UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Tese

Estrutura interna de grânulos de amido de batata modificados por tratamento térmico em baixa umidade e síntese de fenil carbonatos de amido para obtenção de derivados funcionalizados

Josiane Bartz

Pelotas, 2017

Josiane Bartz

Estrutura interna de grânulos de amido de batata modificados por tratamento térmico em baixa umidade e síntese de fenil carbonatos de amido para obtenção de derivados funcionalizados

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 Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação:
Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias - UFPel
Prof. Drª. Elessandra da Rosa Zavareze - UFPel
Prof. Dr Thomas Heinze – Universidade de Jena- Alemanha

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B283e Bartz, Josiane

Estrutura interna de grânulos de amido de batata modificados por tratamento térmico em baixa umidade e síntese de fenil carbonatos de amido para obtenção de derivados funcionalizados / Josiane Bartz ; Alvaro Renato Guerra Dias, Elessandra da Rosa Zavareze, orientadores. — Pelotas, 2017.

98 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Amido de batata. 2. Gelatinização química de superfí. 3. Tratamento térmico em baixa umidade. 4. Fenil carbonatos de amido. 5. Esterificação homogênea. I. Dias, Alvaro Renato Guerra, orient. II. Zavareze, Elessandra da Rosa, orient. III. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Josiane Bartz

Estrutura interna de grânulos de amido de batata modificados por tratamento térmico em baixa umidade e síntese de fenil carbonatos de amido para obtenção de derivados funcionalizados

Tese aprovada como requisito parcial, para a obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.Data da Defesa:

Data da defesa: 20 de abril de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Alvaro Renato Guerra Dias (Orientador), Doutor em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas;

Profª. Daniela Bianchini, Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

Prof. Jander Luis Fernandes Monks, Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas;

Prof. Fabrízio da Fonseca Barbosa, Doutor em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa;

Shanise Lisie Mello El Halal, Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

“Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o Senhor teu Deus, é contigo por onde quer que andares”. Josué 1.9

Agradecimentos

À minha querida família, minha mãe Marli Bartz, e meus irmãos Carlinhos e Dudu (aqui cabe incluir minha cunhada Caty e o meu doce recem chegado sobrinho Nicolas). Tenho orgulho da nossa família e da nossa história. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em tudo o que faço. Mãe, já deixei registrado uma vez nos agradecimentos do mestrado, mas há coisas que precisam ser repetidas pela verdade e importância que possuem: Mãe, obrigada por ter batalhado duro na vida para criar e educar a mim e aos meus irmãos com dignidade. Tenho muito orgulho de ser tua filha. Qualquer ganho que eu possa desfrutar nessa vida, será sempre mérito teu também.

Ao meu amado Marc Kostag, pelo amor, amizade e parceria indescritíveis. Foi preciso ir longe para te achar. Sou grata a tudo que me levou até ti e sou mais grata ainda por como temos escolhido viver a nossa história. De todas as coisas boas e belas que vivi na Alemanha, a nossa amizade e amor é o que tenho mais gratidão. Obrigada pela alegria de viver e sonhar a vida contigo. Em qualquer lugar desse mundão de meu Deus: eu, você e o nosso biscoitão Kodinhas! Ich liebe dich!

Aos amigos que são família: Fabi, Chico, Marcos, Dri, La (tia Seléia e Laís), Viti, Juliana e Emerson (Fernanda). Sou afortunada por tê-los como amigos, os amo muito e queria deixar registrado o quanto vocês são essenciais na minha vida e da diferença que fazem nela. Em especial à Fabi (minha irmã da vida, primeira amiga feita na infância, mãe das minhas preciosas sobrinhas/afilhadas, Dudinha e Aninha. Não podia deixar de registrar novamente o quanto és parte de tudo o que colho agora) e ao Marcos (Por todo o apoio, parceria, incentivo e torcida durante toda a minha vida acadêmica. Tenho muito orgulho do nosso passado e de como o nosso relacionamento se transformou no que é hoje. Não poderia deixar de mencionar o quão grata sou por fazeres parte dessa trajetória).

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos e convívio, em especial aos meus orientadores, Alvaro e Elessandra. Obrigada pela confiança, amizade e suporte durante esse tempo de pós graduação. Assim como ao prof. Thomas Heinze da Universidade de Jena, por me receber, auxiliar e orientar durante o período sanduiche na Alemanha..

Aos colegas do LabGrãos, em especial às amigas queridas que a pós me deu, Nelisa e Gabriela, e aos colegas do Laboratório de Polímeros da Universidade de Jena, em especial ao Robert Hampe e Marc Kostag, pelo precioso auxílio e amizade durante o desenvolvimento do capítulo 3 da tese. Vielen Dank!

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 Pólo de Inovação Tecnológica em Alimentos da Região Sul e ao programa Ciência sem fronteiras (CsF), pelo apoio financeiro.

Resumo

BARTZ, Josiane. **Estrutura interna de grânulos de amido de batata modificados por tratamento térmico em baixa umidade e síntese de fenil carbonatos de amido para obtenção de derivados funcionalizados**. 2017. 98f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

No capítulo 1 e 2 deste trabalho foi investigada a estrutura interna do grânulo de amido modificado por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) em diferentes teores de umidade a partir de gelatinização química de superfície com solução salina de LiCl concentrada para remoção de parte da superfície dos grânulos. No capítulo 1 foi estudado as propriedades morfológicas, estruturais, térmicas e algumas propriedades físico-químicas dos amidos antes e após a remoção de 30 e 50% da superfície granular. No capítulo 2 foi investigado as propriedades de pasta, morfológicas e suscetibilidade enzimática dos grânulos. Os amidos modificados por TTBU à 15 e 21% foram submetidos a remoção granular de 50% da superfície, bem como o TTBU também foi realizado em grânulos remanescentes do amido nativo sob as mesmas condições. A umidade de TTBU influencia na morfologia, organização estrutural, hidrólise, propriedades de pasta, térmicas e fisico-químicas de amido de batata, assim como as modificações observadas ocorrem de forma diferenciada ao longo das diferentes porções do grânulo. A remoção de camadas dos grânulos mostrou que as alterações promovidas pela modificação hidrotérmica ocorre em toda a porção granular e não apenas em determinadas partes isoladas. O capítulo 3 deste estudo aborda a síntese e caracterização de fenil carbonatos de amido com cloroformato de fenila em diferentes solventes e a subsequente conversão destes produtos com aminas para obter carbamatos de amido funcionalizados. Carbonatos de amido organossolúveis foram obtidos em *N,N*-dimetilformamida/LiCl e *N,N*- dimetilacetamida/LiCl e o GS de carbonatos foi facilmente controlado pela quantidade de reagente utilizado. A obtenção de produtos solúveis a partir de cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM Cl) como solvente alternativo para a esterificação do amido com cloroformato de fenila não foi possível. A estrutura dos carbonatos foi elucidada por RMN e FTIR, não sendo observado qualquer indício de reticulação. A conversão de fenil carbonatos de amido em carbamatos foi demonstrada a partir de reações de deslocamento nucleofílico com diferentes aminas. Os carbamatos correspondentes foram solúveis em água e solventes orgânicos.

Palavras-chave: Amido de batata, Gelatinização química de superfície, Tratamento térmico em baixa umidade, fenil carbonatos de amido, esterificação homogênea, aminólise.

Abstract

BARTZ, Josiane. **Internal structure of potato starch granules modified by heat treatment in low humidity and synthesis of phenyl carbonates of starch to obtain functionalized derivatives**. 2017. 98f. Thesis (Doctoral in Food Science and Technology) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

In Chapter 1 and 2 of this work was investigated the internal structure of low moisture heat treatment modified starch granule (TTBU) at different moisture contents by chemical surface gelatinization in concentrated LiCl solution to reveal the internal structure of the granules. In chapter 1 the morphological, structural, thermal and some physical-chemical properties were studied before and after the removal of 30 and 50% of the starch granular surface. In chapter 2 the morphological, pasting properties and enzymatic susceptibility of the granules were investigated. Starches modified by TTBU at 15 and 21% were subjected to 50% of granular surface removal, as well as TTBU was also performed on remaining native starch granules under the same conditions. TTBU moisture influences the morphology, structural organization, hydrolysis, pasting, thermal and physicochemical properties of potato starch. The removal of granular layers showed that the changes promoted by HMT occur throughout the whole granule and was pronounced at the core or peripheral region depending of the moisture content applied during HMT. Chapter 3 of this study focuses on the synthesis and characterization of starch phenyl carbonates obtained by conversion of starch with phenyl chloroformate in different solvents. In a subsequent conversion of the products with amines functionalized starch carbamates are available. Organo-soluble starch carbonates were synthesized in *N,N*-dimethylformamide/LiCl and *N,N*-dimethylacetamide/LiCl and the carbonate DS was easily controlled by the amount of reagent used. Obtaining soluble products from 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (BMIM Cl) as an alternative solvent for the esterification of the starch with phenyl chloroformate was not possible. The structure of the carbonates was elucidated by NMR and FTIR, with no evidence of crosslinking being observed. The conversion of phenyl carbonates intocarbamates has been demonstrated from nucleophilic displacement reactions with different amines. The corresponding carbamates were soluble in water and organic liquids.

Keywords: Starch potato, Chemical surface gelatinization, Heat moisture treatment, starch phenyl carbonates, homogeneous esterification, aminolysis.

Lista de Figuras

Figura 1 - Unidades estruturais de amilose (a) e amilopetina (b) 16
Figura 2 - Cadeias formadoras da molécula de amilopectina. (Círculos representam os resíduos de glicose, linhas horizontais e curvas correspondem às ligações α(1→4) e α(1→6), respectivamente, e o resíduo final à direita constitui a extremidade redutora da molécula). 17
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura lamelar de um grânulo de amido. [Onde A: pilhas de lamelas microcristalinas separadas por anéis de crescimento amorfos; B: vista ampliada das regiões amorfas e cristalinas; C: estruturas helicoidais duplas formadas por cadeias adjacentes de amilopectina, dando origem às lamelas cristalinas (os pontos de ramificação constituem as regiões amorfas)] 18
Figura 4 - Estruturas dos polimorfos cristalinos do tipo-A e tipo-B. [Onde (a): visão 3D das de dupla helice presentes em ambos polimorfos; (b): empacotamento cristalino em do tipo-A, contendo quatro moléculas de água (círculos fechados) para cada célula unitária; (c): polimorfo do tipo-B, contendo trinta e seis moléculas de água]. Linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio..... 19
Figura 5 - Esquema com as estruturas de bloquetes normal e defeituoso..... 20
Figura 6 - Visão geral dos diferentes níveis de organização da estrutura do grânulo de amido..... 22
Figura 7 - Representação esquemática das alterações ocorridas em uma suspensão de amido em excesso de água durante o aquecimento, resfriamento e armazenamento. 24
Figura 8 - Diagrama esquemático mostrando (A) a fusão de bloquetes na região superficial de um grânulo de amido durante TTBU, e (B) a redução no tamanho de bloquetes bem como o desenvolvimento de uma cavidade no centro de um grânulo de amido de batata após TTBU. 27
Figura 9 - Micrografias de luz polarizada dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) sob as umidades de 12, 15, 18, 21 e 24 %. Escala = 50 µm. Seta mostra ponto de ruptura granular..... 38
Figura 10 - Micrografias de luz polarizada do amido de batata TTBU a 15 % de umidade durante o processo de gelatinização química de superfície com solução de LiCl 13 mol.L-1 40
Figura 11 - Micrografia ótica dos grânulos de amido de batata nativo gelatinizados superficialmente após sucessivas etapas de agitação em água. 1ª (A1, A2), 2ª (B1, B2) e 3ª (C1, C2) lavagens..... 41
Figura 12 - D Micrografia de luz polarizada dos grânulos remanescentes de amido de batata TTBU à 24 % de umidade após remoção da superfície gelatinizada. 42
Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de batata nativo (A), superficialmente gelatinizados em solução de LiCl (B), e após remoção da superfície gelatinizada (C). Grânulos remanescentes dos amidos modificados por TTBU a 21 % (D) e 24 % (E) de umidade após a remoção da superfície gelatinizada. 44
Figura 14 - Difratogramas de raios-X dos amidos de batata nativo e modificados por TTBU e seus respectivos grânulos remanescentes em

diferentes regiões granulares. Onde: *GQS = gelatinização química de superfície (0, 30 e 50 % de remoção da superfície granular); **CR = cristalinidade relativa. 49
Figura 15 - Curvas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) e seus respectivos grânulos remanescentes após remoção de 30 e 50 % de superfície. 54
Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos amidos de batata nativos e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) nas umidade de 12, 15, 18, 21 e 24 % 60
Figura 17 - Viscoamilograma de amido de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) em diferentes umidades 62
Figura 18 - Viscoamilograma de amido de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) a 15 % de umidade antes e após remoção de 50 % da superfície granular 66
Figura 19 - Viscoamilograma de amido de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) a 21 % de umidade antes e após remoção de 50 % da superfície granular 66
Figura 20 - Hidrólise enzimática (%) dos amidos de batata de nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) 68
Figura 21 - Hidrólise enzimática (%) em amido de batata nativo e modificado por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) a 15 % de umidade antes e após remoção de 50 % da superfície granular 71
Figura 22 - Hidrólise enzimática (%) em amido de batata nativo e modificado por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) a 21 % de umidade antes e após remoção de 50 % da superfície granular. 72
Figura 23 - Esquema de síntese de fenil carbonato em N,N dimetilformamida (DMF)/LiCl, N,N-dimetilacetamida (DMA)/LiCl, ou cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM Cl) 79
Figura 24 - Esquema de síntese de carbamato de amido por aminólise de fenil carbonato de amido em N,N dimetilformamida (DMF) 80
Figura 25 - Espectro de RMN 1H de fenil carbonato de amido de mandioca (GS 1,48, amostra 9) em DMSO-d6. 82
Figura 26 - Espectro de FTIR de amido de milho nativo (abaixo) e de fenil carbonato de amido de milho (GS 1,47, amostra 3) (acima). 85
Figura 27 - Espectro de RMN 13C (62,5 MHz, DMSO-d6) do fenil carbonato de amido, GS = 1,48 (amostra 9) 86
Figura 28 - Estrutura dos carbamatos de amido com diferentes grupos funcionais terminais obtidos a partir de um procedimento simples de duas etapas: esterificação do amido com cloroformato de fenila e subsequente aminólise 87
Figura 29 - Espectro de RMN 13C (DMSO-d6) do p-aminobenzilamido carbamato, GSCarbamato = 1,06 90

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tempo e grau de remoção da superfície de grânulos de amido de batata nativo e modificados após tratamento com solução de LiCl 13 mol.L-1 39
Tabela 2 -Teor de amilose, poder de inchamennto (PI) e lixiviação de amilose (LAM) dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) e de seus respectivos grânulos remanescentes após remoção de 30 e 50 % da superfície 46
Tabela 3 - Propriedades térmicas dos amidos de batata nativos e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) em diferentes regiões granulares 52
Tabela 4 - Propriedades de pasta dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) 61
Tabela 5 - Propriedades de pasta dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) antes e após a remoção de 50 % da sua superfície 65
Tabela 6 - Síntese de fenil carbonato de amido pela reação do amido com cloroformato de fenila e piridina por 4 h a 0 °C 81
Tabela 7 - Síntese de fenil carbonato de amido pela reação de amido de milho com com cloroformato de fenila em cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM Cl)/piridina (1:1) à 80 °C 84
Tabela 8 - Síntese dos carbamatos de amido por aminólise dos fenil carbonatos de amido com aminas utilizando 2 mols de amina por mol de AGU de carbonato (2,0) em DMF a 60 °C 89

Sumário

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1 Amido 15
2.2.1 Composição e organização estrutural 15
2.2.2 Propriedades funcionais 22
2.2.3 Modificação de amido..... 24
2.2.3.1 Tratamento térmico em baixa umidade 25
2.2.4 Gelatinização química de superfície..... 27
3 CAPÍTULO 1 - Estudo dos grânulos de amido de batata modificados por tratamento térmico em baixa umidade pela técnica de gelatinização química de superfície..... 31
3.1 Introdução 31
3.2 Material e métodos 32
3.2.1 Material..... 32
3.3.2 Tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) 32
3.2.3 Gelatinização química de superfície dos grânulos de amido..... 33
3.2.4 Birrefringência e morfologia..... 34
3.2.5 Teor de amilose..... 34
3.2.6 Poder de inchamento e lixiviação de amilose..... 35
3.2.7 Cristalinidade relativa e difração de raios-x..... 35
3.2.8 Propriedades térmicas..... 35
3.2.9 Análise estatística 36
3.3 Resultados e discussão..... 36
3.3.1 Birrefringência e morfologia..... 36
3.3.2 Gelatinização química de superfície..... 38
3.3.3 Teor de amilose, poder de inchamento e lixiviação de amilose 45
3.3.4 Cristalinidade relativa e difração de raios-x..... 48
3.3.5 Propriedades térmicas..... 51
3.4 Conclusão 55
4 CAPÍTULO 2 - Propriedades de pasta, morfológica e suscetibilidade enzimática de amido de batata modificado por TTBU: estudo de grânulos inteiros e remanescentes após gelatinização química de superfície..... 56
4.1 Introdução 55
4.2 Material e métodos 57
4.2.1 Material..... 57
4.2.2 Tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) 57
4.2.3 Gelatinização química de superfície..... 58
4.2.4 Morfologia..... 58
4.2.5 Propriedades de pasta 58
4.2.6 Suscetibilidade enzimática 59
4.2.7 Análise estatística 59
4.3 Resultados e discussão..... 59
4.3.1 Morfologia..... 59
4.3.2 Propriedades de pasta 61
4.3.3 Hidrólise enzimática 67
4.4 Conclusão 73

5 CAPÍTULO 3 - Síntese de fenil carbonatos de amido como precursor para a obtenção de derivados funcionalizados 75
5.1 Introdução 75
5.2 Material e métodos 76
5.2.1 Material 76
5.2.2 Grau de susbtituição (GS) 77
5.2.3 Caracterização dos produtos 77
5.2.4 Sínteses 78
5.2.4.1 Síntese de fenil carbonato de amido em DMF/LiCl ou DMA/LiCl 78
5.2.4.2 Síntese de fenil carbonato de amido em 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM Cl) 79
5.2.4.3 Aminólise de fenil carbonato de amido em carbamatos 79
5.3 Resultados e discussão 80
5.3.1 Síntese de fenil carbonato de amido 80
5.3.2 Caracterização estrutural dos fenis carbonato de amido 84
5.3.3 Aminólise e caracterização dos amido carbonatos de fenila 87
5.4 Conclusão 90
6 REFERÊNCIAS 91

1 Introdução

O amido é um dos biopolímeros renováveis mais abudantes na natureza, o qual encontra ampla aplicação em diversas áreas da ciência de alimentos e polímeros (BULEÓN et al., 1998; HOOVER, 2010). A modificação de amidos pode ser obtida a partir de tratamentos químicos, físicos, enzimáticos e genéticos (SINGH; KAUR; McCARTHY, 2007) e consiste na alteração de características funcionais com consequente ampliação das possibilidades de uso.

O tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) é uma modificação física na qual suspensões de amido são aquecidas em condições de umidade reduzida (< 35 %) e altas temperaturas (80-130°C), o que preserva a estrutura granular mas pode alterar as propriedades do amido (JACOBS; DELCOUR, 1998). Apesar de uma ampla descrição na literatura das alterações nas propriedades físico-químicas de amidos de diferentes origens botânicas modificados por TTBU, os mecanismos de ação desse tratamento dentro dos grânulos permanece pouco esclarecido.

A estrutura dos grânulos de amido é complexa e consiste de vários níveis de organização: grânulos, anéis de crescimento, bloquetes, lamelas amorfa e cristalina, e cadeias de amilose e amilopectina (PÉREZ; BERTOFT, 2010). Portanto mudanças em diferentes níveis estruturais também podem ocorrer durante o TTBU. No entanto, a maioria das conclusões atuais sobre a organização estrutural e os mecanismos que são desencadeados durante a modificação de amidos por TTBU é apoiada em resultados embasados na totalidade do grânulo e não a partir de regiões específicas. Nesse sentido, a técnica de gelatinização química de superfície (GQS) é uma técnica que pode ser utilizada para o estudo da estrutura interna de grânulos de amido. Soluções concentradas de cloreto de lítio (LiCl) promovem uma gelatinização lenta do amido a partir da periferia granular do amido, permitindo obter frações de grânulos remanescentes com diferentes níveis de remoção das partes mais externas (PAN; JANE, 2000; KUAKPETOON; WANG, 2007).

Visando contribuir para a compreensão da estrutura interna do grânulo de amido modificado por TTBU e um melhor entendimento do mecanismo de ação desse tratamento, o amido de batata nativo e modificado por TTBU em diferentes teores de umidade foi submetido à gelatinização química de superfície com solução salina de LiCl concentrada para remoção de parte da sua superfície granular. As propriedades morfológicas, estruturais, térmicas e algumas propriedades físico-químicas dos amidos após a remoção de 30 e 50% da superfície granular estão abordadas no capítulo 1 desta tese. No capítulo 2, os amidos foram submetidos a remoção granular de 50% da superfície dos grânulos, bem como o TTBU também foi realizado em grânulos remanescentes do amido nativo sob as mesmas condições para efeito de comparação. As propriedades de pasta, morfológicas e suscetibilidade enzimática dos grânulos também foram investigadas.

Paralelamente, como parte do período sanduíche realizado na Friedrich-Schiller-Universität Jena, Alemanha, foi estudado a síntese de fenil carbonatos a partir de diferentes fontes de amido e solventes, visando a obtenção de um composto de plataforma na obtenção de derivados funcionalizados.

Os carbonatos de polissacarídos têm sido estudados como um tipo de derivado reativo, uma vez que são um composto de plataforma promissor, a fim de obter derivados multifuncionais deste biopolímero (ELSCHNER; GANSKE; HEINZE, 2013; ELSCHNER; HEINZE, 2015). A preparação de carbonatos de amido foi mencionada em patentes, as quais reivindicaram a síntese de diéster carbonato de amido ligado intermolecularmente utilizando etil carbonato de etileno como reagente (OPIE, 1956), bem como a conversão de amido com ésteres de ácido clorocarbônico (JAROWENKO; WURZBURG, 1966). No entanto, nenhuma destas patentes proporciona qualquer caracterização dos produtos obtidos.

Nesse sentido, a síntese de fenil carbonatos de amido apresentada no capítulo 3 teve por objetivo uma investigação elaborada de um mecanismo homogêneo e eficiente de síntese de fenil carbonatos de amido como um composto base, bem como a sua subsequente conversão com aminas para obter carbamatos de amido funcionais.

2 Revisão de Literatura

2.2 Amido

2.2.1 Composição e organização estrutural

O amido é um dos biopolímeros mais abundantes e amplamente distribuídos no mundo, de baixo custo e naturalmente renovável, o qual encontra ampla aplicação em diversas áreas da ciência de alimentos e polímeros em geral (TESTER; MORRISON, 1990; HOOVER, 2010). O amido é armazenado nas plantas na forma de grânulos semicristalinos de diferentes tamanhos e formas, os quais sob luz polarizada são birrefringentes, apresentando o modelo típico da cruz de Malta (GALLANT; BOUCHET; BULÉON; PÉREZ, 1992; BULEÓN et al., 1998).

Na maioria das fontes amiláceas os percentuais em massa de amilose e amilopectina variam entre 72 e 82% de amilopectina, e 18 e 33% de amilose. Outros componentes como proteínas, lipídios, fósforo e fibras também são encontrados em quantidades minoritárias. Na figura 1 são apresentadas as unidades estruturais de amilose e amilopectina. A amilose é definida como uma molécula linear formada por unidades de D-glicose unidas por ligações α(1→4) e difere em tamanho e estrutura, dependendo da origem botânica. Apresenta massa molecular entre $1x10^5$ e $1x10^6$ $g.mol^{-1}$ (BULÉON et al., 1998; BILIADERIS, 1991), e atualmente é bem estabelecido que certas moléculas são ligeiramente ramificadas por ligações α(1→6). Em solução aquosa a amilose adota uma estrutura em forma de espiral aleatória, pouco estável e tende a formar complexos simples de inclusão helicoidal com agentes complexantes apropriados (lipídios, iodo). Dependendo do tamanho desses agentes complexantes, a cadeia de amilose pode assumir uma estrutura helicoidal, com 6, 7 ou 8 unidades de glicose. O conteúdo restante de amilose está disposto livremente dentro dos grânulos em uma conformação desordenada (PÉREZ; BERTOFT, 2010).

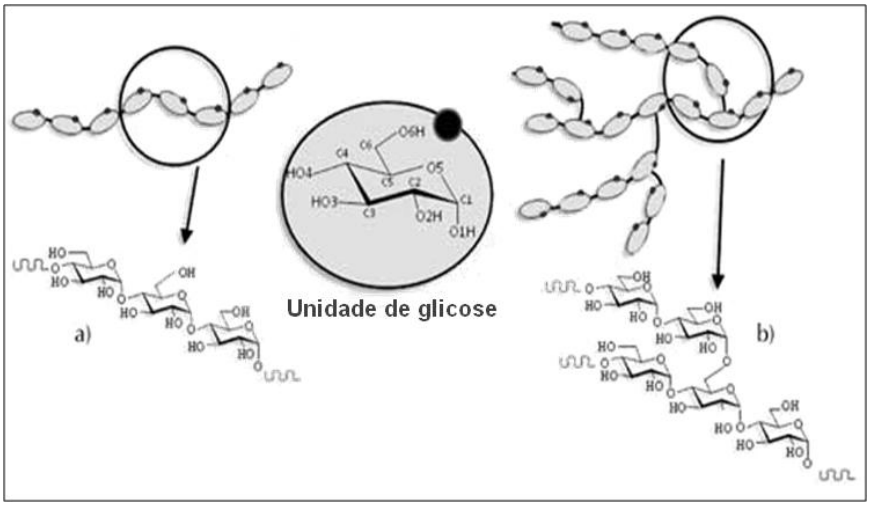


Figura 1 - Unidades estruturais de amilose (a) e amilopectina (b).
Fonte: PÉREZ; BERTOFT, 2010.

A amilopectina constitui uma estrutura intensamente ramificada unida por aproximadamente 95% de ligações α(1→4) e por 5% de ligações α(1→6), sendo uma molécula muito maior do que a amilose (massa molecular entre $1x10^7$ e 1.10^9 $g.mol^{-1}$) (BULÉON et al., 1998; BILIADERIS, 1991). A composição estrutural da amilopectina consiste de uma cadeia C principal (a qual carrega o grupo redutor da molécula) e de numerosas cadeias ramificadas conectadas por ligações α(1→6), constituídas pelas cadeias curtas A (sem ramificação) e por cadeias longas B (ramificadas por uma ou mais cadeias A ou B) (Figura 2). Os pontos de ramificação não são distribuídos aleatoriamente nas moléculas de amilopectina, mas estão agrupados em *clusters*. Por participarem em mais do que um *cluster* cristalino de cadeias laterais, as cadeias B são classificadas de acordo com o número de *clusters* de cadeias laterais em que participam. As cadeias B são classificadas em B1, B2, B3 ou B4, dependendo do seu comprimento e do número de *clusters* que abrangem. Cadeias B1 são cadeias curtas, as quais compoem um *cluster*, enquanto as demais são cadeias longas que agem como cadeias de ligação entre dois ou mais *clusters* (Hizukuri, 1986). De acordo com esse modelo, as longas cadeias B são parte dos segmentos cristalinos e amorfos. *Clusters* compostos por cadeias lineares curtas são considerados mais cristalinos do que as regiões com ramificação e formam lamelas cristalinas mais finas (5-7 nm de espessura)

que se alternam com lamelas menos cristalinas (3-4 nm de espessura) das regiões compostas por pontos de ramificação.

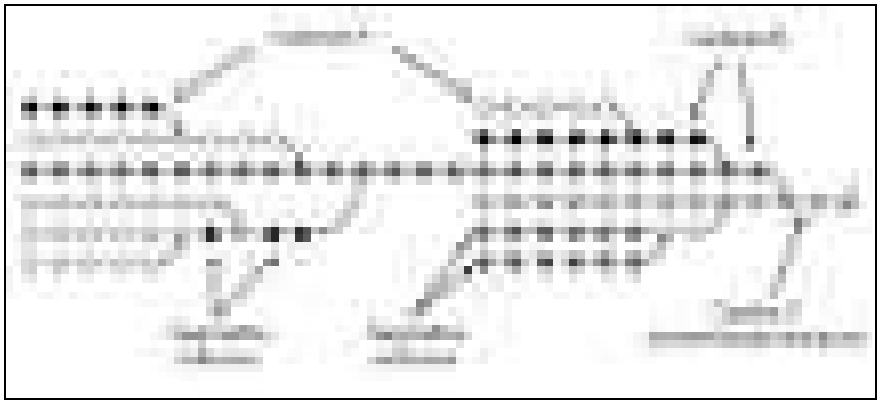


Figura 2 - Cadeias formadoras da molécula de amilopectina. (Círculos representam os resíduos de glicose, linhas horizontais e curvas correspondem às ligações α(1→4) e α(1→6), respectivamente, e o resíduo final à direita constitui a extremidade redutora da molécula).
Fonte: Adaptado de PÉREZ; BERTOFT, 2010.

Os grânulos de amido estão organizados em camadas alternadas amorfas e semicristalinas oriundas da organização radial dos anéis de crescimento a partir do hilo (ponto original de onde o grânulo se desenvolve). Os anéis de baixa densidade amorfos consistem de amilose e amilopectina numa conformação desordenada, enquanto os anéis semicristalinos densos são formados por uma estrutura lamelar com alternância de regiões cristalinas (formadas principalmente por duplas hélices de cadeias laterais de amilopectina dispostas radialmente) e amorfas (amilose, longas cadeias de amilopectina e pontos de ramificação da amilopectina) (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997; BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS; QI, 2004; PÉREZ; BERTOF, 2010). A Figura 3 mostra um esquema proposto para a organização estrutural dos grânulos de amidos.

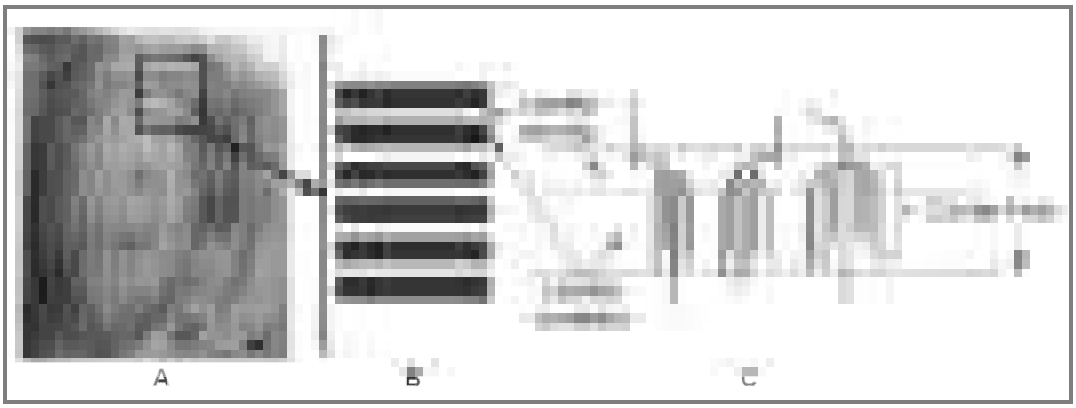


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura lamelar de um grânulo de amido. [Onde A: pilhas de lamelas microcristalinas separadas por anéis de crescimento amorfos; B: vista ampliada das regiões amorfas e cristalinas; C: estruturas helicoidais duplas formadas por cadeias adjacentes de amilopectina, dando origem às lamelas cristalinas (os pontos de ramificação constituem as regiões amorfas)].
Fonte: Adaptado de TESTER; KARKALAS; QI, 2004.

As duplas hélices de amilopectina são formadas por enrolamento de duas cadeias ramificadas de amilopectina, as quais se agrupam nas lamelas cristalinas dos grânulos de amido e formam as estrututas polimórficas do tipo A ou do tipo B (Figura 4), os quais podem ser distinguidos a partir de difractogramas de raios-X. Em amidos de cereais, as cadeias exteriores relativamente curtas de amilopectina favorecem a formação de polimorfos cristalinos do tipo-A, as cadeias mais longas exteriores predominantes em amidos de tubérculos favorecem a formação de polimorfos do tipo-B (HIZUKURI et al., 1985; ZOBEL, 1988; GIDLEY; BULPIN, 1987). As duplas hélices para ambas as formas polimórficas são essencialmente idênticas no que diz respeito à estrutura helicoidal, ou seja, dispostas em pares e as cadeias empacotadas em arranjos paralelos. (GIDLEY; BULPIN, 1987; IMBERTY; PÉREZ,1988). No entanto, o agrupamento destas duplas hélices dentro da estrutura polimórfica do tipo-A é relativamente compacto, e cristaliza-se em uma célula unitária ortogonal com empacotamento hexagonal levemente distorcido com quatro moléculas de água por célula unitária, enquanto que o

polimorfo do tipo-B tem uma estrutura hexagonal mais aberta, com um núcleo helicoidal hidratado por 36 moléculas de água. Além disso, o centro dos amidos A é ocupado por uma hélice de amilose em vez de uma coluna de água. O padrão polimórfico do tipo-C também pode ocorrer em amidos e consiste na mistura dos padrões polimórficos A e B em proporções variáveis (ZOBEL, 1988).

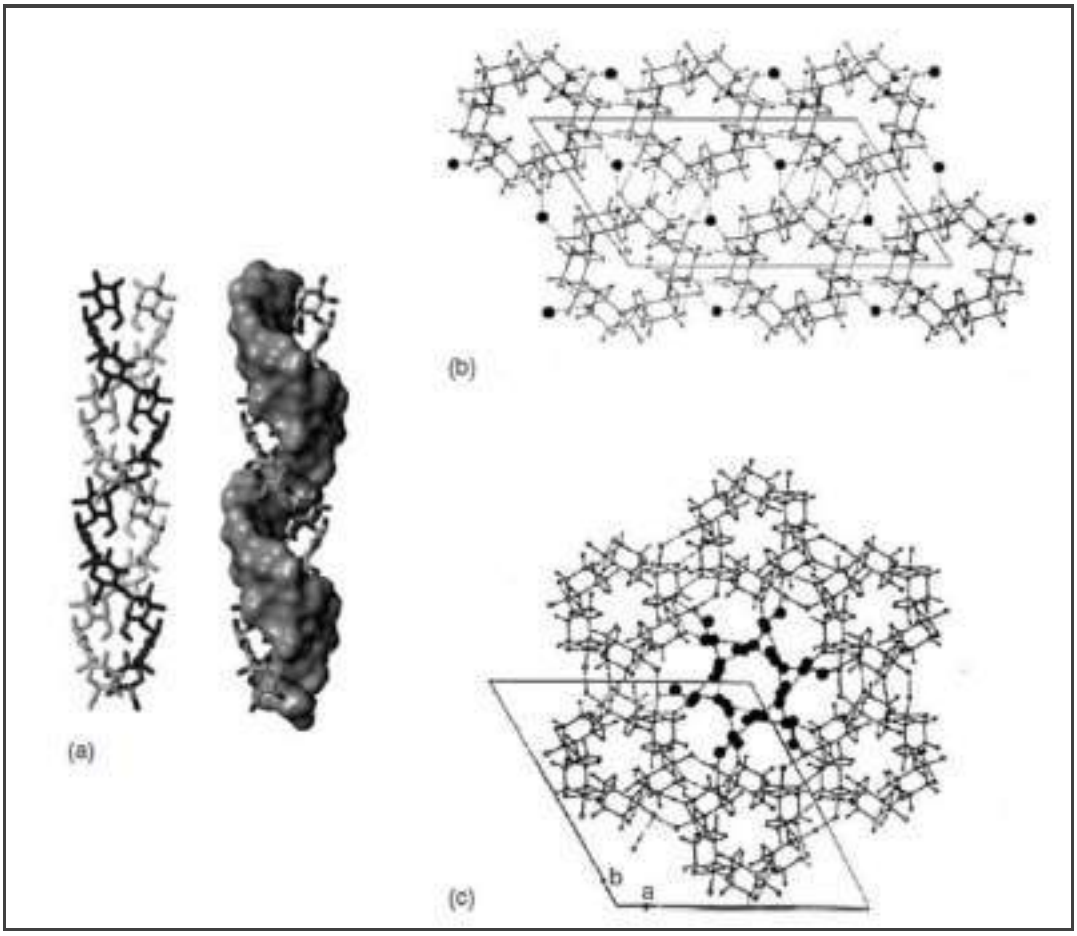


Figura 4 - Estruturas dos polimorfos cristalinos do tipo-A e tipo-B. [Onde (a): visão 3D das duplas hélices presentes em ambos polimorfos; (b): empacotamento cristalino em polimorfo do tipo-A, contendo quatro moléculas de água (círculos fechados) para cada célula unitária; (c): polimorfo do tipo-B, contendo trinta e seis moléculas de água]. Linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio.

Fonte: PÉREZ; BERTOFT, 2010.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (GALLANT et al., 1992; GALLANT et al., 1997) e de microscopia de força atômica (BALDWIN et al., 1998; JIRANUNTAKUL et al., 2013) mostraram forte evidência visual de um outro nível estrutural denominado "bloquete".

O bloquete constitui uma ultraestrutura semicristalina e geralmente consiste de várias moléculas de amilopectina, constituindo as unidades básicas que constroem grânulos de amido. Os bloquetes são similares no formato (alongado) mas diferem em tamanho de acordo com a fonte botânica e localização dentro do grânulo (20-400 nm), e sugere-se que é principalmente organizado por lamelas cristalinas e amorfas de amilopectina (GALLANT et al., 1997). Tang, Mitsunaga e Kawamura (2006) propuseram que geralmente há dois tipos de bloquetes em um mesmo amido, os quais denominou de “normal” e “defeituoso” (Figura 5) Estes construiriam conchas duras e conchas macias nos grânulos.

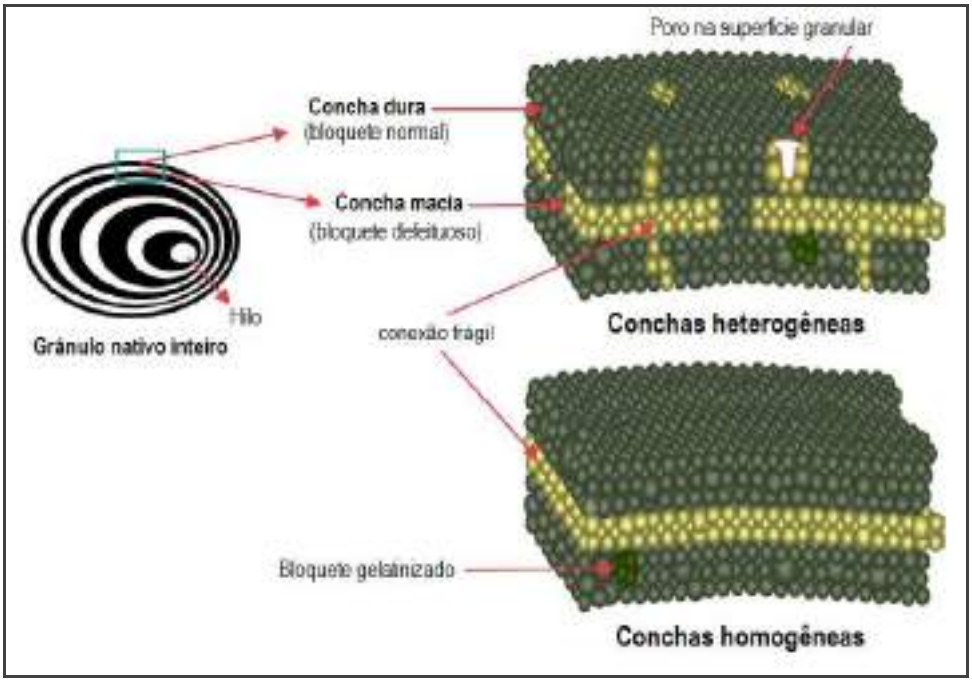


Figura 5 – Esquema com as estruturas de bloquetes normal e defeituoso.
Fonte: Adaptado de TANG; MITSUNAGA; KAWAMURA, 2006.

De acordo com os autores, um bloquete normal seria construído principalmente por lamelas cristalinas e amorfas formadas pelos aglomerados

de moléculas de amilopectina, enquanto um bloquete defeituoso poderia ocorrer pela participação de moléculas pouco ramificadas de amido, as quais tem desvantagem para cristalizar, tais como amilose e material intermediário. No entanto, a maior parte das moléculas pouco ou não ramificadas poderiam estar localizadas entre os bloquetes e contribuir para a resistência e flexibilidade dos grânulos de amido.

Gallant et al. (1992) propuseram que os grânulos de amido são formados por conchas heterogênas (duras e macias). Em conchas heterogêneas, tanto conchas duras quanto macias não são estruturas contínuas e, por esta razão, na superfície de grânulos de amido há muitas regiões macias com bloquetes defeituosos. Estes bloquetes defeituosos se agrupam fragilmente e podem ocasionar a formação de poros nos grânulos, proporcionando fraca resistência às enzimas. Quanto as conchas homogêneas, os bloquetes normais e defeituosos seriam contínuos, sem zonas que se cruzam mutuamente nas conchas, logo, esse tipo de concha teria uniforme resistência as enzimas. Grânulos de amido de batata nativo são desse tipo (GALLANT et al., 1992; TANG et al., 2006).

Na figura 6, Gallant et al., (1997) propõem uma visão geral dos diferentes níveis de organização da estrutura granular, na qual a formação de *clusters* e o conceito de estruturas bloquetes são incluídos.

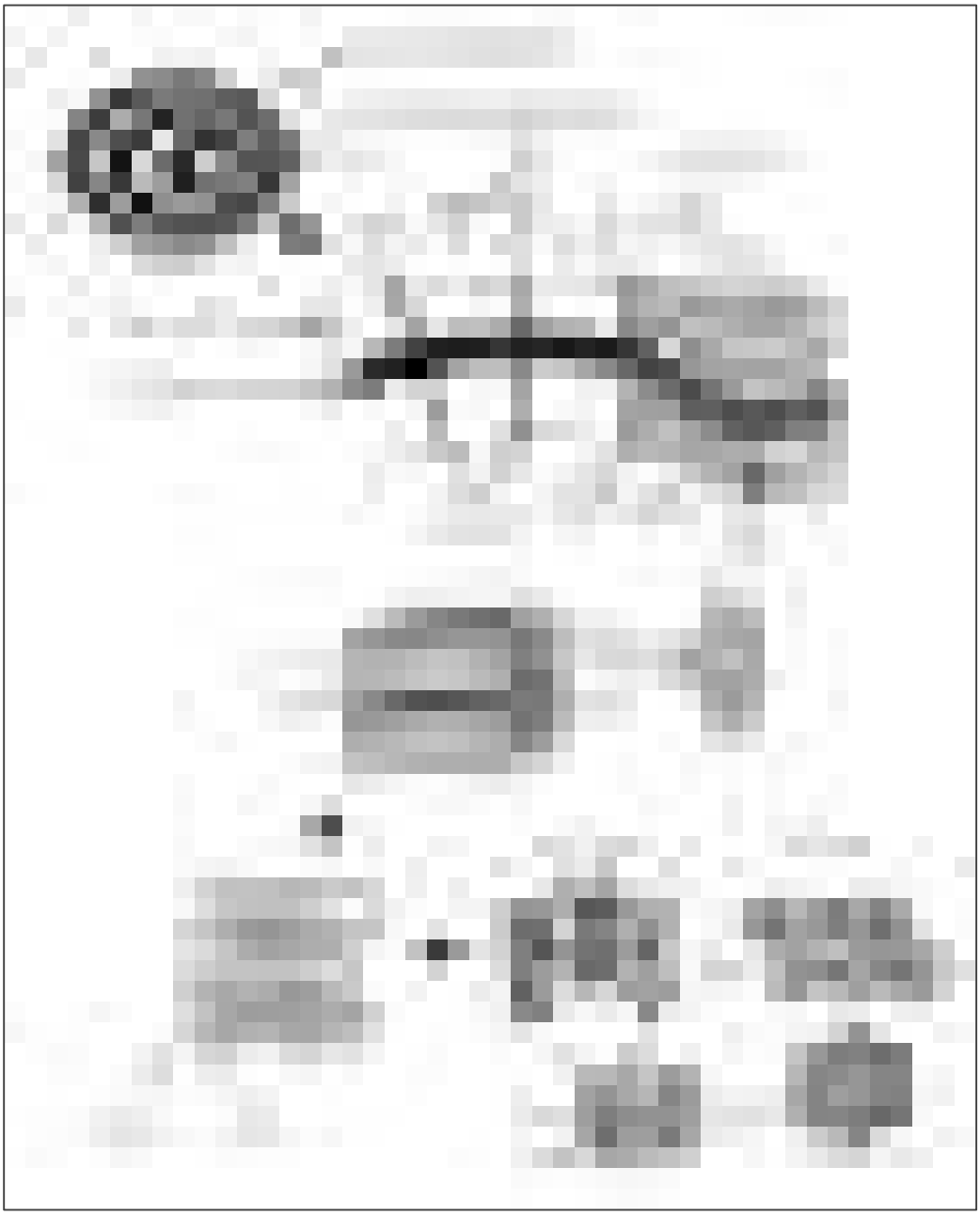


Figura 6 – Visão geral dos diferentes níveis de organização da estrutura do grânulo de amido.
Fonte: Adaptado por GALLANT et al., 1997.

2.2.2 Propriedades funcionais

As propriedades funcionais dos amidos são determinadas pelas alterações que ocorrem durante o processamento (aquecimento, cisalhamento) e subsequente armazenamento. Inchamento granular, gelatinização, formação

de pasta e retrogradação são aspectos importantes da funcionalidade dos amidos, e determinam as suas propriedades nos alimentos processados.

Quando uma suspensão de amido nativo é submetida ao aquecimento progressivo em temperaturas acima de 60°C, as moléculas de água presentes formam ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila de suas macromoléculas, promovendo o inchamento irreversível dos grânulos e a consequente ruptura da estrutura granular, a qual é chamada de “gelatinização” dos grânulos (TESTER; MORRISON, 1990). Conforme os autores, em seu sentido mais restrito, a gelatinização constitui o desordenamento térmico das estruturas cristalinas nos grânulos de amido (ruptura de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares) com consequente perda de birrefringência, mas num sentido mais amplo engloba eventos relacionados, tais como o inchamento granular e a lixiviação de polissacarídeos solúveis, principalmente de amilose, conduzindo a formação de uma pasta viscosa.

A gelatinização do amido, por constituir um processo de absorção de energia, pode ser monitorada e caracterizada a partir de curvas endotérmicas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC), pelo desaparecimento da cruz de Malta em microscópio ótico e/ou pela perda da cristalinidade observada por difração de raios-X (CEREDA, 2002). Tester e Morrison (1990) e Cereda (2002) salientam que a gelatinização dos grânulos, e a consequente formação de pasta, dependem de vários fatores, tais como o tipo de amido, concentração da dispersão, temperatura utilizada, e intensidade de cisalhamento durante o aquecimento.

Ao ocorrer o resfriamento da pasta, algumas cadeias de amilose e amilopectina solubilizadas começam a se reassociar, formando um gel. Este processo é denominado como retrogradação do amido, o qual pode ser acompanhado pelo fenômeno caracterizado como sinerese (expulsão de água das moléculas de amido formadoras do gel) (BILLIADERES, 1991; CEREDA, 2002). De acordo com Sandhu et al. (2007), dentre os principais fatores que influenciam a retrogradação em géis de amido estão a concentração e comprimento de cadeia das moléculas de amilose presentes e o estado de dispersão das cadeias lineares. O comportamento de pastas de suspensões de amido durante o aquecimento e resfriamento pode ser medida a partir de curvas geradas em equipamentos específicos como o viscoamilógrafo

Brabender e o RVA (*Rapid Visco Analyser*). Na figura 7 estão apresentados os eventos decorridos em suspensões de amido durante o aquecimento, resfriamento e armazenamento das mesmas.

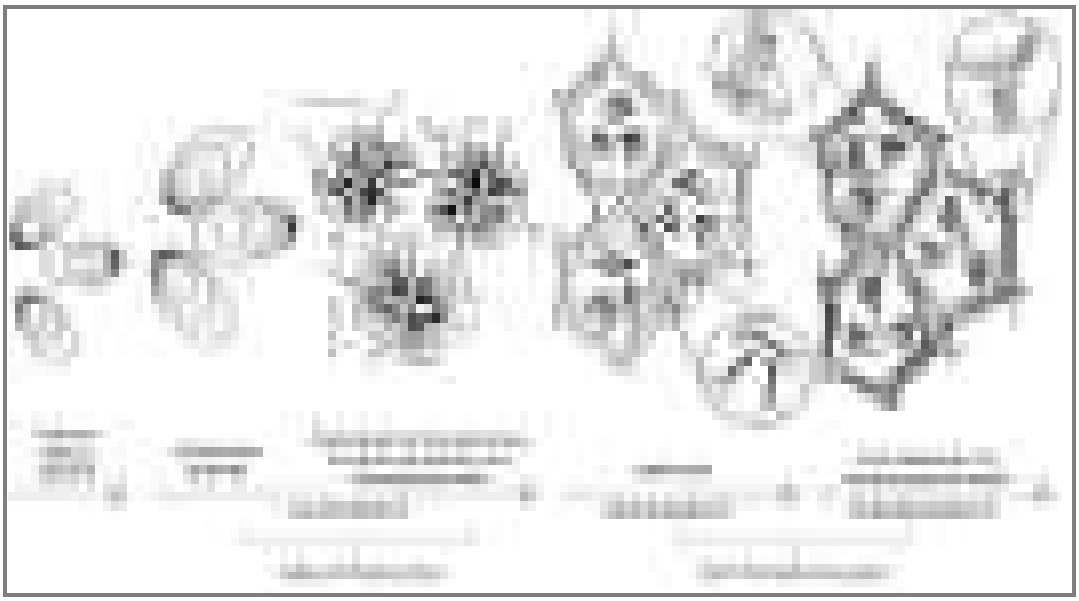


Figura 7 - Representação esquemática das alterações ocorridas em uma suspensão de amido em excesso de água durante o aquecimento, resfriamento e armazenamento.
Fonte: Adaptado de GOESAERT et al., 2005.

2.2.3 Modificação de amido

Amidos modificados são ingredientes comuns em alimentos e em outras aplicações industriais. Condições de cisalhamento, temperatura, pH e refrigeração comumente aplicados durante o processamento costumam ser aspectos limitantes na utilização de amidos nativos. Dessa forma, a modificação deste polímero é uma alternativa para atingir uma determinada funcionalidade ou mesmo para ampliar as suas possibilidades de aplicação.

A modificação de amidos pode ser obtida a partir de tratamentos químicos, físicos, enzimáticos e genéticos (SINGH; KAUR; McCARTHY, 2007) ou pelo uso combinado de um ou mais métodos de modificação (GUNARATNE; CORKE, 2007; DEETAE et al., 2008; LIN et al., 2011; KAUR et al., 2012). No entanto, existe um interesse considerável em modificações

físicas, as quais permitem uma abordagem isenta de produtos químicos e agentes biológicos, e portanto o amido assim obtido continua considerado natural e seguro (JACOBS; DELCOUR, 1998).

2.3.1 Tratamento térmico em baixa umidade

O tratamento térmico em baixa umidade é uma técnica de modificação física que consiste na exposição dos grânulos de amido a temperaturas superiores a de gelatinização por determinado período de tempo e em condições de umidade reduzida. As temperaturas do tratamento geralmente variam entre 80-130°C, por períodos de 15 min à 16h e teor de umidade não superior a 35% (JACOBS; DELCOUR, 1998).

Os efeitos do TTBU sobre a estrutura e as propriedades físico-químicas variam com a fonte botânica, características do amido (como a proporção amilose:amilopectina) e com as condições de TTBU aplicadas (tempo, temperatura, teor de água) (JACOBS; DELCOUR, 1998; HOOVER, 2010; ZAVAREZE et al., 2011). Reduções nos parâmetros de viscosidade, poder de inchamento e lixiviação de amilose, assim como aumento das temperaturas de gelatinização e ampliação da largura das curvas endotérmicas de fusão (PERERA et al., 1997; LIM; CHANG; CHUNG, 2001; HORMDOK; NOOMHORM, 2007; CHUNG; LIU; HOOVER, 2009; VARATHARAJAN et a., 2010; JIRANUNTHAKUL et al., 2011) e transição do polimorfo cristalino do tipo-B para o tipo-A ou para uma mistura de ambos os padrões (GUNARATNE; HOOVER, 2002; HOOVER, 2010; VARATHARAJAN et al., 2011), têm sido relatadas. Além disso, alterações morfológicas como a formação de áreas escuras, ou espaços vazios na região central dos grânulos próxima ao hilo, também foram reportadas a partir de microscopia ótica (KAWABATA et al., 1994; VERMEYLEN et al., 2006; VARATHARAJAN et al., 2011).

Possíveis explicações para os efeitos causados pelo TTBU nas propriedades dos amidos foram reunidos por Jacobs e Delcour (1998) e incluem alterações na cristalinidade (como crescimento de novos cristalitos ou recristalização de cristalitos já existentes, alteração no arranjo do empacotamento de duplas hélices nos cristalitos dos amidos do tipo B ocasionando a transição para o tipo A, formação de novos cristalitos nas

regiões amorfas, como cristalitos de amilose ou de cristalitos oriundos de complexos de amilose e lipídios), alterações na fração amorfa resultando em um aumento da ordem sem aumento da cristalinidade (aumento nas interações entre as cadeias de amilose ou entre cadeias de amilose e amilopectina, e transformação de amilose amorfa em uma hélice), e alterações das interações entre os cristalitos e as partes amorfas.

Jiranuntakul et al. (2013) relataram, a partir de observação por microscopia de força atômica, que a superfície granular do amido de arroz, milho e batata comuns e cerosos foi visivelmente afetada por TTBU (30% de umidade, 100°C, 16h). Protusões de formato oval (atribuídas às estruturas bloquetes da amilopectina) presentes na superfície dos grânulos nativos foram ausentes após o TTBU em amido de arroz e milho e sensivelmente menores em amido de batata (diminuiu de 56 para 28 nm e de 51 para 23 nm em amido de batata comum e ceroso, respectivamente). Os autores sugerem que as condições de umidade e temperatura durante o TTBU possam favorecer a gelatinização das estruturas bloquetes na superfície de amido de arroz e milho, enquanto em amido de batata uma gelatinização parcial ou compressão das duplas hélices de amilopectina (atribuído ao empacotamento mais denso das hélices pela transição do polimorfo cristalino do tipo B para o tipo A) ocorreriam, ocasionando o encolhimento de bloquetes nessa região (Figura 8). Essas alterações na superfície promoveriam uma espécie de barreira à penetração de água para dentro dos grânulos e estariam associadas ao inchamento limitado e aumento da temperatura de gelatinização em amidos modificados por TTBU. O encolhimento de bloquetes também poderia estar associado ao desenvolvimento de uma cavidade oca dentro dos grânulos como observado por estudos de microscopia ótica e de microscopia eletrônica de varredura em outros artigos (KAWABATA et al., 1994, LEE et al., 2012, VERMEYLEN; GODERIS; DELCOUR, 2006).

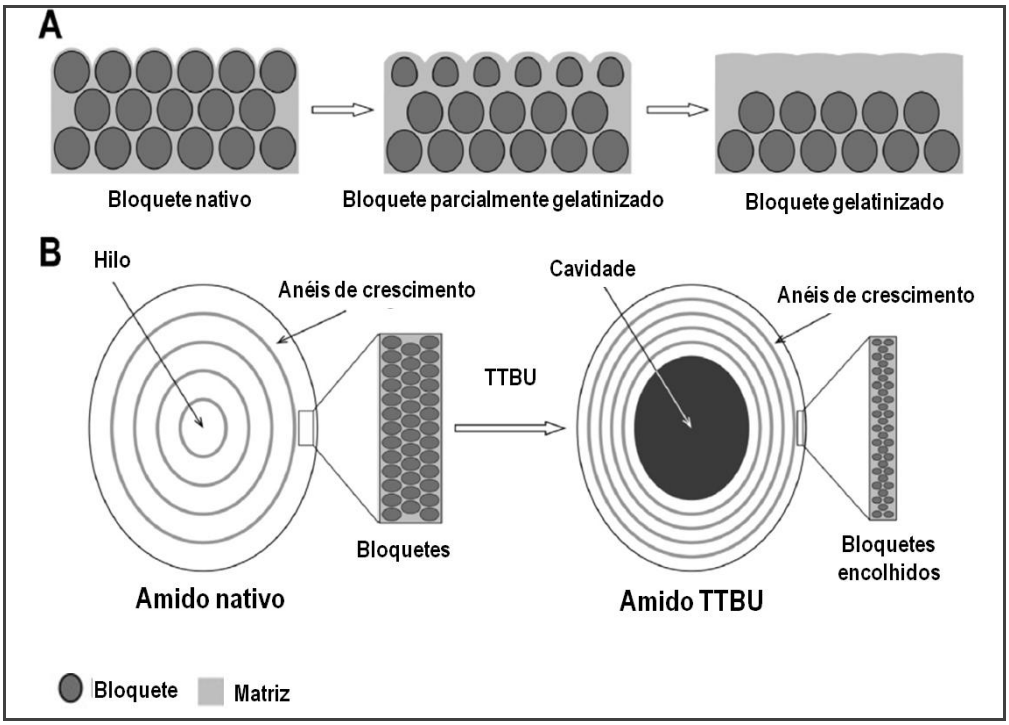


Figura 8 - Diagrama esquemático mostrando (A) a fusão de bloquetes na região superficial de um grânulo de amido durante TTBU, e (B) a redução no tamanho de bloquetes bem como o desenvolvimento de uma cavidade no centro de um grânulo de amido de batata após TTBU.
Fonte: Adaptado de JIRANUNTAKUL et al., 2013.

Além das alterações descritas, outras mudanças em nível molecular, nano ou microestrutural, os quais não foram ainda identificados, podem também estar envolvidos nas mudanças fisico-químicas em amidos modificados por TTBU.

2.2.4 Gelatinização química de superfície

Determinadas soluções salinas são conhecidas por promoverem a gelatinização do amido a temperatura ambiente (EVANS; HAISMAN, 1982, GOUGH; PYBUS, 1973, OOSTEN, 1982, OOSTEN, 1983). Íons de elevada densidade de carga apresentam forte interação eletrostática com a água, reduzindo a fração de água livre em solução, ocasionando um aumento da viscosidade. Por conseguinte, esse aumento da viscosidade retarda a difusão da solução salina para dentro dos grânulos. Além disso, a repulsão gerada

entre os grupos hidroxila do amido e os íons carregados positivamente provoca uma resistência à gelatinização do amido (EVANS; HAISMAN, 1982, GOUGH; PYBUS, 1973, JANE, 1993).

Gough e Pybus (1973) estudaram o efeito da interação de diferentes cátions metálicos com amido de trigo a partir de microscopia ótica. Os autores observaram que o comportamento do amido foi variável com o tipo e a concentração de íons em solução, sendo que soluções de LiCl 14 $mol.L^{-1}$ e $CaCl_2$ 2,5 $mol.L^{-1}$ promoveram a gelatinização do amido a partir da periferia granular dos amidos mesmo à temperatura ambiente.

Posteriormente, Jane (1993) monitorou o processo de gelatinização de amido de milho em soluções salinas de LiCl e $CaCl_2$ em diferentes concentrações, a partir de microscopia ótica e calorimetria diferencial exploratória (DSC). Em concentrações inferiores a 4 $mol.L^{-1}$, o LiCl ocasionou um aumento da temperatura de início e da entalpia de gelatinização, indicando que a interação eletrostática entre os grupos hidroxilas do amido e os íons Li^+ não foi significativa e, portanto, apenas um efeito de solvatação da água pelos íons Li^+ foi predominante. Quando a concentração de LiCl excedeu a 4 $mol.L^{-1}$, no entanto, os valores de início e da entalpia de gelatinização reduziram em decorrência de interações do tipo íon-dipolo (formação do complexo amido-cátion). Os autores sugerem que como a difusão de Li^+ nos grânulos de amido foi impedida pela viscosidade da solução, o aquecimento gerado à medida que os íons Li^+ se complexaram com os grupos OH periféricos dos grânulos, a gelatinização do amido a partir da periferia para dentro dos grânulos foi iniciada à temperatura ambiente. A autora sugere que a gelatinização do amido em soluções salinas neutras seria controlada por dois efeitos principais, relacionados a alteração na estrutura da água decorrente da elevada concentração de íons (aumento da viscosidade) e por complexação entre as hidroxilas presentes no amido e os cátions.

Além disso, Koch e Jane (2000), observaram que amidos de diferentes origens botânicas interagem diferentemente com soluções salinas concentradas. Os autores conduziram a gelatinização química de diferentes fontes de amido em solução de $CaCl_2$ (4 e 4,4 $mol.L^{-1}$) a temperatura ambiente. Com base nas diferenças de comportamento dos grânulos durante a gelatinização, os amidos foram divididos em grânulos que gelatinizaram

uniformemente a partir da periferia granular (batata comum e ceroso, batata doce e milho comum e de alta amilose), grânulos que gelatinizaram desuniformemente a partir da periferia granular (trigo, cevada e cevada de alta amilose), e grânulos em que a gelatinização ocorreu demasiado rápida sem ser possível um controle do processo (cevada ceroso, milho ceroso e arroz).

A técnica de gelatinização química de superfície pode ser utilizada como uma ferramenta útil e barata na pesquisa da estrutura interna de grânulos de amido nativos e modificados à medida que permite estudar frações de grânulos remanescentes com diferentes níveis de remoção das partes mais externas (PAN; JANE, 2000; KUAKPETOON; WANG, 2007; 2008; HUANG et al., 2010).

Utilizando está técnica, Jane e Shen (1993) e Pan e Jane (2000), puderam verificar que a amilose em amido de batata e milho, respectivamente, encontrava-se mais concentrada na periferia granular, assim como uma maior proporção de longas cadeias de amilopectina estavam mais concentradas na região central dos grânulos. Em amido de arroz com diferentes teores de amilose (ceroso, 10,0, 14,5 e 23,4 %), a distribuição de amilose ao longo das regiões granulares foi variável enquanto que a temperatura e a entalpia de gelatinização foram reduzidas em todos os tipos de amido de arroz com o aumento da remoção granular (WANG et al., 2007).

Em grânulos de amido de batata acetilado remanescentes (ceroso e comum de diferentes cultivares) após a remoção de aproximadamente 30 e 40% de superfície com $CaCl_2$ 4 $mol.L^{-1}$, Huang et al. (2010) observaram que maior proporção de grupos acetila estava concentrado na região periférica dos grânulos enquanto maior cristalinidade relativa e temperaturas de gelatinização foram observadas nas porções mais centrais.

Kuakpetoon e Wang (2008) utilizaram LiCl 13 $mol.L^{-1}$ para remover 10, 20, 30 e 40 % da superfície de amido de milho oxidado com hipoclorito com diferentes teores de amilose e puderam obsevar que a localização das frações oxidadas e as propriedades físico-químicas dos amidos oxidados foi variável e afetada pelo arranjo molecular dentro dos grânulos dos diferentes amidos. De forma geral, a oxidação foi maior na periferia dos grânulos, ainda que o nível de oxidação nas regiões granulares tenha sido também suficiente para aumentar o poder de inchamento dos amidos modificados, em detrimento dos nativos, independentemente do grau de remoção das camadas granulares. Os autores

também observaram que a despolimerização de amilose na periferia de amido de milho comum foi mais intensa do que nos amidos com teores altos de amilose (50 e 70 %), o que demonstra a diversidade no arranjo molecular entre os tipos de amido.

3 CAPÍTULO 1 - Amido de batata modificado por tratamento térmico em baixa umidade: estudo da estrtura interna dos grânulos por gelatinização química de superfície

3.1 Introdução

O tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) é uma modificação física na qual os grânulos de amido são expostos a temperaturas superiores à temperatura de gelatinização por determinado período de tempo e em condições de umidade reduzida (JACOBS; DELCOUR, 1998). O tipo e a intesidade das alterações reportadas em amidos submetidos ao TTBU são variáveis de acordo com a fonte amilácea e as condições aplicadas durante o tratamento (HOOVER, 2010; ZAVAREZE; DIAS, 2011; VARATHARANJAN et al., 2011).

Tem sido sugerido que o TTBU promove um rearranjo na estrutura granular pela alteração na conformação das estruturas de amilose e amilopectina, bem como pelo fortalecimento de interações entre as cadeias. Nesse sentido, Gunaratne e Hoover (2002) e Hoover e Manoel (1996) afirmaram que o TTBU permite que a amilose localizada nas regiões amorfas reaja com segmentos ramificados de amilopectina nas regiões cristalinas, propiciando um reforço da estrutura granular. No mesmo sentido, Lim et al. (2001) propuseram que um rearranjo estrutural após TTBU seria decorrente da transformação das regiões intercristalinas amorfas para fases amorfas, o que propiciaria maior liberdade para cadeias curtas presentes na estrutura cristalina se movimentarem e rearranjarem-se dentro do grânulo.

Entretanto, a elucidação das alterações estruturais em amidos submetidos ao TTBU em nível intragranular ainda não é bem clara. A gelatinização química de superfície pode ser utilizada como uma ferramenta útil e de baixo custo na pesquisa da estrutura interna de grânulos de amido. Jane (1993) estudou o mecanismo de gelatinização do amido em soluções salinas neutras e observou que soluções salinas concentradas de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e cloreto de lítio (LiCl) promovem uma gelatinização lenta do amido a partir da periferia dos grânulos, sendo possível obter frações de grânulos

remanescentes com diferentes níveis de remoção das partes mais externas. A estrutura interna de diferentes fontes de amido nativo e em alguns amidos modificados quimicamente foram estudadas a partir desta técnica (PAN; JANE, 2000; KUAKPETOON; WANG, 2007; 2008; HUANG; ZHANG; CHEN, 2010).

Dessa forma, ainda que amidos de diferentes fontes botânicas modificados em diferentes condições de temperatura, umidade e tempos de TTBU tenham sido estudados, a maioria das respostas para os processos desencadeados durante a modificação granular baseiam-se principalmente nos grânulos inteiros sem explorar os seus efeitos nas regiões internas do grânulo.

Neste estudo, grânulos de amido de batata nativo e modificado por TTBU em diferentes teores de umidade foram submetidos à gelatinização química de superfície com solução salina de LiCl concentrada para remoção de aproximadamente 30 e 50 % da superfície granular. Os grânulos intactos e remanescentes foram avaliados quanto às propriedades morfológicas, estruturais, térmicas e algumas propriedades físico-químicas.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material

Amido foi extraído a partir de batatas da cultivar BRS IPR-Bel (*Solanum tuberosum* L.) conforme método proposto por Liu, Weber, Currie e Yada (2003). As batatas foram descascadas manualmente e imersas em bissulfito de sódio 0,1 %, cortadas em cubos, trituradas em liquidificador doméstico e submetidas a sucessivas lavagens seguida de filtração em sacos de algodão e peneiras (80, 150 e 200 mesh). Após decantação, o amido sedimentado foi lavado e seco a 40 °C. Os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

3.2.2 Tratamento térmico em baixa umidade (TTBU)

O tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) foi realizado em amido de batata com umidade ajustada para 12, 15, 18, 21 e 24 % b.u. (TTBU 12 %, TTBU 15 %, TTBU 18 %, TTBU 21 % e TTBU 24 %, respectivamente). Os

teores de umidade foram escolhidos com base em testes preliminares para obter amidos modificados com maior amplitude de variação nas propriedades. Os amidos foram armazenados em recipientes de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração (≈ 4°C) durante 16 h para equalização da umidade. Após, as amostras foram autoclavadas a 110 °C, por período de 1 h. Decorrido o tempo de tratamento, o amido foi mantido na autoclave (desligada e semi aberta) até se atingir temperatura ambiente (para evitar uma possível condensação de água nas paredes do vidro) e seco a 40 °C até a umidade entre 10-11 %, b.u.

3.2.3 Gelatinização química de superfície dos grânulos de amido

Para o estudo da estrutura interna, os grânulos de amido foram submetidos à gelatinização química de superfície (GQS) em solução de LiCl 13 mol L^{-1} para remover aproximadamente 30 e 50% da superfície granular, sendo as frações granulares remanescentes denomidanas de regiões intermediária e central dos grânulos, respectivamente. Os resultados obtidos para os grânulos intactos (0% de remoção granular) em comparação com os resultados para as demais frações, foram designados como referentes à região periférica dos grânulos. O processo foi baseado no método proposto por Pan e Jane (2000), em que o amido (5 g), foi suspenso em 37,5 mL de solução de LiCl concentrada (13 mol.L^{-1}) sob agitação durante diferentes períodos de tempo (pré-estabelecidos em testes para cada amido em particular). A reação foi acompanhada a partir da observação dos grânulos em microscópio sob luz polarizada até se observar o nível de gelatinização superficial desejado. O processo de gelatinização foi interrompido pela adição de água gelada (≈ 4 °C) e a solução de LiCl imediatamente separada por centrifugação (5000 g, 2 min).

A separação dos grânulos remanescentes do amido gelatinizado foi realizada em liquidificador doméstico a partir da agitação mecânica do amido em 250 mL de água destilada por período de 10 min. O sobrenadante contendo o amido gelatinizado foi descartado e os grânulos remanescentes ressubmetidos à agitação mecânica em água. Este procedimento foi repetido em torno de 5 vezes, até o sobrenadante não apresentar turbidez e não ser visível a presença de amido gelatinizado ao microscópio ótico. Os grânulos

remanescentes foram lavados com álcool etílico absoluto e secados a 40°C. O grau de remoção da superfície foi calculada de acordo com a equação 1.

$$SR(\%) = \frac{GAi - GAr}{GAi} \times 100 \qquad \text{Eq. (1)}$$

SR (%) é o percentual de superfície removida dos grânulos de amido (%); *GAi* é a massa de grânulos de amido íntegros (g; base seca (b.s.)); *GAr* é a massa de grânulos de amido remanescentes após a remoção do amido gelatinizado (g; b.s.).

3.2.4 Birrefringência e morfologia

A morfologia e a presença de birrefringência (presença da cruz de malta) nos grânulos foi observada em microscópio ótico (Olympus, modelo BX 51), sob luz polarizada. As lâminas foram preparadas com uma gota de suspensão de 2 mg de amido em 1mL de solução 1:1 de glicerol:água. Para a obtenção das micrografias em campo claro, o amido foi corado com solução 0,2 % de I_2/KI.

As características morfológicas dos grânulos também foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (Shimadzu, SSX-550). As amostras foram espalhadas diretamente sobre a superfície de *stubs* e revestidas com ouro, sendo posteriormente examinadas ao microscópio eletrônico de varredura a uma tensão de aceleração de 15 kV.

3.2.5 Teor de amilose

O teor de amilose foi determinado por método colorimétrico com iodo, conforme método de McGrance, Cornell e Rix (1998) com modificações sugeridas por Hoover e Ratnayake (2001).

Aproximadamente 20mg de amido desengordurado (b.s) juntamente com de 8 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) a 90 % foram agitados durante 20 min e posteriormente condicionados em banho a 85 °C por 30 min. Após arrefecimento, o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 25 mL e

homogeneizado. A uma alíquota de 1 mL da solução foi adicionado 5 mL de solução de I_2/KI (0,0025 mol.L^{-1} de I_2 e 0,0065 mol.L^{-1}de KI) e o volume completado para 50 mL. A solução resultante foi homogeneizada e mantida em repouso por 15 min previamente a leitura da absorbância em 600 nm. Para a construção da curva de calibração foi utilizado 20 mg de amilose de batata pura submetida ao mesmo processo descrito para o amido, sendo retiradas alíquotas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mL para determinação da absorbância.

3.2.6 Poder de inchamento e lixiviação de amilose

O poder de inchamento dos amidos foi obtido pelo aquecimento de suspensões de amido em água (0,5 g em 30 mL) na temperatura de 90°C por 30 min. Após rápido resfriamento as suspensões foram centrifugadas e o poder de inchamento foi obtido pela relação da massa final intumescida pela massa inicial de amido e expressa em g.g^{-1} (KUAKPETOON; WANG, 2007). Para a determinação da lixiviação de amilose, uma alíquota do sobrenadante resultante após a centrifugação das suspensões foi avaliada quanto ao conteúdo de amilose, conforme descrito anteriormente.

3.2.7 Cristalinidade relativa e difração de raios-X

Difratogramas de raios-X dos amidos foram obtidos com um difratômetro de raios-X (X'pert PRO Multi-Purpose, PanAnalytical) em que a região de varredura da difração variou de 5° a 30°, com uma tensão alvo de 30 kV, uma corrente de 30 mA e velocidade de varredura de 1°.min^{-1} A cristalinidade relativa (CR) dos grânulos de amido foi calculada como descrito por Rabek (1980), segundo a equação CR (%) = (Ac / (Ac + Aa)) * 100, onde Ac é a área da fração cristalina e Aa é a área da fração amorfa no difratograma de raios-X.

3.2.8 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas de gelatinização dos amidos foram determinadas em calorímetro diferencial de varredura (DSC, TA-60WS,

Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras de amido (aproximadamente 2,5 mg, b.s.) foram pesadas diretamente em cadinhos de alumínio (Mettler, ME-27331), adicionadas de água destilada (1:3 m/m) e posteriormente seladas hermeticamente e deixadas estabilizar durante 16 h antes do procedimento. Os cadinhos contendo as amostras foram aquecidas, juntamente com um cadinho vazio como referência, sob atmosfera de nitrogênio de 20 a 120°C com uma rampa de aquecimento de 10°C por minuto e fluxo de nitrogênio de 50 $mL.min^{-1}$. A temperatura inicial (To), pico de temperatura (Tp), temperatura de conclusão (Tc) de gelatinização e a entalpia requerida durante a transição térmica (ΔH), foram computados automaticamente, e a variação de temperatura (Tc-To) foi calculada.

3.2.9 Análise estatística

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata, exceto os difractogramas de raios-X e a análise de DSC. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5 % de significância a partir de análise da variância (ANOVA).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Birrefringência e morfologia

Na figura 9 estão apresentadas as micrografias sob luz polarizada dos grânulos de amido de batata nativo e modificados por TTBU nas umidades de 12, 15, 18, 21 e 24 %. Os grânulos de amido de batata nativo exibiram alta birrefringência, observado pela presença da cruz de Malta, a qual indica a orientação radial das estruturas helicoidais.

Após o TTBU os grânulos se mantiveram altamente birrefringentes, exceto na região do hilo onde se observa o desenvolvimento de uma área escura circular na maioria dos grânulos. Nos tratamentos sob maiores teores de umidade (21 e 24 %) essas áreas escuras tornaram-se mais alargadas, evidenciando a formação de um espaço vazio nessa região do grânulo. A

formação de áreas escuras pode ser resultado da perda da orientação radial das moléculas na região do hilo, como resultado da ruptura de duplas hélices de amilopectina durante o TTBU. Além disso, é possível que a energia térmica durante o TTBU, associada a um maior teor de umidade, possa atribuir certa mobilidade às cadeias de amido o que poderia ocasionar uma compressão destas em torno das áreas vazias formadas e ocasionar o deslocamento destas para regiões mais periféricas do grânulo.

Vermeylen, Goderis e Delcour (2006) também relatam o aparecimento de áreas escuras após TTBU. Os autores avaliaram o efeito do TTBU sob diferentes teores de umidades e temperaturas em amido de batata, e concluiram que ambos fatores conduziram à formação de áreas escuras. Em estudo similar, Varatharajan et al. (2010) também observaram que após TTBU as micrografias de campo claro em amido de batata normal e ceroso (27 % de umidade sob 80, 100, 120 e 130 °C/16 h) passaram a apresentar “espaços vazios” na área dos grânulos próxima à região do hilo. Segundo os autores, tal efeito foi intensificado com a elevação da temperatura no amido ceroso e indica que esta região é substancialmente afetada pela temperatura aplicada no tratamento hidrotérmico, assim como o observado neste estudo.

Alterações no formato dos grânulos, bem como aparecimento de fissuras e fragmentos também foram visíveis a partir de 18 % de umidade de tratamento (Figura 9). Esses sinais de degradação térmica foram acentuados com o aumento da umidade de tratamento, sobretudo em TTBU a 24 % de umidade, no qual a ruptura granular foi mais intensa como destacado na figura 9 para o TTBU 24 % (seta).

Figura 9 – Micrografias de luz polarizada dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) sob as umidades de 12, 15, 18, 21 e 24 %. Escala = 50 µm. Seta mostra ponto de ruptura granular.

3.3.2 Gelatinização química de superfície

Para obter grau semelhante de gelatinização química de superfície entre os tratamentos, os amidos foram expostos à solução de LiCl 13 $mol.L^{-1}$ por diferentes períodos de tempo. Os amidos nativo e tratados termicamente com até 12 % de umidade não variaram em tempo para se obter graus semelhantes de gelatinização química de superfície, no entanto, a partir do tratamento a 15 % de umidade o tempo necessário para obter graus

semelhantes de remoção granular foram menores (Tabela 1). Outros autores também reportam diferenças no tempo necessário para a gelatinização de diferentes tipos de amido, o que foi variável em função do conteúdo de amilose e do grau de modificação do amido, quando o caso (WANG et al., 2007; KUAKPEETON; WANG, 2007; 2008; HUANG et al., 2010).

Tabela 1 – Tempo e grau de remoção da superfície de grânulos de amido de batata nativo e modificados após tratamento com solução de LiCl 13 mol.L^{-1}

	Tempo de tratamento em solução de LiCl 13 mol L^{-1} (min)	Grau de remoção da superfície (%)
Nativo	90	28,8
	140	48,8
TTBU* 12 %	90	30,1
	140	50,6
TTBU 15 %	65	28,8
	130	47,5
TTBU 18 %	70	32,0
	110	53,0
TTBU 21 %	55	31,6
	95	49,2
TTBU 24 %	50	35,0
	100	52,1

* TTBU: tratamento térmico em baixa umidade

O processo de gelatinização química de superfície em solução de LiCl (13 mol.L^{-1}) para o amido de batata submetido ao TTBU a 15 % de umidade é apresentado na figura 10. Exceto pelas diferenças no tempo requeridas, a gelatinização ocorreu com pouca variação para a maioria dos grânulos em todos os amidos (nativo e modificados). Os grânulos foram gelatinizados lentamente a partir da sua periferia, sendo verificada a formação de uma crescente camada gelatinizada nessa região com o avanço do tempo de reação com LiCl 13 mol.L^{-1}.

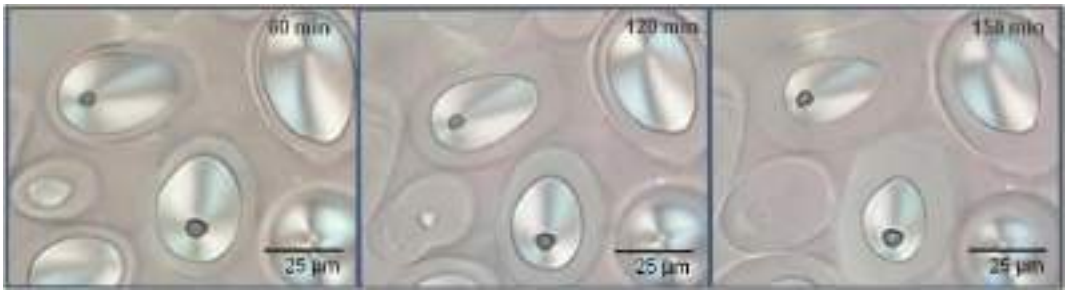


Figura 10 – Micrografias de luz polarizada do amido de batata TTBU a 15 % de umidade durante o processo de gelatinização química de superfície com solução de LiCl 13 mol.L^{-1}.

A diversidade de tamanho granular não tornou o processo de gelatinização desigual e, portanto, a remoção superficial das camadas granulares pode ser considerada representativa da população de grânulos presente em cada amido. Similarmente, Kuakpetoon e Wang (2007) também reportaram considerável homogeneidade na gelatinização química de superfície (≈ 40 %) em grânulos grandes e pequenos de amido de milho comum, ceroso e de alto teor de amilose (50 e 70 %).

No entanto, independentemente do tamanho ou formato dos grânulos, foi possível visualizar que alguns grânulos gelatinizaram mais rapidamente do que outros. Isto demonstra que dentro de uma mesma população de grânulos há diferentes graus de ordenação estrutural.

A figura 11 apresenta o processo de remoção da camada gelatinizada na superfície de grânulos de amido de batata nativo durante o processo de purificação por agitação em água. Na figura 11 (A1, A2), a camada gelatinizada, antes disposta uniformente como um halo ao redor dos grânulos (Figura 10), se desestrutura e se dispersa ao redor dos mesmos como um grande envoltório. À medida que o procedimento de agitação em água foi repetido mais vezes, mais dispersa e menor foi a quantidade de amido gelatinizado presente no sedimento centrifugado (Figura 11 B1, B2 e C1, C2).

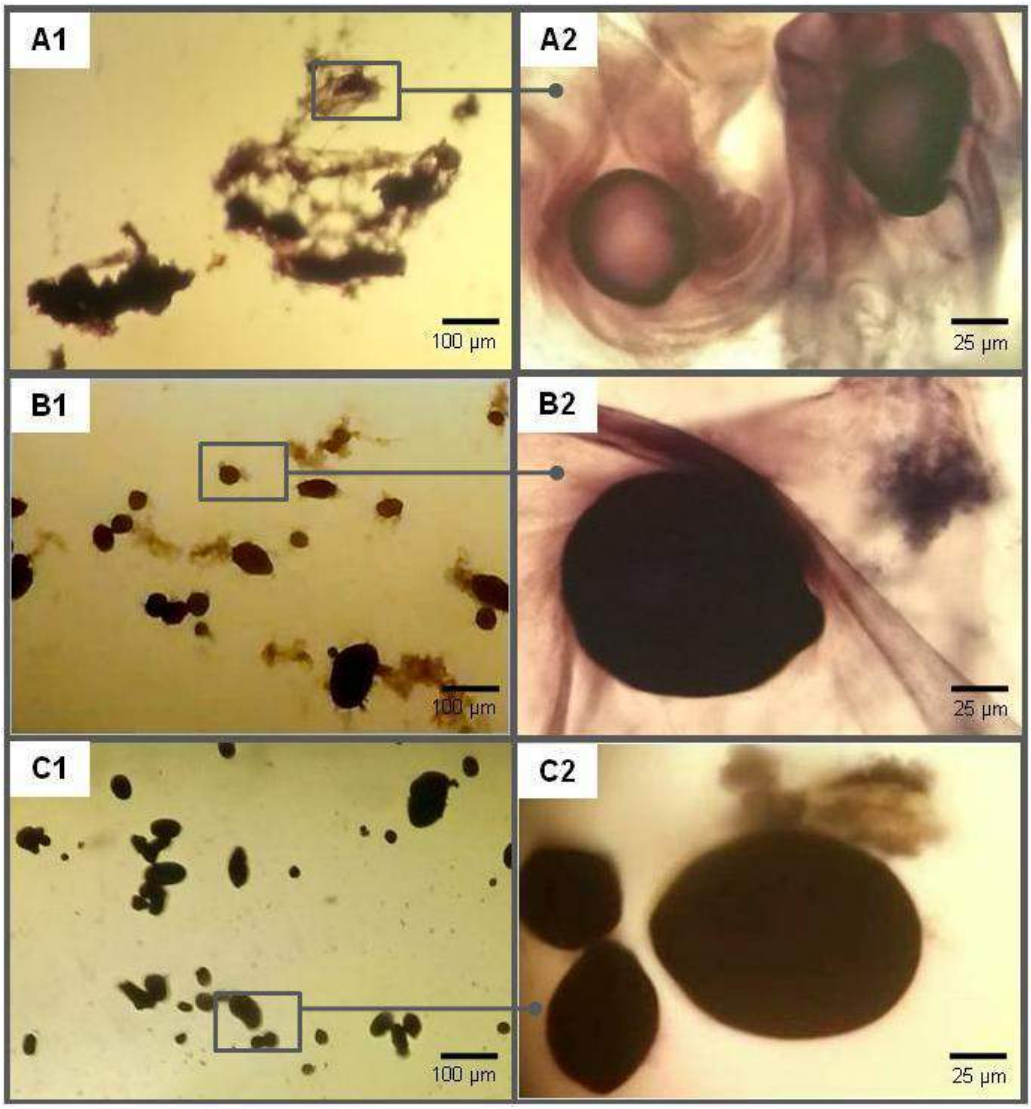


Figura 11 – Micrografia ótica dos grânulos de amido de batata nativo gelatinizados superficialmente após sucessivas etapas de agitação em água. 1ª (A1, A2), 2ª (B1, B2) e 3ª (C1, C2) lavagens.

Os grânulos remanescentes, após a remoção da camada gelatinizada superficial, continuaram a apresentar cruz de malta o que indica que a estrutura semicristalina do amido não foi afetada durante o processo. Além disso, não foi perceptível nenhuma outra alteração nos grânulos decorrente das etapas de agitação mecânica dos grânulos em água. Os grânulos remanescentes do amido TTBU a 24 % de umidade podem ser vistos na figura 12 (a-c). Nesta imagem é possível observar o efeito da intensa remoção das camadas granulares (≈ 50 %) pela aumento proporcional da área escura na região do

hilo, sendo que em alguns grânulos a remoção das camadas alcançou essas áreas, promovendo ruptura granular nessa região (setas).

Figura 12 - Micrografias de luz polarizada dos grânulos remanescentes de amido de batata TTBU a 24 % de umidade após remoção da superfície gelatinizada. Setas destacam a abertura granular na região do hilo.

A morfologia dos amidos também foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e está apresentada na figura 13 (A-E). Os grânulos de amido de batata nativo apresentaram tamanho variável, predominantemente na forma elipsoidal, juntamente com alguns grânulos pequenos mais arredondados (Figura 13 A).

Na figura 13 (B e C) pode-se comparar os grânulos de amido de batata nativo com a superfície gelatinizada e após a remoção da camada gelatinizada superficial (grânulos remanescentes), respectivamente. Alguns grânulos de amido nativo remanescentes apresentaram superfície granular mais irregular (rugosa). Além disso, não foi observado residual de amido gelatinizado na superfície granular ou disperso entre os grânulos de amido remanescentes, o que evidencia a eficiência da remoção das camadas gelatinizadas pela agitação mecânica (Figura 13 C).

De igual modo Wang, Kuo, Wang e Patindol (2007) não observaram nenhuma evidência de ruptura granular após a remoção da camada gelatinizada em grânulos de amido de arroz por mistura mecânica. Os autores reportaram que os grânulos de amido de arroz apresentaram superfície mais lisa e esférica (diferente da forma angular e poligonal comuns ao amido nativo), mas nenhuma fissura evidente ou fragmentos foram observados. Pan e Jane (2000) avaliaram o efeito da agitação mecânica em água na remoção das camadas gelatinizadas sobre a integridade granular a partir de análise da

distribuição da massa molecular em amido de batata. Os autores observaram que os perfis dos amidos antes e após a agitação mecânica foram idênticos, indicando que as moléculas de amido no grânulo permaneceram intactas mesmo após a realização desta. No entanto, Kuakpetoon e Wang (2007) relataram que após a remoção do material gelatinizado em amido de milho, a maioria dos grânulos remanescentes passou a apresentar aparência rugosa e com indícios de erosão. Além disso, os autores destacaram que após o processo de purificação alguns grânulos apresentaram resquício de material gelatinizado. Neste estudo, para todos os amidos, a remoção das camadas gelatinizadas gerou apenas alguns grânulos com a superfície irregular.

De modo geral os grânulos de amido intactos após o TTBU apresentaram uma superfície mais irregular, ranhuras e abaulamento na região do hilo, o que foi mais evidente conforme se aumentou a umidade de TTBU. Os grânulos remanescentes após a remoção da camada gelatinizada (≈ 50 %) dos amidos modificados por TTBU nas umidades de 21 e 24 % podem ser visualizados na figura 13 (D e E), respectivamente.

Nestes amidos é possível visualizar o aparecimento de cavidades na região do hilo em alguns grânulos, o que provavelmente está relacionado às áreas escuras observadas no microscópio ótico (Figura 9). Lee, Kim, Choi e Moon (2012) examinaram por MEV cortes transversais de grânulos de amido de batata modificados por TTBU sob diferentes temperaturas, umidades e tempos. Os autores verificaram uma grande região central vazia em muitos grânulos, a qual gradualmente aumentou com o aumento da umidade de tratamento, o que sugere que esta variável influencia de forma mais significativa na formação dessas cavidades do que a temperatura e o tempo durante TTBU.

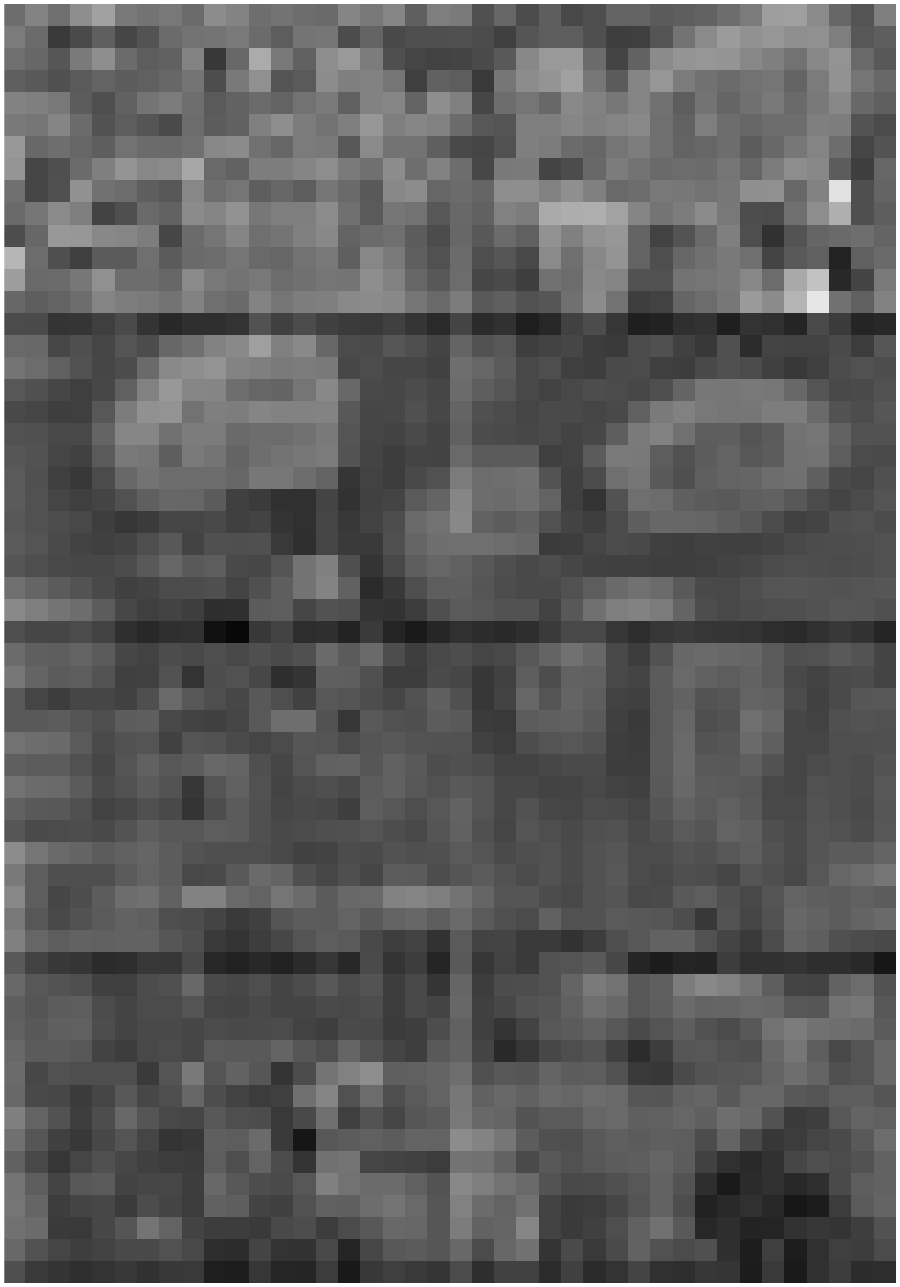


Figura 13 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de amido de batata nativo (A), superficialmente gelatinizados em solução de LiCl (B), e após remoção da superfície gelatinizada (C). Grânulos remanescentes dos amidos modificados por TTBU a 21 % (D) e 24 % (E) de umidade após a remoção da superfície gelatinizada.

3.3.3 Teor de amilose, poder de inchamento e lixiviação de amilose

O teor de amilose dos amidos foi influenciado tanto pelo tratamento hidrotérmico quanto pelo grau de remoção das camadas granulares (Tabela 2). O amido de batata nativo apresentou teor de amilose de 35,3 %, comparável aos valores de 33,5 e 34,0 % descritos por Varatharanjan et al. (2010) e Mbougueng et al. (2012), respectivamente, mas superior ao reportado por outros autores em que o teor de amilose foi entre 20,2 e 29,0 % (JANE; SHEN, 1993; JIRANUNTAKUL et al, 2011; HUANG et al., 2014).

Após o TTBU o teor de amilose aumentou com o incremento do teor de umidade dos tratamentos. A partir de 15 e 18 % de umidade de tratamento houve um aumento de aproximadamente 2,2 % no teor de amilose, e sob as umidades de 21 e 24 % o teor de amilose aumentou em 6,8 e 11,8 %, respectivamente. Um aumento nos teores de amilose após TTBU também foram relatados em amido de arroz (SUN; WANG; XIANG; ZHAO, 2013), em amido de milho (MIYOSHI, 2002) e em amidos de túberculos e raízes (GUNARATNE; HOOVER, 2002). A degradação de cadeias de amilopectina bem como a interação entre as cadeias de amido dentro da região amorfa do grânulo durante o TTBU estão entre os principais fatores atribuídos a um aumento da capacidade das cadeias de amilose em complexar com iodo (GUNARATNE; HOOVER, 2002, SUN et al., 2013).

No amido de batata nativo a amilose estava mais concentrada na região central e igualmente distribuída nas regiões intermediária e periférica dos grânulos (Tabela 2). Este resultado é oposto ao obtido para amido de batata por Jane e Shen (1993) e por Pan e Jane (2000) em amido de milho, no qual a amilose encontrava-se mais concentrada na periferia. Em contrapartida Wang et al. (2007) observaram variação na distribuição de amilose em amidos de arroz com diferentes teores de amilose, sendo que nas cultivares com teor de amilose entre 0 e 14,5 % a amilose estava ligeiramente mais concentrada no núcleo dos grânulos enquanto que no amido de arroz com maior teor de amilose (23,4 %) a distribuição da mesma foi superior na periferia. Do mesmo modo, Kuakpetoon e Wang (2007) reportaram que a amilose foi predominante na periferia dos grânulos de amido de milho com alto teor de amilose (50 % e

70 %), enquanto estava ligeiramente concentrada na região central em amido de milho comum (26,1 % de amilose).

Assim como para o amido de batata nativo, a distribuição radial de amilose granular para todos os amidos modificados por TTBU foi heterogênea, estando predominantemente concentrada nas regiões intermediária e central dos grânulos, exceto para o amido modificado sob maior umidade de TTBU (TTBU 24 %) em que a amilose estava concentrada na região periférica.

Tabela 2 - Teor de amilose, poder de inchamennto (PI) e lixiviação de amilose (LAM) dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) e de seus respectivos grânulos remanescentes após remoção de 30 e 50 % da superfície

	Nativo	TTBU 12%	TTBU 15%	TTBU 18%	TTBU 21%	TTBU 24%
			Amilose (%)			
0 %	35,3 ^{bD}	34,6 ^{bD}	37,6 ^{bC}	37,6 ^{cC}	42,2 ^{cB}	47,2 ^{aA}
30 %	35,5 ^{b}	38,8 ^{a}	40,7 ^{a}	41,9 ^{b}	47,9 ^{a}	46,2 ^{a}
50 %	38,3 ^{a}	39,2 ^{a}	40,6 ^{a}	48,0 ^{a}	45,7 ^{b}	43,9 ^{b}
			PI (g g $^{-1}$)			
0 %	59,6 ^{aA}	44,0 ^{bB}	21,2 ^{bC}	15,3 ^{aD}	11,9 ^{aE}	11,6 ^{aE}
30 %	57,0 ^{a}	53,9 ^{a}	24,1 ^{a}	14,1 ^{a}	11,0 ^{a}	11,0 ^{a}
50 %	49,7 ^{b}	31,2 ^{c}	21,4 ^{b}	14,3 ^{a}	10,5 ^{a}	11,0 ^{a}
			LAM (%)			
0 %	5,8 ^{cB}	9,4 ^{aA}	3,1 ^{aD}	2,1 ^{bE}	4,3 ^{bC}	3,9 ^{bC}
30 %	8,7 ^{b}	9,1 ^{a}	2,1 ^{b}	2,0 ^{b}	5,5 ^{a}	5,1 ^{a}
50 %	10,4 ^{a}	6,2 ^{b}	1,5 ^{c}	4,3 ^{a}	4,7 ^{b}	4,0 ^{b}

[a] Todos os dados estão apresentados em base seca e representam a média de três determinações. Valores seguidos de letra minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha, diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

O poder de inchamento (PI) e a lixiviação da amilose (LAM) dos amidos de batata nativo e modificados por TTBU estão apresentados na tabela 2. O poder de inchamento granular reduziu com o aumento da umidade de TTBU exceto para o TTBU 12 %. Em TTBU realizado a 15 e 21 % de umidade, o

poder de inchamento dos amidos reduziu em torno de 3 e 5 vezes em comparação ao amido nativo, respectivamente.

Na região central dos grânulos foi possivel observar que o PI diminuiu para o amido nativo e para o TTBU realizado sob a menor umidade de tratamento (TTBU 12 %). Isto sugere que a região central nesses amidos pode ter um arranjo estrutural mais compacto ou ser menos suscetível a penetração de água, necessária à hidratação e consequente inchamento granular. A remoção de camadas granulares não afetou o PI dos amidos modificados sob maiores teores de umidade de tratamento (18, 21 e 24 %), provavelmente porque o efeito do TTBU no PI, sob essas condições, foi mais intenso e homogêneo ao longo de todo o grânulo. As mudanças no PI foram mais variáveis em TTBU 12 %, o qual teve um acréscimo no PI de 44,0 $g.g^{-1}$ para 53,9 $g.g^{-1}$ e então uma drástica redução para 31,2 $g.g^{-1}$ nas regiões granulares periférica e central, respectivamente.

Um considerável aumento no PI após a remoção de aproximadamente 50% da superfície granular foi reportado em amido de arroz ceroso (WANG et al., 2007) e em amido de milho ceroso (KUAKPETOON; WANG, 2007), no entanto, ambos os autores descrevem apenas um ligeiro aumento ou a constância do PI para amidos de arroz e milho comuns, respectivamente. Não há disponível na literatura dados sobre PI em diferentes regiões granulares para amidos modificados por TTBU. Tester e Morrison (1990) propuseram que a amilopectina contribui para o inchamento, enquanto a amilose o restringe. Dessa forma, é possível que a redução no inchamento granular observada neste estudo após a modificação por TTBU, assim como para o amido nativo e TTBU 12% na região central dos grânulos, possa estar relacionada com o maior teor de amilose obtido para os mesmos (Tabela 2) ou a um efeito de maior compactação ou enconlhimento das moléculas após o TTBU como sugerido por Jiranuntakul et al. (2013), o que acosionaria uma restrição a penetração da água para o inteiror dos grânulos.

A lixiviação de amilose foi reduzida após o TTBU, exceto sob para TTBU 12 %, no qual a lixiviação aumentou de 5,8 % para 9,4 % (Tabela 2). Nos demais tratamentos, a redução na lixiviação foi maior em TTBU 15 e 18 %, nos quais a redução chega a metade do obtido para o amido nativo, e menos drástica em TTBU 21 e 24 %. A redução na lixiviação de amilose após TTBU

tem sido descrita na literatura (HOOVER; MANOEL, 1996, GUNARATNE; HOOVER, 2002; ZAVAREZE et al., 2010; VARATHARAJAN et al., 2010) e é atribuída a ocorrência de interações adicionais entre as cadeias de amilose e de amilose e amilopectina (Varatharanjan et al., 2011), ao aumento na formação de complexos entre amilose e lipídios (TESTER; MORRISON, 1990), bem como redução na capacidade de hidratação e consequente inchamento dos grânulos (HOOVER; MANOEL, 1996).

Após a remoção de camadas granulares por gelatinização química em solução de LiCl, a lixiviação de amilose no amido de batata nativo em TTBU 18% aumentou com o aumento do grau de remoção da superfície, enquanto que para os amidos modificados por TTBU esse comportamento foi dependente da umidade de tratamento aplicada (Tabela 2). Em TTBU a 12 e 15 % de umidade, houve redução da lixiviação de amilose na região central granular enquanto que para TTBU 21 e 24 % houve um acréscimo da mesma entre as regiões intermediária e central dos grânulos.

3.3.4 Cristalinidade relativa e difração de raios-X

Os difractogramas de raios-X dos amidos de batata nativo e modificados por TTBU, bem como de suas respectivas regiões granulares intermediária e central remanescentes estão apresentados na figura 14. O amido de batata nativo apresentou padrão de raios-X típico de tipo B, com pico de difração forte em 17° (2 θ) e picos de difração medianos em 5,6 º, 15 º, 20 º, 22 º and 24 ° (2 θ). Após o TTBU a intensidade do pico em 5,6 ° e 20 ° foi consideravelmente reduzida, e os picos em 17 °, 22 ° e 24 ° mostraram-se menos resolvidos. Tais alterações indicam a mudança no padrão de raios-X bem como a presença presença de células unitárias do tipo A e do tipo B nos amidos modificados por TTBU. Essas alterações foram gradualmente pronunciadas a partir do TTBU a 18 % de umidade. Em TTBU a 24 % de umidade, esses picos foram inexistentes e o padrão de raios-x do tipo A pode ser confirmado pela detecção dos picos em 15 °, 20 ° e 23 ° (2 θ) e o característico dubleto em 17 ° e 17,8 ° (2 θ). Não houve alteração no padrão de raios-X após a remoção das camadas de amido granular.

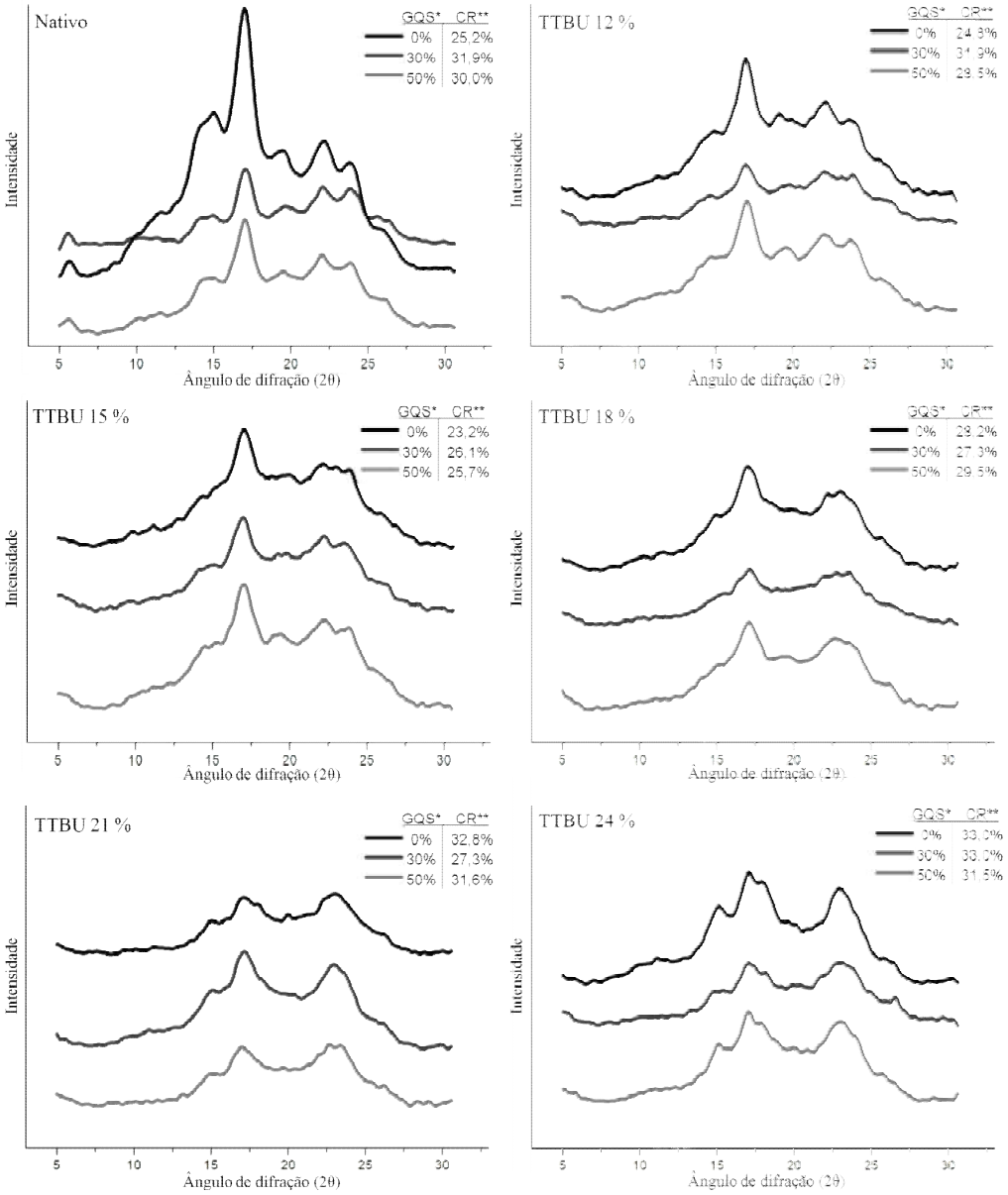


Figura 14 - Difratogramas de raios-X dos amidos de batata nativo e modificados por TTBU e seus respectivos grânulos remanescentes em diferentes regiões granulares. Onde: *GQS = gelatinização química de superfície (0, 30 e 50 % de remoção da superfície granular); **CR = cristalinidade relativa.

A extensão da transformação polimórfica em amido de batata tem sido atribuída à desidratação das 36 moléculas de água presentes no canal central da célula unitária do tipo B, bem como pelo movimento de um par de duplas

hélices dentro desse canal central anteriormente ocupado pelas moléculas de água (GUNARATNE; HOOVER, 2002). De acordo com Varatharajan et al. (2010) uma redução da intensidade de pico em 5,6 ° em amido de batata após o TTBU pode ser advinda de reorientação dos cristais e perda da ordem de empacotamento desses cristais dentro da matriz cristalina do amido. Além disso, os autores sugeriram que redução da intensidade de pico em 20° pode ser um indicativo de reorientação de hélices simples de amilose e amilopectina ou interações entre essas hélices. Neste estudo, a gradual redução das intensidades destes picos de difração e mudança de estado polimórfico (tipo B → tipo A+B ou tipo A) com o incremento da umidade de TTBU, pode ser consequência de um aumento na mobilidade das cadeias de amido dentro da estrutura granular advindo do maior conteúdo de água presente dentro dos grânulos durante o tratamento.

A cristalinade relativa do amido de batata reduziu após o TTBU nas umidades de 12 e 15 %, enquanto foi consideravelmente maior após os tratamentos realizados sob maiores teores de umidade (Figura 14). A redução da cristalinidade relativa após TTBU é comum e tem sido reportada por outros autores (CHUNG; LIU;HOOVER, 2009, VARATHARAJAN et al., 2010, GUNARATNE; HOOVER, 2002) e tem sido atribuída ao colapso da fase cristalina de amilopectina pelo excesso de calor e de umidade aplicados durante o tratamento hidrotérmico (CHUNG et al., 2009). Contudo, um aumento da cristalinidade relativa após o TTBU é menos comum (HOOVER; MANOEL, 1996; HOOVER; VASANTHAN, 1994; VERMEYLEN et, 2006), e pode estar associado a um possível deslocamento de duplas hélices dentro dos cristalitos de amido no sentido de formar uma estrutura cristalina mais ordenada (HOOVER; VASANTHAN, 1994).

Vermeylen et al. (2006) modificaram amido de batata por TTBU (90-130 °C, 23 % b.u., 24 h) e observaram uma redução da cristalinidade relativa nos amidos modificados até 120 °C, enquanto que a temperatura de 130 °C ou mais, foi obtido um material altamente cristalino. Os autores verificaram que o amido modificado a 130 °C apresentou elevado número de cadeias de amilopectina curtas (grau de polimerização ≤ 6), indicando possível degradação térmica do material. Portanto, o aumento da cristalinidade nesse amido foi atribuído à formação de novos cristalitos, em decorrência de um rearranjo

cristalino promovido pela maior mobilidade das cadeias após rompimento de ligações entre as duplas hélices e posterior reorganização durante o TTBU.

Após a remoção da superfície granular, os grânulos remanescentes do amido nativo e modificados por TTBU nas menores umidades de tratamento térmico (12 e 15 %) apresentaram um aumento da cristalinidade relativa, sobretudo na região intermediária dos grânulos (remoção de 30 % da superfície granular). Em TTBU a 18 e 21 % de umidade o percentual de CR ao longo do grânulo foi variável, mas superior nas porções central e periférica, respectivamente. Já para o TTBU a 24 % de umidade a cristalinidade relativa foi inferior na região central, o que está de acordo com as micrografias desses amidos, nas quais o aparecimento de áreas escuras observadas na região do hilo por microscopia ótica (Figura 9) e de cavidades na região central dos grânulos vistos nas imagens de MEV (Figura 13) sugerem menor organização granular nessa região.

3.3.5 Propriedades térmicas

As propriedades de gelatinização dos amidos após o TTBU foram variáveis e dependentes do percentual de umidade aplicado durante o tratamento (Tabela 3). De modo geral, o TTBU antecipou a temperatura de início da gelatinização (exceto para TTBU 24 %) e ocasionou redução da entalpia de gelatinização em todos os amidos, a qual foi mais expressiva com o aumento da umidade de tratamento. Os amidos modificados por TTBU sob os menores teores de umidade (12 e 15 %) apresentaram redução na temperatura de pico (Tp) e temperatura de conclusão (Tc) de gelatinização, enquanto que sob as maiores umidades de tratamento (21 e 24 %) um aumento dessas temperaturas foi observado, especialmente na Tc, as quais aumentaram 10 e 17 °C, respectivamente. O TTBU a 18 % de umidade apresentou temperaturas de gelatinização intermediárias entre os amidos modificados, sendo a Tp ligeiramente inferior e a Tc superior do que o observado para o amido de batata nativo.

Tabela 3 - Propriedades térmicas dos amidos de batata nativos e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) em diferentes regiões granulares

Amido	Superfície removida (%)	Temperaturas de gelatinização (°C)[a]					ΔH^b (J g $^{-1}$)
		To	Tp1	Tp2	Tc	Tc-To	
Nativo	0	61,7	65,3	-	71,3	9,5	14,8
	30	61,3	65,4	-	71,5	10,2	13,3
	50	60,9	65,3	-	71,6	10,7	12,8
TTBU 12 %	0	57,7	62,6	-	70,0	12,3	10,6
	30	57,2	62,5	-	69,4	12,2	10,9
	50	58,1	63,7	-	70,9	12,8	12,2
TTBU 15 %	0	55,7	62,0	-	69,4	13,7	11,2
	30	55,7	62,1	-	69,5	13,9	12,1
	50	55,7	62,3	-	70,3	14,6	13,6
TTBU 18 %	0	56,2	63,8	-	72,3	16,0	8,0
	30	56,1	64,6	-	74,5	18,4	8,8
	50	54,1	67,2	-	74,3	20,2	6,1
TTBU 21 %	0	60,4	67,8	75,2	81,6	21,1	7,6
	30	60,6	67,2	76,5	81,6	21,0	7,0
	50	61,8	69,6	77,4	83,2	21,4	7,4
TTBU 24 %	0	62,7	70,9	79,8	88,3	25,6	6,4
	30	63,7	70,2	80,2	86,7	23,0	9,2
	50	64,6	72,4	81,6	87,9	23,3	7,2

[a] To = temperature de início; Tp = temperatura de pico; Tc = temperatura de conclusão. Tc-To = faixa de temperatura de gelatinização; [b] ΔH = entalpia de gelatinização em J g $^{-1}$.

Um aumento da Tp e Tc em amidos modificados por TTBU tem sido atribuído à fusão de cristalitos do tipo B presentes no amido nativo e à fusão de cristalitos do tipo A formados durante a transformação polimórfica, e pela interação entre cadeias de amilose e de amilopectina (HOOVER, 2010, VARATHARAJAN et al., 2010; JIRANUNTAKUL et al., 2011). De acordo com Vermeylen et al. (2006), a reorientação ou a formação de novos cristalitos são

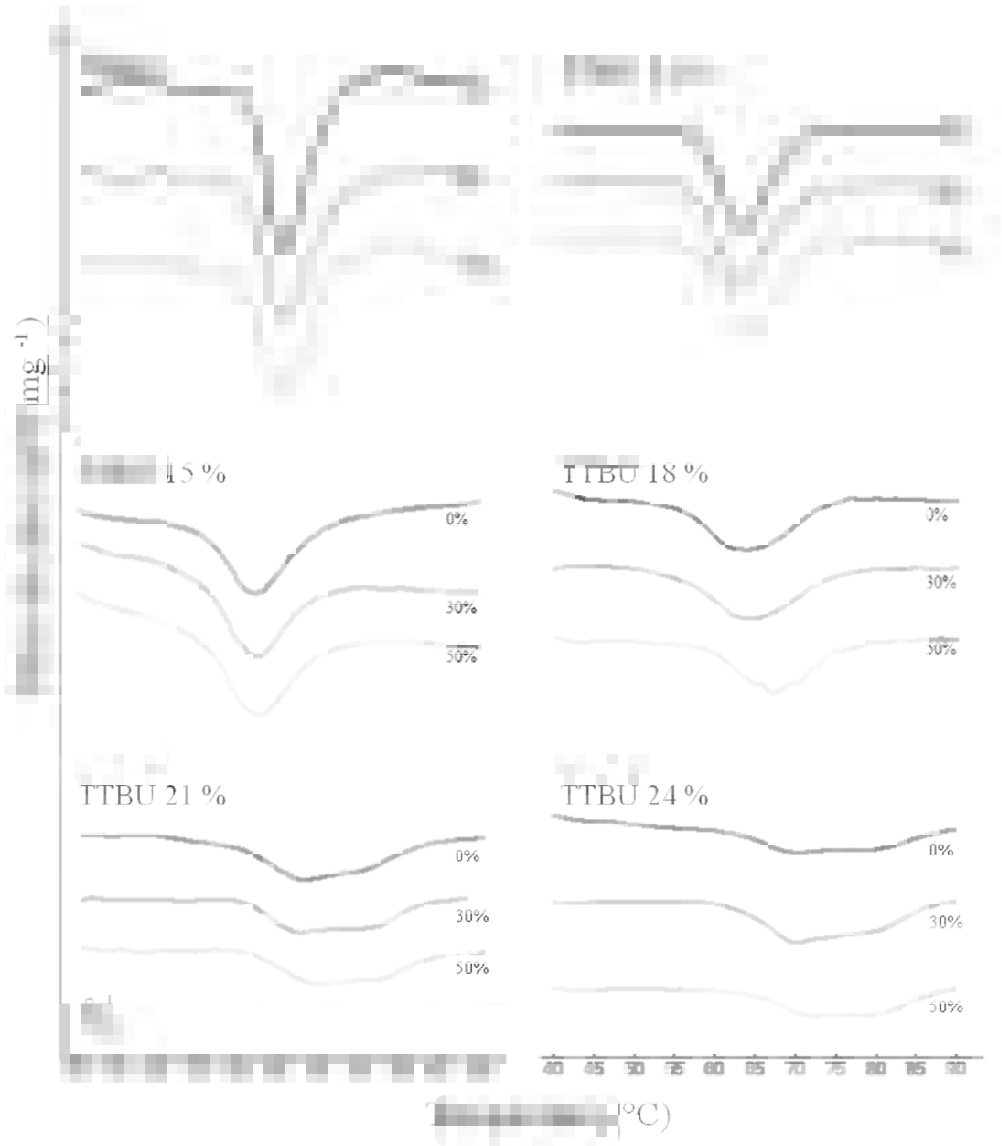
fatores que podem contribuir para um aumento nas temperaturas de gelatinização e da cristalinidade relativa em amidos modificados por TTBU. Neste estudo, a maior Tp e a mudança gradual no padrão de difração de raios-X (Figura 14), em combinação com o aumento do percentual de cristalinidade relativa, observados nos amidos modificados por TTBU sob maiores umidades de tratamento (21 e 24 %) é consistente com esta hipótese.

A não convencional redução na temperatura de gelatinização observada nos amidos modificados sob menores percentuais de umidade (12, 15 e 18 %) não é clara, mas coerente com a redução da entalpia de gelatinização e da cristalinidade relativa nesses amidos, as quais sugerem a ruptura de duplas hélices presentes em regiões amorfas e cristalinas. Logo, é possível que, sob as condições de TTBU aplicadas (1 h, 110 °C), o conteúdo de água presente nesses amidos foi suficiente para enfraquecer ou romper ligações de hidrogênio inter e intramoleculares dentro dos grânulos de amido, mas não para promover o rearranjo da estrutura de modo a aumentar o reforço das interações das moléculas.

Na figura 15 pode-se observar que o TTBU promoveu um alargamento das endotermas de gelatinização em todos os amidos, o qual foi crescente com o aumento da umidade de tratamento. Além disso, em TTBU a 21 e 24% de umidade foi observado o aparecimento de um segundo pico de gelatinização (pequeno pico à direita do pico principal) (Figura 15), o qual tem sido descrito como transição bifásica e atribuído à formação de novas fases cristalinas com diferentes estabilidades térmicas (JIRANUNTAKUL et al., 2011).

Após a remoção das camadas, os grânulos remanescentes do amido de batata nativo não apresentaram alteração da Tp, mas a faixa de temperatura de gelatinização foi aumentada (To reduziu e Tc aumentou) e a entalpia reduzida. Já nos amidos modificados por TTBU, a remoção das camadas granulares proporcionou aumento da Tp e o alargamento das endotermas de gelatinização em todos os amidos. Nas umidades de 12 e 15 % de TTBU, To e Tp reduziram, enquanto que em TTBU a 18, 21 e 24 % de umidade o oposto ocorreu. Uma redução da Tp também foi observada em amido de arroz comum e ceroso (WANG et a., 2007) e em amido de milho comum e ceroso (KUAKPETOON; WANG, 2007) após a remoção de 10, 20 e 50 % da superfície granular. O aumento na entalpia de gelatinização em TTBU

a 12 e 15 % de umidade após a remoção de 30 e 50 % da superfície granular concorda com os maiores percentuais de cristalinidade relativa nessas porções granulares, no entanto, não foi possível visualizar uma tendência no comportamento de ΔH para os demais amidos modificados por TTBU.



Fugura 15 – Curvas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) e seus respectivos grânulos remanescentes após remoção de 30 e 50 % de superfície.

3.4 Conclusão

A modificação do amido de batata por TTBU afeta a morfologia e a a estrutura granular do amido de batata. A formação de áreas escuras na região do hilo e a transformação no padrão polimórfico do tipo B para uma mistura dos tipos A + B foi obtida por TTBU. Redução do poder de inchamento e lixiviação da amilose, bem como maiores teores de amilose concentrada nas regiões mais internas dos grânulos, ocorre com o aumento do percentual de umidade no TTBU.

O TTBU em umidade de 12 e 15 % confere menor cristalinidade relativa e redução nas temperaturas de gelatinização do amido de batata, enquanto em maior umidade (21 e 24 %), um aumento dessas propriedades é observado.

Este estudo é o primeiro que aborda uma caracterização detalhada sobre as regiões internas de grânulos de amido modificado por TTBU utilizando a técnica de gelatinização química de superfície. A remoção de camadas dos grânulos mostrou que as alterações promovidas pela modificação hidrotérmica ocorre em toda a porção granular e não apenas em determinadas partes isoladas.

4 CAPÍTULO 2 - Propriedades de pasta, morfologia e suscetibilidade enzimática de amido de batata modificado por TTBU: estudo de grânulos inteiros e remanescentes após gelatinização química de superfície

4.1 Introdução

O amido é um polissacarídeo abundante na natureza, relativamente barato e naturalmente renovável, o qual encontra ampla aplicação na indústria de alimentos e polímeros. A composição e as características da organização granular são o que determinam a funcionalidade nos amidos e, consequentemente, a sua aplicação posterior (BULEÓN et al., 1998; HOOVER, 2010). Contudo, a utilização de amidos na forma nativa apresenta limitações em determinados tipos de processamentos, sendo a modificação deste polímero uma alternativa para atingir uma determinada funcionalidade ou mesmo para ampliar as possibilidades de aplicação.

O tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) tem se mostrado uma alternativa altamente promissora para a geração de aditivos alimentares ou ingredientes com propriedades específicas (HOOVER et al., 2010; ZAVAREZE; DIAS, 2010).

Os principais efeitos observados após o TTBU incluem alterações no padrão polimórfico, no grau de cristalinidade relativa, no inchamento e na lixiviação de amilose granular, nos perfis térmicos e de viscosidade e na suscetibilidade enzimática dos grânulos (GUNARATNE; CORKE, 2002). A extensão das alterações provocadas pelo TTBU é influenciada pela composição do amido, organização das cadeias de amilose e amilopectina no interior dos grânulos e pelas condições (temperatura, umidade e tempo) prevalecentes durante o tratamento (HOOVER, 2010; ZAVAREZE; DIAS, 2011). A arquitetura granular e, mais especificamente, a organização dos grânulos na superfície, têm sido apresentada como um fator determinante nas propriedades de pasta e na suscetibilidade enzimática (cinética e grau de hidrólise) de amidos modificados por TTBU.

Inúmeros estudos relatam os efeitos do TTBU sobre a estrutura e as propriedades físico-químicas de amidos de diferentes fontes botânicas (HOOVER, 2010; ZAVAREZE et al., 2010; VARATHARAJAN et al., 2011),

entretanto, poucos são os estudos que fornecem alguma compreensão das alterações estruturais ocorridas em amidos submetidos ao TTBU em nível intragranular. Dessa forma, a maioria das respostas para os processos desencadeados durante essa modificação permanecem pouco esclarecidos.

Neste estudo, a técnica de gelatinização química de superfície a partir de solução de LiCl concentrada foi utilizada para remover 50 % da superfície granular a fim de estudar a estrutura interna dos grânulos de amido de batata modificado por TTBU. Além disso, o TTBU também foi realizado em grânulos remanescentes do amido nativo sob as mesmas condições para efeito de comparação. As propriedades de pasta, morfológicas e suscetibilidade enzimática dos grânulos foram investigadas.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material

Amido de batata foi extraído a partir de batatas (*Solanumtuberosum* L.) da cultivar BRS IPR-Bel, conforme método proposto por Liu, Weber, Currie e Yada (2003). Para a realização da hidrólise enzimática foi utilizada a enzima α-amilase pancreática (A3176) adquirida da Sigma-Aldrich Ltda. (St Louis, USA).

4.2.2 Tratamento térmico em baixa umidade (TTBU)

O tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) foi realizado em amido de batata com umidade ajustada para 12, 15, 18, 21 e 24 % b.u. (TTBU 12 %, TTBU 15 %, TTBU 18 %, TTBU 21 % e TTBU 24 %, respectivamente). O procedimento está descrito no capítulo 1 (item 2.2). TTBU também foi realizado em grânulos remanescentes do amido nativo, obtidos por gelatinização química de superfície após remoção de 50 % da superfície (item 2.3), sob as mesmas condições de temperatura e tempo nas umidades de 15 e 21 % (estes tratamentos foram escolhidos por apresentarem propriedades intermediárias entre os amidos modificados).

4.2.3 Gelatinização química de superfície

Para o estudo da estrutura interna os grânulos de amido foram submetidos à gelatinização química de superfície (GQS) em solução de LiCl 13 $mol.L^{-1}$ para remover aproximadamente 50 % da superfície granular. O processo foi baseado no método proposto por Pan e Jane (2000) e a descrição detalhada das condições utilizadas durante a gelatinização, bem como a separação do amido gelatinizado dos grânulos remanescentes, está descrita no capítulo 1 (item 2.3).

4.2.4 Morfologia

Os grânulos originais e remanescentes foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (Shimadzu, SSX-550). As amostras foram espalhadas diretamente sobre a superfície de *stubs* e revestidas com ouro, sendo posteriormente examinadas ao microscópio eletrônico de varredura a uma tensão de aceleração de 15 kV.

4.2.5 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta dos amidos foram avaliadas por RVA - *Rapid Visco Analyser* (modelo RVA-4, *Newport Scientific*, Austrália), através do perfil *Standard Analysis 1* utilizando 2,5 g de amostra corrigida para 14 % de umidade. As amostras foram aquecidas a 50 °C em 1 min, e posteriormente a 95 °C em 3,5 min. Foram mantidas a 95 °C durante 2,5 min e então foram resfriadas a 50 °C em 3,8 min, e mantidas a 50 °C por 2 min. A velocidade de rotação foi mantida em 960 rpm durante 10 s e então, mantida a 160 rpm durante o restante do processo. A partir do viscoamilograma obtido foi avaliada a temperatura de início da formação de pasta, pico de viscosidade, viscosidade inicial, quebra da viscosidade, viscosidade final e a tendência à retrogradação.

4.2.6 Suscetibilidade enzimática

A hidrólise enzimática foi baseada no método proposto por Varatharajan et al. (2011) com algumas modificações. Uma amostra de 0,5 g de amido foi dispersa em 40 mL de solução tampão com pH 6,9 contendo 0,02 $mol.L^{-1}$ de $CaCl_2$ e mantido a 40 °C sob agitação constante. Após 10 min, 1200 U de α-amilase foi adicionada e o início da reação definido. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos intervalos de tempo de 15 e 30 min e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 e 32 h de digestão. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de etanol 95% e a amostra foi centrifugada (5 min, 1000 g). A taxa de hidrólise (%) para cada intervalo de tempo foi determinada pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e defida como a quantidade de açúcares redutores gerados no sobrenadante, expressos em mg de equivalentes de maltose liberados por 100 mg de amido (b.s.).

4.2.7 Análise estatística

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata, e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5 % de significância a partir de análise da variância (ANOVA).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Morfologia

A morfologia dos amidos de batata nativo e modificado por TTBU a 12, 15, 18, 21 e 24 % de umidade foi obtida por microscopia eletrônica de varredura e pode ser visualizada na figura 16. Após o tratamento térmico em baixa umidade os amidos mantiveram morfologia granular semelhante à do amido nativo, no entanto, a partir de 15 % de umidade de tratamento, alguns pontos de aglomeração, ranhuras e abaulamento na região do hilo em alguns grânulos foram observados, o que foi mais evidente com o aumento da umidade de tratamento. Fragmentação granular com evidência de cavidade na

região do hilo também foi verificada em alguns grânulos dos tratamentos sob as maiores umidades (21 e 24 %).

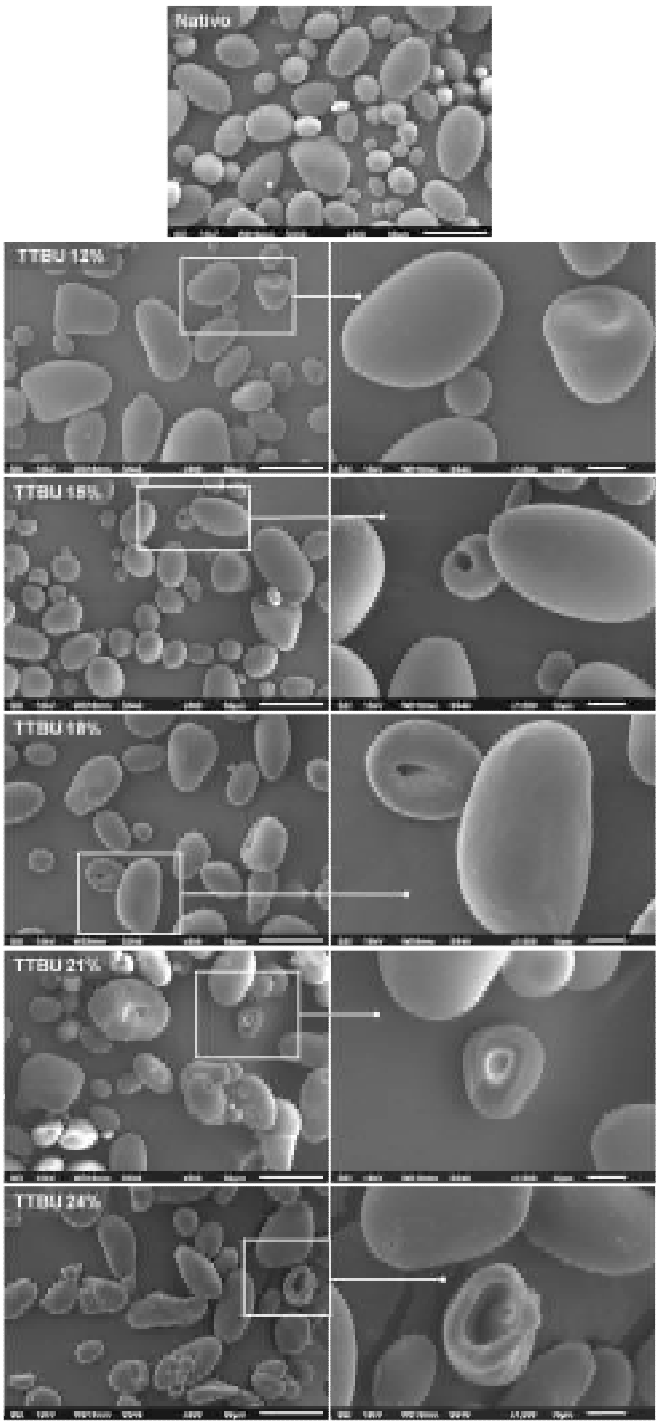


Figura 16 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos amidos de batata nativos e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) nas umidade de 12, 15, 18, 21 e 24 %.

A remoção de 50 % da superfície granular prévia ou após a realização do TTBU a 15 e 21 % de umidade não alterou as características dos grânulos dos amidos como pode ser evidenciado por imagens de MEV apresentadas no Capítulo 1, Figura 13.

4.3.2 Propriedades de pasta

O perfil viscoamilográfico dos amidos de batata nativo e modificados por TTBU estão apresentados na figura 17. As propriedades de pasta do amido de batata nativo foram siginificativamente alteradaa pelo TTBU e dependentes da umidade de tratamento aplicada (Tabela 4).

Tabela 4 - Propriedades de pasta dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU)

	TP** (°C)	PV (cP)	Quebra (cP)	Vf (cP)	Retrogradação (cP)
Nativo	51,0* [b]	5799,7 [a*]	3244,3 [a]	2832,0 [c]	271,0 [d]
TTBU 12 %	51,2 [b]	4252,3 [b]	1360,7 [b]	3173,3 [b]	279,3 [d]
TTBU 15 %	53,5 [a]	1808,7 [c]	310,3 [c]	4386,3 [a]	2885,3 [a]
TTBU 18 %	50,1 [b]	576,3 [d]	229,0 [d]	1032,0 [d]	684,7 [b]
TTBU 21 %	51,4 [b]	256,7 [e]	105,7 [e]	539,3 [e]	386,3 [c]
TTBU 24 %	52,4 [ab]	115,7 [f]	20,3 [f]	236,3 [f]	141,0 [e]

* Médias aritméticas seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. **TP: temperatura de pasta; PV: pico de viscosidade; Vf: viscosidade final.

O pico de viscosidade e a quebra foram reduzidas nos amidos conforme se aumentou a umidade de tratamento hidrotérmico. Adicionalmente, um aumento no tempo para o pico de viscosidade (Figura 17) é coerente com a redução no pico de viscosidade dos amidos submetidos ao TTBU. A temperatura de pasta não apresentou variação significativa após a modificação, ainda que muitos

estudos demonstrem um aumento dessa propriedade após TTBU (HOOVER, 2010).

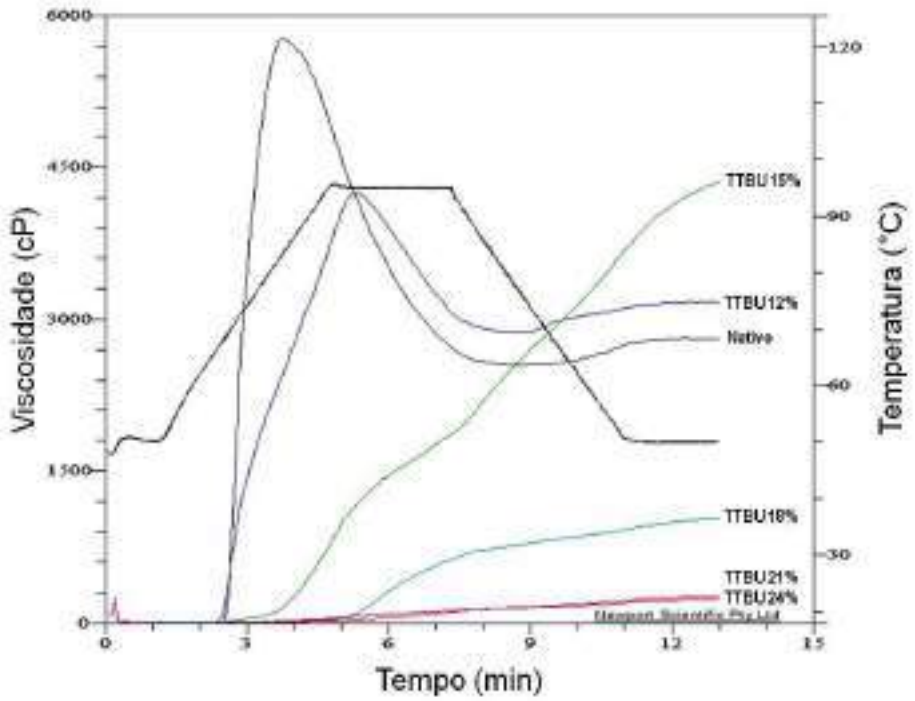


Figura 17 - Viscoamilograma de amido de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) em diferentes umidades.

Pastas menos viscosas e mais estáveis ao aquecimento e cisalhamento são características em amidos modificados por TTBU em diferentes tipos de amido sob diferentes condições de temperatura e umidade de tratamento (HOOVER; VASANTHAN, 1994; GUNARATNE; HOOVER, 2002; ADEBOWALE et al., 2005; VATHARAJAN et al., 2010; KLEIN et al., 2013; JIRANUNTAKUL et al., 2011). O decréscimo no pico de viscosidade em pastas de amido submetido à TTBU tem sido atribuída ao reforço de interações entre as cadeias de amidom o que proveria rigidez à estrutura granular e dificultaria o inchamento em água (HOOVER; VASANTHAN, 1994). Jiranuntakul et al., (2011) também sugeriram que uma restrição à penetração de água nos grânulos de amido de batata após o TTBU pode estar relacionada à gelatinização parcial ou encolhimento das estruturas bloquetes na superfície granular, como evidenciado por microscopia de força atômica.

Em TTBU 12 e 15 % houve um crescente e expressivo aumento da viscosidade final, a qual reduziu gradativamente a partir de TTBU 18 %. A tendência à retrogradação foi maior após a modificação em todos os amidos, exceto em TTBU 24 %, o qual reduziu de 271 cP para 141 cP.

A viscosidade final e a tendência à retrogradação podem ser influenciadas pela lixiviação da amilose, tamanho do grânulo e presença de grânulos intumescidos não fragmentados na pasta, além disso a origem botânica, cultivar, conteúdo de amilose e outras características químicas e estruturais também podem influenciar o comportamento das pastas após modificação por TTBU (HOOVER et al., 2010; ZAVAREZE; DIAS, 2011). A redução na viscosidade final e a tendência à retrogradação são comumente descritas em amidos modificados por TTBU e têm sido atribuídas a um reforço nas interações entre as cadeias de amido (ZAVAREZE et al., 2010, VARATHARAJAN et al. 2010). A menor tendência à retrogradação observada para TTBU 24 % é coerente com a expressiva redução da lixiviação de amilose também observada para esse amido.

A tendência à retrogradação observada nos amidos modificados por TTBU não apresentou um padrão dependente do aumento de umidade durante o tratamento (TTBU 15 % > TTBU 18 % > TTBU 21 % > TTBU 12 % > Nativo > TTBU 24 %). O elevado valor para retrogradação obtido para o TTBU a 15 % de umidade foi discrepante entre os amidos, mas coerente com a elevada viscosidade final também observada para o mesmo.

Uma maior tendência à retrogradação e viscosidade final é atípico em amidos modificados por TTBU, mas podem ser reflexo do aumento na proporção de grânulos intactos inchados, os quais conferem maior resistência ao cisalhamento durante o ciclo de resfriamento no RVA (VARATHARAJAN et al., 2010). De acordo com Adebowale et al., (2005) uma maior viscosidade final pode indicar a presença de moléculas de amido que se dissolvem em proporções maiores à medida que as soluções são arrefecidas. Não foram encontrados estudos que descrevam um comportamento similar em amido de batata modificado por TTBU.

Amido de pinhão foi modificado por Pinto et al., (2012) por 1 h em autoclave sob as umidades de 15, 20 e 25 % e temperaturas de 100, 110 e 120 °C. Em todos os casos, os amidos apresentaram redução no pico de

viscosidade e na quebra bem como aumento da viscosidade final e da tendência à retrogradação, similar ao observado neste estudo. De acordo com os autores, os resultados para essas propriedades de pasta não apresentaram uma tendência em relação à temperatura ou umidade aplicados durante o TTBU, mas antes, foi variável entre os tratamentos. Klein et al. (2013) também relataram aumento da retrogradação e viscosidade final em amido de mandioca e pinhão modificados por TTBU (100 e 120 °C, 1 a 2 h). Os autores atribuíram a maior viscosidade final nesses amidos à maior dureza de gel observada nas pastas dos mesmos. Adebowale et al. (2005) avaliaram as propriedades de pasta em amido de sorgo vermelho modificado por TTBU (16 h, 100 °C) e observaram que a viscosidade final e a tendência à retrogradação aumentaram quando o TTBU foi realizado a 24 e 27 % de umidade, mas se mantiveram inalteradas ou foram levemente superiores quando o TTBU foi realizado a 24 e 27 % de umidade.

Para compreender a contribuição da porção interna dos grânulos nas propriedades de pasta, os amidos de batata nativo e modificados por TTBU foram submetidos à gelatinização química de superfície para remoção de 50 % da superfície granular. Além disso, o TTBU também foi realizado em grânulos remanescentes de amido de batata nativo (50 % de remoção da superfície granular) nos teores de umidade de 15 e 21 % para avaliar o efeito da modificação realizada diretamente nessa fração dos grânulos. As propriedades de pasta dos grânulos inteiros e remanescentes dos amidos nativo e modificados estão descritas na tabela 5 e as curvas viscoamilográficas estão apresentadas nas figuras 18 e 19.

Os grânulos remanescentes do amido de batata nativo após gelatinização química de superfície apresentaram redução do pico de viscosidade, da quebra e da viscosidade final, mas aumento na temperatura de pico e na tendência à retrogradação. A partir viscoamilograma de RVA (Figura 18) é possível observar a curva marcadamente menor e deslocada para a direita, reflexo da maior dificuldade dos grânulos remanescentes em inchar e formar uma pasta viscosa.

Tabela 5 - Propriedades de pasta dos amidos de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) antes e após a remoção de 50 % da sua superfície

	TP** (°C)	PV (cP)	Quebra (cP)	Vf (cP)	Retrogradação (cP)
Nativo	51,0 [b*]	5799,7 [a]	3244,3 [a]	2832,0 [a]	271,0 [b]
Nativo/GQS***	55,5 [a]	1502,3 [b]	96,7 [b]	2220,0 [b]	816,7 [a]
TTBU15 %	53,5 [a]	1808,7 [a]	310,3 [a]	4386,3 [a]	2885,3 [a]
TTBU/GQS 15 %	55,5 [a]	1004,7 [b]	197,7 [b]	1665,0 [c]	858,0 [b]
GQS/TTBU 15 %	51,3 [b]	204, 0 [c]	47,7 [c]	3303,0 [b]	174,0 [c]
TTBU 21 %	51,4 [b]	90,3 [d]	35,0 [b]	195,0 [a]	194,0 [b]
TTBU/GQS 21 %	51,0 [b]	256,7 [a]	105,7 [a]	539,3 [c]	386,3 [a]
GQS/TTBU 21 %	55,9 [a]	121,3 [d]	21,0 [c]	248,0 [b]	94,3 [c]

* Médias aritméticas seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância.. **TP: temperatura de pasta; PV: pico de viscosidade; Vf: viscosidade final. ***GQS: gelatinização química de superfície a 50 % de remoção granular.

Os grânulos remanescentes de TTBU a 15 % apresentaram aumento da temperatura de pasta e redução de todas as viscosidades de pasta (Figura 18), enquanto que em TTBU a 21 %, todas as viscosidades de pasta aumentaram nos grânulos remanescentes e a temperatura de pasta não foi afetada (Figura 19). Esse comportamento indica que a contribuição da região interna dos grânulos de amido de batata nativo e modificado a 15 % de umidade para o desenvolvimento de pastas viscosas foi significativamente menor do que em TTBU a 21 %, no qual a região central dos grânulos foi mais disponível à difusão e absorção de água para o inchamento granular e consequente desenvolvimento de viscosidade.

Figura 18 - Viscoamilograma de amido de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) a 15 % de umidade antes e após remoção de 50 % da superfície granular.

Figura 19 - Viscoamilograma de amido de batata nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) a 21 % de umidade antes e após remoção de 50 % da superfície granular.

O TTBU realizado nos grânulos remanescentes de amido de batata nativo (remoção de 50 % da superfície) apresentaram características de pasta marcadamente diferentes das obtidas quando o TTBU foi realizado nos grânulos intactos. O TTBU realizado tanto prévio como posteriormente à remoção de 50 % da superfície granular ocasionou redução das propriedades de pasta em TTBU a 15 %. No entanto, a intensidade de redução foi drasticamente maior quando o TTBU a 15 % de umidade foi realizado diretamente na fração remanescente dos grânulos (Figura 18).

Para TTBU a 21 % prévio ou posterior a remoção granular houve uma maior variabilidade no comportamento das pastas (Tabela 5). O TTBU realizado diretamente nessa fração granular ocasionou aumento de viscosidade (inicial e final) e temperatura de pasta mas menores valores de quebra e retrogradação quando comparados aos grânulos remanescentes do TTBU relizado nos grânulos inteiros. Além disso, é possível observar uma menor variação no perfil viscoamilográfico das curvas dos amidos modificados a 21 % de umidade (grânulos inteiros e remanescentes antes e após modificação por TTBU) do que a 15 % de umidade. Isto é um indicativo de que a maior umidade permitiu maior homogeneidade do tratamento ao longo do grânulo.

Huang et al. (2014) apresentam o único estudo disponível na literatura sobre as propriedades de pasta em amido submetido a fracionamento por gelatinização química de superfície. Os autores avaliaram amido de batata ceroso e comum (26 % de amilose) na forma nativa e submetidos à acetilação antes e após remoção aproximada de 70 % da superfície granular. Assim como observado neste estudo, os grânulos remanescentes de amido de batata ceroso e comum apresentaram redução no pico de viscosidade.

4.3.3 Hidrólise enzimática

A investigação da hidrólise enzimática do amido é uma forma de refinar a compreensão da estrutura dos grânulos, uma vez que diferenças de susceptibilidade podem ser um reflexo de características estruturais (ZHANG; DHITAL; GIDLEY, 2013). A taxa de hidrólise (%) dos amidos de batata nativo e

submetidos ao tratamento térmico em diferentes teores de umidade durante 32 h de digestão com α-amilase pacreática pode ser visualizada na figura 20.

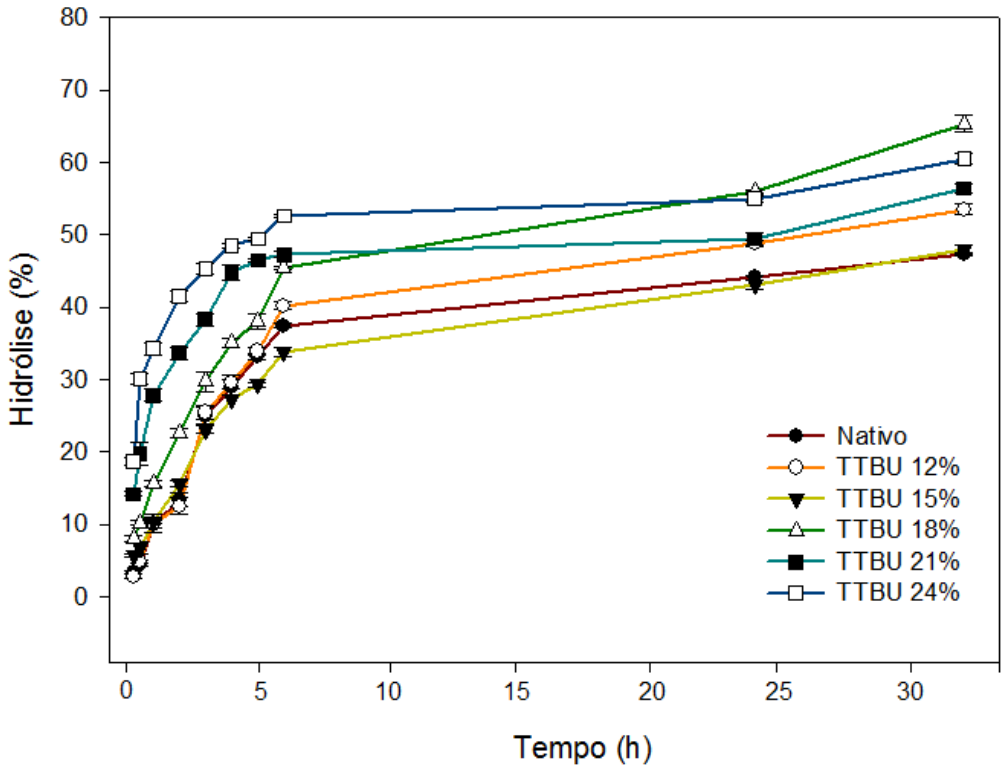


Figura 20 – Hidrólise enzimática (%) dos amidos de batata de nativo e modificados por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU).

Os amidos modificados sob as menores umidades de tratamento (12 e 15 %) apresentaram menor digestibilidade entre os amidos modificados por TTBU, sendo que até 4 h de digestão, a taxa de hidrólise nesses amidos foi equivalente ou similar a obtida para o amido nativo. Nos amidos modificados sob umidades mais elevadas (18, 21 e 24 %), a digestibilidade foi maior e gradual com o aumento da umidade de TTBU durante as primeiras 6 h de digestão.

A partir de 5 h de digestão, dois comportamentos distintos e controversos puderam ser observados para os amidos modificados sob umidades mais baixas. O amido modificado a 12 % de umidade passou a apresentar uma taxa de hidrólise maior do que o amido nativo (6 h de digestão) enquanto que no amido modificado a 15 % de umidade, a taxa de hidrólise foi

reduzida (5 e 6 h) ou foi igual (24 e 32 h) ao observado para o amido nativo. No amido TTBU a 18 % de umidade houve um aumento gradual na taxa de hidrólise após 6h de digestão, o qual ultrapassou os valores obtidos para TTBU 21 % e TTBU 24 % durante o restante da digestão.

Além disso, ao se observar as curvas de hidrólise para os amidos modificados sob umidades mais altas de TTBU, é possível perceber uma diferença no comportamento da curva de hidrólise de TTBU a 21 e 24 % de umidade dos demais amidos em relação a velocidade de reação. Durante as primeiras 5 h de digestão, a cinética de hidrólise nesses amidos foi maior, enquanto que a partir de 5 h de reação a taxa de hidrólise parece ter sido sensivelmente reduzida (independentemente do percentual de hidrólise nesses amidos ter sido maior ou não). Ao final da reação, os amidos foram hidrolisados a uma extensão entre 48,4 % (amido nativo) e 65,3 % (TTBU 18 %).

A maior suscetibilidade enzimática observada em TTBU 18, 21 e 24 % pode estar relacionada com a maior alteração na morfologia desses grânulos como observado por MEV (Figura 16). A maior incidência de fissuras e irregularidas da superfície granular, assim como a formação de cavidades na região central de alguns grânulos, pode ter ocasionado a maior acessibilidade da enzima e por consequência, uma maior hidrólise desses amidos.

A partir de imagens de microscopia confocal de varredura a *laser*, Varatharajan et al. (2011) analisaram os grânulos de amido de batata nativo e ceroso submetidos ao TTBU (100 e 130 °C, 27 % de umidade, 16 h) após 24 h de hidrólise. Os autores observaram um aumento na intensidade de fluorescência nas regiões externas dos grânulos tanto no amido nativo quanto no ceroso após TTBU, indicando que a ordem molecular nessa região dos grânulos foi afetada pelo TTBU e, portanto, tornou os grânulos mais acessíveis à ação da α-amilase. Além disso, a área ao redor do hilo também apresentou sinais de intensa degradação enzimática após TTBU a 130°C em ambos os amidos.

Em polimorfos cristalinos do tipo A, os pontos de ramificação das cadeias estão dispersos em ambas as regiões amorfas e cristalinas, assim como há uma quantidade relativamente maior de cadeias curtas derivadas dessas ramificações localizadas dentro da região cristalina. Ao passo que em polimorfos cristalinos do tipo B, mais pontos de ramificação estão agrupados na

região amorfa. Por conseguinte, é sugerido que polimorfos cristalinos do tipo A seriam mais suscetíveis à hidrólise por α-amilase do que polimorfos do tipo B devido a sua menor organização estrutural na fase cristalina (GUNARATNE e HOOVER, 2002; SHIN et al., 2005; VARATHARANJAN et al., 2010). Nesse sentido, a gradual transição polimórfica gradual do tipo B para o tipo A, observada nesse estudo após o TTBU, sobretudo a partir de TTBU a 18% de umidade (Capítulo 1, Figura 14), poderia ser um dos motivos da maior intensidade no aumento da extensão da hidrólise em TTBU 18, 21 e 24 %.

Varatharajan et al. (2011) estudaram amido de batata comum e ceroso submetidos à TTBU sob diferentes temperaturas (80, 100, 120 e 130 °C, 27 % de umidade, 16 h), nos quais foi observado transição do polimorfo cristalino do tipo B para A, bem como redução da organização estrutural na região superficial granular (avaliado por espectroscopia de infravermelho). No entanto, o aumento na taxa de hidrólise, como esperado, ocorreu quando TTBU foi conduzido à 100 °C e mais intensamente a 120 e 130 °C, mas a 80 °C foi observado uma redução na taxa de hidrólise. Os autores atribuiram a maior resistência à α-amilase observada nesse amido à uma maior interação entre as cadeias de amido, o que teria dificultado o acesso da enzima na direção da hidroxila glicosídica. Nesse sentido, a desorganização estrutural da região cristalina teria sido suprimida por um reforço das interações nas regiões amorfas e cristalinas.

Além dos fatores acima mencionados, Zhang, Dhital e Gidley (2013) também destacam que a taxa de hidrólise em amidos pode ser grandemente afetada pelos produtos da digestão liberados em solução ao longo do processo hidrolítico. Os autores destacam que a extensão de cadeias de amilose hidrolisadas disponíveis para interagir entre si durante o período de digestão poderiam resultar em uma redução na taxa de hidrólise em determinados períodos do processo.

Neste trabalho, após a remoção de 50 % da superfície granular, o amido de batata nativo passou a apresentar digestibilidade maior nas primeiras 2 h de reação, mas a partir de 3 h do processo, o oposto foi observado (Figura 21). As diferenças na suscetibilidade enzimática à α-amilase observadas entre o grânulo inteiro e remanescente são um indicativo de que há variação na organização e distribuição das regiões amorfas ao longo dos grânulos de

amido de batata nativo. Não foram encontrados na literatura estudos sobre a suscetibilidade enzimática em amidos submetidos à gelatinização química de superfície.

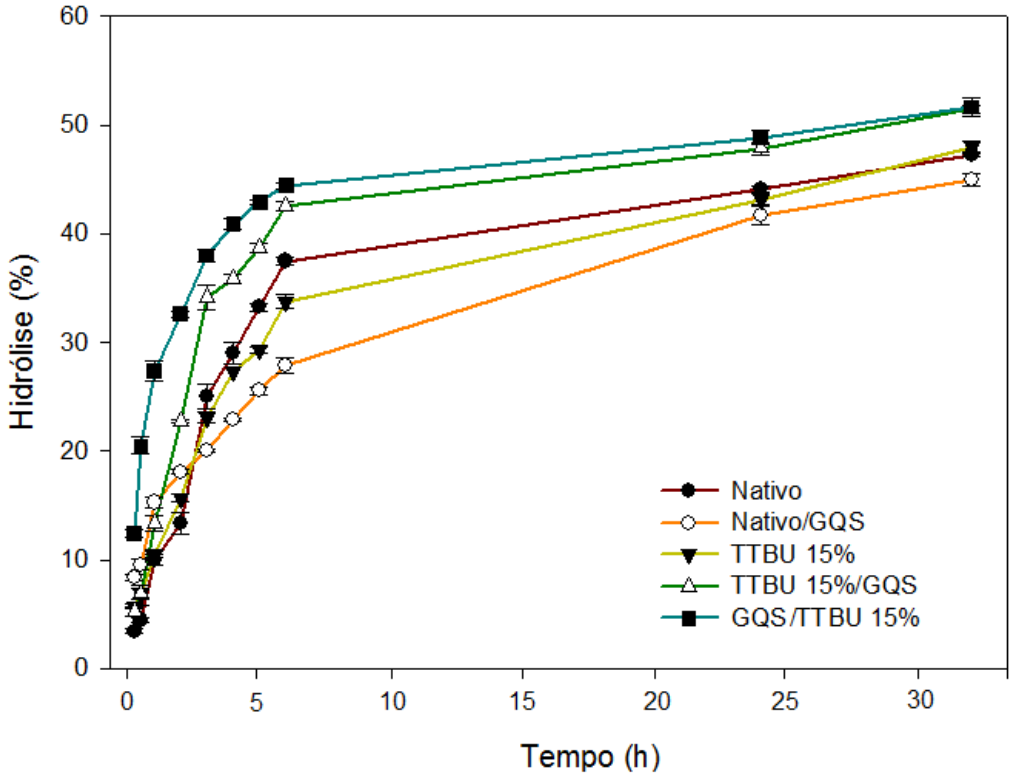


Figura 21 – Hidrólise enzimática (%) em amido de batata nativo e modificado por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) a 15 % de umidade antes e após remoção de 50 % da superfície granular.

A remoção de 50 % da superfície granular não afetou a hidrólise de TTBU 15% durante os primeiros 30 min de digestão, mas a partir de 1 h é possível notar uma maior acessibilidade dessa fração granular ao ataque enzimático, sendo que em 3 h de reação a diferença no percentual de hidrólise entre os amidos é de 7,1 % (como observado pelo crescente distanciamento das curvas de hidrólise entre os amidos no decorrer da digestão). A maior suscetibilidade enzimática da fração remanescente sugere maior heteregeneidade no efeito do TTBU 15 % de umidade ao longo do grânulo.

O efeito do TTBU 15%, quando realizado diretamente na fração remanescente granular (Figura 21), foi mais intenso sobre o aumento da taxa de hidrólise do que o observado nos grânulos em que o TTBU foi realizado

previamente a remoção granular (GQS/TTBU 15% > TTBU 15%/GQS), sobretudo durante as primeiras 3 h de digestão.

Diferentemente de TTBU 15 %, os grânulos remanescentes de TTBU 21 % de umidade, ainda que com algumas variações durante o período de digestão, apresentaram perfil de hidrólise semelhante ao observado pelos seus respectivos grânulos inteiros (Figura 22). Isto é um indicativo de que em TTBU 21 % os domínios amorfos mais acessíveis à ação da α-amilase estão alocados e organizados de forma mais homogênea ao longo dos grânulos do que em TTBU 15 % (Figuras 21 e 22).

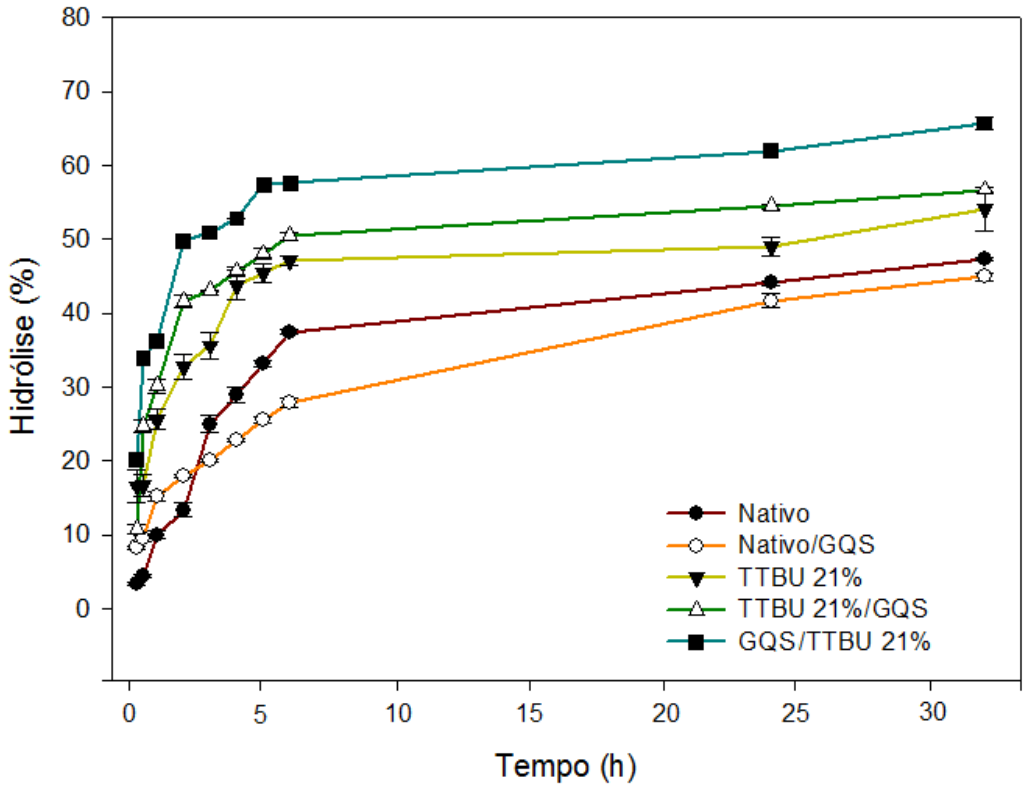


Figura 22 – Hidrólise enzimática (%) em amido de batata nativo e modificado por tratamento térmico em baixa umidade (TTBU) a 21 % de umidade antes e após remoção de 50 % da superfície granular.

Em relação ao efeito do TTBU a 21 % de umidade, realizado diretamente na fração remanescente após a remoção de 50 % da superfície granular (Figura 22), o comportamento observado foi similar ao de TTBU a 15

% de umidade, ou seja, a taxa de hidrólise nesses amidos foi expressivamente maior durante o período de digestão.

A maior suscetibilidade enzimática em ambos os amidos em que o TTBU foi realizado diretamente nos grânulos remanescentes após a remoção de 50 % da superfície, independentemente da umidade de tratamento aplicada, reflete a maior intensidade do tratamento hidrotérmico quando realizado nessa fração isolada dos grânulos.

Com base no que foi observado nesse trabalho e nos estudos citados, pode-se inferir que a suscetibilidade à ação da α-amilase em amidos modificados por TTBU é complexa e dependente de diversos fatores, que associados irão definir a taxa de hidrólise dos amidos durante o período de digestão.

Nesse sentido, a taxa de hidrólise pode ser influenciada tanto por características morfológicas (formação de fissuras e fendas na superfície granular) quanto da estrutura interna (ruptura ou reorientação de cristalitos, mudança na forma polimórfica, interação entre as cadeias de amido e formação de complexos entre amilose e lipídios) dos grânulos de amido, bem como por fatores inerentes ao próprio processo de hidrólise, tais como a extensão de cadeias de amilose hidrolisadas que interagem entre si durante o período de digestão (GUNARATNE; HOOVER, 2002; WATCHARATEWINKUL et al., 2010; ZAVAREZE et al., 2010; VATARATHARAJAN et al., 2011; ZHANG; DHITAL; GIDLEY, 2013).

4.4 Conclusão

A umidade de TTBU influencia nas propriedades de pasta e hidrólise enzimática do amido, de forma diferenciada nas diferentes porções granulares.

A redução no desenvolvimento da viscosidade e uma maior tendência a retrogradação foram observados na maioria dos amidos de batata após o TTBU. A análise das frações remanescentes revela que a região periférica dos grânulos em amido nativo e TTBU a 15 % de umidade são mais disponíveis à difusão e absorção de água para o inchamento granular e o consequente desenvolvimento de viscosidade, enquanto que para TTBU a 21 % a região central dos grânulos é mais efetiva.

Maior umidade de tratamento proporciona aumento na hidrólise enzimática nas primeiras horas de digestão, o que condiz com a maior incidência de alterações na morfológia e na organização de cristalitos com o aumento da umidade de TTBU. A região central dos grânulos de amido modificado por TTBU é mais suscetível à hidrólise enzimática enquanto no amido nativo, essa porção granular apresenta maior resistência à α-amilase após 3 h de digestão.

A maior suscetibilidade enzimática da fração remanescente sugere maior heteregeneidade no efeito do TTBU 15 % de umidade no grânulo íntegro ao longo das diferentes porções granulares.

Menor variabilidade no comportamento das pastas e de hidrólise enzimática observado entre as regiões periféricas e central dos grânulos em TTBU a 21 % sugere que o maior conteúdo de água proporciona maior homogeneidade do tratamento hidrotérmico nas diferentes porções granulares em amido de batata.

5 CAPÍTULO 3 – Síntese de fenil carbonatos de amido como precursor para a obtenção de derivados funcionalizados

5.1 Introdução

Os carbonatos de polissacarídos têm sido estudados como um tipo de derivados reativos, uma vez que são compostos base promissores para a obtenção de derivados multifuncionais de biopolímeros. Como um precursor de carbonato, em princípio, qualquer tipo de molécula que possui um grupo funcional nucleofílico, tal como aminas, álcoois ou tióis, poderia se ligar à cadeia de um polissacarídeo (ELSCHNER; GANSKE; HEINZE, 2013; ELSCHNER; HEINZE, 2015). Estudos mais detalhados sobre a síntese homogênea de carbonatos com variado grau de substituição (GS) foram realizados predominantemente com celulose e de dextrana (GS) (ELSCHNER et al., 2013; ELSCHNER; KÖTTERITZSCH; HEINZE, 2014; ELSCHNER; WONDRACZEK; HEINZE, 2013; WONDRACZEK; ELSCHNER; HEINZE, 2011; ELSCHNER; WONDRACZEK; HEINZE et al., 2016). Produtos regiosseletivamente modificados também puderam ser obtidos variando-se o meio reacional, a temperatura e o tempo de síntese (ELSCHNER et al., 2016b). No caso da celulose, foi observada uma seletividade preferencial no carbono 6 enquanto que para a dextrana uma selectividade no carbono 2 foi predominante (ELSCHNER et al., 2016 b).

O amido é um dos biopolímeros renováveis de maior ocorrência na natureza e desempenha um papel importante em diversas aplicações, tanto na forma nativa como modificada. (TESTER; KARKALAS; QI, 2004; FORSSELL, 2004; MASON, 2009; MAURER, 2009). A preparação de carbonatos de amido é mencionada em patentes, as quais reivindicam a síntese de carbonato diéster de amido ligado intermolecularmente utilizando etil carbonato como reagente (OPIE, 1956), bem como a conversão de amido com ésteres de ácido clorocarbônico (JAROWENKO; WURZBURG, 1966). No entanto, nenhuma destas patentes proporciona qualquer caracterização dos produtos obtidos. Mais recentemente, a ciclodextrina, um oligossacarídio cíclico formado por

unidades de glicose unidas por ligações α-1,4, foi utilizada em conjunto com carbonato de dialquil para obter carbonatos com solubilidade adequada para aplicações farmacêuticas e catalíticas (GAN et al., 2001; HUANG; ZHANG; ZHANG, 2013).

Fenil carbonatos de diferentes polissacarídeos foram preparados pela conversão dos polímeros com cloroformato de fenila (ELSCHNER; GANSKE; HEINZE, 2013; ELSCHNER; WONDRACZEK; HEINZE, 2013; ELSCHNER; HEINZE, 2015; POURJAVADIet al., 2011). Verificou-se que o GS dos fenil carbonatos diminuiram na ordem pululana> dextrana> celulose> amido sob condições reacionais similares (ELSCHNER; GANSKE; HEINZE, 2013). No entanto, estas investigações incidiram principalmente sobre a modificação da celulose. A única investigação detalhada para amidos foi relatada no estudo de Hampe e Heinze (2016), no qual os autores apresentam a síntese e caracterização de etil carbonatos de amido solúveis utilizando éster etílico de ácido clorocarbônico e 1H-imidazole-1-carboxilato de etila como reagentes.

Neste estudo, a síntese de fenil carbonatos de amido visa, preferencialmente, a obtenção de uma metodologia de síntese homogênea eficiente, visto que reações homogêneas proporcionam uma via para a síntese de materiais à base de biopolímeros de elevado valor agregado uma vez que possibilita maior controle das características do produto final, tais como solubilidade, GS e regiosseletividade da substituição (em uma mesma unidade de anidroglicose bem como ao longo das cadeias do polímero). Assim, objetivou-se com o estudo elaborar uma investigação elaborada de uma metodologia de síntese eficiente para a obtenção de fenil carbonatos de amido como um composto base para reações subsequentes. Também foi estudada uma subsequente conversão destes compostos com aminas para obter carbamatos de amido funcionais.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Material

Amido de mandioca (M_n - massa molecular numérica média = 3321 $g \cdot mol^{-1}$, M_w - massa molecular ponderal média = 9302 $g \cdot mol^{-1}$), amido de milho

($M_{n,}$ 56921 g·mol^{-1}, M_w = 342700 g·mol^{-1}), e Hylon VII (amido amilomaize, conteúdo de amilose > 70 %, M_n = 33739 g·mol^{-1}, M_w = 535160 g·mol^{-1}), foram fornecidos pela National Starch & Chemical GmbH (Neustadt, Alemanha). O M_n e o M_w dos amidos foi obtido por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) conforme descrito por Hampe, Heinze (2016). Os amidos e o LiCl foram secos sob vácuo por 4 h à 100 °C previamente às reações.

Os demais reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados sem tratamento adicional.

5.2.2 Grau de susbtituição (GS)

O GS dos carbonatos de amido foi obtido a partir de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{1}H realizada à temperatura ambiente a partir de 16 varreduras de cada amostra (50 mg de amostra por mL de solvente). Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro de RMN da marca Bruker, modelo Avance III 250 MHz. Para cálculo do GS foi utilizada a razão das integrais espectrais dos hidrogênios aromáticos pertencentes ao grupo fenila (7,00-7,90 ppm) e dos hidrogênios da AGU (unidade de anidroglicose) (2,80-6,00 ppm). As amostras foram dissolvidas em DMSO-d*6* (5 %, m/m) e adicionadas de quatro gotas de ácido trifluoroacético (com o propósito de deslocar os sinais pertencentes à água e aos grupos hidroxila restantes da AGU para fora da região de interesse do espectro, evitando sobreposição dos sinais) (HAMPE; HEINZE, 2016).

A determinação do GS dos carbamatos de amido foi obtida a partir de análise elementar (carbono, nitrogênio e hidrogênio), a qual foi realizada em analisador CHNS 932 (Leco) a partir da combustão a 1000 ºC de 1 mg de amostra.

5.2.3 Caracterização dos produtos

Os produtos obtidos foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^{13}C e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro de RMN da marca

Bruker, modelo Avance III 400 MHz a partir de 20.000 varrreduras a 70 °C utilizando-se até 100 mg de amostra por mL de solvente (DMSO-d*6)*.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram registados em espectrofotômetro da marca Nicolet, modelo AVATAR 370 DTGS na região de 4000 – 400 cm^{-1}. Para as leituras foram preparadas pastilhas a partir da mistura das amostras com KBr em uma proporção de 1:100 (amostra:KBr).

Os carbonatos e carbamatos também foram caracterizados quanto a sua organosolubilidade, determinada numa concentração de 5 % em diferentes solventes orgânicos, tais como DMSO (dimetilsulfóxido), DMA (*N,N*-dimetilformamida), DMF (*N,N*-dimetilacetamida), acetona e água.

5.2.4 Sínteses

5.2.4.1 Síntese de fenil carbonato de amido em DMF/LiCl ou DMA/LiCl

O processo de síntese foi adaptado de procedimentos relatados previamente (HAMPE; HEINZE, 2016; ELSCHNER et al., 2013; ELSCHNER; HEINZE, 2015; HAYASHI, 2002). O amido (2,5 g, b.s.) foi dissolvido em 75 mL de DMF ou DMA e aquecido a 120 °C durante 2 h sob atmosfera de N_2. Após arrefecimento a 90 °C, 0,75 g de LiCl foi adicionado (para auxiliar a dissolução do amido no solvente) e a suspensão foi agitada até a obtenção de uma solução límpida (aproximadamente 1 h). A solução foi então transferida para um balão de parede dupla e arrefecida a 0 °C. Piridina e cloroformato de fenila foram utilizados em diferentes razões molares de reagentes por AGU, conforme especificado para cada reação na tabela 6. Piridina foi utilizada como uma base com a finalidade de tornar os grupos OH mais reativos e capturar o ácido clorídrico liberado durante a reação com cloroformato de fenila Piridina foi adicionada previamente e a reação foi iniciada pela adição de cloroformato de fenila (adicionado lentamente para evitar formação de gás e precipitação do reagente) (Figura 23). A reação prosseguiu por 4 h a 0 °C sob agitação e foi interrompida pela adição de 800 mL de água gelada. O precipitado foi filtrado e lavado duas vezes com 200 mL de água e duas vezes com 200 mL de etanol.

A purificação foi finalizada por reprecipitação em 10 mL de DMF ou DMA em água, e subsequente filtração e lavagem com 200 mL de etanol.

5.2.4.2 Síntese de fenil carbonato de amido em 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM Cl)

Diferentes teores de amido de milho (2, 5 e 10 %) foram dissolvidos em 9,8 g de BMIM Cl a 80 °C durante 24 h sob atmosfera de N_2. Piridina e, subsequentemente, cloroformato de fenila foram adicionados à solução nas razões molares de 2, 3 e 5 mols por mol de AGU. A reação prosseguiu por diferentes períodos de tempo (1-4 h) a 80 °C antes do produto ser precipitado em 150 mL de água gelada. O precipitado foi filtrado e lavado duas vezes com 100 mL de água e subsequentemente duas vezes com 100 mL de etanol. Na figura 23 está apresentado o esquema de síntese proposto e o detalhamento de cada reação realizada em BMIM Cl pode ser visualizado na tabela 7.

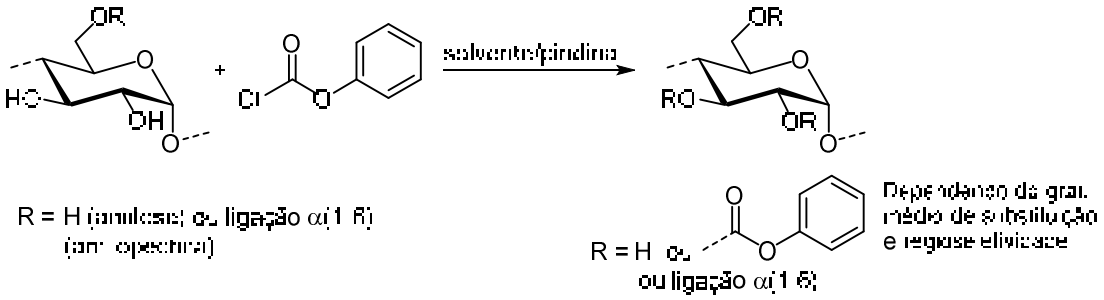


Figura 23 - Esquema de síntese de fenil carbonato em *N,N*-dimetilformamida (DMF)/LiCl, *N,N*-dimetilacetamida (DMA)/LiCl, ou cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM Cl).

5.2.4.3 Aminólise de fenil carbonato de amido em carbamatos

Fenil carbonato de amido (1 g) foi dissolvido em 7,5 mL de DMF, aquecido a 60 °C e adicionado (rapidamente sob forte agitação) de 2 mols de amina por mol de AGU de carbonato (Figura 24). As aminas *p*-aminobenzilamina, propargilamina, etanolamina ou (2-metoxietil)-metilamina foram dissolvidas em 7,5 mL de DMF. Após 4, 8 ou 24 h de reação a 60 °C, a

mistura reacional foi precipitada em 200 mL de isopropanol e o produto foi isolado por filtração. O precipitado foi lavado duas vezes com 100 mL de isopropanol, duas vezes com água (200 mL) e duas vezes com 100 mL de etanol previamente a secagem em estufa (40 °C). As condições reacionais estipuladas foram baseadas em resultados prévios (ELSCHNER et et al., 2013).

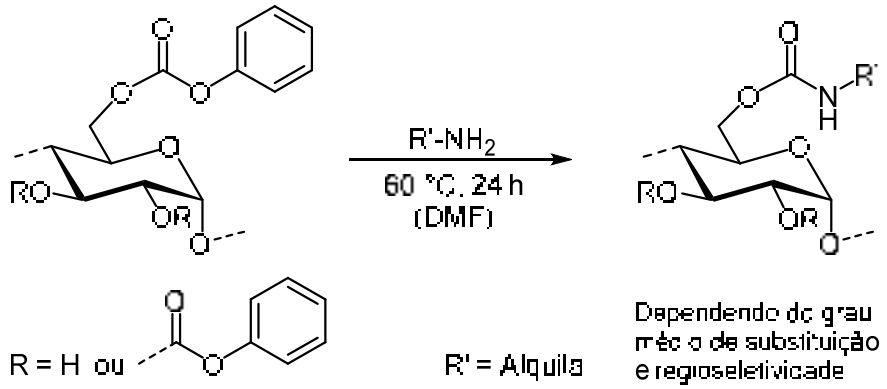


Figura 24 – Esquema de síntese de carbamato de amido por aminólise de fenil carbonato de amido em *N,N*-dimetilformamida (DMF).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Síntese de fenil carbonato de amido

As condições reacionais e os resultados obtidos para a síntese de fenil carbonatos de amido em DMF/LiCl e DMA/LiCl estão sumarizadas na tabela 6. Amido de milho, Hylon VII (amido de milho com alto teor de amilose) e amido de mandioca foram utilizados na conversão com cloroformato de fenila. Os espectros de RMN ^{1}H foram utilizados para determinar os valores de GS, os quais foram obtidos sem etapa de peracetilação adicional, a partir da correlação entre as integrais correspondentes dos hidrogênios do grupo fenila e dos hidrogênios de AGU (Figura 25). Um GS acima de 2,25 pode ser obtido utilizando excesso do reagente (Tabela 6, amostra 5), no entanto, sob razões molares mais baixas a reação foi mais eficiente (Tabela 6, amostras 1-3). Os valores de GS alcançados foram similares ao obtido para a síntese de fenil

carbonato de celulose sob condições semelhantes de reação (ELSCHNER et al., 2013; ELSCHNER; HEINZE, 2015).

Tabela 6 – Síntese de fenil carbonato de amido pela reação do amido com cloroformato de fenila e piridina por 4 h a 0 °C

Amido[a]	**Solvente**[b]	**Razão molar**[c]	**Amostra**	**Rendimento (%)**	**GS**[d]
Milho	DMF/LiCl	1:1	**1**	79	0,60
Milho	DMF/LiCl	2:1	**2**	80	1,26
Milho	DMF/LiCl	3:1	**3**	78	1,47
Milho	DMF/LiCl	10:1	**4**	68	1,85
Milho	DMF/LiCl	20:1	**5**	73	2,25
Hylon VII	DMF/LiCl	2:1	**6**	83	1,35
Mandioca	DMF/LiCl	0,5:1	**7**	69	0,42
Mandioca	DMF/LiCl	1:1	**8**	73	0,83
Mandioca	DMF/LiCl	2:1	**9**	70	1,48
Mandioca	DMA/LiCl	2:1	**10**	86	1,46
Milho	DMA/LiCl	2:1	**11**	43	1,25

[a] Milho, M_n=56921 g·mol^{-1}; Hylon VII, M_n=33739 g·mol^{-1}; Mandioca, M_n=3321 g·mol^{-1}; [b] DMF - *N,N*-dimetilformamida, DMA - *N,N*- dimetilacetamida; [c] Mol de cloroformato de fenila por mol de unidades de anidroglucose; [d] GS – Grau de substituição médio, determinado por espectroscopia de RMN ^{1}H.

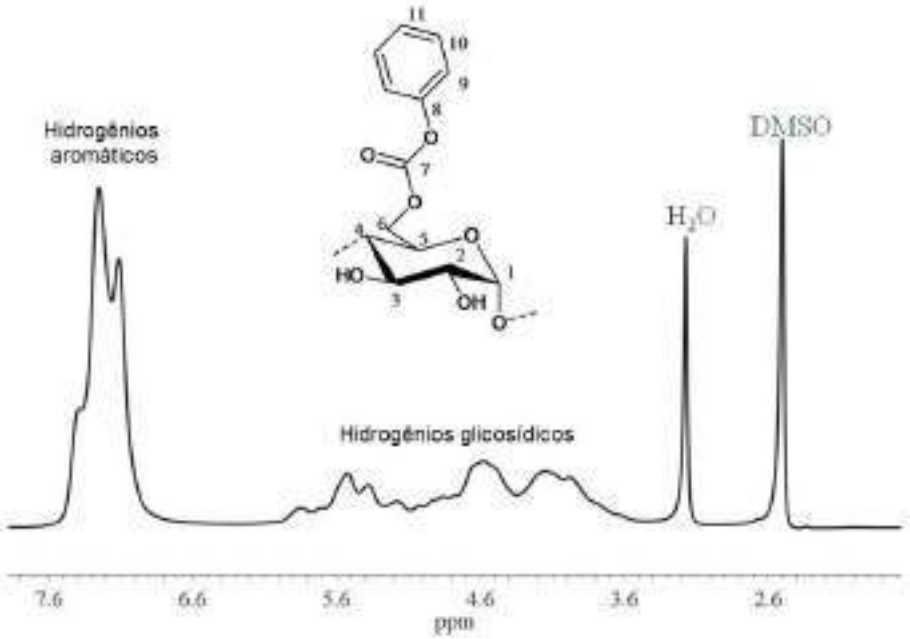


Figura 25 – Espectro de RMN ^{1}H de fenil carbonato de amido de mandioca (GS 1,48, amostra 9) em DMSO-*d6.*

O GS do fenil carbonato de amido de milho aumentou com a quantidade de reagente utilizado de 0,60 (razão molar 1:1) para 2,25 (razão molar 1:20) (Tabela 6, amostras 1 e 5, respectivamente). A mesma tendência foi observada para o amido de mandioca, onde o GS aumentou de 0,43 (razão molar 1:0,5) para 1,48 (razão molar 1:2) (Tabela 6, amostras 7 e 9, respectivamente). Contudo, o amido de mandioca mostrou marginalmente maiores valores de GS do que o amido de milho sob as mesmas condições reacionais (Tabela 6, amostras 1, 2 *vs*. 8, 9). Também o amido Hylon VII apresentou GS ligeiramente superior ao de milho (Tabela 6, amostra 6 *vs.* 2). Ambos, amido de mandioca e Hylon VII apresentam menor massa molecular que o amido de milho. Por conseguinte, as soluções apresentaram menores viscosidades, o que permite uma maior transferência de calor e massa e, dessa forma, o gradiente de concentração resultante poderia ter aumentado a eficiência da reação.

A mudança no meio reacional para DMA/LiCl ao invés de DMF/LiCl não resultou em significativa mudança do GS para o amido de mandioca e milho, como pode ser visualizado pela comparação das amostras 9 e 10 *vs*. 2 e 11, respectivamente (Tabela 6). Foi reportado que em DMA ocorre uma reação secundária mais pronunciada com cloroformato de fenila (WONDRACZEK et

al., 2011), o que pode ter ocasionado os menores valores de GS na síntese com celulose, conforme reportado pelo autor. Uma vez que neste trabalho não se observou uma diminuição da atividade dos reagentes em DMA em comparação com DMF para a esterificação de amido de mandioca (9, 10), a concentração do íon cloreto na solução (solução de amido: 1,0 % de LiCl enquanto que solução de celulose: 7,5 % de LiCl) teve grande influência na reatividade do cloroformato de fenila, o que está de acordo com a literatura (KEVILL; WEITL, 1968). Contudo, não foi possível sintetizar fenil carbonatos de amido solúveis em DMA, além do obtido com amido de mandioca.

Recentemente foi reportado que tricarbonato de celulose (GS = 3) pode ser sintetizado de forma eficiente no líquido iônico BMIM Cl (ELSCHNER et al., 2014). A fim de se obter fenil carbonatos de amido com valores de GS superiores à 2,25, investigou-se a esterificação do amido de milho com cloroformato de fenila no líquido iônico (Tabela 7). Primeiramente foi estudado o efeito da concentração de amido em solução, o qual variou de 2 para 10% em massa, enquanto os demais parâmetros reacionais permaneceram inalterados (Tabela 7, amostras 11 e 13). Após 1h de reação e sob razão molar do reagente por AGU (unidade de anidroglicose) de 2:1 foi possível obter um GS de 1,71. Este resultado mostra que a reação em BMIM Cl foi mais eficiente do que em DMF/LiCl sob condições similares (Tabela 6, amostra 2, GS = 1,26). O aumento da concentração de amido, no entanto, conduziu a menores valores de GS (Tabela 7, amostras 12, GS = 1,51, e 13, GS = 1,16).

A fim de excluir um possível efeito cinético decorrente da maior viscosidade do meio, o tempo de reação foi gradualmente aumentado para 4 h e o amido ultilizado numa concentração de 10 % em massa (Tabela 7, amostras 14-16). No entanto, os valores de GS permaneceram inalterados. É possível que a acessibilidade dos grupos OH do amido em BMIM Cl tenha sido inferior sob as concentrações de amido mais elevados, advindo da dissolução incompleta do amido em contraste com, por exemplo, soluções de celulose em BMIM Cl. Não foi possível isolar os pordutos obtidos quando sob maior razão molar de reagente por AGU, não sendo possível determinar o GS dos mesmos (Tabela 7, amostras 17 e 18). No entanto, nenhum dos fenil carbonatos de amido obtidos no líquido iônico apresentou organossolubilidade, essencial para

a utilização destes amidos como compostos base para a conversão em produtos funcionalizados por reações subsequentes, tal como por aminólise.

Tabela 7 - Síntese de fenil carbonato de amido pela reação de amido de milho com com cloroformato de fenila em cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM Cl)/piridina (1:1) a 80 °C

Razão molar[a]	Concentração de amido (%, b.s.)	Tempo reacional (h)	Amostra	Rendimento (%)	GS[b]
2:1	2	1	**11**	73	1.71
2:1	5	1	**12**	74	1.51
2:1	10	1	**13**	86	1.16
2:1	10	2	**14**	88	1.18
2:1	10	3	**15**	73	1.19
2:1	10	4	**16**	76	1.21
3:1	2	1	**17**	-	-
5:1	2	1	**18**	-	-

[a] Mol de cloroformato de fenila por mol de AGU; [b] GS – grau de substituição médio, determinado por espectroscopia de RMN ^{1}H.

5.3.2 Caracterização estrutural dos fenis carbonato de amido

A estrutura molecular dos carbonatos de amido foi estudada por meio de FTIR e espectroscopia de RMN C^{13}. Os espectros de FTIR dos fenil carbonatos de amido apresentaram um estiramento da ligação C = O devido ao grupo carbonato em 1765 cm^{-1}, como pode ser visualizado na Figura 26. Uma vez que não foram encontrados sinais adicionais na região do grupo carbonila do espectro ou um desdobramento da banda em 1765 cm^{-1} (detalhe ampliado, Figura 26), pode-se excluir a reticulação inter ou intramolecular, como previamente reportado para carbonatos de dextrana (WONDRACZEK et al.,

2011). A expressiva redução na banda em 3400 cm-1 no espectro do carbonato também confirma o envolvimento dos grupos OH na conversão do amido nativo em fenil carbonato.

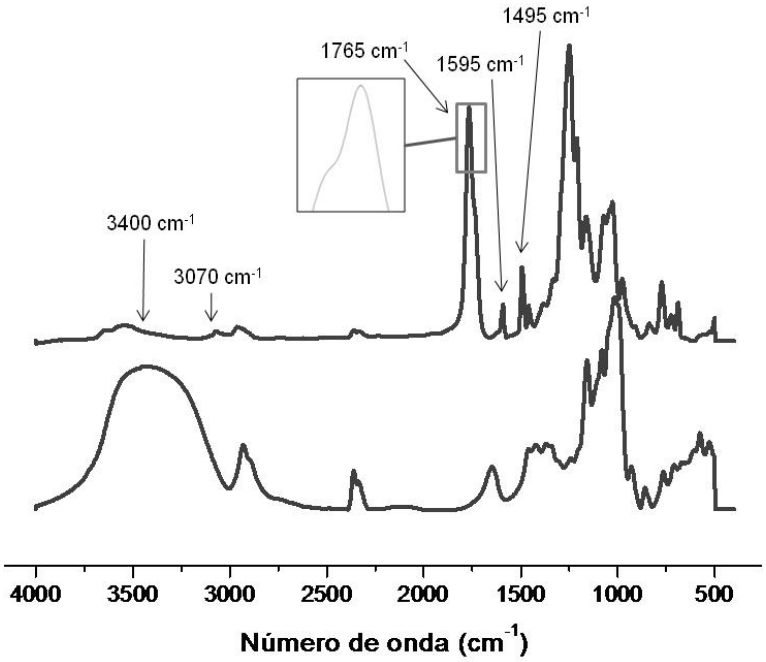


Figura 26 – Espectro de FTIR de amido de milho nativo (abaixo) e de fenil carbonato de amido de milho (GS 1,47, amostra 3) (acima).

O espectro de RMN ^{13}C do fenil carbonato do amido de mandioca com GS de 1,48 (Tabela 6, amostra 9) está apresentado na figura 27. Os sinais do substituinte carbonato puderam ser claramente atribuídos. Os carbonos aromáticos aparecem em um conjunto de 3 picos entre 121 e 130 ppm e um outro pico único em 151 ppm. O carbono carbonílico foi observado em 153 ppm. Um pequeno ombro ao lado direito deste pico (seta na ampliação do pico na Figura 27) é um inidicativo de que, além do grupo hidroxila do C primário na posição 6, um dos grupos OH dos carbonos secundários nas posições 2 ou 3 também foram substituídos. O aparecimento de dois sinais para o C1 em 101 ppm e C1' em 96 ppm confirma a substituição parcial na posição 2 da cadeia de AGU. A ausência de sinal em 60 ppm, o qual indica o carbono do grupo hidroxila primário não substituído (posição 6), revela uma funcionalização

completa nesta posição. Para polissacarídos tais como amido ou celulose, é bem conhecido que os grupos OH de carbonos primários são mais reativos e mais facilmente acessíveis em comparação com os grupos OH de carbonos secundários nas posições 2 e 3. O pico para o C na posição 6 completamente substituído aparece em 67 ppm.

Figura 27 - Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-d6) do fenil carbonato de amido, GS = 1,48 (amostra 9).

A dissolução dos fenil carbonatos de amido foram testadas em DMSO, DMF, DMA e acetona. Todos os derivados de amido sintetizados em DMF/LiCl apresentaram elevada solubilidade nos solventes orgânicos testados (Tabela 6). Mesmo após uma semana de armazenamento as soluções se mantiveram translúcidas. Não foi observada a ocorrência de gelificação, agregação ou formação de precipitados, o que está de acordo com os resultados obtidos nos espectros de FTIR, ou seja, de que não houve reticulação indesejada durante a síntese dos fenil carbonatos de amido.

Todos os fenil carbonatos de amido sintetizados em BMIM Cl foram insolúveis em acetona. Com exceção da amostra 11 (Tabela 6), os demais apresentaram certo grau de intumescimento em DMSO, DMF e DMA. Nenhuma das amostras foi claramente solúvel nos solventes orgânicos testados, diferentemente do que foi observado para os carbonatos obtidos em DMF/LiCl. Estes resultados indicam uma distribuição não uniforme ao longo da cadeia polimérica.

Uma explicação razoável pode ser um estado diferente de dissolução do amido em líquido iônico do que em DMF/LiCl, isto é, apenas uma dissolução parcial do polímero em BMIM Cl. Essa dificuldade de solubilização pode ter reduzido a acessibilidade dos grupos OH em BMIM Cl e a reação ocorreria preferencialmente nas regiões dissovidas. Nesse sentido, a síntese dos fenil carbonatos de amido em BMIM Cl foi mais eficiente em comparação com a síntese em DMF/LiCl (amostras 11 e 2, Tabela 6), no entanto, conduz a formação de produtos insolúveis e, portanto, menos úteis em termos de modificação adicional posterior.

5.3.3 Aminólise e caracterização dos amido carbamatos de fenila

A aminólise foi escolhida como exemplo para possíveis reações de deslocamento nucleofílico com os fenil carbonatos de amido. Os fenil carbonatos de amido de mandioca (GS 1,48) e milho (GS 0,60 e 1,47) obtidos em DMF/LiCl foram utilizados para avaliar a conversão em carbamatos mediante aminólise com diferentes aminas (Figura 6). Foram utilizadas quatro diferentes aminas com grupo funcional adicional, nomeadamente *p*-aminobenzilamina, propargilamina, etanolamina e (2-metoxietil)metilamina (MEMA).

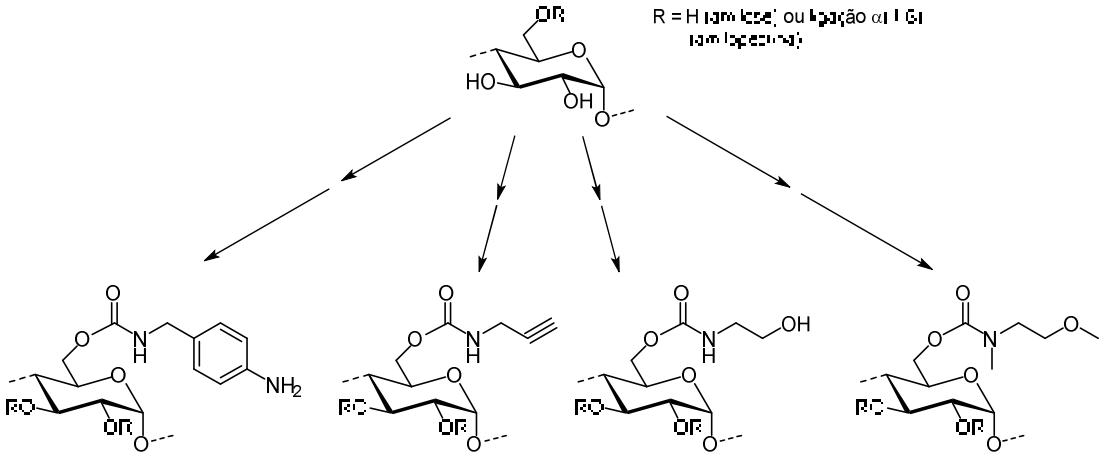


Figura 28 - Estrutura dos carbamatos de amido com diferentes grupos funcionais terminais obtidos a partir de um procedimento simples de duas etapas: esterificação do amido com cloroformato de fenila e subsequente aminólise.

O GS dos carbamatos correspondentes obtidos a partir de análise elementar estão apresentados na tabela 8. A substituição nucleofílica acíclica do grupo fenil pela *p*-aminobenzilamina proporcionou um carbamato com GS de 1,06 após 24 h de reação, o que equivale a 70 % de eficiência de síntese (coeficiente do GS carbonato /GS carbamato). A aminólise com propargilamina (amina menos reativa) mostrou uma eficiência de apenas 50 %. A introdução de um novo grupo OH na cadeia polimérica pela utilização de etanolamina pode ser realizada com eficiência em torno de 70 %. Foi possível obter carbamato de amido solúvel em água e em solventes orgânicos quando se utilizou amido de mandioca como material de partida. A conversão com MEMA apresentou a menor eficiência de reação (13 a 19 %) e apenas carbamatos com baixos valores de GS foram obtidos. A baixa reatividade desta amina secundária e a maior basicidade inerente pode ter conduzido à reticulação inter e intramolecular do carbonato, ocasionado a insolubilidade dos produtos nos solventes orgânicos testados.

Os carbamatos de amido também foram caracterizados por espectroscopia de FTIR (dados não mostrados) e por RMN de ^{13}C. Na Figura 29 está apresentado RMN ^{13}C típico obtido para o carbamato de amido de p-aminobenzila (GS = 1,06), no qual pode-ser ver claramente a estrutura e pureza do produto. O sinal em 45 ppm referente ao grupo metileno introduzido prova que o substituinte está ligado covalentemente ao polímero. Os átomos de carbono aromáticos aparecem entre 114 e 148 ppm. O grupo C = O do carbamato (157 ppm) foi deslocado para a esquerda no espectro em comparação com o carbonato correspondente (153 ppm).

Tabela 8 – Síntese dos carbamatos de amido por aminólise dos fenil carbonatos de amido com aminas utilizando 2 mols de amina por mol de AGU de carbonato (2,0) em DMF a 60 °C

Carbonato		**Amina**	**Tempo reacional (h)**	**GS[b]**	**Solubilidade[c]**			
Amido	GS[a]				água	DMSO	DMA	DMF
Mandioca	1.48	*p*-aminobenzilamina	4	0.84	-	+	+	+
Mandioca	1.48	*p*-aminobenzilamina	8	1.03	-	+	+	+
Mandioca	1.48	*p*-aminobenzilamina	24	1.06	-	+	+	+
Mandioca	1.48	Propargilamina	24	0.75	-	+	+	+
Milho	1.47	Etanolamina	24	0.97	-	+	+	+
Mandioca	1.48	Etanolamina	24	1.08	+	+	+	+
Milho	0.60	MEMA[d]	24	0.08	-	-	-	-
Milho	1.47	MEMA	24	0.28	-	-	-	-
Mandioca	1.48	MEMA	24	0.18	-	-	-	-

[a]GS – Grau de substituição médio, determinado por espectroscopia de RMN ^{1}H; [b] GS determinado por análise elementar; [c] + solúvel, - insolúvel; [d] MEMA - (2-metoxietil)metilamina.

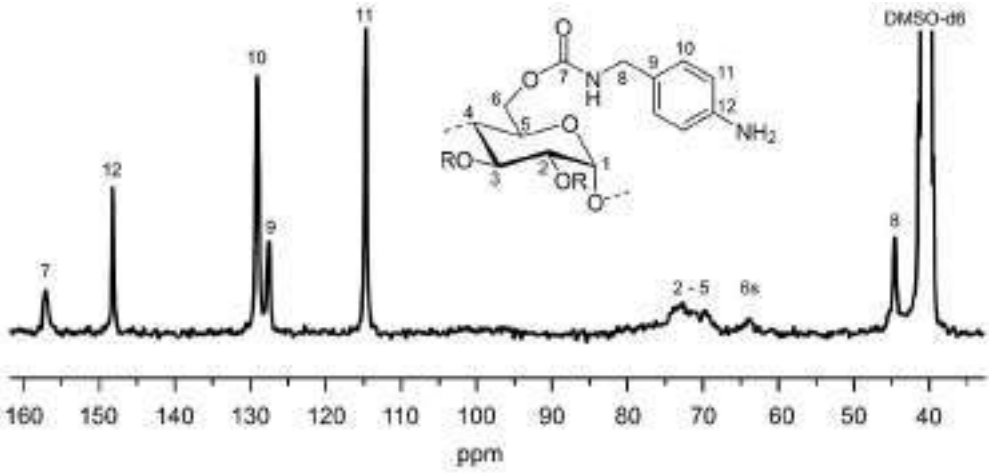


Figura 29 – Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d*6*) do *p*-aminobenzilamido carbamato, $GS_{Carbamato}$ = 1,06.

5.4 Conclusão

Carbonatos de amido organosolúveis foram obtidos em DMF/LiCl e DMA/LiCl e o GS dos carbonatos foi facilmente controlado pela quantidade de reagente utilizado. BMIM Cl pode ser utilizado como solvente alternativo para a esterificação do amido com cloroformato de fenila, no entanto, apenas produtos insolúveis foram isolados. A estrutura dos carbonatos foi elucidada por RMN e FTIR, não sendo observada qualquer reticulação em contraste com outros polissacáridos. Foi possível obter carbonatos de amido solúveis em solventes orgânicos, o que os torna ideais na aplicação de processos tais como revestimentos de superfície e modificação subsequente para introduzir outras funcionalidades específicas. A conversão de fenil carbonatos de amido em carbamatos foi demonstrada a partir de reações de substituição nucleofílica com diferentes aminas. Os carbamatos correspondentes foram solúveis em água e líquidos orgânicos. A conversão simultânea de carbonatos com nucleófilos, de modo a obter derivados de carbamato multifuncionais a partir de polissacarídeos é viável.

6 Referências

ADEBOWALE, K. O.; OLU-OWOLABI, B. I..; OLAYINKA, O. O.; LAWAL, O. S. Effect of heat moisture treatment and annealing on physicochemical properties of red sorghum starch. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.9, p.928-933, 2005.

BALDWIN, P. M.; ADLER, J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. **Journal of Cereal Science**, v.27, p.255-265, 1998.

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

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

CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo: Fundação Cargill, (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-americanas, v. 1), 2002. 221p.

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**, n.75, n.436-447, 2009.

DEETAE; P.; SHOBSNGOB, S.; VARANYANOND, W.; CHINACHOTI, P.; NAIVIKUL, O.; VARAVINIT, S. Preparation, pasting properties and freeze-thaw stability of dual modified crosslink-phosphorylated rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.351-358, 2008.

ELSCHNER, T.;GANSKE, K.; HEINZE, T. Synthesis and aminolysis of polysaccharide carbonates. **Cellulose**, v.20, p.339-353, 2013.

ELSCHNER, T.; HEINZE, T. Cellulose Carbonates: A Platform for Promising Biopolymer Derivatives With Multifunctional Capabilities. **Macromolecular Bioscience**, v.15, p.735-746, 2015.

ELSCHNER, T.; KÖTTERITZSCH, M;HEINZE, T. Synthesis of Cellulose Tricarbonates in 1-Butyl-3-methylimidazolium Chloride/Pyridine. **Macromolecular Bioscience,** v.14, p.161-165, 2014.

ELSCHNER, T.; WONDRACZEK, H.; HEINZE, T.Syntheses and detailed structure characterization of dextran carbonates. **Carbohydrate Polymers**, v.93, p.216-223, 2013.

ELSCHNER, T.; REISHOFER, D.; KARGL, R.;GRIEßER, T.;HEINZE, T.; KLEINSCHEK,K. S. Reactive cellulose-based thin films - a concept for

multifunctional polysaccharide surfaces. **RSC Advances**, v.6, p.72378-72385, 2016a.

ELSCHNER, T.; LÜDECKE, C.; KALDEN, D.; ROTH, M.; LÖFFLER, B.; JANDT, K. D.;HEINZE, T.Zwitterionic Cellulose Carbamate with Regioselective Substitution Pattern: A Coating Material Possessing Antimicrobial Activity. **Macromolecular Bioscience**, v.16, p.522-534, 2016b.

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

FORSSELL, P. in: **Starch in food: structure, function and applications**, (Eds:ELIASSON, A.-C.), Woodhead Publishing, Cambridge, London, p.461, 2004.

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

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BULÉON, A.; PÉREZ, S. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. **European Journal of Clinical Nutrition***,* v.46, p.S3-S16, 1992.

GAN, Y.; ZHANG, Y.; XIAO, C.; ZHOU, C.; ZHAO, Y.A novel preparation of methyl-β-cyclodextrin from dimethyl carbonate and β-cyclodextrin. **Carbohydrate Research**, v.346, p.389-392, 2010.

GIDLEY, M. J.; BULPIN, P. V. Crystallisation of malto-oligosaccharides as models of the crystalline forms of starch: minimum chain-length requirement for the formation of double helices. **Carbohydrate Research**, n.161, p.291-300, 1987.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, n.16, p.12-30, 2005.

GOUGH, B. M.; PYBUS, J. N. Effect of metal cations on the swelling and gelatinization behaviour of large wheat starch granules. **Starch/Stärke**, v.25, p.123-130, 1973.

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

GUNARATNE, A; HOOVER, R. Effect of heat – moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches.**Carbohydrate Polymers**, n.49, p.425-437, 2002.

HAMPE, R.;HEINZE, T.Synthesis and structure characterization of soluble starch ethyl carbonates. **Starch/Stärke**, v.68, p.505-513, 2016.

HAYASHI, S. Synthesis and Properties of Cellulose Carbonate Derivatives. **Kobunshi Ronbunshu**, v.59, p.1-7, 2002.

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

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

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, p.835-847, 2010.

HOOVER, R.; MANOEL, H.The effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of normal maize, waxy maize, dull waxy maize and amylomaise V starches. **Journal of Cereal Science**, n.23, p.153-162, 1996.

HOOVER, R; VASANTHAN, T. Effect of heat–moisture treatment on the structure and physicochemical properties of cereal, tuber and legume starches. **Carbohydrate Research,** v.252, p. 33–53, 1994.

HORMDOK, R; NOOMHORM, A. Hydrothermal treatments of rice starch for improvement of rice noodle quality. **Lebensmittel-Wissenchaft und Tecnologie**, v.40, n.10, p.1723-1731, 2007.

HUANG, J., CHEN, Z.; XU, Y.; LI, H., LIU, S.; YANG, D., SCHOLS, H. A. Comparison of waxy and normal potato starch remaining granules after chemical surface gelatinization: Pasting behavior and surface morphology. **Carbohydrate Polymers**, v.102, p.1001-1007, 2014.

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

HUANG, D.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.A novel synthesis of ethyl carbonate derivatives of β-cyclodextrin. **Carbohydrate Research**, v.370, p.82-85, 2013.

IMBERTY, A.; PÉREZ, S. A re-visit to the threedimensional structure of B-type starch. **Biopolymers**, v.27, p.1205-1221, 1988.

JACOBS, H.; DELCOUR, J. A. Hydrothermal Modifications of Granular Starch, with Retention of the Granular Structure: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.8, p.2895-2905, 1998.

JANE, J-L. Mechanism of Starch Gelatinization in Neutral Salt Solutions. **Starch-Stärke**, p.161-166, 1993.

JANE, J-L.; SHEN, J. Internal structure of the potato starch granule revealed by chemical gelatinization.**Carbohydrate Research**, v.247, p.279-290, 1993.

JAROWENKO, W.; WURZBURG, O. B. **Novel starch ester derivatives**. Patent US3284442, 1966.

JIRANUNTAKUL, W.; PUTTANLEK, C.; RUNGSARDTHONG, V.; PUNCHA-ARNON, S.; UTTAPAP, D. Microstructural and physicochemical properties of heat-moisture treated waxy and normal starches.**Journal of Food Engineering**, n.104, p.246-258, 2011.

JIRANUNTAKUL, W.; SUGIYAMA, S.; TSUKAMOTO, K.; PUTTANLEK, C.; RUNGSARDTHONG, V.; PUNCHA-ARNON, S.; UTTAPAP, D. Nano-structure of heat–moisture treated waxy and normal starches. **Carbohydrate Polymers**, v.97, p.1-8, 2013.

KAWABATA, A.; TAKASE, N.; MIYOSHI, E.; SAWAYAMA, W.; KIMURA, T.; KUDO, K. Microscopic observation and X-ray diffractometry of heat/moisture-treated starch granules. **Starch/Stärke**, v.46, p.463–469, 1994.

KAUR, B.; ARIFFIN, F.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Progress in starch modification in the last decade. **Food Hydrocolloids**, v.26, p.398-404, 2012.

KEVILL, D. N.; WEITL, F. L.Kinetics and mechanism of the decomposition of 1-adamantyl chloroformate. **Journal of American Chemical Society**, v.90, p.6416-6420, 1968.

KLEIN, B.; PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; ZAVAREZE, E. R.; COLUSSI, R.; EVANGELHO, J. A.; GUTKOSKI, L. C.; DIAS, A. R. G. Effect of single and dual heat-moisture treatments on properties of rice, cassava, and pinhao starches. **Carbohydrate Polymers**, v.98, p.1578-1584, 2013.

KOCH, K.; JANE, J-L. Morphological changes of granules of different starches by surface gelatinization with calcium chloride. **Cereal Chemistry**, v.77, n.2, p.115-120, 2000.

KUAKPETOON, D.; WANG, Y-J. Internal structure and physicochemical properties of corn starches as revealed by chemical surface gelatinization. **Carbohydrate Research**, v.342, p.2253-2263, 2007.

KUAKPETOON, D.; WANG, Y-J. Locations of hypochlorite oxidation in corn starches varying in amylose content. **Carbohydrate Research,** v.343, p.90-100, 2008.

LEE, C. J.; KIM, Y.; CHOI, S. J.; MOON, T. W. Slowly digestible starch from heat-moisture treated waxy potato starch: Preparation, structural characteristics, and glucose response in mice. **Food Chemistry**, v.133, p.1222-1229, 2012.

LIM, S. –T.; CHANG, E. –H.; CHUNG, H. –J. Thermal transition characteristics of heat-moisture treated corn and potato starches. **Carbohydrate Polymers**, n.46, p.107-115, 2001.

LIN, J-H; SINGH, H.; WEN, C-Y; CHANG, Y-H. Partial-degradation and heat dual modification on the enzymatic resistance and boiling-stable resistant starch content of corn starches. **Journal of Cereal Science**, v.54, p.83-89, 2011.

LIU, Q.; WEBER, E.; CURRIE, V.; YADA, R. Physicochemical properties of starches during potato growth. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.213–221, 2003.

MASON, W. R. in: **Starch: Chemistry and Technology** (Eds: WHISTLER, R. L.; J. N. BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F.), Academic Press, New York, USA, p.745, 2009.

MAURER, H. W. in: **Starch: Chemistry and Technology**, (Eds: WHISTLER, R. L.; J. N. BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F.), Academic Press, New York, USA, p.657, 2009.

MBOUGUENG, P. D.; TENIN, D.: SCHER, J; TCHIÉGANG, C. Influence acetylation on physicochemical, functional and thermal properties of potato and cassava starches. **Journal of Food Engineering**, v.108, p.320-326, 2012.

McGRANCE, S. J.; CORNELL, H. J.; RIX, C. J.A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products. **Starch/Stärke**, n.50, p.158-163, 1998.

MYOSHI, E. Effects of heat-moisture treatment and lipids on gelatinization and retrogradation of maize and potato starches. **Cereal Chemistry,** v.79, p.72–77, 2002.

OPIE, J. W. **Starch carbonate**. Patent US2767171, 1956.

OOSTEN, B. J. Tentative hypothesis to explain how electrolytes affect the gelatinization temperature of starches in water. **Starch/Stärke**, v.34, p.233-239, 1982.

OOSTEN, B. J. Explanation for the phenomena arising from starch electrolytes interactions. **Starch/Stärke**, v.35, p.166-169, 1983.

PAN, D. D.; JANE, J-L. Internal structure of normal maize starch granules revealed by chemical surface gelatinizatin. **Biomacromolecules**, v.1, p.126-132, 2000.

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, p.235-247, 1997.

PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structure of starch components and their contribution to the architecture of starch granule: a comprehensive review. **Starch/Stärke**, n.62, p.389-420, 2010.

PINTO, V. P.; VANIER, N. L.; KLEIN, B.; ZAZAREZE, E. R.; ELIAS, M. C.; GUTKOSKI, L. C.; HELBIG, E.; DIAS, A. R. G. Physicochemical, crystallinity, pasting and termal properties ofheat–moisture-treated pinhão starch. **Starch/Stärke**, V.64, P.855–863, 2012.

POURJAVADI, A.; SEIDI, F.; AFJEH, S. S.; NIKOSERESHT, N.; SALIMI, H.; NEMATI, N. Synthesis of soluble N-functionalized polysaccharide derivatives using phenyl carbonate precursor and their application as catalysts. **Starch/Stärke**, v.63, p.780-791, 2011.

RABEK, J. F. Applications of wide-angle X-ray diffraction (WAXD) to the study of the structure of polymers, In: **Experimental Methods in Polymer Chemistry** (1º ed., 505-508), Chichester: Wiley-Interscience, 1980.

RATNAYAKE, W. S., HOOVER, R., SHAHIDI, F., PERERA, C., JANE, J. Composition, molecular structure and physicochemical properties of starches from four field pea (Pisum sativum L.) cultivars. **Food Chemistry**, v.74, p.189–202, 2001.

SANDHU, K. S.; SINGH, N.; LIM, S. T. A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: physicochemical, thermal, morphological and pasting properties**. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.40, p.1527-1536, 2007.

SHIN, S.I.; KIM, H.J.; HA, H. J.; LEE, S. H.; MOON, T. W. Effect of hydrothermal treatment on formation and structural characteristics of slowly digestible non-pasted granular sweet potato starch. **Starch/Stärke**, v.57, p.421-430, 2005.

SINGH, J.; KAUR, L.; McCARTHY, O. J. Factors influencing the physic-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food aplllications – A review. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1-22, 2007.

SUN, Q.; WANG, T.; XIONG, L.; ZHAO, Y. The effect of heat moisture treatment on physicochemical properties of early indica rice. **Food Chemistry,** v.141, p.853-857, 2013.

TANG, H., MITSUNAGA, T., KAWAMURA, Y. Molecular arrangement in blockletsand starch granule architecture. **Carbohydrate Polymers,** v.63, n.4, p.555–560, 2006.

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

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

VARATHARAJAN, V.; HOOVER, R.; SEETHARAMAN, K. The impact of heat-moisture treatment on the molecular structure and physicochemical properties of normal and waxy potato starches. **Carbohydrate Polymers**, v.81, p.466-475, 2010.

VARATHARAJAN, V.; HOOVER, R.; JIHONG, L.; VASANTHAN, T.; NANTANGA, K. K. M.; SEETHARAMAN, K.; LIU, Q.; DONNER, E.; JAISWAL, S.; CHIBBAR, R. N. 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, p.2594-2606, 2011.

VERMEYLEN, R.; GODERIS, B; DELCOUR, J. A. An X-ray study of hydrothermally treated potato starch. **Carbohydrate Polymers**, v.64, p.364-375, 2006.

WANG, Y.-J; KUO, M-I; WANG, L.; PATINDOL, J. Chemical composition and structure of granule periphery and envelope remnant of rice starches as revealed by chemical surface gelatinization. **Starch/Stärke***, v.*59, p.445–453, 2007.

WATCHARATEWINKUL, Y.; PUTTANLEK, C.; RUNGSARDTHONG, V.; UTTAPAP, D. Pasting properties of a heat-moisture treated canna starch in relation to its structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v.75, p.505-511, 2009.

WONDRACZEK, H.;ELSCHNER, T.; HEINZE, T.Synthesis of highly functionalized dextran alkyl carbonates showing nanosphere formation. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.1112-1118, 2011.

ZHANG, B.; DHITAL, S.; GIDLEY, M. Synergistic and antagonistic effect of α-amylase and amyloglucosidase on starch digestion. **Biomacromolecules**, v.14, p.1945-1954, 2013.

ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Impact f heat-moisture treatment and anneling in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.317-328, 2011.

ZAVAREZE, E. R.; STORCK, C. R.; CASTRO, L. A. S.; SCHIRMER, M. A.; DIAS, A. R. G. Effect of heat-moisture treatment on rice starch of varying amylose content. **Food Chemistry**, n.121, p.358-365, 2010.

ZOBEL, H. F. Starch crystal transformation and their industrial importance.**Starch/Stärke**, n.40, p.1–7, 1988.