para a gelatinização do amido (Tabela 7).

Jambrak et al., (2010) modificaram amido de milho com ultrassom em diferentes tempos e potências. Os autores verificaram uma manutenção na To e Tp e uma redução no Tc, além da redução da entalpia em alguns dos tratamentos que envolveram o uso de banho de ultrassom e probe de ultrassom com o maior tempo (30 min) e maior potência (400 w). Os autores concluíram que a redução da entalpia indica a perda da organização das duplas hélices pelo efeito da cavitação do ultrassom.

O ENZ também não alterou a entalpia de gelatinização, e aumentou apenas o Tp, sugerindo que o grau de hidrólise de 7% não foi suficiente para promover alterações nas propriedades térmicas no amido de pinhão. Esta característica pode ser um fator importante na produção dos nanocristais, pois este pré-tratamento favorece a formação de partículas com menor tempo de hidrólise ácida (LECORRE et al., 2012b) e não causou perdas nas propriedades térmicas do amido (Tabela 7).

A variação nas entalpias de gelatinização pode ser explicada pelas forças de ligação entre as duplas hélices da amilopectina, que formam a região cristalina

(SANDHU; SINGH, 2007). Cada modificação promoveu certa reorganização estrutural alterando o alinhamento das ligações de hidrogênio nas moléculas de amido, sendo o TTBU e o ANN os mais intensos.

Os pré-tratamentos aplicados promoveram pequenas alterações na estrutura molecular (Figuras 8 e 10, Tabela 3) e com maior intensidade nas propriedades de pasta (Figura 11) e nas propriedades térmicas (Tabela 6) e manutenção ou pequena redução na cristalinidade relativa (Tabela 5). Estas características indicam que as modificações aplicadas podem ser benéficas na produção de nanocristais, visto que o amido não perdeu a cristalinidade e nem foi gelatinizado durante os tratamentos aplicados nos amidos de pinhão.

4.1.5 Conclusão

As modificações as quais o amido de pinhão foi submetido promoveram alterações nas propriedades de pasta, cristalinidade e nas propriedades térmicas, sendo que o TTBU foi o que apresentou o efeito mais intenso em todas as propriedades analisadas. Com estes resultados, é possível inferir que todas as modificações aplicadas no amido de pinhão apresentam potencial para exercer a função de pré-tratamento à hidrólise ácida, na produção de nanocristais, podendo-se obter melhorias no processo.

4.2 Estudo 2 - Pré-tratamentos nos amidos de feijão Carioca

4.2.1 Estrutura molecular

Os amidos de feijão nativo e modificados foram avaliados em coluna GPC (Sheparose 2B CL), sendo que a distribuição do peso molecular das frações expressos pelo conteúdo de carboidratos e o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\max}$) referente a ligação com iodo foram analisados e estão representadas na Figura 14 a-d.

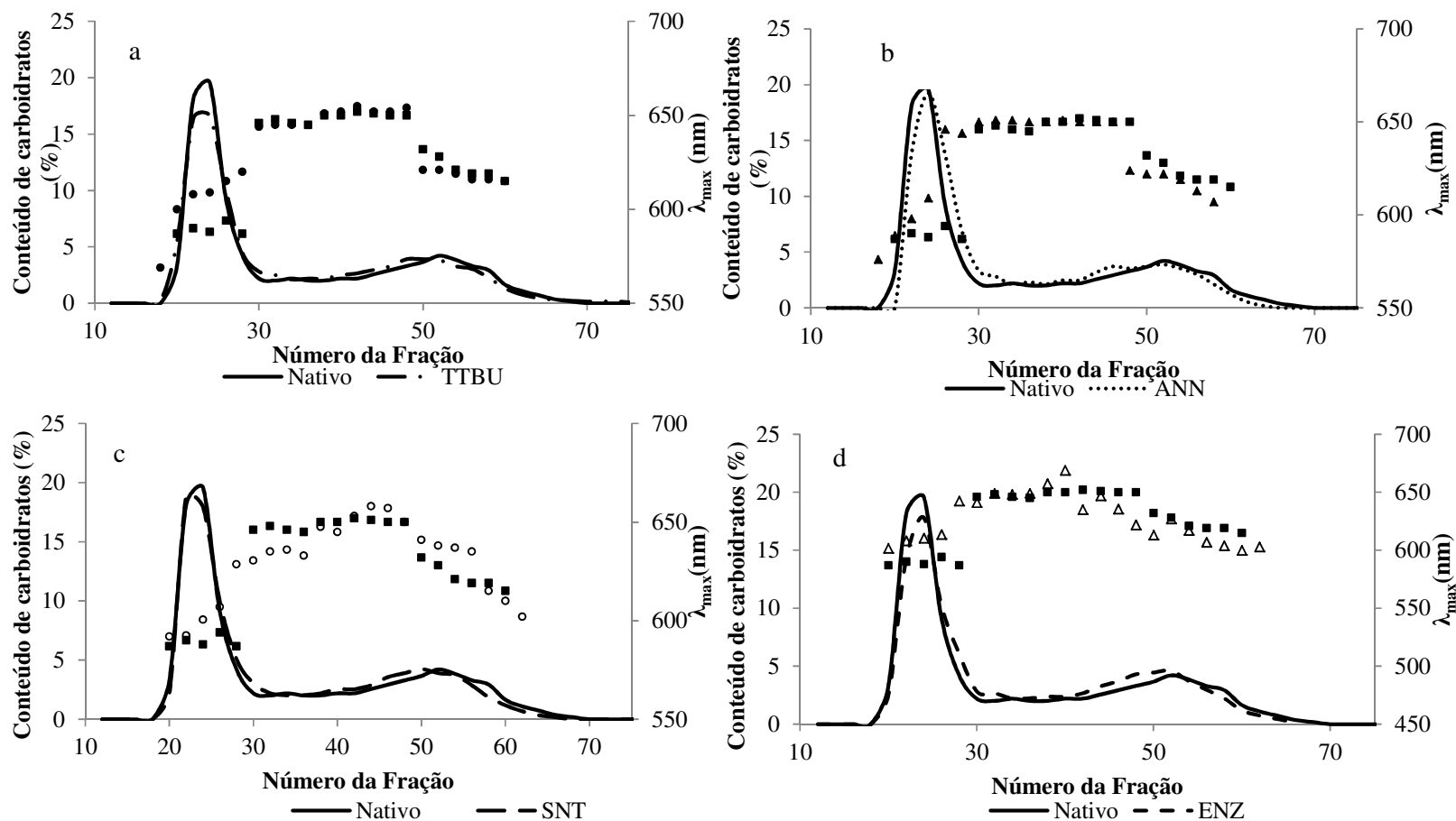


Figura 14 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel Sepharose CL 2B CL (GPC) dos amidos de feijão nativo e modificados por (a) tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), (b) annealing (ANN), (c) ultrassom (SNT) e (d) hidrólise enzimática (ENZ). No eixo principal o conteúdo total de carboidratos (linhas contínua, pontilhada e tracejada) e no eixo secundário o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\max}$) (■ nativo, ● TTBU, ▲ ANN, ○ SNT, Δ ENZ).

Pode-se verificar pequenas alterações na concentração de carboidratos, após a separação nas colunas em gel Sheparose 2B CL, no entanto, não foi possível verificar alterações no perfil de distribuição nas cadeias e nem no $\lambda_{\max}$, resultado das ligações com iodo do amido de feijão quando comparado ao amido nativo (Figura 14).

Para confirmar este comportamento as amostras foram desramificadas com as enzimas pululanase e isoamilase e eluídas em coluna GPC com gel de agarose 6B CL (Figura 15, Tabela 8).

A fração F1 representa cadeias com alto peso molecular, que após a desramificação representam as cadeias de amilose, seguidas da fração F2 que representa a porção de materiais intermediários e a fração F3 se refere as cadeias curtas provenientes das cadeias laterais das ramificações da molécula de amilopectina (VAMADEVAN et al., 2014).

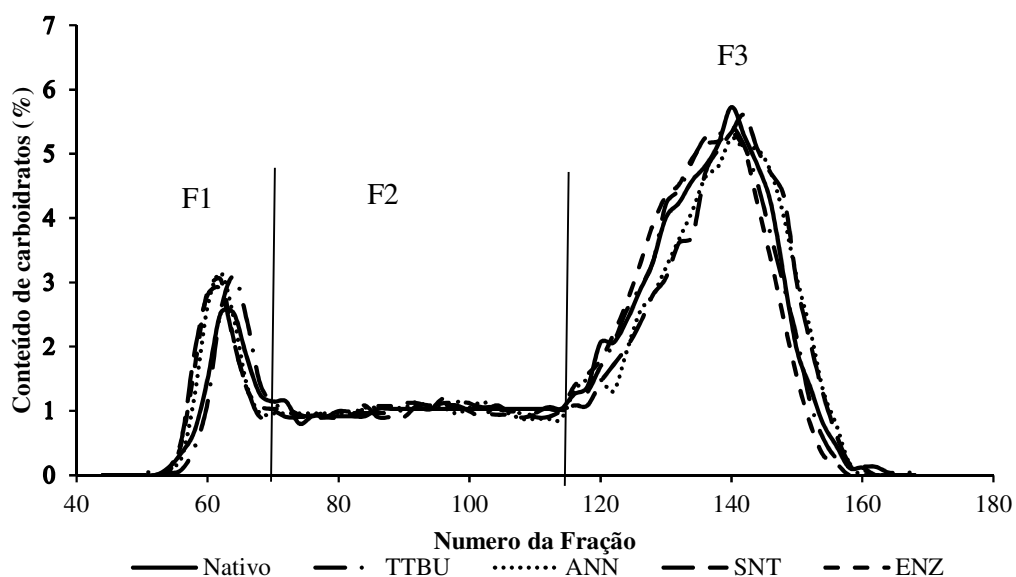


Figura 15 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL dos amidos de feijão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), desramificados com pullulanase e isoamilase. No eixo principal o conteúdo total de carboidratos. F1 - cadeias lineares longas de glicose, F2 – materiais intermediários e F3 – cadeias curtas de glicose.

Na Figura 15, pode-se verificar pequenas alterações na concentração de carboidratos após a separação nas colunas em gel Sheparose 6B, no entanto, não foi possível verificar alterações no perfil de distribuição nas cadeias. Pode-se observar um leve deslocamento da distribuição nas frações de F1 para F2, quando os amidos foram submetidos ao tratamento SNT e ENZ (Tabela 8). Este comportamento ocorreu devido ao cisalhamento causado pelas microbolhas geradas durante o processo de SNT (Suslick, 1990) e a hidrólise de algumas cadeias após o tratamento ENZ (KIM; PARK; LIM, 2008). A cavitação gerada pelo ultrassom promove a quebra de ligação C-C e a formação de cadeias mais lineares (Suslick, 1990).

Tabela 8 Frações moleculares (FM) do amido de feijão Carioca desramificado nativo e modificados

Tratamentos	Frações moleculares do amido desramificado		
	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Nativo	13	26	61
TTBU	13	26	61
ANN	13	26	61
SNT	12	27	61
ENZ	12	27	61

F1 - cadeias lineares longas de glicose, F2 – materiais intermediários e F3 – cadeias curtas de glicose.

Na Figura 16 está representada a hidrólise do amido de feijão Carioca com α -amilase por duas horas à 37 °C.

A hidrólise enzimática por α -amilase ocorre randomicamente nas ligações α ,(1-4) e preferencialmente na região amorfa (TESTER; QI; KARKALAS, 2006), sendo que após duas horas de tratamento, o amido apresentou um percentual de hidrólise de 3%. Este resultado mostra a reduzida ação enzimática no amido de feijão, confirmada pela pequena variação na fração F1 do amido desramificado (Tabela 8).

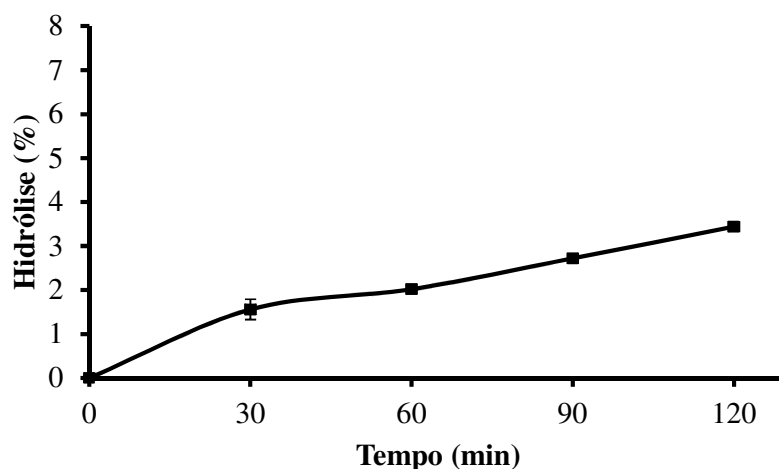


Figura 16 Perfil de hidrólise dos amidos de feijão Carioca com enzima α -amilase por 2h

Comparando os resultados da hidrólise do amido de feijão Carioca (Figura 16) e do amido de pinhão (Figura 9), observa-se que o amido de feijão é mais resistente a hidrólise por α -amilase, com apenas 3% de hidrólise, enquanto que, amido de pinhão apresentou 7%. Este comportamento pode ser atribuído a origem botânica, ao conteúdo de amilose, a cristalinidade relativa e a organização das cadeias laterais da amilopectina presentes nos amidos (BLAZEK; GILBERT, 2010; GALLANT et al., 1992; KIM; PARK; LIM, 2008; LECORRE et al., 2012; O'BRIEN; WANG, 2008; UTHUMPORN; ZAIDUL; KARIM, 2010; ZHU; WANG; WANG, 2013).

4.2.2 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta, tais como pico de viscosidade, viscosidade mínima, quebra, viscosidade final, tendência a retrogradação e temperatura de pasta dos amidos de feijão nativo e modificados estão representadas na Figura 17 e os valores obtidos para cada parâmetro estão apresentados na Tabela 9.

O TTBU promoveu um decréscimo em todos os parâmetros de viscosidade no amido de feijão Carioca, sendo o único tratamento que promoveu aumento na temperatura de pasta (Tabela 9 e Figura 17).

As mudanças nas propriedades de pasta que ocorrem com o TTBU são atribuídas a redução do poder de inchamento granular e a lixiviação da amilose, além do aumento das interações entre as cadeias de amido e o aumento da rigidez do grânulo (VASANTHAN; HOOVER, 1994). O TTBU em amidos de leguminosas, em geral, promove redução no lixiviamento da amilose, no inchamento dos grânulos e no pico de viscosidade e aumento nas temperaturas de gelatinização, susceptibilidade a ação da α -amilase e hidrólise ácida. Estas mudanças são atribuídas a interação de diversos fatores, tais como: (1) conteúdo de amilose, (2) interações entre as cadeias do amido, (3) organização das cadeias de amilose na região amorfa e (4) complexos entre amilose-lipídios (HOOVER et al., 2010).

O ANN promoveu redução no pico de viscosidade e quebra, não alterou a viscosidade mínima e aumentou a viscosidade final.

A redução da quebra é oriunda desta reorganização a nível granular após as modificações, fazendo com que o amido se torne mais resistente ao cisalhamento e ao aquecimento (ADEBOWALE et al., 2009)

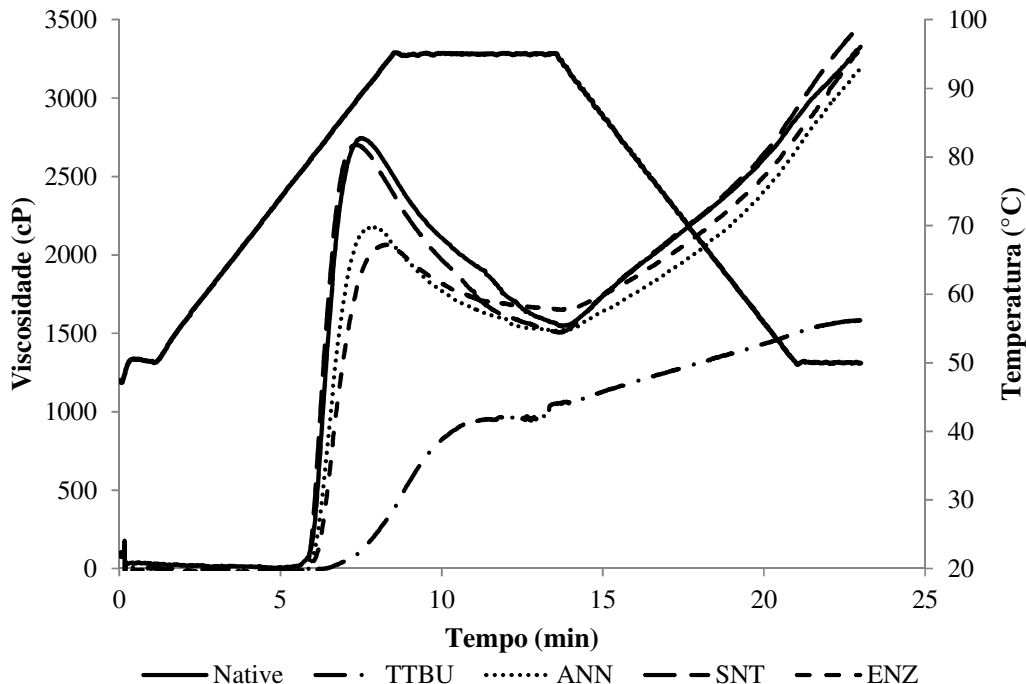


Figura 17 Propriedades de pasta dos amidos de feijão Carioca nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ)

O ANN promove uma reorganização nos grânulos de amido que segundo Vamadevan et al., (2013) consiste em uma organização nas cadeias adjacentes da amilopectina (cadeias curtas e cadeias longas), permitindo uma correção nos defeitos das duplas hélices e promove o alinhamento destas duplas hélices. Com isso, geralmente há um aumento na cristalinidade, fortalecendo assim os grânulos aumentando a temperatura necessária para formação de pasta (ADEBOWALE et al., 2009).

O amido modificado por SNT apresentou poucas alterações quando comparado ao amido nativo de feijão, aumentando apenas a viscosidade final (7%) e a retrogradação (15%) (Tabela 9 e Figura 17).

Tabela 9 Propriedades de pasta dos amidos de feijão nativo e modificados

Tratamentos	Nativo	TTBU	ANN	SNT	ENZ
PV (cP)	2703,0±43	971,7±21	2280,5±67	2681,5±15	2081,5±25
VM (cP)	1524,5±21	941,0±11	1564,5±11	1488,0±18	1658,5±9
QB (cP)	1178,5±22	30,7±12	662,0±3	1193,5±7	423,0±6
VF (cP)	3247,0±80	1583,7±14	3361,5±44	3509,5±36	3398,5±88
RT (cP)	1722,5±59	642,7±7	1797,0±33	2021,5±54	1740,0±79
TP (°C)	78,7±0,1	88,4± 0,02	79,0± 0,2	78,3±0,02	79,8±0,1

PV- pico de viscosidade; VM- viscosidade mínima; QB- Quebra; VF- viscosidade final; RT- Tendência a retrogradação; TP- Temperatura de pasta.

Jambrak et al., (2010) estudaram o efeito do ultrassom nas propriedades físicas de amido de milho com diferentes intensidades (2, 34, 55, 73 Wcm⁻²) e tempos (15 e 30 min). Os autores verificaram um aumento na temperatura das suspensões depois do SNT, sendo que, os tratamentos com intensidade de 73 Wcm⁻² nos dois tempos estudados, a temperatura final da suspensão ultrapassou 50°C. Estes autores também verificaram aumento na viscosidade, analisada com reômetro, nos tratamentos com intensidade de 73 Wcm⁻². Por outro lado, os demais tratamentos não apresentaram diferenças do amido nativo. Como conclusão, os autores descrevem que o aumento na viscosidade é devido ao efeito de cavitação

causado pelo ultrassom e que a reatividade da água aumentou durante o processo envolvendo assim, pressões elevadas que facilitaram a difusão da água para dentro dos grânulos de amido, especialmente nas regiões amorfas.

Hu et al., (2013) estudaram o efeito de duas frequências de ultrassom de alta potência (25 kHz + 40 kHz) e hidrólise com α -amilase nas propriedades e estrutura de amidos de feijão Mung. Após a hidrólise com α -amilase por 90 min a 60 °C, os autores verificaram uma redução de aproximadamente 70% na viscosidade do amido de feijão Mung. Com a aplicação do ultrassom durante o processo de hidrólise a viscosidade diminuiu 77% no tratamento com 25 kHz e 81% no tratamento com 40 kHz e 87% com dupla frequência de ultrassom. Os autores concluíram que a aplicação de dupla frequência de ultrassom promoveu maiores danos a região cristalina dos grânulos, diminuindo assim, a viscosidade.

O efeito brando do ultrasom pode ser atribuído ao emprego de banho de gelo durante a modificação. Este recurso foi utilizado para evitar aumento da temperatura da suspensão de amido e consequentemente degradação térmica ou gelatinização das amostras. Além disso, o emprego de 50% da amplitude, favoreceu a preservação da viscosidade do amido de feijão. Como consequência a modificação não foi tão agressiva quando comparada aos resultados verificados na literatura.

A modificação por ENZ promoveu um comportamento de pasta semelhante ao ANN, diminuindo o pico de viscosidade e a quebra e aumentando a viscosidade final (Figura 11 e Tabela 9). Verifica-se que a hidrólise de apenas 3% reduziu 47% o pico de viscosidade em relação ao amido nativo.

Os relatos relacionados com a hidrólise enzimática de amidos descrevem que esta ocorre em duas etapas, rápida e lenta. Na etapa com maior velocidade, as enzimas atacam a região amorfa dos grânulos, enquanto que na etapa lenta, após longos períodos de reação, a lamela cristalina é degradada (KIM; PARK; LIM, 2008). As alterações na estrutura molecular dos grânulos de amido durante a modificação enzimática afetam as propriedades de pasta de acordo com a intensidade do tratamento (LEE; LEE; LEE, 2010).

A redução do pico de viscosidade após o ENZ, pode ser efeito da desintegração de alguns grânulos de amido mais frágeis, diminuindo assim a capacidade dos grânulos de formar gel com a água (UTHUMPORN; ZAIDUL; KARIM, 2010).

4.2.3 Cristalinidade

A cristalinidade relativa (CR) foi determinada pela difração de raio-X dos amidos de feijão e está apresentada na Tabela 10. O amido de feijão apresentou cristalinidade relativa seguindo a ordem: ENZ>Nativo>ANN>SNT>TTBU (Tabela 10).

A diminuição da CR sob TTBU, em geral, é atribuída pela desrupção dos cristalitos da amilopectina (CHUNG; HOOVER; LIU, 2009), movimento lateral e adjacente e também ao longo do eixo, na lamela cristalina, que causa a ruptura dos cristalitos em amidos que apresentam cristais tipo-B (HOOVER, 2010; VERMEYLEN; GODERIS; DELCOUR, 2006). Neste estudo foi verificada uma distribuição constante das cadeias de amilopectina (Figura 14 e Figura 15), após o TTBU, sugerindo que não houve rompimento da estrutura molecular, mas sim uma organização da região cristalina (alinhamento e espessura da lamela cristalina) e como reflexo disso, diminuição da CR (Figura 18).

O ANN não promoveu alterações na CR dos amidos de feijão, quando comparada a CR do amido nativo (Tabela 10). A manutenção ou pequeno aumento na cristalinidade é um comportamento que foi verificado na maioria das pesquisas que envolvem ANN. Conforme a teoria proposta por Vamadevan et al., (2013) o ANN promove uma correção nos defeitos das duplas hélices das cadeias de amilopectina, favorecendo a manutenção ou aumento da estrutura cristalina.

O SNT promoveu uma diminuição da CR em relação ao amido nativo de feijão (Tabela 10). Este comportamento pode estar relacionado com ação não seletiva do ultrassom, sendo que, a erosão causada pelo processo de cavitação promove alterações tanto na região cristalina quanto na região amorfa dos grânulo de amido (KIM et al., 2013).

O aumento na CR promovido pela ação da α -amilase (Tabela 10) é resultado da ação enzimática, que ocorre em duas etapas. Na fase rápida (0-9h), a hidrólise promove a remoção da região amorfa dos grânulos, favorecendo a cristalinidade do amido. Na sequência, a fase mais lenta (9-24h), a enzima promove erosões na região cristalina, causando alterações nas propriedades térmicas dos cristais, facilitando o acesso da água através dos poros dos grânulos (KIM; PARK; LIM, 2008).

Tabela 10 Cristalinidade relativa dos amidos de feijão nativo e modificados

Tratamentos	CR (%)
Nativo	25,17
TTBU	23,24
ANN	25,04
SNT	24,40
ENZ	26,18

O amido nativo de feijão apresentou padrão de difração tipo C (A + B) com picos intensos no ângulo de difração 2θ em 15.0° , 17.0° , 23° e um leve pico em 5.5° , (Figura 18). Segundo Cai et al., (2014) e Cheetham e Tao, (1998) o amido tipo-A é caracterizado pela presença de picos no ângulo de difração 2θ e, 15° , 23° , 17° e 18° e o amido tipo-B se caracteriza pela presença de picos em $5,6^\circ$, 15° , 20° , 22° e 24° . O amido tipo-C é caracterizado pela mistura dos tipos A e B e a presença de picos na mesma região, $5,5^\circ$, 15° , 17° , 23° .

Após as modificações com TTBU, SNT e ENZ foi possível verificar o desaparecimento do pico no ângulo de difração 2θ em $5,5^\circ$ e uma intensificação de um pico em 18° . É possível afirmar que houve uma alteração no padrão de difração do amido de tipo-C para tipo-A após estas modificações (Figura 18). Este comportamento já foi verificado em alguns amidos quando submetido ao TTBU (KLEIN et al., 2013; VERMEYLEN; GODERIS; DELCOUR, 2006) e ocorre devido ao movimento lateral e adjacente na lamela cristalina quando os amidos são submetidos aos TTBU.

Após o tratamento com ANN o pico em $5,5^\circ$ foi intensificado (Figura 18). A CR do amido de feijão após o ANN não sofreu alterações (Tabela 10), sendo possível verificar que a teoria proposta por Vamadevan et al., (2013) de que o ANN promove uma melhora na estrutura cristalina dos amidos, intensificando os picos e em alguns casos, aumento na CR pode ser aplicada para o amido de feijão.

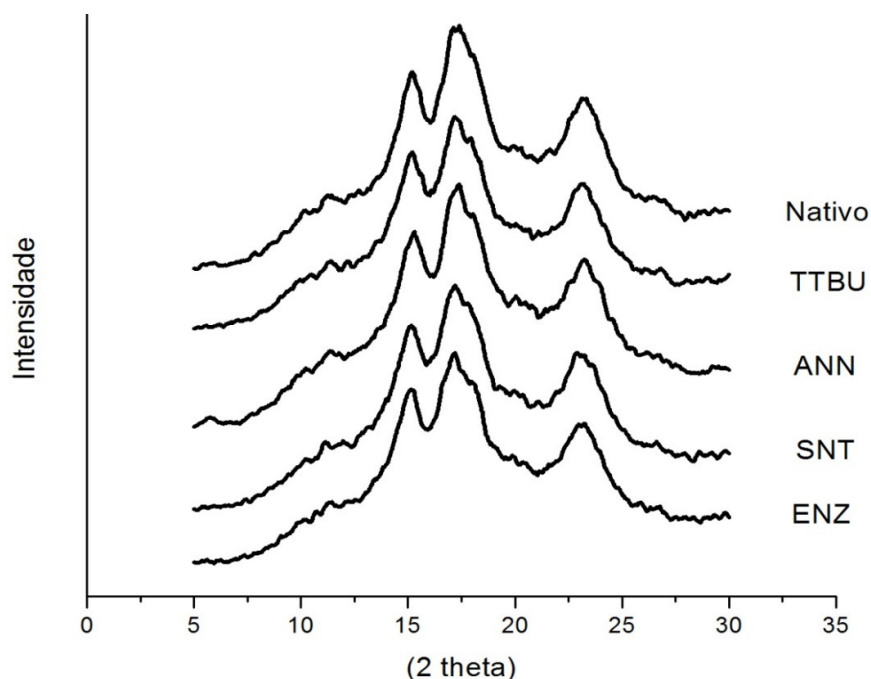


Figura 18 Difratogramas de raio-X dos amidos de feijão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).

Bel Haaj et al., (2013) verificou que o tratamento com ultrassom com elevada potência dissipada e longos períodos (75 min) resultou em uma destruição severa dos clusters de amilopectina na lamela cristalina, levando a formação de partículas em escala nanométrica com baixa cristalinidade ou amorfas.

Kim; Park; Lim, (2008) estudaram a fragmentação dos grânulos de amido de arroz ceroso por hidrólise enzimática e posterior tratamento com ultrassom. Os autores verificaram que a hidrólise enzimática com α -amilase por até 9h não alterou o padrão de difração de raio-X da amostras, mas hidrólises mais extensivas (24h) diminuíram consideravelmente a intensidade de difração, concluindo que a hidrólise inicialmente ocorre na região amorfa (até 9h) e posteriormente ocorre erosões na região cristalina com a continuidade da hidrólise. Os autores concluíram que apesar de não promover mudanças na difração de raio-X e a erosão que ocorre na região amorfa não afetar a estrutura cristalina, afetou a fusão dos cristais, possivelmente pela rapidez com que a água se infiltra na região cristalina, uma vez que a região amorfa foi danificada.

4.2.5 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos nativo e modificados de feijão Carioca estão apresentados nas Tabela 11 e Tabela 12. As amostras foram submetidas ao aquecimento sem presença de água, com o objetivo de verificar as temperaturas de fusão dos amidos e a entalpia envolvida no processo (Tabela 11) e na presença de água (3 vezes o peso da amostra) para verificar as temperaturas de gelatinização, bem como a entalpia envolvida no processo de gelatinização (Tabela 12) e as curvas endotérmicas resultantes estão apresentadas na Figura 19 a-c.

O amido nativo de feijão apresentou apenas dois picos endotérmicos quando submetido ao aquecimento pelo DSC, com umidade reduzida (<10%). Estes picos são referentes ao anelamento dos cristais de amilopectina durante a análise (100-160°C) e a fusão dos cristais de amilopectina (140-200°C), (Tabela 11), respectivamente (LIU et al., 2006; SHOGREN, 1992).

Os amidos modificados por ANN, SNT e ENZ apresentaram o primeiro pico endotérmico entre 149,75 e 154,89 °C e o segundo entre 158,81 e 165,40 °C. Ao passo que, o amido modificado com TTBU apresentou o pico endotérmico Z a uma temperatura inferior, sendo o T_o a 119,98 °C, sugerindo que além do efeito de anelamento o TTBU favoreceu interações com os lipídios residuais da amostra (Figura 19a).

O segundo pico endotérmico, resultado da fusão dos cristais da amilopectina, foi deslocado para a direita após as modificações no amido de feijão. O SNT foi o tratamento que promoveu a menor alteração, mantendo também a entalpia do processo. Nos demais tratamentos, as temperaturas aumentaram e a entalpia diminuiu, com exceção do ANN, onde a entalpia não apresentou alterações, em relação ao amido nativo (Tabela 11).

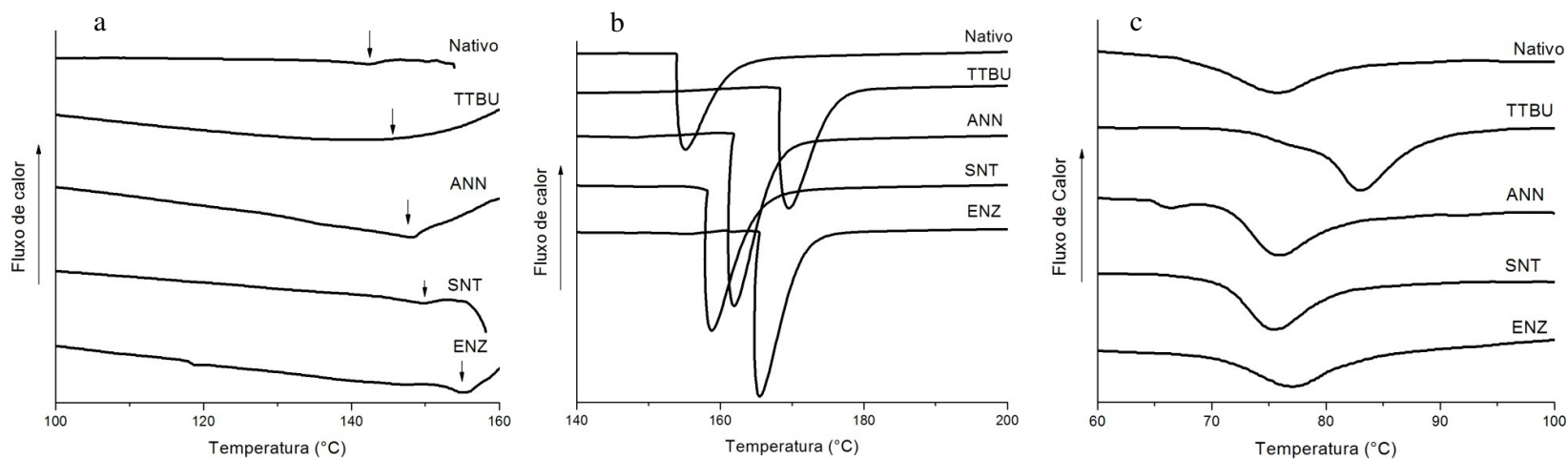


Figura 19 Curvas de DSC dos amidos de feijão Carioca nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), (a) com destaque entre as temperaturas 100-160 °C nas curvas de fusão, (b) entre as temperaturas de fusão 140-200 °C e (c) as curvas de gelatinização do amido entre 50-100 °C.

O aumento nas temperaturas de fusão T_o , T_p e T_c após o TTBU pode ser atribuído as mudanças estruturais com os grânulos de amidos após as modificações, que envolvem interações amilose-amilose e amilose-lipídios, diminuindo a mobilidade das cadeias na lamela amorfa (HOOVER, 2010).

A manutenção da entalpia após a modificação com ANN, pode ser resultado da correção dos defeitos físicos da amilopectina que o ANN promove (VAMADEVAN et al., 2013), fortalecendo a organização molecular, aumentando assim as temperaturas de fusão e mantendo a entalpia (Tabela 11).

O efeito brando do SNT no amido de feijão, aumentou as temperaturas de fusão e diminuiu menos de 3% a entalpia. Este comportamento sugere que o tratamento de ultrassom, nas condições empregadas, não comprometeu as propriedades térmicas do amido de feijão. Por outro lado, o tratamento ENZ promoveu uma redução de 11% na entalpia do amido de feijão (Tabela 11 e Figura 19b).

Esta redução na entalpia sugere que o uso de um tratamento com 3% de hidrólise enzimática no amido de feijão promoveu mais danos a região cristalina, quando comparado ao tratamento nas mesmas condições, ao amido de pinhão, que apresentou 7% de hidrólise enzimática (Figura 9) e manutenção na entalpia de fusão dos cristais de amilopectina (Tabela 6).

O efeito das modificações nos grânulos de amido de feijão foi verificado também pelo aumento das temperaturas de gelatinização e diminuição da entalpia (Tabela 12 e Figura 19c). As modificações com TTBU, ANN e ENZ no amido de feijão promoveram um aumento na temperatura de início da gelatinização. Apenas as modificações com TTBU e ENZ promoveram aumento nas T_p e T_c . Por outro lado, o amido modificado com ANN não apresentou alterações nas T_p e T_c e redução da entalpia de gelatinização. O tratamento com SNT não promoveu alterações em nenhuma propriedade térmica, e o ENZ não promoveu alterações na entalpia, quando comparados ao amido nativo (Tabela 12).

O aumento nas temperaturas T_o , T_p e T_c após o TTBU é atribuído as mudanças estruturais com os grânulos de amidos, que envolvem interações amilose-amilose e amilose-lipídios, diminuindo a mobilidade das cadeias na lamela amorfa (HOOVER, 2010).

Tabela 11 Temperatura inicial (To), temperatura de pico (Tp), temperatura final (Tc), diferença de temperaturas (Tc-To) e entalpia (ΔH) de fusão dos amidos de feijão nativo e modificados

Tratamentos	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔH (J/g)
<i>Nativo</i>				
1° pico	143,90	142,38	143,72	0,88
2° pico	153,89	155,08	161,08	177,97
<i>TTBU</i>				
1° pico	119,98	140,98	164,08	50,53
2° pico	167,87	169,50	175,51	144,79
<i>ANN</i>				
1° pico	133,41	148,20	155,69	25,54
2° pico	161,54	161,82	167,96	177,93
<i>SNT</i>				
1° pico	144,13	149,75	152,61	0,86
2° pico	156,39	158,81	165,17	176,05
<i>ENZ</i>				
1° pico	152,13	154,89	160,68	2,95
2° pico	164,46	165,40	171,39	158,71

Varatharajan et al., (2010) atribuíram o aumento nas temperaturas To, Tp e Tc em amidos de batata como a fusão dos cristalitos tipo-B presentes nos grânulos nativos, formação de cristalitos tipo-A com o TTBU e a formação dos cristalitos ocorreu pela interação entre as cadeias amilose-amilose, amilose-amilopectina e amilopectina-amilopectina durante a modificação. No amido ceroso de batata, o aumento das temperaturas foi atribuído pela fusão dos cristalitos tipo-B e alguns cristalitos tipo-A presentes no amido nativo, formação de cristalitos tipo-A durante o TTBU e cristalitos resultantes da interação amilopectina-amilopectina.

As alterações que ocorrem durante a modificação com ANN foram estudadas em inúmeras pesquisas. A maioria dos autores propõem uma reorganização na estrutura cristalina, formação de complexos entre amilose e lipídios e amilose-amilopectina, em geral aumentando a To mais que a Tc. Vamadevan et al., (2013) recentemente desenvolveram uma teoria de que o ANN promove uma correção dos

defeitos físicos existentes na lamela cristalina, fazendo com que as cadeias laterais da amilopectina que não estão em formato de dupla hélice se enovalem, aumentando o empacotamento e a espessura da lamela.

Com isso, dependendo da origem botânica do amido (os autores sugerem 4 grupos - grupo 1 cereais como aveia, cevada e cevada cerosa; grupo 2 arroz com média amilose, arroz ceroso, milho ceroso; grupo 3 amido de mandioca, feijão Mung; grupo 4 amidos tipo B batata, batata cerosa, canna, e inhame), os fenômenos podem ocorrer com maior ou menor intensidade. O aumento da entalpia de gelatinização depois do ANN pode ser explicada pelo aumento do número de duplas hélices, aumento de ligações de hidrogênio intra e intermolecular mais estáveis, além do alongamento das duplas hélices através das ligações interhelicoidais.

Tabela 12 Temperatura inicial (To), temperatura de pico (Tp), temperatura final (Tc), diferença de temperaturas (Tc-To) e entalpia (ΔH) de gelatinização dos amidos de feijão nativo e modificados

Tratamentos	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc-To (°C)	ΔH (J/g)
Nativo	68,85	75,67	81,28	12,43	8,37
TTBU	80,18	83,00	87,71	7,53	5,78
ANN	71,45	75,65	80,61	9,16	8,13
SNT	68,95	75,23	81,12	12,17	8,25
ENZ	71,22	77,06	82,12	10,90	7,38

Jambrak et al., (2010) avaliaram o efeito da modificação com ultrassom em amido de milho sob diferentes intensidades (2, 34, 55 e 73 W cm⁻²) e tempos (15 e 30 min). Estes autores verificaram que os tratamentos com ultrassom não alteraram as temperaturas de gelatinização do amido de milho. Os tratamentos promoveram a redução da entalpia de gelatinização, sendo que o tratamento mais intenso (73 W cm⁻² por 30 min) reduziu cerca de 42% a entalpia de gelatinização. Esta redução verificada pelos autores indicou que uma menor quantidade de energia foi necessária para promover a gelatinização, quando comparado com o amido nativo ou com as demais amostras modificadas. Eles verificaram também uma variação da entalpia entre os amidos modificados e atribuíram a quebra da organização das duplas hélices como as responsáveis pela transição da entalpia.

Kim; Park; Lim, (2008) verificaram um leve aumento na entalpia após 3h de hidrólise com α -amilase, e posterior redução com o decorrer de 24h de hidrólise. Os autores atribuíram este pequeno aumento sendo um indicativo de que o tratamento com 3h promoveu um pequeno aumento na região cristalina, pela formação de erosões na região amorfa. Após 9h os autores observaram uma redução na entalpia de gelatinização, concluindo que este comportamento poderia ser resultado do ataque enzimático nas regiões cristalinas. A redução da entalpia de gelatinização confirma a hipótese de que a hidrólise enzimática, promoveu danos a região cristalina do amido de feijão.

Os pré-tratamentos aplicados promoveram pequenas alterações na estrutura molecular (Figuras 14 e 15, Tabela 8) e com maior intensidade nas propriedades de pasta (Figura 17) e nas propriedades térmicas (Tabela 12) e manutenção ou pequena redução na cristalinidade relativa (Tabela 10). Estas características indicam que as modificações aplicadas podem ser benéficas na produção de nanocristais, visto que o amido não perdeu a cristalinidade e nem foi gelatinizado durante os tratamentos aplicados no amido de feijão.

4.2.6 Conclusão

As modificações as quais o amido de feijão Carioca foi submetido promoveram alterações nas propriedades de pasta, cristalinidade e nas propriedades térmicas, sendo que o TTBU foi o que apresentou o efeito mais intenso em todas as propriedades analisadas. Com estes resultados, é possível inferir que todas as modificações aplicadas no amido de feijão Carioca apresentam potencial para exercer a função de pré-tratamento à hidrólise ácida, na produção de nanocristais, podendo-se obter melhorias no processo.

4.3 Estudo 3 - Produção dos nanocristais de amido de pinhão

Os resultados do Estudo 3 são referentes a produção de nanocristais de amido utilizando as modificações empregadas no Estudo 1 como pré tratamento.

Um pré-tratamento considerado ideal para a produção de nanocristais de amido, deve promover rupturas e orifícios nos grânulos e permitir uma melhor

difusão do ácido através dos grânulos de amido (LECORRE et al., 2012b), sem comprometer a estrutura cristalina.

4.3.1 Cinética e rendimento da hidrólise

As amostras de amido de pinhão nativo e pré-tratadas com TTBU, ANN, SNT e ENZ foram submetidas a hidrólise ácida com H_2SO_4 3M a 40°C por 7 dias. O comportamento desta hidrólise foi monitorado a cada 24 horas e está representado na Figura 20. É possível observar que todas as amostras de amido de pinhão apresentaram o mesmo perfil de hidrólise, com dois estágios. Uma hidrólise relativamente rápida até o terceiro dia, seguida de uma fase com menor velocidade até o final da hidrólise (Figura 20).

Este comportamento bifásico da hidrólise do amido tem sido atribuída como a hidrólise das regiões mais amorfas dos grânulos de amido na fase rápida e durante a fase lenta, o material cristalino é degradado lentamente (HOOVER, 2000). Ao final dos processos, obteve-se o rendimento da hidrólise que está apresentado na Tabela 13.

As amostras de amido nativo e pré-tratados apresentaram uma redução no rendimento da hidrólise de 5 para 7 dias de reação (Tabela 13). Após o pré-tratamento com TTBU, o rendimento da hidrólise foi 44% maior que o rendimento do amido nativo, seguido pelo pré-tratamento com SNT, que promoveu um aumento de 31%. Este comportamento diferenciado entre os amidos se deve as alterações na organização molecular do amido causado pelos pré-tratamentos de forma distinta, melhorando o rendimento das hidrólises.

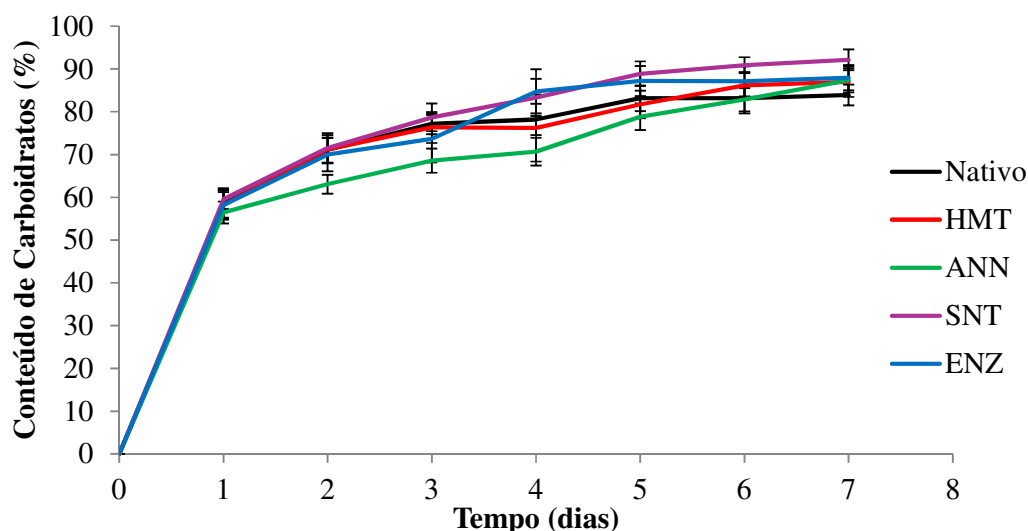


Figura 20 Curvas de hidrólise ácida dos amidos de pinhão nativo e pré-tratado com tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).

Brumovsky; Thompson, (2001) propuseram que uma hidrólise ácida parcial poderia atacar preferencialmente a região amorfa dos grânulos, aumentando a acessibilidade aos terminais das cadeias livres associadas com as duplas hélices.

Além disso, Nakazawa; Wang, (2003), propuseram que a estrutura tipo-A presente nos amidos, dificulta a ação do ácido, por serem mais compactas, enquanto que as estruturas tipo-B apresentaram maior no grau de hidrólise, provavelmente devido à sua estrutura menos compacta.

Duas teorias foram estabelecidas por Hoover (2000) quanto ao desenvolvimento da hidrólise ácida em amidos, sendo a primeira referente a densidade do empacotamento das cadeias de amido entre os cristalitos, dificultado a penetração do ion H_3O^+ . A segunda teoria é que, para que a hidrólise ácida aconteça nas ligações glicosídicas, é necessário que ocorra uma mudança conformacional nas unidades D-glicopiranosil (cadeira $\rightarrow$ meia cadeira). A imobilização da conformação deste açúcar devido ao denso empacotamento das duplas hélices das cadeias de amilopectina na região cristalina pode dificultar a transição conformacional requerida para que a hidrólise ocorra.

Tabela 13 Rendimento da hidrólise ácida nos amidos nativo de pinhão e com pré-tratamentos

Tratamentos ¹	Rendimento da hidrólise (%)	
	5 dias	7 dias
Nativo	10,23±0,96 *b	8,23±0,17 b
TTBU	14,73±0,93 *a	12,50±0,23 a
ANN	11,70±0,57 *ab	9,31±0,83 b
SNT	13,43±1,38 *ab	8,84±0,72 b
ENZ	11,50±0,20 *ab	8,63±0,03 b

¹Os resultados são a média de duas determinações. Os valores com diferentes letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si ($p < 0.05$). * e ns na mesma linha representam diferença e não diferença significativa, respectivamente, entre as médias submetidas ao teste de t a 5% de probabilidade de erro.

Segundo Ambigaipalan et al., (2014); Hoover; Manuel, (1996b); Varatharajan et al., (2010), após o tratamento com TTBU os amidos, em geral, apresentam uma redução na hidrólise ácida com HCl 2,2 M por pelo menos 30 dias. No entanto, em nosso estudo, o TTBU não apresentou diferenças em relação ao amido nativo (Figura 20). Uma hipótese que pode justificar esta diferença no comportamento entre os amidos estudados anteriormente e o amido de pinhão, seria o tipo e a concentração do ácido utilizado na hidrólise.

Angellier et al., (2004) testaram diferentes temperaturas, concentrações de ácido, concentrações de amido, tempo de reação e velocidade de agitação na produção de nanocristais de amido de milho ceroso. Os autores obtiveram nanocristais em suspensão aquosa depois de 5 dias de hidrólise com H₂SO₄ 3,16 M a 40 °C com agitação de 100 rpm e concentração de amido de 14,69% com rendimento da hidrólise de 15,7% e o mesmo formato dos nanocristais obtidos pelos métodos clássicos de hidrólise com HCl por 40 dias.

O pré-tratamento com ANN apresentou uma redução de 5% até o 5º dia de hidrólise, quando comparado ao amido nativo, mas não apresentou diferenças com o amido nativo após 7 dias de hidrólise (Figura 20).

Hoover; Vasanthan, (1994) estudaram o efeito do ANN no grau de hidrólise ácida de amidos anelados de trigo, batata e lentilha e também verificaram uma redução de 5% depois de 7 e 20 dias, em comparação aos respectivos amidos

nativos. Os mesmos autores verificaram um aumento de 14% na hidrólise do amido de aveia. A redução foi atribuída como efeito da reorganização intermediárias entre as zonas cristalinas e amorfas, causada pelo annealing. Pode-se concluir que a reorganização promovida pelo ANN no amido de pinhão, proporcionou uma proteção à região cristalina do grânulo de amido, não sendo definitiva, podendo ser destruída com a hidrólise com H_2SO_4 3M mais prolongada.

O ultrassom pode promover a quebra de ligações moleculares C-C e a formação de radicais com cadeias longas, devido ao efeito da cavitação (SUSLICK, 1990). Pode-se verificar na Tabela 3, que este efeito foi leve e não causou grandes danos na estrutura molecular do amido de pinhão e apresentou o mesmo perfil de hidrólise, quando comparados ao amido nativo (Figura 20). Aos 7 dias de reação foi possível verificar um aumento na hidrólise ácida, que pode estar relacionado com a desorganização e leve rompimento das cadeias na região amorfa e um colapso nas duplas hélices da amilopectina facilitando o acesso do ácido para realizar a hidrólise. Este pré-tratamento pode ser uma alternativa para diminuir o tempo de hidrólise na produção de nanocristais de amido.

O pré-tratamento ENZ promoveu um aumento na hidrólise de aproximadamente 5% em relação ao amido nativo. Diferentemente dos resultados verificados neste trabalho, Lecorre et al., (2012b) avaliaram a hidrólise do amido por três enzimas amilolíticas para serem empregadas como pré-tratamento na produção de nanocristais de amido. A enzima glucoamilase apresentou a melhor performance e foi selecionada para a produção dos nanocristais. Os autores verificaram a formação de nanocristais depois de 6h de hidrólise ácida e um rendimento de hidrólise de 15%, geralmente encontrado após 5 dias pela hidrólise convencional, em apenas 45h (1,8 dias) de reação. Eles concluíram que as enzimas α -, β - e glucoamilase foram eficientes na formação de microporos nos grânulos de amido e que o pré-tratamento enzimático pode ser uma alternativa na redução do tempo envolvido na produção dos nanocristais.

Algumas possibilidades podem ser indicadas para as divergências dos resultados verificados na literatura e os encontrados neste estudo. A condução da hidrólise enzimática foi realizada em grandes volumes (3 L de suspensão de amido) e submetidas a agitação constante. O aumento de escala (RIOS et al., 2004) e o emprego da enzima α -amilase e não glucoamilase (LECORRE et al., 2012b) podem ter sido responsáveis pela baixa eficiência do tratamento enzimático.

Apesar da baixa eficiência, o pré-tratamento TTBU, confirma a hipótese de que utilizar pré-tratamentos físicos na produção de nanocristais pode aumentar o rendimento do resíduo recolhido após a hidrólise.

4.3.2 Estrutura molecular

A distribuição das cadeias dos nanocristais hidrolisados por 5 e 7 dias foi verificada por GPC depois de desramificadas (Figura 22 e Figura 23) e a porcentagem de cada fração (F1, F2 e F3) está relacionada na Tabela 14. A separação por GPC revelou a presença de duas frações apenas, que incluem uma pequena porcentagem de materiais intermediários (F2) e uma grande quantidade de cadeias curtas (F3).

O desaparecimento da fração F1, verificada quando comparamos estes mesmos amidos antes da hidrólise ácida (Figura 10), representa a remoção de boa parte das cadeias longas da amilopectina (F2) e das cadeias de amilose (F1) pela ação do ácido sulfúrico (Tabela 14). Estas cadeias ficam localizadas preferencialmente na região amorfa dos grânulos (HOOVER et al., 2010) (ATKIN et al., 1999). As frações remanescentes podem ser classificadas como as cadeias B longas (B2), cadeias B curtas (B1) e cadeias A da amilopectina, conforme a Figura 21, proposta por Hizukuri, (1986).

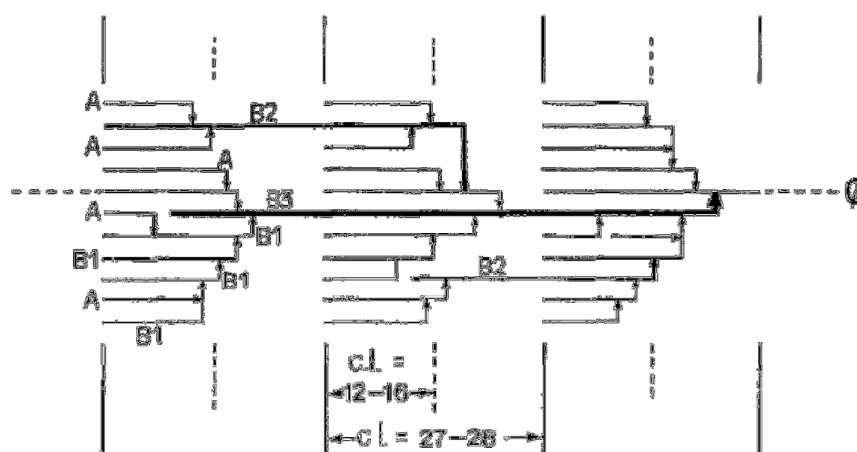


Figura 21 Modelo das cadeias de amilopectina que formam os clusters. Cadeias tipo A, B1; B2 e B3; φ terminal redutor; — cadeias D-glicose α,(1-4) e → ligações α,(1-6). Fonte: (HIZUKURI, 1986)

Kim et al., (2012) produziram nanocristais de amido de milho ceroso, normal e de alta amilose (0,26%; 26,25%; 60,95%), bem como amido de batata (22,83% de amilose) e de feijão Mung (30,11% de amilose) e verificaram que, no amido de milho ceroso, a proporção de cadeias curtas (B1 e A) aumentou e as cadeias longas (B2) diminuíram com a hidrólise ácida. Os autores concluíram que as longas cadeias da amilopectina tais como as B2 foram mais susceptíveis a hidrólise ácida. Ao passo que, os amidos com amilose apresentaram um aumento nas duas frações (B2 e B1 + A) e que o pico referente a amilose desapareceu com a hidrólise ácida.

Com isso, concluíram que as cadeias de amilose e as longas cadeias de amilopectina são mais susceptíveis a hidrólise ácida, provavelmente porque estas cadeias estão localizadas principalmente na região amorfa dos grânulos, enquanto que as cadeias curtas da amilopectina que compõem a região cristalina, mais organizada e de difícil acesso pelo ácido.

Tabela 14 Frações moleculares dos nanocristais de pinhão desramificados com 5 e 7 dias de hidrólise

Treatmentos	FM dos nanocristais 5 dias			FM dos nanocristais 7 dias		
	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Nativo	0	0,6	99,4	0	0	100
TTBU	0	1,2	99,3	0	1,7	98,3
ANN	0	2,3	97,7	0	2,5	97,5
SNT	0	0,2	99,8	0	0,3	99,7
ENZ	0	0,1	99,9	0	0	100

Com a análise do perfil de distribuição das cadeias em GPC não é possível determinar o DP das cadeias remanescentes. No entanto acredita-se que a hidrólise ácida ocorreu de maneira semelhante ao verificado por Kim et al., (2012), sendo necessário um estudo mais detalhado utilizando cromatografia de alta performance para esclarecer o comportamento das amostras de amido de pinhão sob hidrólise ácida.

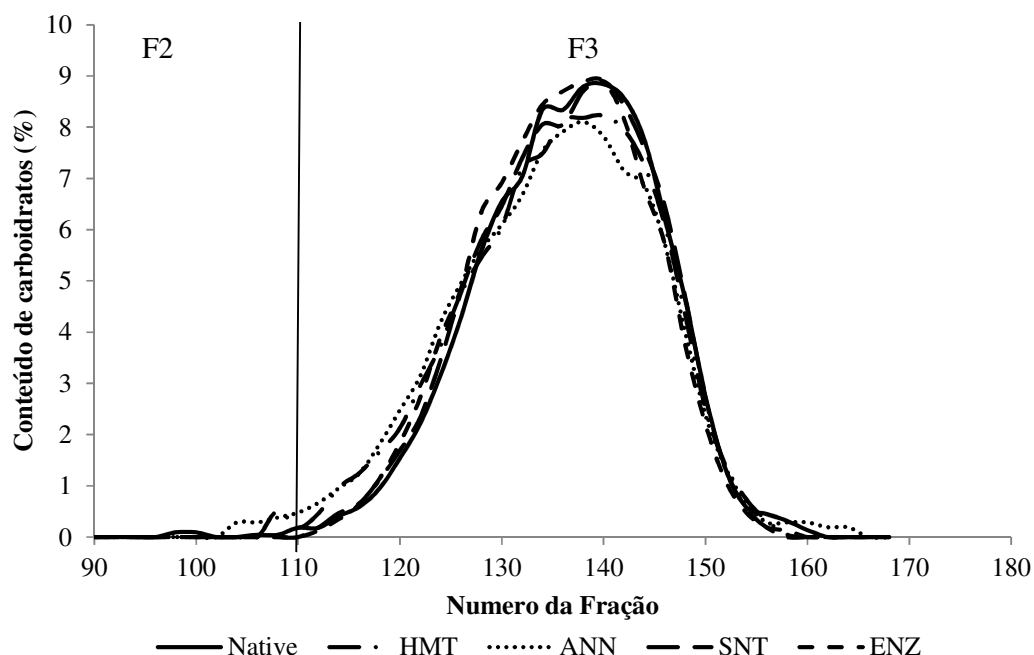


Figura 22 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL (GPC) dos amidos de pinhão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 5 dias, após a desramificação com pululanase e isoamilase.

No entanto, analisando a Figura 22, após 5 dias de hidrólise ácida é possível verificar que todas as amostras tiveram o mesmo comportamento quanto a distribuição de cadeias diante da hidrólise. Na Figura 23, é possível verificar que a curva deslocou-se para a direita, nos amidos pré-tratados. Este comportamento demonstrou que aos 7 dias de hidrólise, o ácido começa a degradar a região cristalina do amido, e que os tratamentos realizados antes da hidrólise favoreceram este ataque nas cadeias curtas da amilopectina.

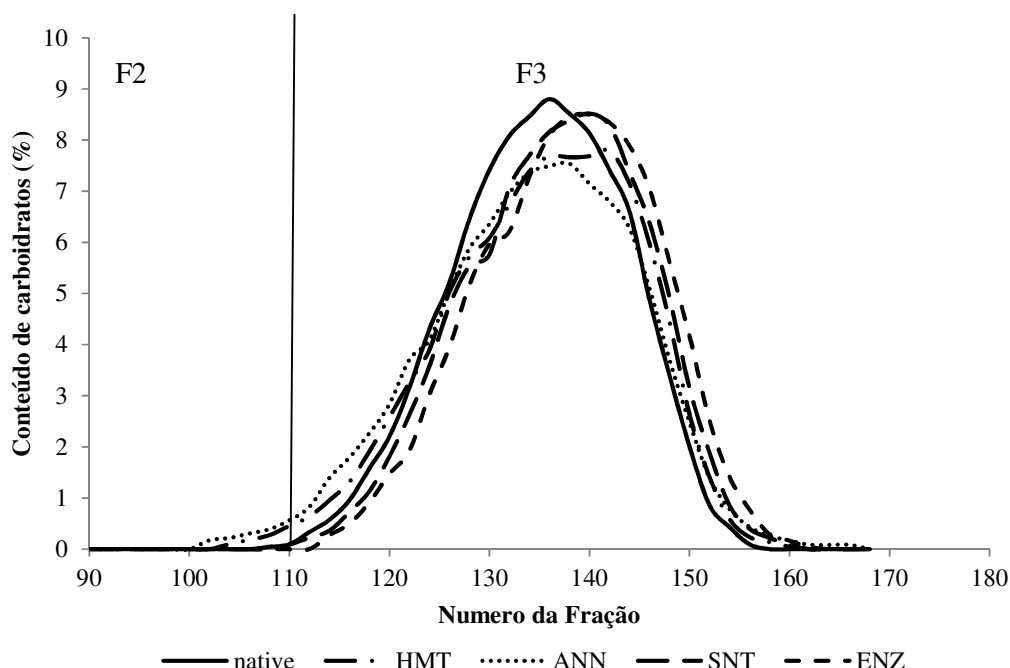


Figura 23 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL (GPC) dos amidos de pinhão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 7 dias, após adesramificação com pululanase e isoamilase.

Com base no perfil de distribuição das cadeias, conclui-se que a hidrólise ácida mantida até o quinto dia é mais apropriada para a produção de nanocristais de amido de pinhão, pois promoveu a remoção da região amorfa, com menor degradação nas regiões cristalinas de interesse.

4.3.3 Cristalinidade

A cristalinidade relativa (CR) foi determinada pela difração de raio-X dos nanocristais de amido de pinhão após 7 dias de hidrólise e está apresentada na Tabela 10.

Em teoria, a hidrólise ácida remove a região amorfa dos grânulos de amido na fase rápida da reação e ataca a região cristalina em condições reacionais prolongadas (HOOVER, 2000; KONG et al., 2012; LIN et al., 2011; WANG et al., 2001). Além disso, a taxa de hidrólise não é constante durante a reação, variando

conforme a origem botânica do amido empregado (WANG et al., 2001). Baseado nisso, pode-se verificar que a hidrólise ácida no amido de pinhão promoveu a remoção das cadeias de amilose que formam a região amorfa dos grânulos (Tabela 14) e aumentou a cristalinidade dos SNCs formados, em todos os tratamentos utilizados (Tabela 15). Dentre os pré-tratamentos empregados no amido antes da hidrólise, o tratamento que menos afetou a CR foi o ANN e o que promoveu a maior perda foi o ENZ (Tabela 15).

Lecorre; Bras; Dufresne, (2011) avaliaram a influência da origem botânica e o conteúdo de amilose de diferentes amidos nativos na produção de nanocristais. Os autores verificaram o aumento da cristalinidade de 29 a 34% dos SNCs com a hidrólise ácida. Para as amostras com o mesmo conteúdo de amilose (milho, batata e trigo), os SNCs resultantes apresentaram tamanho e cristalinidade semelhantes, provando que a origem botânica apresenta restrita influência. Por outro lado, para a mesma origem botânica (milho), mas com conteúdo de amilose diferentes (0, 25 e 70%), foram obtidos cristais com diferentes tamanhos. Este resultado indica que a amilose apresenta grande influência na produção dos SNCs.

A pequena redução ou manutenção da CR nas amostras pré-tratadas com ANN pode ser consequência da reorganização das cadeias de amilopectina, induzidas pelo ANN no amido. Com isso, se obteve SNCs com cristalinidade semelhante aos SNCs obtidos do amido nativo (Tabela 15).

Tabela 15 Cristalinidade relativa (CR) dos nanocristais obtidos a partir de amido de pinhão com hidrólise ácida de 7 dias de hidrólise

Tratamento	Cristalinidade Relativa (%)
Nativo	42,00
TTBU	35,95
ANN	40,96
SNT	34,18
ENZ	29,68

Kim et al., (2013) verificaram que a região amorfa foi removida de forma seletiva com o emprego da α -amilase. Esta remoção induziu a fragmentação do amido em partículas ou *blockets* cristalinos. No entanto, estas partículas se

apresentaram instáveis, rapidamente solubilizáveis por forças físicas, como ultrassom, formando agregados. Os autores verificaram uma redução da cristalinidade do amido de arroz, com o aumento da hidrólise enzimática.

O pré-tratamento enzimático foi anteriormente proposto por Lecorre et al., (2012b) como uma alternativa para a redução do tempo requerido na obtenção dos nanocristais de amido. Os autores verificaram que o pré-tratamento não alterou a estrutura cristalina do amido de milho, bem como, não alterou a cristalinidade dos SNCs depois de 2 dias de hidrólise ácida. Os autores concluíram que a redução do tempo de hidrólise é limitada pela taxa de hidrólise da lamela amorfa, que permaneceu inalterada após 2 dias de reação. Também verificaram, que o mecanismo de hidrólise enzimática pode ter causado cristalitos com defeitos, refletindo na duração da hidrólise ácida.

Na Figura 24 estão representados os padrões de difração de raio-X dos nanocristais de amido de pinhão.

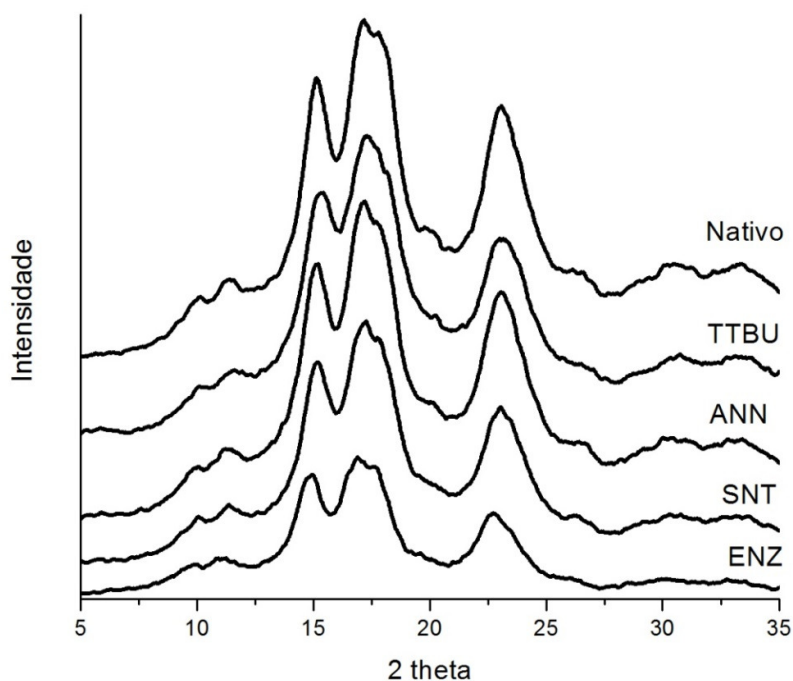


Figura 24 Difrátogramas de raio-X dos nanocristais de amidos de pinhão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ) hidrolisados por 7 dias.

Os SNCs obtidos a partir de amido de pinhão apresentaram padrão de difração de raio-X tipo-A, com a presença de picos no ângulo de difração 2θ em 15° , 17° , 18° e 23° (Figura 24). O amido de pinhão nativo apresenta um padrão de difração de raio-X tipo-C (A+B).

O desaparecimento do pico no ângulo de difração 2θ em $5,7^\circ$ sugere que a organização cristalina característica da difração tipo-B foi removida com a hidrólise ácida. Este comportamento está em acordo com o verificado por Kim et al., (2012), que verificou o desaparecimento do pico em $5,6^\circ$ na produção de SNCs de amido de batata e de milho com alto teor de amilose (tipo-B) e feijão Mung (tipo-C). Os autores citados concluíram que a organização cristalina dos amidos tipo-B é mais rapidamente destruída com a hidrólise ácida do que a organização cristalina tipo-A.

Os pré-tratamentos SNT e ENZ promoveram uma redução na intensidade dos picos. Baseado na teoria de que hidrólise enzimática preferencialmente ocorre no material amorfo, bem como, nas evidências quanto a remoção das cadeias longas, aumento na CR e entalpia após a hidrólise ácida, a reduzida CR e intensidade dos picos nestas amostras (SNT e ENZ), pode-se inferir que ambos os tratamentos favoreceram a ação do ácido na região cristalina dos grânulos de amido de pinhão, formando assim partículas com menor cristalinidade.

4.3.4 Morfologia

Na Figura 25 está apresentado um exemplo dos nanocristais obtidos com amido de pinhão nativo após 5 dias de hidrólise. É possível verificar que as partículas são pouco homogêneas, necessitando de exames mais detalhados do tamanho e da morfologia das mesmas para conclusões precisas sobre a influência dos pré-tratamentos quanto aos parâmetros morfológicos.

Durante o experimento verificou-se a presença de contaminantes, como fenóis remanescentes na extração do amido de pinhão, bem como uma grande formação de aglomerados resultante da centrifugação e liofilização dos nanocristais. Na tentativa de desfazer estes aglomerados, foram empregados homogeneizador ultraturrax (10 min) e ultrassom (2 min), mesmo assim, não foi suficiente para a completa ruptura da aglomeração das partículas.

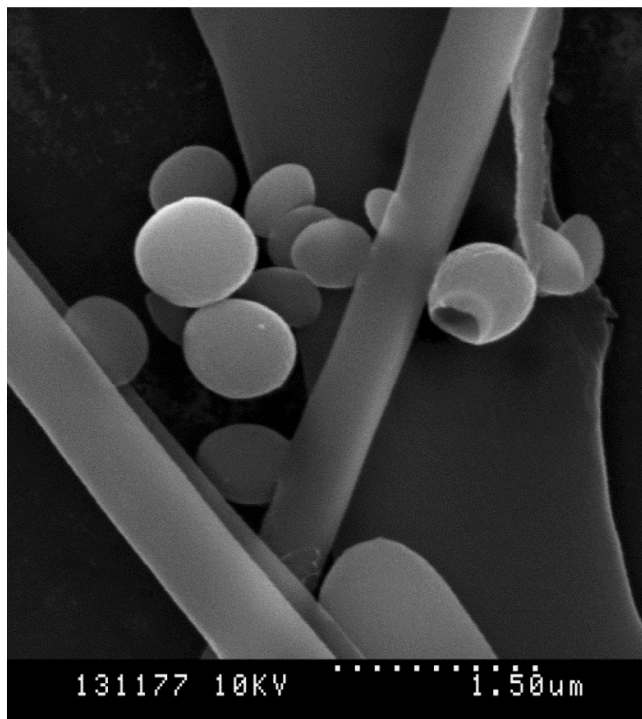


Figura 25 Nanocristais obtidos após hidrólise ácida por 5 dias do amido nativo de pinhão.

4.3.5 Propriedades térmicas

O comportamento térmico dos nanocristais de amido de pinhão foram avaliadas por DSC e as curvas obtidas estão representadas na Figura 26 a-b, bem como os parâmetros de temperatura de fusão dos cristais (T_o , T_p , T_c , T_c-T_o) e a entalpia obtidos estão apresentados na Tabela 16. As amostras foram analisadas com umidade reduzida ($< 5\%$) prevendo-se a aplicação das mesmas como enchimento em embalagens elaboradas por extrusão e com excesso de água, sendo que nesta última não apresentaram picos até a temperatura de 150°C .

A fusão ocorre em baixas umidades (menor que 11%) e elevadas temperaturas (geralmente superiores a 180°C), onde o cisalhamento e o aquecimento promovem a formação de um material viscoelástico fundido (VERGNES; VALLE; COLONNA, 2003). A temperatura teórica de fusão dos cristais perfeitos sem água está entre 160 e 210°C , com uma entalpia correspondente entre 160 e 875 J mg^{-1} , dependendo da origem botânica do amido (COLONNA; BULEON, 2010).

Os nanocristais de amido de pinhão obtidos após a hidrólise ácida por 7 dias apresentaram dois picos endotérmicos, sendo que o primeiro pico foi observado entre 140,83 e 160,72 °C e o segundo pico endotérmico entre 159,69 e 179,62 °C. Poucos estudos foram verificados na literatura sobre as propriedades térmicas dos nanocristais de amido (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012; THIELEMANS; BELGACEM; DUFRESNE, 2006). Nestes estudos dois picos endotérmicos também foram verificados nos SNCs, e as explicações envolvendo o aumento na temperatura de fusão dos cristais após a hidrólise ácida foram atribuídas considerando uma abordagem polimérica clássica.

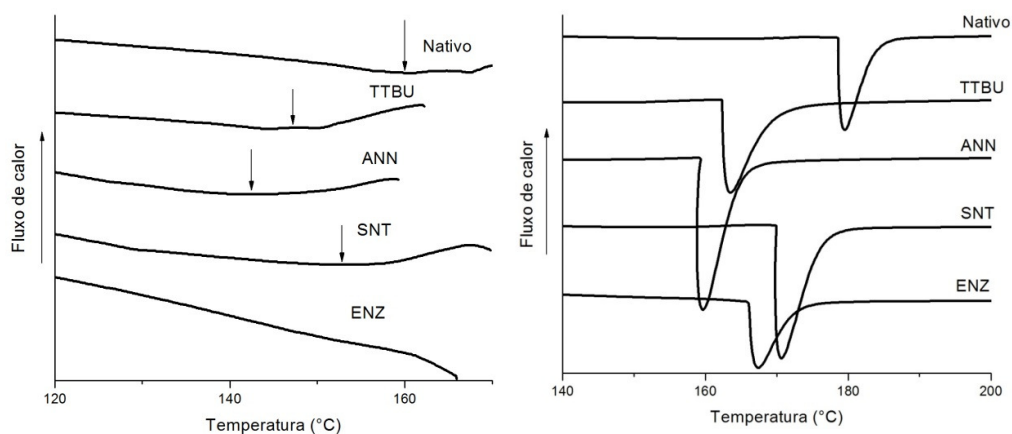


Figura 26 DSC dos amidos de pinhão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 7 dias, (a) com destaque entre as temperaturas 120-160 °C e (b) 140-200 °C.

No ponto de vista polimérico, os dois picos verificados podem ser atribuído a transição esmética (estado de gel), definido por (WAIGH et al., 2000) para amidos com reduzido conteúdo de água contendo tamanhos de cristalitos. Com isso o primeiro pico (corresponde ao pico a 160,72 °C no amido nativo) pode ser atribuído a fusão dos cristais menos estáveis e o segundo pico (corresponde ao pico a 179,62 °C no amido nativo) a fusão dos cristais mais estáveis remanescentes (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012). Os mesmos autores ressaltam que é necessário confirmar os mecanismos de degradação ou despolimerização que ocorrem nestas condições.

Com base nisso, Lecorre; Bras; Dufresne, (2012) propuseram então que fatores como o aumento na cristalinidade, cristais mais perfeitos e a redução do conteúdo de plastificante podem ser os responsáveis pelas alterações nas propriedades térmicas do primeiro pico. No caso dos SNCs de amido nativo de pinhão todas possibilidades podem igualmente ter promovido o aumento nas temperaturas do primeiro pico. De fato, já foi demonstrado que os SNCs são mais cristalinos que os amidos antes da hidrólise ácida (Tabela 5 e Tabela 15). Também, devido ao processo de liofilização, é possível que os nanocristais, ou pelo menos a parte cristalina das partículas, se tornem bem empacotados e ligados via ligações de hidrogênio, formando assim cristais mais perfeitos (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012a).

Tester; Morrison, (1990) sugeriram que a amilose age como plastificante (diluente) nos grânulos de amido. Com isso, depois de uma hidrólise a maior parte da região amorfa é removida, limitando assim o efeito plastificante da amilose e aumentando a temperatura de fusão dos cristais (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012). Podemos confirmar este efeito pela remoção da amilose quando o amido foi hidrolisado para a produção dos SNCs (Tabela 14) e aumento nas temperaturas de fusão dos SNCs de amido nativo de pinhão (Tabela 16).

Por outro lado, os pré-tratamentos térmicos (TTBU e ANN) promoveram o efeito inverso que o verificado nos nanocristais de amido nativo. Estes pré-tratamentos diminuíram as T_o , T_p , T_c de fusão dos cristais (segundo pico) quando comparados aos seus respectivos amidos antes da hidrólise (Tabela 6) e também quando comparados aos SNCs originados do amido nativo de pinhão (Tabela 16).

A redução das temperaturas envolvidas na fusão dos nanocristais podem estar relacionadas com o tamanho das partículas, e pelo reduzido DP das cadeias de amilopectina remanecentes. Lecorre; Bras; Dufresne, (2012a) verificou temperaturas de fusão elevadas, em excesso de água, pela presença de partículas com grande superfície de contato e a presença substâncias na superfície dos nanocristais, como grupos sulfato.

Noda et al., (1998) apresentou em estudos com amido de batata doce e trigo sarraceno, que os parâmetros de DSC são influenciados pela arquitetura molecular da amilopectina. Os mesmos autores sugeriram que valores baixos de T_o , T_p , T_c e ΔH reflete a presença abundante de amilopectina curtas (DP 6–12). O comprimento das cadeias de amilopectina com DP 6–12 são muito curtas para formar duplas

hélices estáveis e podem requerer menor energia para desenovelar e se fundir durante a gelatinização (CHUNG; LIU; HOOVER, 2009; SRICHUWONG et al., 2005).

Os pré-tratamentos empregados reduziram a T_o , T_p e T_c de fusão e promoveram um aumento de pelo menos 15% (TTBU) na entalpia quando comparados aos SNCs derivados do amido de pinhão nativo. Este aumento na entalpia significa uma maior estabilidade quando os nanocristais são submetidos a elevadas temperaturas.

Tabela 16 Temperatura inicial (T_o), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_c), diferença de temperaturas ($T_c - T_o$) e entalpia (ΔH) dos amidos de pinhão nativo e modificados após a hidrólise de 7 dias.

Tratamentos	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	$T_c - T_o$ (°C)	ΔH (J/g)
<i>Nativo</i>					
1° pico	152,72	160,72	169,46	16,74	2,53
2° pico	178,59	179,62	183,77	5,18	92,30
<i>TTBU</i>					
1° pico	130,82	144,58	159,36	28,54	12,73
2° pico	162,15	163,53	169,38	7,23	107,71
<i>ANN</i>					
1° pico	131,60	140,83	156,95	25,35	6,92
2° pico	159,69	159,69	164,99	7,14	156,42
<i>SNT</i>					
1° pico	148,67	155,14	160,51	11,84	1,67
2° pico	169,34	170,66	176,27	6,93	128,82
<i>ENZ</i>					
1° pico	-	-	-	-	-
2° pico	167,35	167,35	172,34	6,34	118,90

Pode-se destacar o pré-tratamento ANN, que favoreceu a formação de SNCs com elevada entalpia de fusão (Tabela 16). Este resultado sugere que o ANN promoveu um empacotamento nas cadeias de amilopectina, fazendo com que os nanocristais fossem termicamente mais estáveis.

Ao verificar as propriedades térmicas da amostra com pré-tratamento ENZ, apenas um pico endotérmico foi detectado (Figura 26a-b). Este comportamento sugere a presença homogênea de cristais com temperaturas de fusão e estabilidade térmica elevadas (Tabela 16).

4.3.6 Conclusão

O TTBU e SNT se mostram como pré-tratamentos eficientes no aumento do rendimento de nanocristais em 5 dias de hidrólise, comparados com o amido nativo.

Os cristais tipo-A presentes no amido de pinhão pareceram ser mais resistentes a hidrólise ácida que os cristais tipo-B.

O pré-tratamento ANN promove a formação de nanocristais com cristalinidade relativa (CR) semelhante aos nanocristais do amido nativo e com elevada estabilidade térmica.

4.4 Estudo 4 - Produção dos nanocristais de amido de feijão Carioca

Os resultados do Estudo 3 apresentados a seguir são referente a produção de nanocristais de amido utilizando as modificações empregadas no Estudo 2 como pré tratamento.

4.4.1 Rendimento e cinética da hidrólise

As amostras de amido de feijão nativo e pré-tratadas com TTBU, ANN, SNT e ENZ foram submetidas a hidrólise ácida com H_2SO_4 3M a 40°C por 7 dias. O comportamento desta hidrólise foi monitorado a cada 24 horas e está representado na Figura 27. É possível observar que todas as amostras de amido de feijão apresentaram o mesmo perfil de hidrólise, com dois estágios, conforme já discutido na Seção 4.3.1 Ao final dos processos, obteve-se o rendimento da hidrólise, que está descrito na Tabela 17.

As amostras de amido nativo e pré-tratados apresentaram redução no rendimento de hidrólise de 5 para 7 dias de reação (Tabela 17). Foi possível verificar também que o amido de feijão Carioca apresentou elevado rendimento após a hidrólise (Tabela 17), sendo 180% a mais do percentual normalmente encontrado

nos estudos de produção de nanocristais até agora (ANGELLIER et al., 2004; KIM et al., 2012; LE CORRE et al., 2012a; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011). Este fator faz com que o amido de feijão Carioca ganhe destaque e desperte interesse na produção destas partículas.

Após o pré-tratamento com TTBU, o rendimento da hidrólise foi maior dentre todos os tratamentos, sendo 18% maior que o rendimento do amido nativo, seguido do pré-tratamento com SNT (10%), sendo que depois de 7 dias não foi possível verificar diferença entre todos os tratamentos.

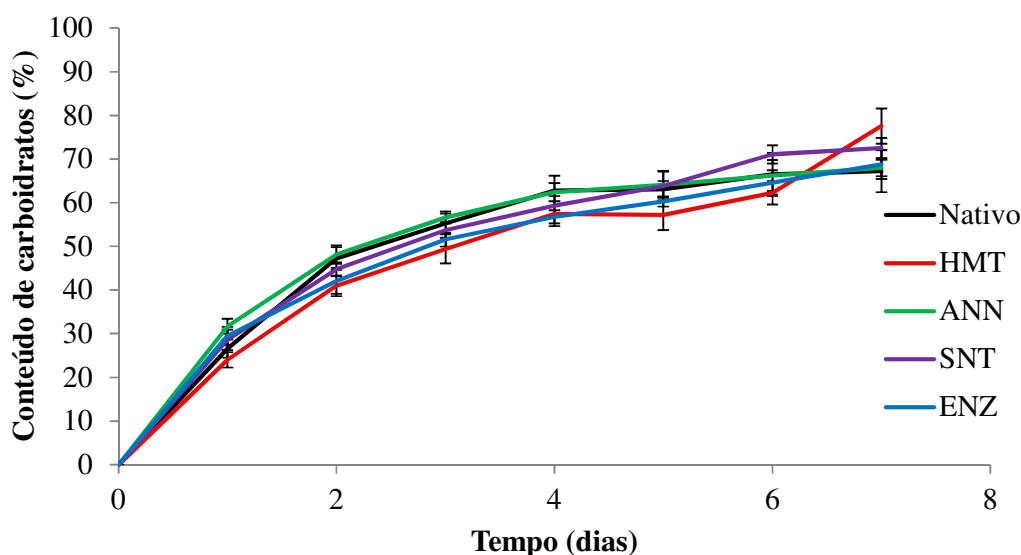


Figura 27 Curvas de hidrólise ácida dos amidos de feijão nativo e pré-tratado com tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ).

Este comportamento diferenciado, aos 5 dias de hidrólise, entre os amidos se deve as alterações na organização molecular do amido causado pelos pré-tratamentos, comportamento este, verificados também para o amido de pinhão. Também, pode estar relacionado com a menor acessibilidade do ataque dos prótons hidrolíticos na lamela cristalina (HOOVER, 2000) refletindo as interações entre as mudanças na orientação dos cristalitos, tamanho do cristal e realinhamento das dupla hélices após o TTBU no amido de leguminosas (AMBIGAIPALAN et al., 2014).

Ambigaipalan et al., (2014) não verificaram diferença significativa durante os primeiros nove dias de hidrólise com HCl entre os amidos de fava, feijão preto, feijão

pinto, nativos e modificados por TTBU. Eles concluíram que as interações entre amilose-amilose, amilose-amilopectina ocorridas durante o TTBU não foram suficientes para dificultar a ação dos íons H_3O^+ nas região amorfas. Porém, depois do 9º dia, a hidrólise diminuiu em todos os amidos com TTBU. Os autores concluíram que a redução da hidrólise depois do nono dia refletiu as alterações interplanárias entre a orientação cristalina, o tamanho dos cristais e o realinhamento das duplas hélices.

Tabela 17 Rendimento de hidrólise das amostras de amido de feijão nativo e com pré-tratamento.

Tratamentos ¹	Rendimento de hidrólise	
	5 dias	7 dias
Nativo	35,90±0,63*bc	30,13±0,87a
TTBU	42,31±0,79*a	33,60±0,67a
ANN	35,23±0,10*c	31,33±0,93a
SNT	39,60±0,47*ab	32,00±0,50a
ENZ	36,30±0,40*bc	31,10±0,57a

¹Os resultados são a média de duas determinações. Os valores com diferentes letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si ($p < 0.05$). * e ns na mesma linha representam diferença e não diferença significativa, respectivamente, entre as médias submetidas ao teste de t a 5% de probabilidade de erro.

4.4.2 Estrutura molecular

A distribuição das cadeias dos nanocristais hidrolisados por 5 e 7 dias foi verificada por GPC depois de desramificadas (Figura 28 e Figura 29) e a porcentagem de cada fração F1, F2 e F3 está apresentada na Tabela 18.

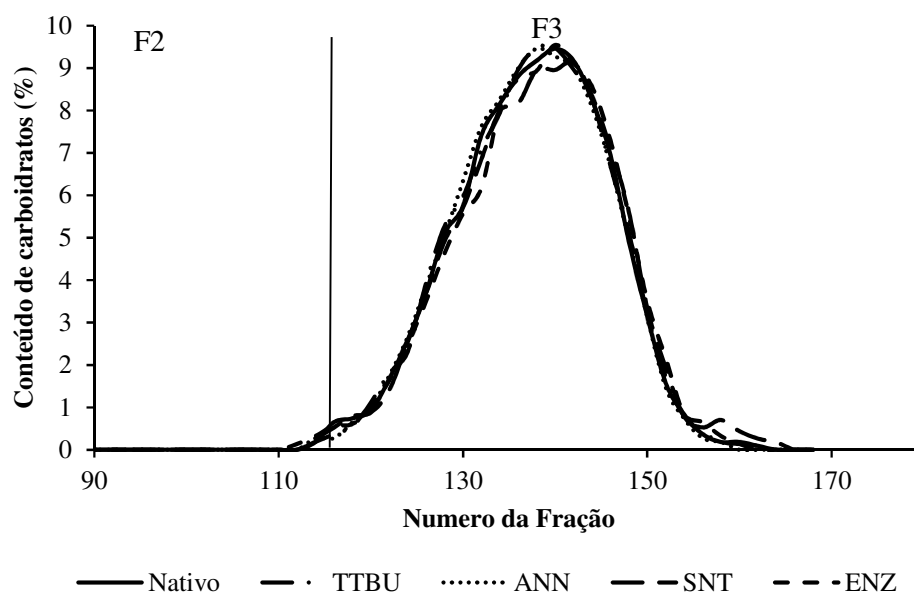


Figura 28 Cromatografia de exclusão de tamanho em (GPC) gel Sepharose CL 6B CL dos amidos de feijão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 5 dias, desramificados com pululanase e isoamilase.

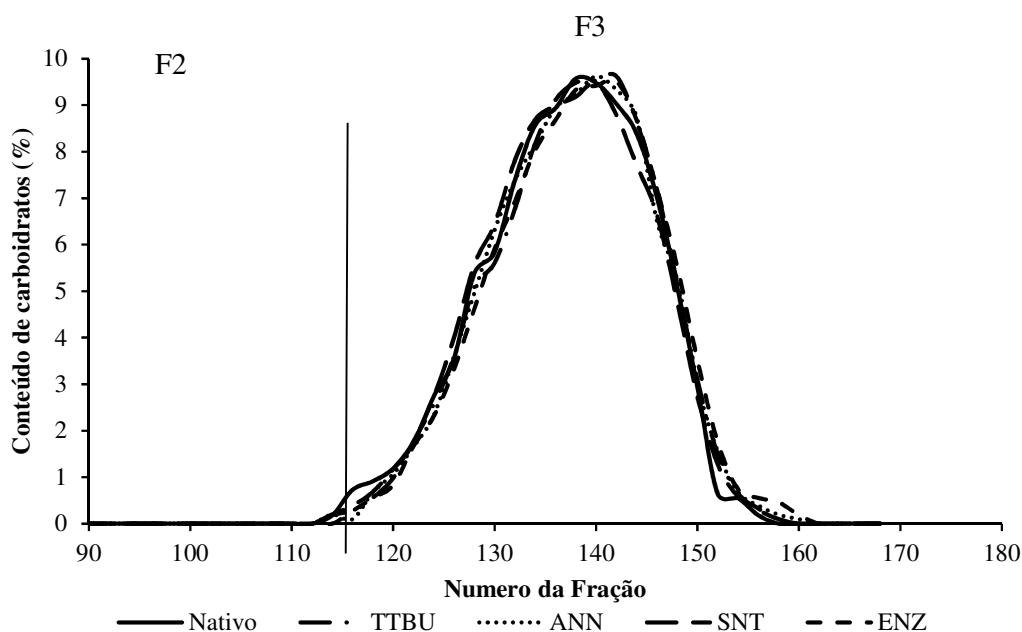


Figura 29 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B CL dos amidos de feijão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 7 dias, desramificados com pululanase e isoamilase.

Pode se verificar que a separação por GPC revelou a presença de duas frações apenas, que incluem uma pequena porcentagem de materiais intermediários (F2) e uma grande quantidade de cadeias curtas (F3) (Tabela 18). O desaparecimento da fração F1, verificada quando compararmos estes mesmos amidos antes da hidrólise ácida (Tabela 8), representa a remoção de boa parte das cadeias longas da amilopectina (F2) e das cadeias de amilose (F1) pela ação do ácido sulfúrico.

Tabela 18 Frações moleculares dos nanocristais de feijão desramificados com 5 e 7 dias de hidrólise

Treatmentos	FM dos nanocristais 5 dias			FM dos nanocristais 7 dias		
	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Nativo	0	3,9	96,1	0	3,2	96,8
TTBU	0	3,8	96,2	0	3,7	96,3
ANN	0	3,9	96,1	0	3,3	96,7
SNT	0	3,8	96,2	0	3,2	96,8
ENZ	0	3,4	96,6	0	3,3	96,7

Pode-se verificar uma pequena redução da fração F2 após 7 dias de hidrólise, quando comparada com 5 dias de reação, sendo que o pré-tratamento com ENZ foi o que apresentou a menor quantidade de F2 com 5 dias (Tabela 18). Este comportamento pode ser atribuído a ação enzimática que promoveu uma hidrólise leve (Figura 16) de 3% nos grânulos do amido de feijão, favorecendo o ataque ácido nas cadeias de amilose e amilopectina (LECORRE et al., 2012).

4.4.3 Cristalinidade

A cristalinidade relativa (CR) foi determinada pela difração de raio-X dos nanocristais de amido de feijão e está apresentada na Tabela 19.

Pode-se verificar que a hidrólise ácida no amido de feijão promoveu a remoção das cadeias de amilose que formam a região amorfa dos grânulos (Tabela 18) e aumentou a cristalinidade dos SNCs formados, em todos os pré-tratamentos utilizados (Tabela 19). Dentre os pré-tratamentos empregados no amido antes da hidrólise, o tratamento que menos afetou a CR foi o ENZ e o que promoveu a maior perda foi o TTBU (Tabela 15).

O efeito do TTBU na cristalinidade não foi positivo, mesmo que este pré-tratamento tenha favorecido o rendimento de hidrólise, com 5 dias de reação, pois o interesse é a obtenção de nanocristais com elevada cristalinidade.

Observando a CR, pode-se confirmar que o pré-tratamento ENZ não foi suficiente para prejudicar a lamela cristalina do amido de feijão promovendo uma redução. É possível confirmar que o amido de feijão tem maior resistência ao ataque enzimático que o amido de pinhão (Figura 9), hidrolisados nas mesmas condições reacionais.

Tabela 19 Cristalinidade relativa dos amidos de feijão Carioca nativo e modificados após a hidrólise de 7 dias

Tratamentos	CR (%)
Nativo	42,14
TTBU	36,84
ANN	40,63
SNT	40,31
ENZ	42,06

Os picos verificados no padrão de difração de raio-X dos nanocristais de amido de feijão no ângulo de difração 2θ foram em 15° , 17° , 18° e 23° . Isso indica que a hidrólise ácida promoveu uma alteração do padrão de difração do tipo-C (amido nativo de feijão) para o tipo-A (SNCs) (Figura 30).

Este comportamento também foi verificado no amido de pinhão e concluiu-se que os cristais tipo-A presentes no amido pareceram ser mais resistentes a hidrólise ácida que os cristais tipo-B, ressaltando que tanto o amido de pinhão, quanto o

amido de feijão apresentam cristalinidade tipo-C (A+B), conforme sugerido por Zhang; Ao; Hamaker, (2006) e Zhang; Venkatachalam; Hamaker, (2006)

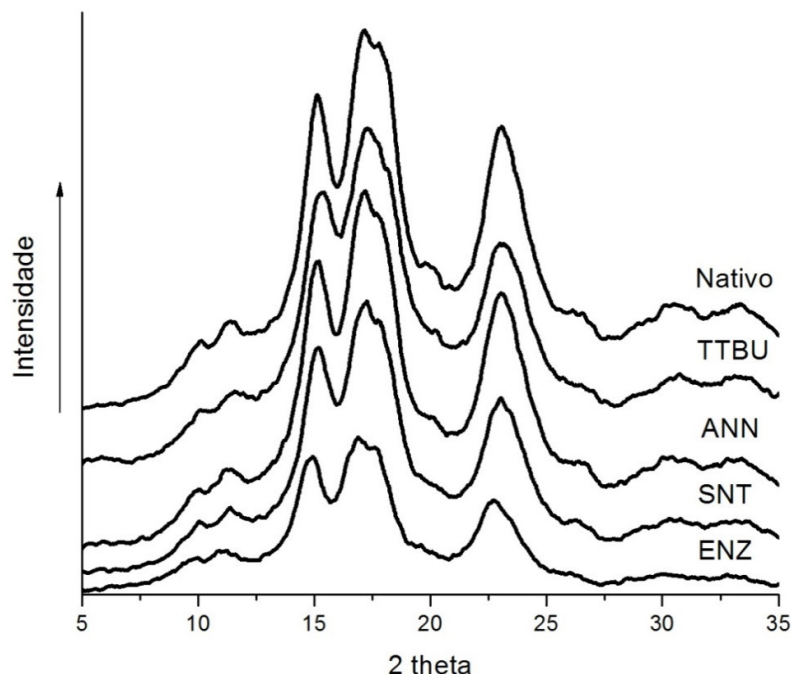


Figura 30 Difratogramas de raio-X dos nanocristais de amidos de feijão nativo e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ) hidrolisados por 7 dias.

4.4.4 Morfologia e tamanho de partículas

Na Figura 31a observa-se a presença de aglomerados formados após a centrifugação e liofilização do resíduo insolúvel da hidrólise ácida do amido de feijão. Enquanto que, na Figura 31b o foco do microscópio foi aproximado para a superfície dos aglomerados e estão apresentados os nanocristais obtidos com amido de feijão nativo após 7 dias de hidrólise. É possível verificar que as partículas são pouco homogêneas, necessitando de exames mais detalhados do tamanho e da morfologia das mesmas para conclusões precisas sobre a influência dos pré-tratamentos quanto aos parâmetros morfológicos.

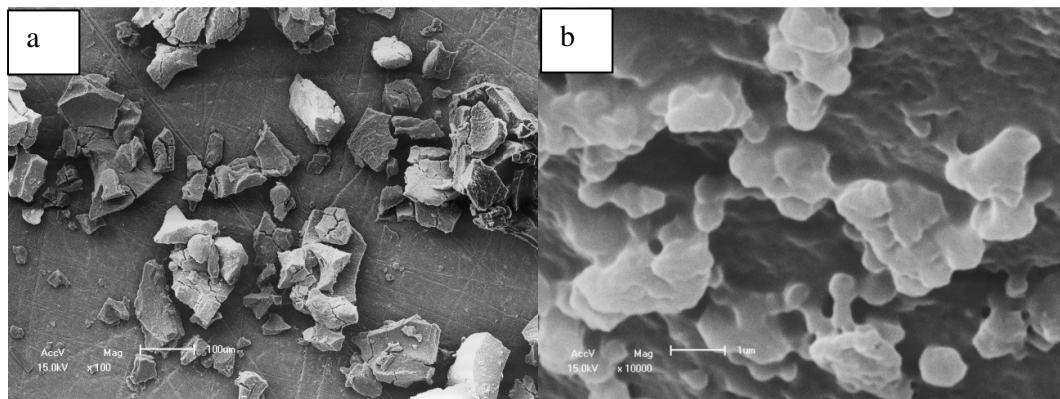


Figura 31 (a) Aglomerados e (b) nanocristais obtidos após hidrólise ácida por 7 dias do amido nativo de feijão.

4.4.5 Propriedades térmicas

O comportamento térmico dos nanocristais de amido de feijão foram avaliadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) sendo que as curvas endotérmicas obtidas estão representadas na Figura 32 a-b e os parâmetros de temperatura de fusão dos cristais, bem como a entalpia requerida no processo estão apresentados na Tabela 20. As amostras foram analisadas com umidade reduzida (< 5%) prevendo-se a aplicação das mesmas como enchimento em embalagens elaboradas por extrusão e com excesso de água, sendo que nesta última não apresentaram picos até a temperatura de 150°C.

A designação de fusão do amido inclui a perda da cristalinidade e estrutura granular (COLONNA; BULEON, 2010). A fusão ocorre em baixas umidades (menor que 11%) e elevadas temperaturas (geralmente superiores a 180°C), onde o cisalhamento e o aquecimento promovem a formação de um material viscoelástico fundido (VERGNES; VALLE; COLONNA, 2003).

Os nanocristais de amido de feijão obtidos após 7 dias de hidrólise ácida apresentaram dois picos endotérmicos, sendo que o primeiro pico foi observado entre 151,90 e 162,90 °C e o segundo pico endotérmico entre 151,61 e 171,66 °C (Figura 32 a-b). Os relatos encontrados na literatura sobre propriedades térmicas dos nanocristais de amido descrevem dois picos endotérmicos, sendo o primeiro pico (corresponde ao pico a 142,38 °C no amido nativo) atribuído a fusão dos cristais menos estáveis e o segundo pico (corresponde ao pico a 155,08 °C no amido nativo) a fusão dos cristais mais estáveis remanescentes (LECORRE; BRAS; DUFRESNE,

2012b). As explicações envolvendo o aumento na temperatura de fusão dos cristais após a hidrólise ácida foram atribuídas considerando uma abordagem polimérica clássica (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012b; THIELEMANS; BELGACEM; DUFRESNE, 2006),

Nos nanocristais obtidos a partir de amido sem pré-tratamento (nativo) de feijão a hidrólise ácida promoveu um aumento nas temperaturas dos dois picos endotérmicos e uma redução na entalpia necessária para a fusão dos cristais (Tabela 20).

O pré-tratamento SNT não apresentou o primeiro pico endotérmico, levando a crer, que a ação da cavitação durante a modificação do amido, antes da hidrólise, facilitou a ação do ácido na remoção dos cristais menos estáveis durante a produção dos SNCs. Baseado neste comportamento, pode-se afirmar que o ultrassom auxiliou na formação de cristais mais homogêneos e com elevada estabilidade térmica, visto que, a entalpia de fusão dos cristais remanescentes foi maior que a verificada na amostra sem pré-tratamento (Tabela 20).

O aumento na cristalinidade, cristais mais perfeitos e a redução do conteúdo de plastificante podem ser os responsáveis pelas alterações nas propriedades térmicas do primeiro pico (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012a).

Tester; Morrison, (1990) sugeriram que a amilose age como plastificante (diluyente) nos grânulos de amido. Com isso, depois de uma hidrólise a maior parte da região amorfa é removida, limitando assim o efeito plastificante da amilose e aumentando a temperatura de fusão dos cristais (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012a). Podemos confirmar este efeito pela remoção da amilose quando o amido foi hidrolisado para a produção dos SNCs (Tabela 14) e aumento nas temperaturas de fusão dos SNCs de amido nativo de pinhão (Tabela 20 e Figura 32b).

Dentre os pré-tratamentos aplicados, apenas o ANN promoveu aumento e o ENZ não alterou as temperaturas de fusão dos nanocristais, descritos como sendo segundo pico (Tabela 20). Este aumento pode estar relacionado ao efeito do ANN na correção dos defeitos físicos da amilopectina (VAMADEVAN et al., 2013), promovendo um empacotamento mais denso das cadeias, preservando a região cristalina da ação ácida.

Por outro lado, a redução das temperaturas envolvidas na fusão dos nanocristais podem estar relacionadas com o tamanho das partículas, e pelo reduzido DP das cadeias de amilopectina remanescentes. Lecorre; Bras; Dufresne,

(2012) verificou temperaturas de fusão elevadas, em excesso de água, pela presença de partículas com grande superfície de contato e a presença substâncias na superfície dos nanocristais, como grupos sulfatos.

Tabela 20 Temperatura inicial (T_o), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_c), diferença de temperaturas ($T_c - T_o$) e entalpia (ΔH) dos amidos de feijão nativo e modificados após a hidrólise de 7 dias

Tratamentos	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	$T_c - T_o$ (°C)	ΔH (J/g)
<i>Nativo</i>					
1° pico	149,67	162,90	166,27	16,60	0,94
2° pico	170,21	171,66	176,51	6,30	102,40
<i>TTBU</i>					
1° pico	151,61	155,11	158,89	7,28	2,84
2° pico	166,44	167,99	173,68	7,24	105,99
<i>ANN</i>					
1° pico	154,50	156,97	160,19	14,69	0,36
2° pico	166,31	167,62	173,19	6,88	116,06
<i>SNT</i>					
1° pico	-	-	-	-	-
2° pico	150,22	151,61	157,25	7,03	112,21
<i>ENZ</i>					
1° pico	143,21	151,90	156,51	13,30	0,38
2° pico	163,95	165,75	171,64	7,69	91,57

Também, devido ao processo de liofilização, é possível que os nanocristais, ou pelo menos a parte cristalina das partículas, se tornem bem empacotados e ligadas via ligações de hidrogênio, formando assim cristais mais perfeitos (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012), influenciando nas propriedades e na estabilidade térmica.

Na amostra com pré-tratamento ENZ foi verificado uma mudança na linha de base (Figura 32a), indicando a presença da transição vítrea destes nanocristais. Em geral a transição vítrea (T_g) é sobreposta pelas temperaturas de fusão, não sendo possível detectar as alterações de T_g em amido por DSC (LECORRE; BRAS;

DUFRESNE, 2012a). Neste caso, é possível constatar que a combinação de um pré-tratamento enzimático e a hidrólise ácida do amido de feijão promoveram uma redução na Tg dos SNCs obtidos.

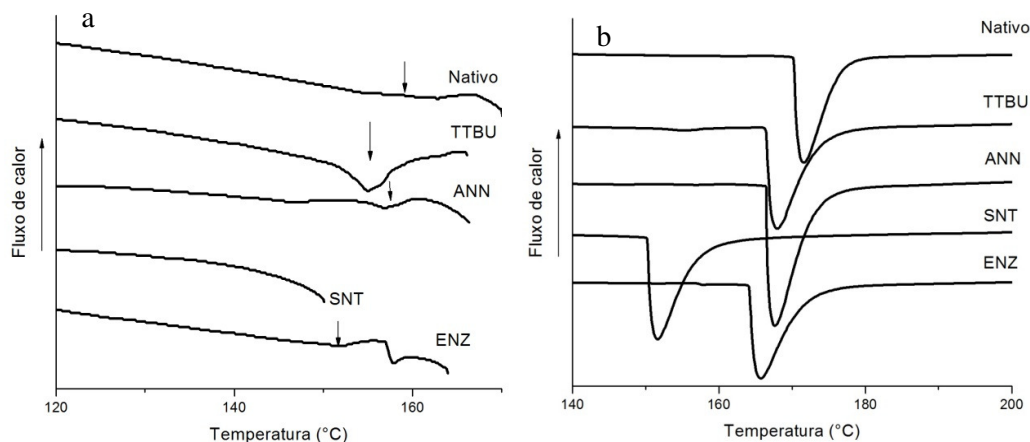


Figura 32 DSC dos amidos de feijão nativo, e modificados por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática (ENZ), após hidrólise ácida de 7 dias, (a) com destaque entre as temperaturas 120-70 °C e (b) 140-200 °C.

4.4.6 Conclusão

O amido de feijão apresentou um rendimento de SNCs, após a hidrólise elevado, em relação aos estudos já realizados na produção de nanocristais.

O TTBU e SNT se mostram como pré-tratamentos eficientes no aumento do rendimento de nanocristais em 5 dias de hidrólise, comparados com o amido nativo de feijão Carioca.

Os cristais tipo-A presentes no amido de feijão Carioca pareceram ser mais resistentes a hidrólise ácida que os cristais tipo-B.

O pré-tratamento ANN promove a formação de nanocristais com elevada estabilidade térmica..

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As modificações com tratamento térmico de baixa umidade (TTBU), annealing (ANN), ultrassom (SNT) e hidrólise enzimática com α -amilase (ENZ)

influenciam as propriedades dos amidos de pinhão e de feijão, bem como, na produção e nas características dos nanocristais (SNCs).

O TTBU e o SNT aumentam o rendimento dos SNCs (de 18 a 44%) mas promovem perdas na cristalinidade relativa dos mesmo, enquanto que, o ANN promove melhor estabilidade térmica dos SNCs.

A decisão pela aplicação de um pré-tratamento, que promova alterações nos nanocristais resultantes, dependerá da aplicação dos mesmos.

O amido de feijão Carioca se mostrou promissor para a produção de SNCs, principalmente pelo elevado rendimento (35,23 a 42,31%) após a hidrólise com ácido sulfúrico, sendo 180% maior do que o verificado na literatura até então. No entanto estudos buscando amidos com outras fontes, bem como, com grânulos menores, pode facilitar a redução do tamanho das partículas para escalas nanométricas.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS, K. A.; KHALIL, S. K.; HUSSIN, A. S. M. Modified Starches and Their Usages in Selected Food Products : A Review Study. **Journal od Agricultural Science**, v. 2, n. 2, p. 90–100, jun. 2010.
- ADAM, F. et al. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. **Bioresource technology**, v. 114, p. 457–65, jun. 2012.
- ADEBOWALE, K. O. et al. Modification and properties of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa* Hochst. Ex A. Rich.) Harms starch I: Heat moisture treatments and annealing. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1947–1957, out. 2009.
- ADEBOWALE, K. O.; AFOLABI, T. A.; OLU-OWOLABI, B. I. Hydrothermal treatments of Finger millet (*Eleusine coracana*) starch. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 6, p. 974–983, nov. 2005.
- ADEOSUN SUNDAY, O. et al. Review of Green Polymer Nanocomposites. **Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering**, v. 11, n. 4, p. 483–514, 2012.
- ALIYU, M.; HEPHER, M. J. Effects of ultrasound energy on degradation of cellulose material. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 7, p. 265–268, out. 2000.
- AMBIGAIPALAN, P. et al. Starch chain interactions within the amorphous and crystalline domains of pulse starches during heat-moisture treatment at different temperatures and their impact on physicochemical properties. **Food chemistry**, v. 143, p. 175–84, 15 jan. 2014.
- ANGELLIER, H. et al. Optimization of the preparation of aqueous suspensions of waxy maize starch nanocrystals using a response surface methodology. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1545–1551, jun. 2004.
- ANGELLIER, H.; MOLINA-BOISSEAU, S.; DUFRESNE, A. Mechanical properties of waxy maize starch nanocrystal reinforced natural rubber. **Macromolecules**, v. 38, n. 22, p. 9161–9170, out. 2005.
- ANGELLIER-COUSSY, H. et al. The molecular structure of waxy maize starch nanocrystals. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 12, p. 1558–66, 17 ago. 2009.

- ASHAMOL, A. et al. Nanocomposites of crosslinked starch phthalate and silane modified nanoclay: Study of mechanical , thermal , morphological , and biodegradable characteristics. **Starch - Stärke**, v. 65, n. 5-6, p. 443–452, set. 2013.
- ASKELAND, D. R.; FULAY, PRADEEP, P.; WRIGHT, WENDELIN, J. **The Science and Engineering of Materials**. 6. ed. Cengage Learning, 2010. v. 1 p. 896
- ATKIN, N. J. et al. Localisation of Amylose and Amylopectin in Starch Granules Using Enzyme-Gold Labelling. **Starch - Stärke**, v. 51, n. 5, p. 163–172, maio 1999.
- BEL HAAJ, S. et al. Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1625–32, 15 fev. 2013.
- BELLO-PÉREZ, L. A. et al. Isolation and characterization of starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: A novel starch for application in food industry. **Starch - Stärke**, v. 58, n. 6, p. 283–291, jun. 2006.
- BEMILLER, J. N. Starch Modification: Challenges and Prospects-Review. **Starch - Stärke**, v. 49, n. 4, p. 127–131, abr. 1997.
- BERTOFT, E. et al. Internal unit chain composition in amylopectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 527–543, nov. 2008.
- BERTOFT, E. et al. The fine structure of cassava starch amylopectin. Part 2: building block structure of clusters. **International journal of biological macromolecules**, v. 47, n. 3, p. 325–35, 1 out. 2010.
- BLAZEK, J.; GILBERT, E. P. Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3275–89, 13 dez. 2010.
- BRUMOVSKY, J. O.; THOMPSON, D. B. Production of Boiling-Stable Granular Resistant Starch by Partial Acid Hydrolysis and Hydrothermal Treatments of High-Amylose Maize Starch. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 6, p. 680–689, nov. 2001.
- BULÉON, A et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85–112, ago. 1998.
- CAI, J. et al. Structural and functional properties of C-type starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 289–300, jan. 2014.
- CALLISTER, W. D. J.; RETHWISCH, D. G. Polymer Structures. In: WILLIAM D. CALLISTER, J.; RETHWISCH, D. G. (Eds.). **Materials Science and Engineering: An Introduction**. 8. ed. John Wiley & Sons Inc., 2010. v. 1 p. 984.
- CHAM, S.; SUWANNAPORN, P. Effect of hydrothermal treatment of rice flour on various rice noodles quality. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 284–291, maio 2010.

- CHAPMAN, R.; MULVANEY, P. Electro-optical shifts in silver nanoparticle films. **Chemical Physics Letters**, v. 349, n. December, p. 358–362, 2001.
- CHEETHAM, N. W. .; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 4, p. 277–284, ago. 1998.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–35, jul. 2011.
- CHENG, W. et al. Impact of ultrasonic treatment on properties of starch film-forming dispersion and the resulting films. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 3, p. 707–711, jul. 2010.
- CHIOU, B. et al. Extruded Starch – Nanoclay Nanocomposites : Effects of Glycerol and Nanoclay Concentration. **Polymer Engineering and Science**, v. 47, n. 11, p. 1898–1904, nov. 2007.
- CHIU, C.; SOLAREK, D. Modification of Starches. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. (Eds.). **Starch Chemistry and Technology**. Third Edit ed. Elsevier Inc., 2009. p. 629–655.
- CHUNG, H.-J.; HOOVER, R.; LIU, Q. The impact of single and dual hydrothermal modifications on the molecular structure and physicochemical properties of normal corn starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 2, p. 203–10, 1 mar. 2009.
- CHUNG, H.-J.; LIU, Q.; HOOVER, R. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 436–447, fev. 2009.
- CLADERA-OLIVERA, F. et al. Thermodynamic properties of moisture desorption of raw pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 5, p. 900–907, maio 2008.
- COLONNA, P.; BULEON, A. Thermal transitions of starches. In: BERTOLINI, A. C. (Ed.). **Starches: Characterization, Properties, and Applications**. Taylor & F ed. New York: CRC Press, 2010. p. 72–95.
- CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Starch Characterisation of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* Seeds. **Starch - Stärke**, v. 59, n. 6, p. 284–289, jun. 2007.

- CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Comparative Study of the Starch Digestibility of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* Seed Flour. **Starch - Stärke**, v. 60, n. 3-4, p. 192–198, mar. 2008.
- CORDENUNSI, B. R. et al. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3412–6, 2 jun. 2004.
- CRAVOTTO, G. et al. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 898–902, jul. 2008.
- CZECHOWSKA-BISKUP, R. et al. Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 175–184, maio 2005.
- DA PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1076–80, jul. 2013.
- DAUDT, R. M. et al. Determination of properties of pinhão starch: Analysis of its applicability as pharmaceutical excipient. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 420–429, jan. 2014.
- DENYER, K.; SMITH, S. M. Starch Synthesis. In: MURPHY, D. J.; MURRAY, B. G. (Eds.). **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. 3. ed. Elsevier Ltd., 2003. p. 1249–1256.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1 mar. 1956.
- DUFRESNE, A. Comparing the mechanical properties of high performances polymer nanocomposites from biological sources. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 6, n. 2, p. 322–30, fev. 2006.
- DUFRESNE, A. Processing of polymer nanocomposites reinforced with polysaccharide nanocrystals. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 6, p. 4111–28, jun. 2010.
- DUFRESNE, A.; CAVAILLE, J. New Nanocomposite Materials: Microcrystalline starch reinforced thermoplastic. **Macromolecules**, v. 29, n. 96, p. 7624–7626, ago. 1996.
- FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WEISS, J. **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing**. Food Engin ed. Urbana: Springer London, 2011. p. 666

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Food and agricultural commodities production: Country rank in the world, by commodity**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>>.

FRENCH, D. Chemical and Physical Properties of Starch. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 1048–1061, out. 1973.

GALLANT, D. J. et al. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymic degradation. **European journal of clinical nutrition**, v. 46 Suppl 2, p. S3–16, out. 1992.

GÉRARD, C. et al. Relationship between branching density and crystalline structure of A- and B-type maize mutant starches. **Carbohydrate research**, v. 326, n. 2, p. 130–44, 2 jun. 2000.

GÉRARD, C. et al. Amylose determination in genetically modified starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 1, p. 19–27, jan. 2001.

GÉRARD, C. et al. Order in maize mutant starches revealed by mild acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 131–141, maio 2002.

GONÇALVES, P. M. et al. Characterization of starch nanoparticles obtained from *Araucaria angustifolia* seeds by acid hydrolysis and ultrasound. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 21–27, set. 2014.

GOULA, A. M. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 492–498, ago. 2013.

HABITANTE, A. M. B. Q. et al. Phase transitions of cassava starch dispersions prepared with glycerol solutions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, n. 2, p. 599–604, 22 jul. 2008.

HANNAH, L. C.; JAMES, M. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 160–5, abr. 2008.

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

HOOVER, R. Acid-Treated Starches. **Food Reviews International**, v. 16, n. 3, p. 369–392, 20 jul. 2000.

HOOVER, R. et al. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 399–413, mar. 2010.

HOOVER, R. The impact of heat-moisture treatment on molecular structures and properties of starches isolated from different botanical sources. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 9, p. 835–47, out. 2010.

HOOVER, R.; MANUEL, H. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of cereal, legume, and tuber starches. **Food Research International**, v. 29, n. 8, p. 731–750, 15 jan. 1996a.

HOOVER, R.; MANUEL, H. The Effect of Heat–Moisture Treatment on the Structure and Physicochemical Properties of Normal Maize, Waxy Maize, Dull Waxy Maize and Amylomaize V Starches. **Journal of Cereal Science**, v. 23, n. 2, p. 153–162, mar. 1996b.

HOOVER, R.; RATNAYAKE, W. S. Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 489–498, set. 2002.

HU, A. et al. Ultrasonically aided enzymatical effects on the properties and structure of mung bean starch. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 20, p. 146–151, out. 2013.

HUGHES, T. et al. Composition, morphology, molecular structure, and physicochemical properties of starches from newly released chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Canada. **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 627–635, jun. 2009.

IIDA, Y. et al. Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 140–146, abr. 2008.

IMBERTY, A. et al. New Three-Dimensional Structure for A-Type Starch. **Macromolecular Symposia**, v. 20, n. 10, p. 2634–2636, out. 1987.

IMBERTY, A.; PEREZ, S. A Revisit to the Three-Dimensional Structure of B-Type Starch. **Biopolymers**, v. 27, n. 8, p. 1205–1221, ago. 1988.

ITOH, K. et al. Introduction of Wx Transgene into Rice wx Mutants Leads to Both High- and Low-Amylose Rice. **Plant Cell Physiology**, v. 44, n. 5, p. 473–480, maio 2003.

JAMBRAK, A. R. et al. Ultrasound effect on physical properties of corn starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 91–100, jan. 2010.

- JANE, J.; WONG, K.; 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, n. 3, p. 219–227, maio 1997.
- JANES, K. A et al. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 255–67, 15 jun. 2001.
- JAYAKODY, L.; HOOVER, R. The effect of lintnerization on cereal starch granules. **Food Research International**, v. 35, n. 7, p. 665–680, jan. 2002.
- JAYAKODY, L.; HOOVER, R. Effect of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of starches from different botanical origins – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 691–703, nov. 2008.
- JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 2, p. 210–8, abr. 2004.
- KARIM, A. A. et al. Pasting and retrogradation properties of alkali-treated sago (*Metroxylon sagu*) starch. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 6, p. 1044–1053, ago. 2008.
- KIM, H. et al. Effect of ultrasonic treatments on nanoparticle preparation of acid-hydrolyzed waxy maize starch. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 2, p. 582–8, 2 abr. 2013.
- KIM, H.-Y. et al. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. **Starch - Stärke**, v. 64, n. 5, p. 367–373, 19 maio 2012.
- KIM, J.-Y.; PARK, D.-J.; LIM, S.-T. Fragmentation of Waxy Rice Starch Granules by Enzymatic Hydrolysis. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 182–187, mar. 2008.
- KLEIN, B. et al. Effect of single and dual heat-moisture treatments on properties of rice, cassava, and pinhao starches. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 2, p. 1578–84, 6 nov. 2013.
- KONG, X. et al. Influence of acid hydrolysis on thermal and rheological properties of amaranth starches varying in amylose content. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1800–7, jun. 2012.
- KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 146–158, mar. 2007.
- KUMARI, M.; UROOJ, A.; PRASAD, N. N. Effect of storage on resistant starch and amylose content of cereal–pulse based ready-to-eat commercial products. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1425–1430, jan. 2007.

- LAN, H. et al. Impact of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of normal, waxy and high amylose bread wheat starches. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 663–675, dez. 2008.
- LE CORRE, D. et al. Optimization of the batch preparation of starch nanocrystals to reach daily time-scale. **Starch - Stärke**, v. 64, p. 489–496, jun. 2012.
- LECORRE, D. et al. Enzymatic pretreatment for preparing starch nanocrystals. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 1, p. 132–7, 9 jan. 2012.
- LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: A review. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1139–53, 10 maio 2010.
- LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of botanic origin and amylose content on the morphology of starch nanocrystals. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 12, p. 7193–7208, 19 nov. 2011.
- LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of native starch's properties on starch nanocrystals thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 658–666, jan. 2012a.
- LECORRE, D. S.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of the Botanic Origin of Starch Nanocrystals on the Morphological and Mechanical Properties of Natural Rubber Nanocomposites. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 297, n. 10, p. 969–978, 13 out. 2012b.
- LEE, K. Y.; LEE, S.; LEE, H. G. Effect of the degree of enzymatic hydrolysis on the physicochemical properties and in vitro digestibility of rice starch. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 1333–1340, 31 out. 2010.
- LI, C.; SUN, P.; YANG, C. Emulsion stabilized by starch nanocrystals. **Starch - Stärke**, v. 64, p. 497–502, 29 fev. 2012.
- LIN, N. et al. Preparation, Modification, and Application of Starch Nanocrystals in Nanomaterials: A Review. **Journal of Nanomaterials**, p. 1–13, 2011.
- LIU, H. et al. Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 3, p. 357–363, ago. 2006.
- MA, X.; YU, J.; KENNEDY, J. F. Studies on the properties of natural fibers-reinforced thermoplastic starch composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 1, p. 19–24, out. 2005.
- MASON, T. J.; LORIMER, J. P. General Principles. In: MASON, T. J.; LORIMER, J. P. (Eds.). **Applied Sonochemistry: Uses o Power Ultrasound in Chemistry and Processing**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. p. 26–74.

- MASON, T. J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Sonochemistry**, v. 3, n 1, p. 253–269, 1996.
- MIAO, M. et al. Impact of mild acid hydrolysis on structure and digestion properties of waxy maize starch. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 506–513, maio 2011.
- 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, nov. 2003.
- NITSCHKE, M. . et al. Biopolymers on food technology: production and applications of modified starches. In: BERTOLINI, A. C. . (Ed.). **Biopolymers Technology**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2007. p. 13–44.
- NODA, T. et al. Relationships between chain length distribution of amylopectin and gelatinization properties within the same botanical origin for sweet potato and buckwheat. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 153–158, out. 1998.
- O'BRIEN, S.; WANG, Y.-J. Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -amylase and glucoamylase. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 4, p. 597–607, jun. 2008.
- PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the Physical Chemistry of Starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n. 1, p. 1–17, jul. 2001.
- PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 147–154, abr. 2008.
- PERERA, C.; HOOVER, R.; MARTIN, A. M. The effect of hydroxypropylation on the structure and physicochemical properties of native , defatted and heat-moisture treated potato starches. **Food Research International**, v. 30, n. 314, p. 235–247, 1997.
- PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch - Stärke**, v. 62, n. 8, p. 389–420, 5 jul. 2010.
- PINTO, V. Z. et al. Physicochemical, crystallinity, pasting and thermal starch properties of heat-moisture-treated pinhao. **Starch - Stärke**, v. 64, p. 855–863, nov. 2012.
- PINTO, V. Z. et al. Molecular structure and granule morphology of native and heat-moisture-treated pinhão starch. **International Journal of Food Science and Technology**, v. accept, 2014.

- QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 16, p. 2693–700, 15 nov. 2004.
- RANI, P. R. et al. Storage studies on pinto beans under different moisture contents and temperature regimes. **Journal of Stored Products Research**, v. 52, p. 78–85, jan. 2013.
- RIOS, G. M. et al. Progress in enzymatic membrane reactors – a review. **Journal of Membrane Science**, v. 242, n. 1-2, p. 189–196, out. 2004.
- ROCHA, T. S. et al. Structural characterization of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) starch and the effect of annealing on its semicrystalline structure. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 4208–16, 27 abr. 2011.
- RUPOLLO, G. et al. Pasting, morphological, thermal and crystallinity properties of starch isolated from beans stored under different atmospheric conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1403–1409, ago. 2011.
- SANDHU, K.; SINGH, N. Some properties of corn starches II: Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1499–1507, 2007.
- SARGEANT, J. G.; WYCOMBE, H. Determination of Amylose : Amylopectin ratios of starches. **Starch - Stärke**, v. 34, n. 3, p. 89–92, 1982.
- SCHLEMMER, D.; OLIVEIRA, E. R. DE; SALES, M. J. A. Polystyrene / thermoplastic starch blends with different plasticizers preparation and thermal characterization. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 635–638, mar. 2007.
- SCHMIDT, G.; MALWITZ, M. M. Properties of polymer – nanoparticle composites. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, n. 1, p. 103–108, mar. 2003.
- SHOGREN, R. L. Effect of moisture content on the melting and subsequent physical aging of cornstarch. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, n. 2, p. 83–90, jan. 1992.
- SINGH, V.; ALI, S. Z. Acid degradation of starch. The effect of acid and starch type. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 2, p. 191–195, fev. 2000.
- SIQUEIRA, G. et al. High reinforcing capability cellulose nanocrystals extracted from *Syngonanthus nitens* (Capim Dourado). **Cellulose**, v. 17, n. 2, p. 289–298, 24 nov. 2009.
- SMITH, A. M. The biosynthesis of starch granules. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 335–41, jan. 2001.

SMITH, J.; BEDROV, D.; SMITH, G. D. A molecular dynamics simulation study of nanoparticle interactions in a model polymer-nanoparticle composite. **Composites Science and Technology**, v. 63, n. 11, p. 1599–1605, ago. 2003.

SOUZA, J. M. L. DE. **Caracterização e efeitos do armazenamento de amêndoas com películas e despelículas sobre propriedades das frações proteica e lipídica de castanha-do-brasil (Tese de Doutorado)**. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Pelotas, 2013.

SPADA, J. C. et al. Microencapsulation of β -carotene using native pinhão starch, modified pinhão starch and gelatin by freeze-drying. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 1, p. 186–194, 9 jan. 2012a.

SPADA, J. C. et al. Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1166–1173, ago. 2012b.

SRICHUWONG, S. et al. 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, 20 jun. 2005.

STAHL, J. A. et al. Physicochemical properties of Pinhão (*Araucaria angustifolia*, Bert, O. Ktze) starch phosphates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 1206–1214, set. 2007.

SUSLICK, K. S. Sonochemistry. **Science**, v. 247, n. 4949, p. 1439–1445, mar. 1990.

TESTER, R. F.; DEBON, S. J. Annealing of starch - a review. **International journal of biological macromolecules**, v. 27, n. 1, p. 1–12, 16 mar. 2000.

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

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

TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and Gelatinization of Cereal Starches. I. Effects of Amylopectin, Amylose, and Lipids. **Cereal Chemistry**, v. 6, n. 67, p. 551–557, 1990.

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

THIELEMANS, W.; BELGACEM, M. N.; DUFRESNE, A. Starch nanocrystals with large chain surface modifications. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 22, n. 10, p. 4804–10, 9 maio 2006.

THYS, R. C. S. et al. The effect of acid hydrolysis on the technological functional properties of pinhão (*Araucaria brasiliensis*) starch. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. sup.1, p. 89–94, fev. 2013.

USDA. **National Nutrient Database for Standard Reference**. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/>>. Acesso em: 5 maio. 2014.

UTHUMPORN, U.; ZAIDUL, I. S. M.; KARIM, A. A. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 47–54, mar. 2010.

VAMADEVAN, V. **Organization of glucan chains in starch granules as revealed by hydrothermal treatment (Ph. D. Thesis)**. University of Guelph, Guelph, 2013.

VAMADEVAN, V. et al. Impact on molecular organization of amylopectin in starch granules upon annealing. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 1045–1055, out. 2013.

VAMADEVAN, V. et al. Hydrothermal treatment and iodine binding insights into the organization of glucan chains within the semi-crystalline lamella of corn starch granules. **Biopolymers**, n. 612, p. in proof, 2014.

VAMADEVAN, V.; BERTOFT, E.; SEETHARAMAN, K. On the importance of organization of glucan chains on thermal properties of starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1653–1659, 15 fev. 2013.

VAN SOEST, J. J. G. et al. The influence of starch molecular mass on the properties of extruded thermoplastic starch. **Polymer**, v. 37, n. 16, p. 3543–3552, ago. 1996.

VANDEPUTTE, G. . et al. Rice starches. II. Structural aspects provide insight into swelling and pasting properties. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 1, p. 53–59, jul. 2003.

VANIER, N. L. **Armazenamento de cultivares de feijão e seus efeitos na qualidade tecnológica dos grãos e nas propriedades do amido (Dissertação de Mestrado)**. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

VANIER, N. L. et al. Physicochemical, crystallinity, pasting and morphological properties of bean starch oxidised by different concentrations of sodium hypochlorite. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1255–1262, abr. 2012.

VARATHARAJAN, V. et al. The impact of heat-moisture treatment on the molecular structure and physicochemical properties of normal and waxy potato starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 466–475, jun. 2010.

- VARATHARAJAN, V. et al. Impact of structural changes due to heat-moisture treatment at different temperatures on the susceptibility of normal and waxy potato starches towards hydrolysis by porcine pancreatic alpha amylase. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2594–2606, nov. 2011.
- VASANTHAN, T.; HOOVER, R. The effect of annealing on the physicochemical properties of wheat, oat, potato and lentil. **Journal of Food Biochemistry**, v. 17, n. 709, p. 303–325, out. 1994.
- VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 905–911, dez. 2010.
- VERGNES, B.; VALLE, G. DELLA; COLONNA, P. Rheological Properties of Biopolymers and Applications to Cereal Processing. In: BRESLAUER, K.; KALETUNC, G. (Eds.). **Characterization of Cereal and Flour**. Marcel Dek ed. New York: CRC Press, 2003. p. 221–279.
- VERMEYLEN, R. et al. Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1775–86, 2004.
- VERMEYLEN, R.; GODERIS, B.; DELCOUR, J. A. An X-ray study of hydrothermally treated potato starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 364–375, maio 2006.
- WAIGH, T. A et al. The phase transformations in starch during gelatinisation: a liquid crystalline approach. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 2, p. 165–76, 8 set. 2000.
- WANG, L. et al. Structures and physicochemical properties of acid-thinned corn, potato and rice starches. **Starch - Stärke**, v. 53, p. 570–576, nov. 2001.
- WANG, S.; COPELAND, L. Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. accept, 25 set. 2013.
- WASSERMAN, L. A. et al. Preparation of wheat starch Treatment of gels and DSC characterization. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 1, p. 153–157, fev. 2007.
- WEI, C. et al. Formation of semi-compound C-type starch granule in high-amylose rice developed by antisense RNA inhibition of starch-branching enzyme. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 11097–104, 27 out. 2010.
- WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Caractrization of Pinhão Starches. Part I: Extration and properties od the starch granules. **Starch - Stärke**, v. 37, n. 7, p. 224–117, 1985.

- WU, Y. et al. Preparation of microporous starch by glucoamylase and ultrasound. **Starch - Stärke**, v. 63, n. 4, p. 217–225, 4 abr. 2011.
- YAI, H. Mechanical , thermal and structural properties of rice starch films reinforced with rice starch nanocrystals. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 439–449, jan. 2013.
- YOUSIF, A. M.; KATO, J.; DEETH, H. C. Effect of Storage on the Biochemical Structure and Processing Quality of Adzuki Bean (*Vigna angularis*). **Food Reviews International**, v. 23, n. 1, p. 1–33, jan. 2007.
- ZAVAREZE, E. D. R. et al. Effect of heat-moisture treatment on rice starch of varying amylose content. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 358–365, jul. 2010.
- ZAVAREZE, E. D. R.; DIAS, A. R. G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 317–328, jan. 2011.
- ZENKER, M.; HEINZ, V.; KNORR, D. Application of Ultrasound-Assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 9, p. 1642–1649, set. 2003.
- ZHANG, G.; AO, Z.; HAMAKER, B. R. Slow digestion property of native cereal starches. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3252–8, nov. 2006.
- ZHANG, G.; VENKATACHALAM, M.; HAMAKER, B. R. Structural basis for the slow digestion property of native cereal starches. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3259–66, nov. 2006.
- ZHANG, S.-D. et al. Modified Corn Starches with Improved Comprehensive Properties for Preparing Thermoplastics. **Starch - Stärke**, v. 59, n. 6, p. 258–268, jun. 2007.
- ZHANG, Z. et al. Sonication Enhanced Cornstarch Separation. **Starch - Stärke**, v. 57, n. 6, p. 240–245, jun. 2005.
- ZHENG, J. et al. Dual-frequency ultrasound effect on structure and properties of sweet potato starch. **Starch - Stärke**, v. 65, p. 621–627, jul. 2013.
- ZHONG, Z.; SUN, X. S. Thermal characterization and phase behavior of cornstarch studied by differential scanning calorimetry. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 4, p. 453–459, ago. 2005.
- ZHU, F.; WANG, S.; WANG, Y.-J. Physical properties and enzyme susceptibility of rice and high-amylose maize starch mixtures. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 93, n. 12, p. 3100–6, set. 2013.

ZUO, J. Y. et al. The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 16, n. 4, p. 462–8, abr. 2009.

ZUO, Y. Y. J. et al. Quantification of high-power ultrasound induced damage on potato starch granules using light microscopy. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 421–6, maio 2012.