**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**

**Características estruturais, físico-químicas e funcionais
dos amidos de mandioca e de milho com diferentes teores de amilose
oxidados por ozônio**

Manoel Divino da Matta Júnior

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos

**Piracicaba
2015**

Manoel Divino da Matta Junior
Bacharel em Ciências dos Alimentos

**Características estruturais, físico-químicas e funcionais
dos amidos de mandioca e de milho com diferentes teores de amilose
oxidados por ozônio**

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.

Orientador:
Profa. Dra. **SILENE BRUDER S. SARMENTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Matta Júnior, Manoel Divino da

Características estruturais, físico-químicas e funcionais dos amidos de mandioca e de milho com diferentes teores de amilose oxidados por ozônio / Manoel Divino da Matta Júnior. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

122 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Amido modificado 2. Oxidação 3. Ozônio 4. Características estruturais
5. Propriedades funcionais I. Título

CDD 664.23
M435c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser esse Pai amoroso e bondoso, nos dando a graça da vida, sem o qual minhas forças de nada valeriam. Por ter me guiado e dado alento nos momentos de dificuldades e permitido concluir mais essa etapa da vida.

Aos meus pais, pela educação oferecida, que me permitiu a realização de mais essa etapa dos meus estudos e por acreditarem no meu trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Silene Bruder Silveira Sarmiento pelo exemplo, orientação, amizade, principalmente paciência, confiança e compreensão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de auxílio à pesquisa (processo FAPESP N° 2012/50976-1).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Prof.^a Dr.^a Celia Maria Landi Franco e a Pesquisadora Jaqueline de Moraes, do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, do IBILCE/ UNESP, pela realização das análises de distribuição dos comprimentos de cadeia ramificadas da amilopectina e calorimetria diferencial de varredura.

Aos Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate e Prof.^a Dr.^a Marina Tolentino Marinho, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, e aos Prof. Dr. Guilherme Sassaki e Prof. Dr. Anderson Barison, da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio com a análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

Ao Dr. Luciano Henrique Campestrini, pelo auxílio com o tratamento dos dados e discussão dos resultados de IFTR e RMN.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Azevedo e ao técnico Leandro Luís Góia, da ESALQ/ USP, pela realização das análises de Raio-X

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu Dos Santos Dias, Da ESALQ/ USP, pelo auxílio com o tratamento estatístico dos dados.

À empresa Ingredion Ingredientes Industriais LTDA, e aos Senhores José Eduardo Camargo e Marcelo Hideki Minamiguchi, pelas amostras de amido de mandioca e de amidos de milho fornecidas para o presente estudo.

À empresa Amidos Pasquini (Nova Esperança - PR) e a senhora Michele Caroline Rios, pela amostra de amido de mandioca fornecida para os testes iniciais.

À Carlota Boralli Prudente dos Anjos (a Cá) pela colaboração na realização das análises no laboratório, pela amizade, e por me proporcionar momentos de alegria, que ficarão guardados para sempre.

Ao amigo Luis Fernando Polesi, pelas inúmeras conversas, discussão e risadas sobre a ciência do amido, tema esse que nos possibilitou construir essa amizade.

Às estagiárias Gisele Marcondes Luz, Isabela Cristina Freitas Romo, Jaqueline Barduco, Rafaela Moretti Vieira, Maila Fernanda Sandi, pelo auxílio com as análises e pela amizade.

A todos os amigos do curso de pós-graduação, pela amizade, apoio e ajuda nos momentos difíceis.

Aos amigos André Luis Pancieira, e Ariane Vendremiati, Daniele do Carmo Balestrin, a Murilo Saraiva Guimarães e Ana Carolina Ribeiro Dias, Denis Santiago da Costa por todos esses anos de amizade, conversas, e momentos memoráveis e por terem me apoiado e auxiliado inúmeras vezes.

À Karen A. Bressan, pelo companheirismo, pela paciência e carinho, pelas vezes que mesmo sem entender bem o porquê me apoiou e acreditou em mim, e por ter se tornado tão especial nessa minha caminhada, e nas outras ainda que virão.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 O amido	15
2.2 Modificação química do amido por oxidação	19
2.3 Oxidação do amido por ozônio	23
2.4 Expansão das massas de produtos amiláceos ao forno.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material	29
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Sistema de ozonização do amido.....	29
3.2.2 Avaliação do amido de mandioca e dos amidos de milho com diversos teores de amilose, antes e após modificação por ozônio.....	31
3.2.2.1 Avaliação estrutural e físico-química.....	31
3.2.2.1.1 Espectroscopia de Absorção na região do Infra Vermelho	31
3.2.2.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN)	32
3.2.2.1.3 Acidez (pH) e teor de amilose.....	32
3.2.2.1.5 Teor de carboxilas e de carbonilas	33
3.2.2.1.6 Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina	34
3.2.2.1.7 Cromatografia de permeação em gel.....	35
3.2.2.1.8 Difração de raios X e cristalinidade	35
3.2.2.1.9 Calorimetria diferencial de varredura.....	36
3.2.2.1.10 Fator de inchamento dos grânulos.....	36
3.2.2.2 Avaliação funcional.....	37
3.2.2.2.1 Propriedades de pasta	37
3.2.2.2.2 Índice de absorção (IAA) e de Solubilidade em água (ISA)	38
3.2.2.2.3 Claridade das pastas	38
3.2.2.2.4 Capacidade de expansão da massa de amido durante o forneamento	39
3.2.2.3 Análise estatística dos resultados	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

4.1 ^1H -RMN das amostras de amidos	41
4.2 Espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	43
4.3 Teor de carbonilas e de carboxilas	48
4.4 Teor de amilose	52
4.5 Distribuição dos comprimentos das cadeias ramificadas da amilopectina.....	54
4.6 Distribuição do tamanho molecular dos componentes do amido por cromatografia de permeação em gel	60
4.7 Difração de raios X e cristalinidade relativa.....	64
4.8 Propriedades térmicas.....	71
4.9 Propriedades de pasta	79
4.10 Índice de solubilidade em água e índice de absorção de água.....	87
4.11 Transparência das pastas	89
4.12 Fator de inchamento dos grânulos	91
4.13 Capacidade de expansão da massa amido/água durante o cozimento ao forno.....	93
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	101
6 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	107

RESUMO

Características estruturais, físico-químicas e funcionais dos amidos de mandioca e de milho com diferentes teores de amilose oxidados por ozônio

A oxidação é um método que visa a modificação do amido por agentes oxidantes diversos, introduzindo grupamentos funcionais e realizando cisão das ligações glicosídicas. Seus objetivos são reduzir a viscosidade do polissacarídeo, elevar a transparência da pasta e limitar sua retrogradação. O objetivo do presente estudo foi modificar os amidos de milho com diferentes teores de amilose e o amido de mandioca pelo tratamento com ozônio e também caracterizar as amostras oxidadas quanto às características moleculares, estruturais e funcionais, correlacionando-as entre si. O processo de oxidação foi efetivo em alterar diversas propriedades e funcionalidades dos amidos estudados, contudo de modos distintos para as diferentes fontes. Tais diferenças decorrem da composição e estrutura granular peculiares de cada um, promovendo diferentes taxas de degradação das lamelas amorfas e cristalinas e da presença de grupos carboxilas. A oxidação pelo ozônio nas condições estudadas reduziu a viscosidade apenas do amido de milho normal; no caso dos amidos de milho ceroso e de mandioca, a viscosidade foi ligeiramente aumentada. O amido de milho de alta amilose não apresentou viscosidade nas condições de analisadas pelo Rapid Visco Analyser, tanto antes como após a oxidação. O *setback* foi reduzido pelo processo oxidativo com o ozônio para os três amidos, tornando-os mais estáveis. A oxidação aumentou a claridade de pasta de todos os amidos. A ozonização também causou alterações no amido de milho ceroso e no de mandioca, de modo a proporcionar capacidade de expansão no forno, em índices próximos àqueles de amostras comerciais de polvilho azedo. Os demais amidos não se expandiram significativamente. A propriedade de expansão no forno foi afetada principalmente pela variação de entalpia de gelatinização dos amidos, mas também pelos teores de carboxilas e de carbonilas, fator de inchamento, quebra de viscosidade, *setback*, cristalinidade relativa e tamanho das cadeias ramificadas de amilopectina (cadeias B2 e B3 e tamanho médio). O uso do ozônio, portanto, poderá ser útil nesta modalidade de modificação dos amidos e, em especial para o amido de mandioca ou de milho ceroso, capacitando-os para a expansão no forno, o que poderia gerar produtos panificáveis mais padronizados do que os obtidos pelo polvilho azedo, ou sem as consequências da oxidação por métodos químicos mais agressivos, como o uso do hipoclorito de sódio.

Palavras-chave: Amido modificado; Oxidação; Ozônio; Características estruturais; Propriedades funcionais

ABSTRACT

Structural, physico-chemical and functional characteristics of cassava starch and corn starches with different levels of amylose oxidized by ozone

Oxidation is a method which aims the starch modification by various oxidizing agents, introducing functional groups and performing the cleavage of glycosidic linkages. Its objectives are to reduce the polysaccharides viscosity, raising the transparency paste and minimizing retrogradation. The aim of this study was to modify the corn starch with different levels of amylose and the cassava starch using ozone and also to characterize the samples oxidized as the molecular, structural and functional characteristics, relating them with each other. The oxidation process was effective changing several properties and features of the studied starches, however, in different ways for the different sources. These differences come from having starches different composition and granular structure, providing different rates of degradation of amorphous and crystalline lamellae and the presence of carbonyl groups, and carboxyl formed. A reduction in viscosity was observed for the normal corn starch after oxidation, and an increase for the waxy maize and cassava starches. The high amylose corn starch showed no viscosity by Rapid Visco Analyser, before or after oxidation. The setback was reduced by the oxidation process with ozone for the three starches, rendering them more stable. Oxidation by ozone under the conditions studied increased paste clarity of all starches. Ozonation caused changes in the waxy corn and cassava starches, providing baking properties, in indices close to those of commercial samples of sour cassava starch. The other starches are not expanded significantly in the oven. The baking property was mostly affected by enthalpy of gelatinization of starches, but also by carboxyl and carbonyl contents, swelling factor, breakdown, setback, relative crystallinity and size of amylopectin branched chains (B2, B3 and medium size). So, the use of ozone may be useful in this starch modification modality, and in particular for cassava or waxy maize starches, enabling the expansion in oven, which could generate more standardized baking products than those obtained by sour cassava starch, or without consequences of oxidation using more aggressive chemical methods, such as sodium hypochlorite.

Keywords: Modified starch; Oxidation; Ozone; Structural characteristics; Functional properties

LISTA DE ABREVIATURAS

% R- Porcentagem de retrogradação

ΔH - Variação de entalpia

ΔH_G - Variação de entalpia de gelatinização

ΔH_R - Variação de entalpia de retrogradação

ΔT - Transição térmica

Aa- Amido de milho de alta amilose

Aao- Amido de milho de alta amilose oxidado

BV- *Blue Value*

C- Amido de milho ceroso

CHO- Carboidrato

Co- Amido de milho ceroso oxidado

CPG- Cromatografia de permeação a gel

CR- Cristalinidade relativa

DSC- Calorimetria diferencial de varredura

GP- Grau de polimerização

IAA- Índice de absorção de água

IFTR- Espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier

ISA- Índice de solubilidade em água

Ma- Amido de mandioca

Mao- Amido de mandioca oxidado

N- Amido de milho normal

No- Amido de milho normal oxidado

PCA- Análise de componentes principais

Pv- Pico de viscosidade

Qv- Quebra de viscosidade

RMN- Ressonância magnética nuclear

RVA- Rapid visco analyser

SB- *Setback*

Tf- Temperatura final

Ti- Temperatura inicial

TiG- Temperatura inicial de gelatinização

Tp- Temperatura de pico

TpG- Temperatura de pico de gelatinização

UV- Ultra violeta

Vf- Viscosidade final

1 INTRODUÇÃO

O amido é um ingrediente com variadas possibilidades de usos industriais, como na indústria química, têxtil, petroquímica, farmacêutica e papelreira, dentre outras. Seu principal uso, entretanto, é no setor alimentício. As possibilidades decorrem das características físico-químicas e funcionais que apresenta, como a insolubilidade em água, a gelatinização, a gelificação, a possibilidade de hidrólise e outras. Tais propriedades variam com a fonte de amido utilizada, podendo ainda ser modificadas por processos químicos e físicos diversos.

A oxidação é um destes métodos de modificação do amido, conferindo propriedades funcionais diferenciadas, tais como baixa viscosidade, maior estabilidade frente à retrogradação e claridade da pasta, capacidade de formar filmes e propriedades de adesão (KUAKPETOON; WANG, 2006). Tais propriedades originam outras possibilidades de uso para este polissacarídeo.

A oxidação pode também, em alguns amidos, gerar outra importante propriedade, que é a capacidade de expansão da massa amido/água em forno convencional. Esta característica vem sendo extensivamente estudada, tendo como modelo o polvilho azedo, produto tradicionalmente obtido a partir do amido de mandioca, submetido à fermentação natural e secagem solar (comprimentos de ondas da região do ultra-violeta). Tais etapas causam a oxidação do material despolimerizado e são responsáveis pela capacidade de expansão (BERTOLINI et al., 2001b; DEMIATE et al., 2000; VATANASUCHART et al., 2005), ou seja, podem propiciar produtos forneados com volume específico elevado e estrutura alveolar e crocância comparáveis aos dos produtos extrusados (BERTOLINI et al., 2001a). Por se tratar de etapas naturais, dependentes das condições climáticas, geram desuniformidade na qualidade do produto final. Se aplicadas a amidos de outras fontes, estes mesmos processos podem não conferir expansão, ou causar expansão muito incipiente (CEREDA et al., 2001). A elucidação do mecanismo exato para este fenômeno ainda é controverso.

O método de oxidação química mais estudado para o amido é o que utiliza o hipoclorito de sódio e, em menor escala, o peróxido de hidrogênio. Estes compostos, contudo, podem criar problemas pela geração de águas residuais e também pela possibilidade de deixar resíduos indesejáveis em produtos alimentícios (AN; KING, 2009). Por se tratar de oxidante verde, o ozônio seria preferível ao tratamento com estes reagentes, pois requer poucos procedimentos de purificação (AN; KING, 2009; CHAN et al., 2011), constituindo uma boa alternativa tecnológica para degradação de substâncias orgânicas. A oxidação com ozônio

pode ser considerada uma tecnologia limpa (TEIXEIRA; JARDIM, 2004; AMORIM; LEÃO; MOREIRA, 2009; SOUZA, 2010) e, além disto, os produtos finais da reação são gás carbônico e água, íons inorgânicos e subprodutos menos tóxicos.

Estudos de modificação do amido por ozônio são recentes e ainda não exploraram em profundidade as várias fontes de amido. Alguns amidos oxidados por ozônio são os de mandioca, milho normal, sagú, arroz normal e ceroso, trigo, inhame e cará. O processo de ozonização por via seca foi estudado por Chan, Bhat e Karim, (2009); Amorim, Doval e Cristianini (2011); Chan et al. (2011); Sandhu et al. (2012), Oladebeye et al. (2013) e Ding et al. (2015), e os que utilizaram meios aquosos foram os de An e King (2009); Klein et al. (2014) e Çatal e Ibanoglu (2014). Estes estudos têm se concentrado em avaliar o processo oxidativo, o teor de carboxilas gerado, as alterações na massa molecular dos componentes do amido e as mudanças nas propriedades de pasta. Alguns poucos trabalhos têm investigado em profundidade o efeito deste processo sobre o amido, correlacionando as modificações moleculares, estruturais e físico-químicas com a funcionalidade do mesmo.

Avanços no processo oxidativo por ozônio sobre amidos mais usuais, como o de mandioca e milho normal, assim como em amidos modelos, como o de milho de alta amilose e o ceroso, possibilitariam ganhos na produção e comercialização destes produtos e seus derivados, pois poderiam direcionar para novos ingredientes e usos, como os produtos panificáveis sem glúten, além de gerar menos resíduos nos alimentos e meio ambiente.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi modificar, por oxidação com ozônio, o amido de mandioca e os amidos de milho com diversos teores de amilose e caracterizá-los molecular, estrutural e funcionalmente, inclusive a capacidade de expansão no forno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O amido

O amido é a principal substância de reserva nas plantas superiores e é definido como um polissacarídeo composto por unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas α -(1 $\rightarrow$ 4) e α -(1 $\rightarrow$ 6) (THOMAS; ATWELL, 1999).

O amido isolado constitui ingrediente em diversos setores industriais, tendo no setor alimentício uma de suas principais áreas de aplicação. Os amidos de diferentes fontes vegetais apresentam propriedades específicas que conferem funcionalidades distintas aos alimentos. As aplicações industriais do amido nativo, entretanto, são limitadas às suas propriedades intrínsecas. Com isto, modificações químicas ou físicas de amido têm sido realizadas com o objetivo de aumentar seu potencial de uso e valor agregado. Constantes pesquisas sobre modificação de amidos visando propriedades diferenciadas têm sido necessárias.

O amido deve muito de sua funcionalidade às macromoléculas que o compõe, assim como à organização física das mesmas para formar a estrutura granular (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006). As macromoléculas são a amilose e a amilopectina, sendo a primeira formada por unidades de glucose unidas por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4), originando uma cadeia linear, e a última, por unidades de glucose unidas em ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) e α -(1 $\rightarrow$ 6), de estrutura ramificada. A amilose, entretanto, pode apresentar algumas poucas ramificações, com ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) (BULEON et al., 1998), as quais estão frequentemente localizadas próximas à extremidade redutora (TAKEDA; TAKEDA; HIZUKURI, 1987). Segundo Buléon et al. (1998), estas ramificações são separadas por distâncias tais que permitem que estas moléculas ajam como essencialmente lineares, não alterando significativamente suas características como massa molecular e capacidade de se complexar com o iodo, álcoois ou lipídios.

As proporções dessas macromoléculas no amido diferem em relação às fontes vegetais, às variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (ELIASSON, 2004; TESTER et al., 2004).

A maioria dos amidos contém entre 20 e 30 % de amilose e 70 e 80 % de amilopectina (BILIADERIS, 1991). Os amidos de cereais, por exemplo, apresentam em média 72 a 82% de amilopectina e 18 a 33% de amilose. Entretanto alguns genótipos mutantes de milho, cevada e arroz podem apresentar até 70 % de amilose, enquanto alguns genótipos, chamados cerosos, apresentam menos que 1% de amilose (milho, cevada, arroz e sorgo) (BULEON et al., 1998).

Baseados nestas diferenças, foi estabelecida uma classificação do amido em diferentes grupos: os cerosos, que contêm pequenas quantidades de amilose (aproximadamente 1 %), os normais, que contêm entre 17 % e 24 % de amilose e os de alta amilose, com 50, 70 % ou mais deste polímero (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006). Alguns amidos ainda, tais como o de milho de alto teor de amilose (WANG et al., 1993), também apresentam componentes intermediários, que são moléculas ramificadas, de menor massa molecular, e de cadeias mais longas do que aquelas da amilopectina (TAKEDA; TAKEDA; HIZUKURI, 1993).

Além das macromoléculas, a maioria dos amidos dos cereais normais também contém ácidos graxos livres e fosfolipídeos (LIM; KASEMSUWAN; JANE, 1994), enquanto os cerosos contêm muito pouco lipídeo e o de alta amilose contém mais lipídeos (JANE et al., 2009). Os amidos de raízes e tubérculos contêm pouco ou nenhum fosfolipídeo (LIM; KASEMSUWAN; JANE, 1994).

A amilose possui facilidade em adquirir conformação helicoidal, pois as cadeias de α -D-glucose costumam enrolar-se em espiral, formando uma estrutura na qual a hélice é formada por pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas. O interior da α -hélice contém somente átomos de hidrogênio (lipofílico) enquanto os grupos hidroxilas posicionam-se no lado externo da mesma. A hélice consiste em média de 6 resíduos de glucose por volta (0,8 nm) e uma cavidade hidrofóbica com diâmetro de 0,5 nm (HOOVER, 2001).

A amilose é capaz de interagir com o iodo e produzir um complexo de inclusão helicoidal, tendo aproximadamente seis moléculas de glucose por giro, na qual a molécula de iodo está na cavidade central da hélice do polissacarídeo. Este complexo apresenta cor azul comum à absorção máxima dos comprimentos de onda de 620 nm a 680 nm (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006). As amiloses ramificadas apresentam capacidade de ligação com iodo e massa molecular próximas às das amiloses originais, mantendo-se completamente diferentes daquelas da amilopectina (TAKEDA; TAKEDA; HIZUKURI, 1987).

A amilopectina apresenta grau de polimerização da ordem de 10^4 a 10^5 unidades de glucose, massa molecular da ordem de $0,5 \cdot 10^8$ a 10^9 Daltons e comprimento das ramificações variável, mas é comum apresentarem entre 20 e 30 unidades de glucose. A amilopectina em contato com solução de iodo apresenta coloração avermelhada (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006; CEREDA et al., 2001).

A molécula de amilopectina consiste de uma cadeia principal C, que carrega o grupo redutor da molécula, e numerosas cadeias ramificadas denominadas cadeias A e B. As cadeias

A são aquelas conectadas a outras cadeias via ligações α -(1 $\rightarrow$ 6), mas não carregam qualquer ramificação. As cadeias B são aquelas conectadas a outras cadeias também via ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) e possuem uma ou mais cadeias A ou B ligadas a ela por ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) (FRENCH, 1984; BULEON et al., 1998) e apresentam diferentes comprimentos. Estes diferentes comprimentos de cadeias laterais da amilopectina foram classificados por Hanashiro, Abe e Hizukuri (1996) em quatro grupos, de acordo com o grau de polimerização (GP), sendo (GP 6-12); (GP 13-24); (GP 25-36); (GP $\geq$ 37), frações essas equivalentes às cadeias A, B1, B2, B3, respectivamente.

Essa distribuição está relacionada com as características do amido. Amidos com amilopectina que apresentam altas e baixas proporções de cadeias curtas (GP 6-12), respectivamente, apresentam padrões cristalinos A e B (BULEON et al., 1998). O arranjo da amilose e da amilopectina nos grânulos leva à formação de zonas de deposição mais ou menos densas. A região onde se concentra a amilopectina é mais densa ou cristalina. Por ser mais compacta, esta região dificulta a entrada de moléculas como as de água e enzimas, apresentando-se mais resistente ao processo hidrolítico (CEREDA et al., 2001). As propriedades físico-químicas do amido e, portanto, a aplicação do mesmo, variam com a razão amilose/amilopectina, grau de ramificação da amilose e da amilopectina e tamanho dos grânulos (KORTSTEE et al., 1998).

A organização do grânulo de amido é complexa e depende fortemente da origem botânica (BULEON et al., 1998). Vários modelos para a ultra-estrutura do amido ou diferentes níveis de organização das macromoléculas no interior dos grânulos têm sido propostos na literatura.

Os grânulos de amido se organizam em camadas alternadas com anéis de crescimento alternados que crescem a partir de uma região central. Os anéis amorfos consistem de ambas as macromoléculas em conformação desordenada, enquanto os semicristalinos são formados por estrutura lamelar de regiões cristalinas e amorfas alternadas. A região cristalina é formada pelas duplas hélices das cadeias laterais da amilopectina, enquanto que a amorfa contém os pontos de ramificação da amilopectina e amilose. As cadeias ramificadas da amilopectina estão arranjadas em forma de *clusters*. As moléculas de amilose podem passar através de ambas as regiões, estando em conformação ordenada nas regiões cristalinas e desordenada nas regiões amorfas (BULEON et al., 1998; JANE, 2004; JANE, 2009; BLAZEK; GILBERT, 2011).

Na representação esquemática da arquitetura de grânulos proposta por Gallant, Bouchet e Baldwin (1997), os grânulos apresentam camadas alternadas de material cristalino

e semi-cristalino. As camadas se tornam mais finas conforme se distanciam do centro dos grânulos (devido ao aumento do tamanho do grânulo pela constante taxa de crescimento). Gallant, Bouchet e Baldwin (1997) também sugeriram que as lamelas amorfas e cristalinas da amilopectina são organizadas em estruturas maiores denominadas de bloquetes, mais ou menos esféricas e de tamanhos que dependem do tipo de amido e localização no grânulo. Um bloquete contém várias lamelas cristalinas e amorfas. A organização dos bloquetes nas lamelas do amido e a presença de canais radialmente arranjados em alguns amidos influenciam suas propriedades. A região semi-cristalina teria bloquetes menores (20-50 nm) que os da região cristalina (50-500 nm), indicando menor organização cristalina. A amilopectina está presente em ambas as regiões, entretanto, na semi-cristalina, embora ainda apresente conformação helicoidal dupla, sua cristalinidade seria reduzida, principalmente devido interação com a amilose.

A presença de bloquetes e os canais amorfos desempenham papel importante em ambas, a resistência do amido ao ataque enzimático e a estrutura de camadas semi-cristalinas. O tamanho dos bloquetes pode influenciar a suscetibilidade enzimática do amido, juntamente com outros fatores como o teor de amilose, a localização e a interação amilose com a amilopectina. Os bloquetes de tamanho maior são mais resistentes que os menores (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

A ordem cristalina dos grânulos influencia as propriedades funcionais do amido. Em seu estado nativo, o amido é insolúvel em água fria, apresentando grânulos parcialmente cristalinos cuja morfologia, composição química e estrutura molecular são características de cada espécie em particular (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006). Com o aquecimento da suspensão de amido em água acima de determinada temperatura crítica, os grânulos passam a absorver água e intumescem, aumentando em muitas vezes o tamanho original, formando uma pasta. A abundância de grupos hidroxilas nas moléculas de amido confere características hidrofílicas, porque permitem que o polímero estabeleça ligações de hidrogênio com a água (MUNHOZ; WEBWER; CHANG, 2004).

Durante o aquecimento dos grânulos na presença de água ocorre o processo de gelatinização do amido. Este fenômeno causa uma mudança irreversível na estrutura granular, podendo se observar a penetração de água inicialmente nas regiões amorfas, pois as pontes de hidrogênio nessas regiões são ligações mais fracas e facilmente rompidas, permitindo a hidratação e inchamento do grânulo de amido. Com o aumento da temperatura, o inchamento do grânulo aumenta, assim como absorção de água, resultando na perda da ordem cristalina

(birrefringência), pois há a dissociação de duplas hélices da região cristalina, e também a lixiviação da amilose (HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003).

As pastas de amido, em concentrações suficientemente elevadas, tendem a formar géis quando resfriadas. A gelificação ocorre pela formação de uma rede tridimensional na qual os grânulos intumescidos são ligados. A rede, que é de natureza cristalina, consiste de segmentos de moléculas lineares e ramificadas as quais formam uma estrutura contínua (OTT; HESTER, 1965) que retém uma fase líquida no seu interior.

Com o resfriamento das pastas, ocorre a retrogradação ou reassociação das moléculas de amido em estrutura menos ordenada e, conseqüentemente, menos solúvel. As moléculas de amilose formam duplas hélices com 40-70 unidades de glucose e as cadeias de amilopectina cristalizam-se por associação das cadeias mais curtas (SINGH et al., 2003). O rearranjo das moléculas se dá por ligações de hidrogênio (MUNHOZ; WEBER; CHANG, 2004). Alguns dos fatores que podem interferir na retrogradação são a fonte botânica, concentração, condições de aquecimento e resfriamento, pH e presença de solutos como lipídeos e açúcares. Singh et al. (2003) afirmam que o teor de amilose é um dos principais fatores que influencia a retrogradação, sendo que quanto maior for o teor desta macromolécula, maior será esta tendência de reassociação.

As propriedades dos amidos são únicas para cada fonte botânica. Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de melhor entender a relação entre as características estruturais do amido e suas propriedades físico-químicas (KORTSTEE et al., 1998). O âmbito de aplicação do amido pode ser tanto melhorado como limitado pela sua estrutura molecular. Por exemplo, arranjos compactos de moléculas nas regiões cristalinas podem inibir que a água ou os reagentes químicos entrem em contato com as moléculas da região cristalina (HUANG et al., 2007).

2.2 Modificação química do amido por oxidação

A oxidação como um método de modificação do amido contribui com maior fluidez da pasta de amido devido à cisão oxidativa (WURZBURG, 1986), sendo que estas pastas fluidas apresentam alto teor de sólidos além de elevadas transparência e resistência à retrogradação (TORNEPORT; SALOMONSSON; THEANDER, 1990; WING, 1994). De acordo com Wurzburg (1986) estes amidos são frequentemente controlados e comercializados com base nas medidas da fluidez dos mesmos em água. De acordo com este autor, a oxidação dos amidos pode produzir ampla faixa de fluidez, sendo considerado que, de um modo geral,

são diretamente proporcionais. O amido oxidado é amplamente utilizado em indústrias, onde se requer também a formação de filmes ou a propriedade de adesão (SANGSEETHONG; TERMVEJSAYANON; SRIROTH, 2010).

Os diferentes procedimentos de oxidação resultam em variações na estrutura molecular, podendo causar despolimerização e gerar diferentes teores de carbonilas e carboxilas no amido, causando alteração de propriedades diversas. Dentre outras, são propriedades frequentemente afetadas o poder de inchamento dos grânulos, viscosidade máxima e poder de expansão no forno (SHIRAI et al., 2007), propriedades térmicas (SANGSEETHONG; LERTPHANICH; SRIROTH, 2009), retrogradação (KUAKPETOON, WANG, 2006; SANGSEETHONG; LERTPHANICH; SRIROTH, 2009) e transparência da pasta (TORNEPORT; SALOMONSSON; THEANDER, 1990; WING, 1994). A oxidação dos amidos de diferentes fontes, entretanto, pode modificar as diferentes propriedades físico-químicas do amido.

A modificação química de amidos por oxidação é normalmente conduzida pela reação com um agente oxidante, em temperatura e pH controlados. De acordo com Wing e Willett (1997), o hipoclorito de sódio é o oxidante mais antigo e frequentemente utilizado para oxidar amido, entretanto, outros agentes como o peróxido de hidrogênio, permanganato, periodato e dicromato também têm sido utilizados. A oxidação por estes agentes compreende o tratamento em meio aquoso, sob condições ambientes e baixas concentrações (<3 %) de oxidante, após o qual o produto deve ser recuperado por filtração e lavagem com água. Com isto, parte do produto solubilizado devido à quebra da macromolécula pode ser perdida.

No caso do amido, os agentes oxidantes penetram no grânulo, principalmente nas regiões menos cristalinas, ou amorfas, do grânulo (RUTENBERG; SOLAREK, 1984). De acordo com os autores, quando as condições da reação são mais severas, há a formação de fragmentos ácidos e material altamente degradado, e a superfície dos grânulos pode apresentar rachaduras e fissuras.

Segundo Newton e Peckham (1944), o processo de oxidação do amido produz ácidos orgânicos, como o glucônico, glucurônico, sacárico, cítrico, láctico, acético, propiônico e butírico, o dióxido de carbono e acetona. O processo de oxidação pode ser semelhante ao processo de hidrólise, porém na oxidação, ao final, têm-se ácidos e aldeídos de baixa massa molecular.

A maioria das oxidações de amido, segundo Hugh e Roberts (1965), tem início com a remoção do hidrogênio das moléculas para produzir grupamentos carbonilas. A degradação das moléculas decorre de reações subsequentes, pela eliminação de uma alquila ou pelo

rompimento das ligações entre os carbonos. As reações oxidativas de álcoois podem ser agrupadas de acordo com o mecanismo, em homolítica (ou oxidação do radical livre); eliminação heterolítica de um próton, frequentemente por meio de um éster intermediário e, transferência de hidreto (eliminação heterolítica de um íon hidreto).

Duas reações principais ocorrem durante a oxidação. Primeiramente, os grupamentos hidroxilas nos carbonos de posição 2, 3 e 6 da glucose são oxidadas. Posteriormente, ocorre a quebra das moléculas de amido pelo rompimento das ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) da amilose e da amilopectina (WURZBURG, 1986). Inicialmente a oxidação se dá nos carbonos 2 ou 3, com a formação de grupos carbonilas e carboxilas. As carboxilas são, em sua maioria, ácidos glucurônicos, e as carbonilas são, predominantemente, grupos aldeídos (65-80 %) e grupos cetônicos na posição C2 (9 %) (RUTEENBERG; SOLAREK, 1984).

A extensão das mudanças nas propriedades estruturais e físico-químicas do amido oxidado depende principalmente da origem botânica do amido nativo (SANGSEETHONG; TERMVEJSAYANON; SRIROTH, 2010) e sua estrutura molecular (WURZBURG, 1986). Também é função do tipo de agente oxidante e das condições de reação (SANGSEETHONG; TERMVEJSAYANON; SRIROTH, 2010), tais como o pH, temperatura, concentração do agente oxidante (WURZBURG, 1986).

A heterogeneidade do grânulo dentro de uma mesma fonte de amido pode afetar a extensão das modificações de um modo geral. As mudanças observadas em propriedades físico-químicas, morfológicas, térmicas e reológicas após as modificações podem fornecer uma base de fundamentos para a compreensão da eficiência desses processos (SINGH; KAUR; MCCARTHY, 2007).

Amidos com estrutura cristalina menos compactada, ou com estrutura mais amorfa, podem proporcionar locais de reação mais acessíveis ao oxidante. Quaisquer características químicas que afete o empacotamento das lamelas cristalinas e o tamanho das lamelas amorfas podem também influenciar o grau de oxidação.

Sangseethong, Termvejsayanon e Sriroth (2010) compararam oxidação de amido de mandioca com hipoclorito de sódio e com peróxido de hidrogênio, sem acidificação prévia, observando que o primeiro favorece a formação de carboxilas enquanto que o segundo a de carbonilas. Os reagentes produziram amidos oxidados com viscosidade e distribuição de tamanho molecular semelhantes, muito embora o peróxido consiga os mesmos efeitos em tempo menor. Os géis dos amidos oxidados por peróxido ao serem resfriados tendiam a ser mais firmes que aqueles oxidados por hipoclorito.

Jenkins e Donald (1995) investigaram a influência da amilose sobre a estrutura granular do amido de milho utilizando difração de raios X (SAXS) e observaram que a somatória do tamanho das lamelas cristalinas e amorfas eram constantes, a 9 nm, para os três amidos de milho de teores diferenciados de amilose (0, 28 e 70 %). No entanto, o tamanho das lamelas amorfas diminuiu com o aumento do teor de amilose. Eles sugeriram que a amilose pode romper o empacotamento das duplas hélices da amilopectina por co-cristalização com as cadeias de amilopectina e puxar algumas cadeias de amilopectina de duas lamelas cristalinas adjacentes mais próximas umas das outras. Portanto, a quantidade de amilose também pode afetar o acesso do agente de oxidação ao amido durante a oxidação (JENKINS; DONALD, 1995).

Os amidos de milho ceroso, milho normal ácido-modificado, batata, batata-doce, mandioquinha-salsa, milho normal e mandioca quando modificados por tratamento com peróxido de hidrogênio diferiram dos correspondentes nativos por apresentarem maior poder redutor, susceptibilidade à sinérese, expansão no forno e conteúdo de carboxilas. Em relação à viscosidade aparente, os amidos modificados apresentaram menores picos, o que sugere redução da massa molecular das macromoléculas (SHIRAI et al., 2007).

Tanto a amilose, como a amilopectina, são degradadas na oxidação do amido, mas a primeira é mais suscetível (WANG; WANG, 2003, KUAKPETOON; WANG, 2006). A relação amilose/amilopectina tem grande reflexo nas propriedades físico-químicas dos amidos oxidados, sendo a amilose um fator preponderante no controle da eficiência desta reação (KUAKPETOON; WANG, 2006). A degradação das amilopectinas de cadeias longas (GP>24) foi mais pronunciada nos amidos de milho ceroso e normal do que no de alta amilose. Kuakpetoon e Wang (2006) observaram maiores teores de carboxilas nas amilopectinas que nas amiloses, particularmente nos amidos de alta amilose.

O processo oxidativo do amido gera a redução do pH da solução, produz carboxilas e carbonilas e, além disto, promove a cisão de algumas ligações glicosídicas, resultando em redução da massa molecular dos componentes do amido (RUTEENBERG; SOLAREK, 1984). O entendimento das alterações durante a oxidação por hipoclorito é complicado pela presença das condições alcalinas durante a reação. Na condição de alcalinidade, o oxigênio do ar pode promover tanto a degradação como a oxidação dos amidos. Esta possibilidade, juntamente com o enfraquecimento das ligações glicosídicas mediante a oxidação das hidroxilas secundárias, podem colaborar para a degradação do amido mediante quebra das ligações glicosídicas (WURZBURG, 1986). Oxidações conduzidas em condições alcalinas amenas apresentam maior número de grupamentos funcionais, entretanto a extensão da

redução de viscosidade é muito maior do que no processamento com alta alcalinidade (SANGSEETHONG; LERTPHANICH; SRIROTH, 2009). Sob pHs intermediários, formam-se grupos ceto, enquanto que em pHs elevados são formadas principalmente carboxilas. Considerando que as carboxilas desempenham importante papel na estabilização das moléculas lineares de amilose e minimizam a retrogradação, as oxidações normalmente devem ocorrer sob condições de alcalinidade suave a moderada, favorecendo a produção de carboxilas (WURZBURG, 1986).

O uso de hipoclorito sob condições ligeiramente alcalinas promove a cisão e formação de grupos funcionais concomitantemente. A formação de grupos funcionais nos C2 e C3 poderia enfraquecer a ligação na posição do C1, levando à despolimerização do amido via beta-eliminação (WHISTLER; LINKE; KAZENIAC, 1956). Na oxidação por peróxido, em Sangseethong, Termvejsayanon e Sriroth (2010), as reações acontecem em taxa relativamente mais rápida. Os teores de carbonila e carboxila do amido oxidado por este agente permaneceram praticamente inalterados enquanto ocorreu decréscimo suave da viscosidade entre os tempos de reação de 30-300 min. Parece que as alterações estruturais (isto é, a formação de grupos funcionais e a redução do tamanho molecular) neste caso ocorreram, na maior parte, nos primeiros 30 min, mas não foi possível determinar como estes dois processos se relacionam. As reações acontecem provavelmente via mecanismo onde o arranjo de um radical livre ($R^{\cdot}CHOH$) induz a quebra da ligação glicosídica e a formação de grupo carbonila (ARTS et al., 1997).

2.3 Oxidação do amido por ozônio

O ozônio é um agente oxidante mais efetivo que o próprio oxigênio, tendo a vantagem de reagir com a maioria das substâncias em temperatura ambiente, e pode oxidar por via seca, evitando-se as perdas de material, que normalmente ocorrem nos processos de lavagem e filtração exigidos pelos tratamentos com agentes químicos mais tradicionais (KESSELMANS; BLEEKER, 1997). Além da via seca, pode ocorrer também em meios aquosos, conforme proposta de Hoigné e Bader (1976). De acordo com estes últimos autores, o ozônio em meio aquoso pode tanto reagir com os substratos, como, em valores críticos de pH, se decompor antes da reação com os substratos. Um dos produtos da decomposição do ozônio, é o radical hidroxila, que pode se tornar o principal oxidante, reagindo diretamente com o substrato. Em meio alcalino, também pode se formar radicais livres, que podem tanto reagir com o substrato, gerando peróxido de hidrogênio, como se converter em peróxido de

hidrogênio, composto que também pode agir como oxidante do amido. Os valores de pH críticos acima dos quais o segundo tipo de reação predomina depende de ambos, a taxa na qual o ozônio reage diretamente com os substratos e os solutos, incluindo os produtos de reação, que elevam ou retardam a decomposição do ozônio. Quando em meio ácido a reação é direta entre o substrato e ozônio, altamente seletiva, porém mais lenta (HOIGNÉ; BADER, 1976).

Wang, Hollinsworth e Kasper (1999) descreveram o método de uma etapa para despolimerização de polissacarídeos (com ligações beta) dissolvidos em água ou em soluções básicas por oxidação seletiva pelo ozônio. Os autores descreveram as condições otimizadas para se conduzir esta degradação, onde a ligação aldósídica é oxidada para uma função éster aldônica que hidrolisa sob condições básicas empregadas para dar um aldonato livre, com a clivagem da cadeia. Esta oxidação pelo ozônio de carboidratos não protegidos é complicada por várias reações paralelas, sendo que estas reações não seletivas incluem a degradação oxidativa por espécies de radicais que oxidam os resíduos de glucosil para ácidos fórmico, acético e oxálico. As degradações não seletivas causadas pelos ácidos podem ser minimizadas por tampões básicos. Os produtos da despolimerização dos polissacarídeos formam uma distribuição de tamanho de cerca de uma massa molecular nominal, e a massa molecular média dos produtos pode ser controlado pela taxa ou teor de ozônio que passa pela mistura da reação.

Algumas pesquisas têm sido conduzidas nos anos mais recentes sobre a oxidação do amido por ozônio. Segundo An e King (2009) as propriedades da pasta geradas pela oxidação por ozônio (30 min) são semelhantes às dos amidos oxidados brandamente por agentes químicos. Ao aplicar ozônio em amido de arroz estes autores constataram grânulos com maior poder de inchamento e menor tendência à retrogradação que o não oxidado. As pastas se apresentaram mais viscosas, porém os géis menos rígidos.

Dos amidos de mandioca, sagú e milho ozonizados pelos tempos de geração do ozônio de até 10 min e de exposição por 10 min, por Chan, Bhat e Karim (2009), o primeiro apresentou-se mais suscetível à formação de carbonilas e o último à formação de carboxilas. Esta diferença pode ser explicada pela morfologia do grânulo e pela sua estrutura. Os autores sugeriram que o maior teor de carboxilas encontrado no amido de milho pode ser devido à presença de poros na superfície dos grânulos deste amido, o que facilitaria a difusão do ozônio. A despolimerização e degradação da amilose influenciaram o inchamento dos grânulos de amido, pois com a amilose degradada os grânulos podem absorver a água mais

facilmente e inchar. Isto também aumenta a solubilidade dos amidos de mandioca oxidados em relação ao não oxidado.

Amidos (milho, mandioca e sagú) sob a forma de pó foram expostos (10 min) a diferentes tempos de geração de ozônio. A extensão da oxidação e, portanto, seu efeito sobre a estrutura molecular e propriedades reológicas dos amidos, variaram entre as diferentes fontes dentro de uma mesma dose de ozônio. Esta variabilidade foi atribuída às diferentes taxas de degradação das regiões amorfas e cristalinas e à formação de carbonilas e carboxilas. A oxidação promoveu decréscimo de massa molecular dos amidos de milho e sagú, mas elevou a massa molecular do amido de mandioca. A viscosidade decresceu drasticamente com o aumento do tempo de geração de ozônio para todos os amidos. Não se observou diferenças nas temperaturas e entalpias de gelatinização de todos os amidos oxidados quando comparados com seus pares não modificados. A entalpia de retrogradação se elevou acentuadamente no amido de milho para 1 min de geração de ozônio. Entre os três amidos testados, o de milho pareceu ser o mais sensível à oxidação (CHAN et al., 2011).

2.4 Expansão das massas de produtos amiláceos ao forno

A capacidade de expansão da massa de alguns amidos durante o forneamento é uma propriedade de singular importância em produtos panificáveis, adquirida pelo processo oxidativo. O exemplo clássico é o do polvilho azedo, cuja capacidade de expansão é adquirida pelos processos de fermentação natural, seguida de secagem solar do amido de mandioca, o que conduz à oxidação pela radiação ultra-violeta (UV). A expansão não é obtida ao se utilizar amido nativo de mandioca ou outras fontes (CEREDA et al., 2001).

Esta expansão não envolve a rede de glúten ou a produção de CO₂ por fermentos biológicos ou químicos, a exemplo do que acontece na panificação convencional (CAMARGO et al., 1988; DEMIATE et al., 2000; VATANASUCHART et al., 2005; MARCON et al., 2009). A expansão é atribuída à vaporização da água e à fluidez da pasta. A massa predominantemente líquida é transformada em estrutura alveolar de reduzida densidade durante a secagem e desenvolve-se uma coloração superficial. A estabilização se dá pela gelatinização do amido no forneamento e perda de água (BERTOLINI et al., 2001a).

A produção de uma estrutura celular definida em produtos panificáveis a base de farinha de trigo depende não só da produção, mas também da retenção das bolhas de gás pela massa. A obtenção de uma massa com características mais extensíveis é importante para aumentar a retenção do gás, enquanto que a redução da resistência da massa e da elasticidade,

desempenham papel importante na modificação da estrutura das bolhas durante o processamento (CAUVAIN, 2007). Deste modo, a expansão em massas à base de polvilho azedo durante a cocção, implica em que o gás seja produzido e expandido, elevando o volume. A retenção do gás supõe que a massa tenha propriedades viscoelásticas adequadas para o reter.

A rede viscoelástica é formada pelas moléculas de amido após a gelatinização do mesmo, melhorando suas propriedades reológicas. De acordo com Mestres et al. (1996), nem a fermentação e nem a secagem solar alteraram as propriedades térmicas dos cristais do amido de mandioca, entretanto, a viscosidade intrínseca, seguindo o mesmo padrão da viscoamilografia, foram reduzidas logo nos primeiros dias de fermentação e primeiras horas de secagem solar. A viscosidade intrínseca pode ser explicada pela redução da massa molecular, pela alteração da conformação macromolecular e elevação da convolução (efeito de enrolar-se) mediante interação com outras moléculas. O estudo destes autores constatou que a redução da viscoamilografia e da viscosidade intrínseca está associada ao aumento do volume ao forno. Como esta redução não estava associada com a degradação do amido pela amilase ou ácido, os autores consideraram que isto poderia talvez decorrer da degradação oxidativa.

Na produção do polvilho azedo, tanto a acidificação, como a radiação UV, causam despolimerização do amido de mandioca. A oxidação do amido causa principalmente cisão das ligações glicosídicas e oxidação dos grupamentos hidroxílicos em grupamentos carboxilas e carbonilas (BERTOLINI et al., 2001b). O processo de acidificação/oxidação do polvilho também causa alteração do poder redutor das moléculas e da viscosidade, sinérese e claridade das pastas (APLEVICZ; DEMIATE, 2007). Ocorre também despolimerização parcial das moléculas do amido de mandioca nas regiões amorfas, fornecendo pequenos fragmentos lineares. Com isto, facilita-se a formação de uma massa ou matriz amorfa por ligações de hidrogênio, tendo como consequência uma boa expansão do amido durante a cocção (BERTOLINI; MESTRE; COLONNA, 2000; VATANASUCHART et al., 2005).

A expansão ou aeração da massa de amido de mandioca se inicia logo após a temperatura de gelatinização, enquanto que a perda de peso dessas massas se eleva acentuadamente devido à perda de água por evaporação (BERTOLINI et al., 2001a). Medidas por análises termodinâmicas nos estudos destes autores mostraram queda do módulo de armazenamento para a massa de polvilho azedo exatamente antes do início da expansão. Esta queda foi dramaticamente menor para a massa do amido nativo de mandioca e ausente na

massa de amido de milho. Isto sugere que o mecanismo de expansão do polvilho azedo está relacionado com a baixa viscosidade de massa.

O processo de expansão do polvilho azedo em altas temperaturas é similar ao observado em amidos extrusados, onde a força de expansão seria o vapor de água e a expansão da célula seria governada principalmente pela viscosidade da crosta da massa (BERTOLINI; MESTRE; COLONNA, 2000). Além da evaporação da água, Bertolini et al. (2001a) atribuíram a expansão à fluidicidade da pasta de amido. O fato de que a variabilidade da temperatura e a perda de peso em teores adequados de água foram significativamente superiores para a massa de mandioca do que para a de milho é indicativa do importante papel desempenhado pela fusão (*melting*) do amido na expansão. A habilidade de expansão poderia estar correlacionada com as alterações nas propriedades termodinâmicas da massa do miolo quando próximas da temperatura de fusão (BERTOLINI et al., 2001a)

Bertolini, Mestre e Colonna (2000) sugerem que a diminuição na viscosidade intrínseca resultante da acidificação e irradiação por UV poderia ser a responsável pela expansão. Em estudo posterior por Bertolini et al. (2001b) com amido de mandioca e de milho tratados com ácido láctico (0,24 M) e comprimentos de onda de 254 e 360 nm de luz UV, constataram que ambos os amidos apresentaram diminuição da viscosidade intrínseca, indicando despolimerização, entretanto, esta foi mais intensa para amido de mandioca.

Ao comparar amido de mandioca com o de milho comum fermentados e oxidados pela exposição ao sol ou pelo peróxido de hidrogênio, Dias et al. (2007) observaram que o primeiro desenvolveu a propriedade de expansão enquanto que o segundo não. De acordo com Bertolini, Mestre e Colonna (2000) o conteúdo interno de lipídeos no amido de milho pode prevenir a sua expansão e limitar sua desorganização, até mesmo quando parcialmente degradado.

Vatanasuchart et al. (2003) também observaram haver correlação linear entre propriedades de pasta e expansão da massa. Os amidos de mandioca tratados com ácido láctico e irradiados com UVB (310 – 330 nm) ou UVC (254 nm) por 7-9 h foram capazes de absorver e reter água durante a gelatinização e se expandirem durante o aquecimento da massa. Estes tratamentos causaram despolimerização parcial das moléculas de amilose e formação de estrutura de rede ligada através de interações de hidrogênio. Essa estrutura teve maior capacidade de absorção de água durante a gelatinização elevando os picos de viscosidade em viscosímetro. O aumento significativo da temperatura de pasta pode confirmar a formação de uma rede estrutural formada na região amorfa dos grânulos. Uma redução no conteúdo de amilose dos amidos irradiados por UV também foi observada. Em estudo

posterior, Vatanasuchart et al. (2005) constataram que exposições excessivas, entretanto, não proporcionaram estrutura de amido eficaz para a expansão da massa no cozimento.

Nos estudos de Sandhu et al. (2008), Sangseethong, Lertphanich e Sriroth (2009) e Dias et al. (2011a, 2011b) a expansão da massa se correlacionou com a oxidação, pela formação de carbonilas e carboxilas, porém esses autores não explicam o fenômeno em profundidade. Dias et al. (2011a) estudaram o amido de mandioca natural e o fermentado por 30 dias e, na sequência, seco ao sol ou em estufa ou tratado com hipoclorito de sódio. Os fermentados e secos ao sol apresentaram número elevado de grupos carboxílicos e carbonílicos, biscoitos com maior expansão da massa e menor dureza que o de amido fermentado e seco em estufa. A intensidade de oxidação com o hipoclorito de sódio alterou proporcionalmente as propriedades de pasta reduzindo-as, elevando a capacidade de expansão e reduzindo a dureza do biscoito do amido fermentado. As propriedades do amido oxidado com o hipoclorito de sódio variaram com a concentração de cloro ativo, temperatura e pH. Em estudo posterior, Dias et al. (2011b) constataram que a oxidação do amido de mandioca fermentado utilizando peróxido produziu teor de carboxilas e carbonilas no amido e volume específico e dureza dos biscoitos, que foram similares aos do amido fermentado seco ao sol. A oxidação química produziu produtos mais homogêneos. Estes autores sugerem que estudos adicionais devam ser realizados com outras fontes de amido que não apresentam expansão quando passam pelos mesmos tratamentos que o polvilho azedo passa.

Geralmente a propriedade de expansão dos amidos tem sido avaliada sempre após processo fermentativo ou tratamento ácido e um tratamento oxidante químico posterior, mas estudo utilizando apenas oxidantes químicos, como o hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio, foi encontrado na literatura o de Dias et al. (2007) e Shirai et al. (2007). Não foram encontrados trabalhos correlacionando ozonização de amido com a expansão das massas em forno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O amido de mandioca, o de milho normal (Amisol 3408), milho ceroso (Amisol 4000) e milho de alta amilose (Hylon VII) foram gentilmente fornecidos pela empresa Ingredion Brasil (Mogi Guaçu, SP).

3.2 Métodos

3.2.1 Sistema de ozonização do amido

A modificação do amido foi efetuada por sistema descontínuo, em conjunto piloto, conforme visualizado pelas Figuras 1 e 2.

Figura 1 - Sistema operacional para ozonização do amido

O sistema foi constituído por uma unidade geradora de ozônio (Ozone & Life, modelo O&L 3.0 RM, São José dos Campos, Brasil) a partir de oxigênio gasoso industrial (95 %). O gerador de ozônio foi ligado a um reator cilíndrico de vidro, com altura de 56 cm e capacidade para 2 L. Pela rolha do sistema de vedação do reator passava um tubo de vidro que terminava em um difusor de porosidade média para liberação do ozônio no meio. O sistema de homogeneização da amostra constou de um agitador magnético na base do reator e um ímã colocado por dentro, no fundo do cilindro, para agitar a suspensão.

Figura 2 - Aspecto geral do sistema operacional de ozonização do amido

Após a realização de pré-testes, as condições do experimento foram estabelecidas, e o mesmo foi realizado em temperatura de 25°C, o manômetro do cilindro de oxigênio posicionado para 0,5 L.min⁻¹ e o gerador de ozônio trabalhou com a carga de 36 mg O₃.L⁻¹ do gás gerado. Amostras de 300 g de amido foram suspensas em água na proporção 1:1,5 (amido:água, m/m) e colocadas no reator. O pH das suspensões não foi corrigido, sendo 6,0 dos amidos de mandioca, de milho normal e ceroso e de 5,9 para o amido de alta amilose. A carga de ozonização foi de 60 min. Para cada amido estudado foram efetuadas três repetições de tratamento oxidativo.

O gás produzido no ozonizador saía por um tubo de vidro, sendo encaminhado durante a estabilização inicial do sistema para o filtro destruidor de ozônio, o qual trabalha por efeito Joule (Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil), e pode ser visualizado no lado esquerdo superior da Figura 2. Uma vez estabilizado o sistema, o gás era direcionado para dentro do reator e iniciava-se a contagem do tempo de ozonização. O gás que saía do reator era capturado em armadilhas de iodeto de potássio, visando dosar o ozônio que efetivamente reagiu na suspensão de amido e o que era residual. Esta armadilha constava de dois cilindros de vidro, ligados em série. Em cada cilindro de lavagem de gás eram adicionados 200 mL de solução de iodeto de potássio a 2% (p/v). O gás entrava por um tubo a uma profundidade do reagente de 15 cm. O segundo tubo atuava capturando o ozônio residual, caso o primeiro tubo saturasse.

Para a determinação do ozônio residual nas armadilhas de iodeto de potássio utilizou-se a metodologia preconizada pela International Ozone Association, Quality Assurance Committee, Revised Standardized Procedure 001/96 (MASSCHELEIN et al., 1998). O iodo

formado nas soluções de KI nos frascos, imediatamente após a acidificação por adição de 5 mL do reagente acidificante (H_2SO_4 4,5 mol.L⁻¹), foi titulado com uma solução recentemente padronizada de tiossulfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹). Após a titulação para uma cor amarelo pálido, 0,5 mL de solução indicadora de amido foi adicionada para completar e registrar o resultado final. A concentração de ozônio em g.L⁻¹ foi igual a 24 x volume de tiossulfato em L x Normalidade do tiossulfato dividido pelo volume de entrada do gás que passou em L.

A carga total de ozônio recebida no reator durante os 60 min menos o total perdido nas armadilhas foi de 0,36 g de O₃/100g de amido, ou seja, a carga efetivamente recebida pelo amido.

O material ozonizado foi filtrado e imediatamente desidratado em estufa com circulação de ar (Marconi, MA 035, Piracicaba, Brasil), dotada do Programa Integrado Derivativo (PID), a 35 °C por 12 h. As amostras desidratadas de amido foram moídas em almofariz e passadas pela peneira de 60 *mesh* (0,250 mm).

3.2.2 Avaliação do amido de mandioca e dos amidos de milho com diversos teores de amilose, antes e após modificação por ozônio

Os amidos nativos e modificados foram caracterizados para avaliar as modificações em nível estrutural, físico-químico e funcional.

3.2.2.1 Avaliação estrutural e físico-química

3.2.2.1.1 Espectroscopia de Absorção na região do Infra Vermelho

As amostras foram analisadas por espectroscopia vibracional de FT-IR, utilizando espectrofotômetro (Spectrometer-Perkin Elmer, Spectrum One, Boston, EUA). As pastilhas com o amido (1 %) em brometo de potássio foram preparadas em prensa hidráulica (Perkin Elmer, Boston, EUA). Os espectros foram obtidos no intervalo espectral de 4000 a 400 ondas.cm⁻¹, com resolução de 4 ondas.cm⁻¹ e coletando-se 16 varreduras/amostra. O processamento dos espectros foi realizado com o auxílio do programa IRSearch Master (Biorad), efetuando a correção de linha de base, a normalização e diminuição da relação sinal/ruído.

3.2.2.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN)

Para a realização destas análises, aproximadamente 30 mg de cada amostra foram solubilizadas em DMSO- δ_6 (0,5 mL), e transferidas para tubos de RMN (5mm $\varnothing$ interno). Para amostras de amido de milho de alta amilose, a solubilização ocorreu em DMSO- δ_6 acrescido de LiBr (0,5 % p/v). Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em equipamento Bruker (DRX-400 Advance, Rheinsteten, Alemanha), operando em frequência de ressonância de 400,13 MHz de ^1H , com um tempo de relaxação de 6,50 s, coletando-se 32.000 pontos para efeitos de processamento, a 70°C. Como padrão de calibração utilizou-se o próprio DMSO- δ_6 (2,60 ppm). Os espectros foram processados utilizando-se o software Topspin[®] (versão 1.3, Bruker, Rheinsteten, Alemanha).

3.2.2.1.3 Acidez (pH) e teor de amilose

As determinações dos componentes das amostras foram efetuadas em triplicatas.

Amostras de 10 g de amido foram suspensas em 100 mL de água destilada e agitadas (agitador magnético) por 30 min para que as partículas ficassem uniformemente suspensas (ADOLF LUTZ, 2008) e o pH foi determinado em potenciômetro calibrado (Tecnal, modelo TEC-5, Piracicaba, Brasil).

O teor de amilose aparente foi determinado em amostras previamente desengorduradas conforme descrito por Franco et al. (2002b), com modificações. Amostras de 0,5 g foram dispersas em 25 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) 90%, colocadas sob agitação em banho de água fervente por 1 h e agitadas por mais 16 h à temperatura ambiente. Os amidos foram recuperados através de precipitação com aproximadamente 75 mL de etanol anidro, e posterior centrifugação a 4000.g por 10 min. Em seguida, os amidos precipitados foram filtrados a vácuo (papel de filtro Whatman nº 1) e secos em estufa com circulação de ar a 38 °C por 24 h. As afinidades por iodo (AI) dos amidos desengordurados foram determinadas usando um autotitulador potenciométrico (Metrohm, modelo 848 Tritinoplus, Herisau, Suíça). O teor de amilose aparente foi determinado pela metodologia descrita por Schoch (1964) com modificações por Kasensuwan et al. (1995).

O teor de amilose absoluta foi determinado por procedimento baseado no uso da concanavalina A, pelo Kit Amilose/Amilopectina (K-AMYL 07/11, Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Irlanda), segundo o preconizado pelo fabricante.

3.2.2.1.5 Teor de carboxilas e de carbonilas

Os teores de carbonilas foram determinados, em triplicata, pelo método descrito por Smith (1967). Foram pesados 4 g da amostra, suspensos em 100 mL de água destilada e levados ao banho fervente por 30 min ou até completar a gelatinização do amido. O material foi, então, resfriado até 40 °C e o pH acertado para 3,2 com solução de HCl 0,1 mol.L⁻¹. Foram adicionados 15 mL da solução de cloridrato de hidroxilamina (0,05 g.mL⁻¹) e a mistura foi incubada a 40 °C por 4 h. A solução foi titulada até pH de 3,2 com a solução de HCl 0,1 mol.L⁻¹. O teste em branco foi conduzido com o amido não modificado. O teor de grupos carbonilas foi calculado conforme a eq. (1).

$$\% \text{ carbonilas} = \left[\frac{(\text{branco} - \text{amostra}) \text{ mL} \cdot \text{normalidade do ácido} \cdot 0,028 \cdot 100}{\text{massa da amostra (base seca) em g}} \right] \quad (1)$$

O teor de carboxilas foi determinado pelo método modificado de Chattopadhyay, Singhal e Kulkarni (1997), em triplicata. Amido (2 g) foi misturado com 25 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹ e a suspensão agitada continuamente por 30 min com agitador magnético. A suspensão foi filtrada (vácuo) em funil de vidro (150 mL) com placa porosa nº 3 (porosidade de 16 a 40 micra) e o amido foi lavado com 400 mL de água destilada. O amido foi, então, cuidadosamente transferido para béquer de 500 mL e o volume ajustado para 300 mL com água destilada. Esta suspensão foi aquecida em banho de água fervente, sob agitação contínua por 15 min, para assegurar completa gelatinização, resfriada a 50 °C e o volume ajustado para 450 mL com água destilada. O material foi titulado até pH 8,3 com solução padrão de NaOH 0,01 mol.L⁻¹. Um teste de branco foi conduzido com amido não modificado. O teor de grupos carboxilas foi calculado conforme as eq. (2) e (3).

$$\text{Miliequivalentes acidez/100g amido} = \frac{[(\text{amostra} - \text{branco}) \text{ mL} \cdot \text{normalidade NaOH} \times 100]}{\text{massa da amostra (base seca) em g}} \quad (2)$$

$$\% \text{ carboxilas} = (\text{miliequivalentes de acidez} / 100 \text{ g amido}) \cdot 0,045 \quad (3)$$

Em ambas as análises a titulação foi realizada utilizando-se o autotitador potenciométrico (Metrohm, 848 Tritino plus, Herisau, Suíça). Estas determinações foram efetuadas em triplicatas.

3.2.2.1.6 Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina

Os amidos nativos e oxidados foram inicialmente desengordurados segundo o procedimento descrito por Jane e Chen (1992), com modificações. Amostras de 50 mg de amido foram dispersas em 5 mL de solução de DMSO 90 %. A suspensão foi mantida em banho de água fervente durante 1 h com agitação, e por mais 16 h em temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,5 mL da dispersão de amido foi misturada a 2 mL de etanol absoluto e o amido precipitado foi recuperado por centrifugação a 12000.g por 10 min. As amostras desengorduradas foram desramificadas seguindo o procedimento descrito por Wang e Jane (1995). À 5 mg de amido desengordurado foram adicionados 1,8 mL de água ultra pura (18 mΩ.cm) e as amostras foram mantidas em banho de água fervente por 30 min sob agitação. Após resfriamento, 0,2 mL de tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹ de pH 3,5, 4 µL de solução azida 10 % (m/v) e 3 µL de isoamilase (Megazyme, 3U), foram adicionados e a suspensão foi incubada a 40 °C por 16 h sob agitação de 100 rpm. Após este período, o pH foi ajustado para 6,5-7,0 com NaOH 1 mol.L⁻¹ e a suspensão colocada em banho de água fervente por 15 min para inativação da enzima. Após atingirem a temperatura ambiente as amostras foram filtradas em membranas de teflon de 0,22 µm.

A distribuição do comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina foi analisada usando o sistema cromatográfico de troca aniônica com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD, Dionex Corporation, ICS 3000, Sunnyvale, EUA) equipado com amostrador automático AS40.

Alíquotas de 20 µL das amostras preparadas e filtradas previamente foram automaticamente injetadas no sistema HPAEC-PAD constituído por uma coluna de troca aniônica Carbopac PA-200 (250x3 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-200. A forma de onda empregada foi a *standard quadruple* com os seguintes potenciais de pulso e durações: E1 = 0,10 V (t₁=0,40 s); E2 = -2,00 V (t₂= 00,02 s); E3 = 0,60 V (t₃=0,01 s); E4 = -0,10 V (t₄= 0,06 s). Os parâmetros da fase móvel utilizada para a separação foram constituídos pelo eluente A (200 mmol.L⁻¹ de NaOH) e eluente B (1 mol.L⁻¹ de acetato de sódio e 100 mmol.L⁻¹ de NaOH), com fluxo de 0,5 mL/min e temperatura de 35°C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura 18 (mΩ.cm) e degaseificados com N₂. O gradiente ótimo foi: 0 - 10 min, gradiente linear de 0 a 70 mmol.L⁻¹ de acetato de sódio; 10 - 80 min, gradiente linear terminando com 350 mmol.L⁻¹ de acetato de sódio. 80 a 110 min a concentração de 350 mmol.L⁻¹ de acetato foi mantida. A concentração de hidróxido de

sódio foi mantida constante em 100 mmol.L^{-1} durante toda a corrida. Uma mistura de maltodextrinas (grau de polimerização 1-7) foi usada para identificação da série homóloga de comprimento de cadeia. Os dados coletados foram analisados utilizando-se o software Chromeleon, Versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

3.2.2.1.7 Cromatografia de permeação em gel

Os perfis de distribuição da massa molecular das amostras dos amidos foram determinados por cromatografia de permeação em gel, utilizando-se coluna GE XK 26/70 (2,6 cm diâmetro e 70 cm altura), empacotada com gel Sepharose CL-2B. As amostras foram preparadas seguindo a metodologia de Song e Jane (2000). Alíquota de 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) 90 % foi adicionada a 0,1 g de amido. A mistura foi aquecida em banho de água fervente por 1 h, permanecendo por 24 h a 25°C sob agitação constante. Alíquota de 3 mL (30 mg de amido) foi misturada com 10 mL etanol absoluto para precipitar o amido, com posterior centrifugação por 30 min a 3000.g. O amido precipitado foi redissolvido com 9 mL de água destilada quente. A mistura foi colocada em banho fervente por 30 min. Uma alíquota de 4 mL foi aplicada na base da coluna e eluída de modo ascendente. Uma solução contendo 25 mmol.L^{-1} de NaCl e 1 mmol.L^{-1} de NaOH foi usada como eluente numa taxa de 60 mL.h^{-1} . Frações de 4 mL foram coletadas (Gilson, modelo FC203B, Middleton, Inglaterra) e analisadas quanto ao teor de carboidratos totais a 490 nm pela metodologia de fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e *blue value* a 630 nm (JULIANO, 1971).

3.2.2.1.8 Difração de raios X e cristalinidade

As amostras dos amidos foram equilibradas em dessecador contendo solução de BaCl_2 saturada (25°C , $a_w = 0,9$) durante 10 dias. As amostras foram submetidas a um difrator de raios X (Shimadzu, XRD 7000, Tokio, Japão) com radiação de cobre, utilizando-se velocidade de varredura de $2^{\circ} \cdot \text{min}^{-1}$, sob ângulo 2θ variando de 4 a 50° , com voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. Os perfis de difração dos raios X foram classificados de acordo com os padrões de Zobel (1964).

A cristalinidade relativa foi quantitativamente calculada baseando-se na relação entre a área dos picos e área total dos difratogramas, conforme método descrito por Nara e Komiya (1983), utilizando o software *Origin*, versão 7.5 (Microcal Inc., Northampton, EUA). Os

gráficos foram plotados entre os ângulos 2θ de 3 a 30° e suavizados com a ferramenta *Adjacent Averaging*.

3.2.2.1.9 Calorimetria diferencial de varredura

As propriedades térmicas dos amidos foram avaliadas em triplicata, utilizando o calorímetro diferencial de varredura (Perkin Elmer, modelo Pyris 1, Boston, EUA). O amido foi pesado (2 mg) em recipientes de alumínio para amostras voláteis (Perkin Elmer, modelo 0219-0062, Boston, EUA) e adicionado de água deionizada utilizando uma microseringa na proporção amido: água de 1:3. Os recipientes foram selados na prensa universal (Perkin Elmer, modelo B013-9005, Boston, EUA) e equilibrados a temperatura ambiente por 2 h antes da análise. O equipamento foi calibrado com índio. A varredura foi realizada a uma taxa de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ entre 30 e 130°C . Um recipiente de alumínio vazio foi utilizado como referência. Com base no termograma, foram obtidos os seguintes valores de gelatinização: temperatura de início (T_i), temperatura de pico (T_p), temperatura final (T_f), faixa de temperatura ($\Delta T = T_f - T_i$) e variação de entalpia (ΔH).

Cada recipiente de alumínio analisado quanto à gelatinização foi, então, armazenado durante 11 dias em câmara fria a 4°C e avaliado quanto às propriedades térmicas de retrogradação, utilizando o mesmo equipamento e condições de trabalho. Com base no termograma foram obtidas as temperaturas de transição (inicial, de pico e final) e a variação de entalpia. A taxa de retrogradação foi calculada pela razão entre a variação de entalpia de gelatinização e aquela de retrogradação.

3.2.2.1.10 Fator de inchamento dos grânulos

O fator de inchamento dos grânulos de amido foi avaliado de acordo com o método direto proposto por Tester e Morrison (1990), com modificações. A expansão dos grânulos e água intra-granular absorvida foram avaliadas na temperatura de 95°C , em triplicata. Amostras de amido ($200\text{ mg} \pm 0,1$) foram pesadas em tubos de centrífuga (15 mL) e 5 mL de água foram adicionados. Os tubos foram tampados e colocados em banho *Dubnoff* na temperatura de 95°C , sob agitação constante, por 30 min. A seguir os tubos foram rapidamente resfriados a 20°C e 0,5 mL de dextrana azul (5 mg.mL^{-1}) foi adicionado. Os tubos foram agitados brandamente sendo invertidos por 5 vezes. Os tubos foram, então, centrifugados a $1500.g$ por 5 min e a absorbância do sobrenadante foi medida a 620 nm em espectrofotômetro. A absorbância do tubo de referência no qual não havia amido, também foi

medida.

O fator de inchamento (FI) foi obtido com base na massa do amido corrigido para base seca, assumindo como densidade do amido o valor de $1,4 \text{ g.mL}^{-1}$, conforme as eq. (4), (5), (6), (7) e (8).

$$A_I (\text{mL}) = 5,5 (A_r/A_s) - 0,5 \quad (4)$$

$$V_1(\text{mL}) = M (\text{mg}) / 1,4 \quad (5)$$

$$V_2 (\text{mL}) = 5,0 - A_I \quad (6)$$

$$V_3 (\text{mL}) = V_1 + V_2 \quad (7)$$

$$FI = V_3 / V_1 \quad (8)$$

Sendo:

M - massa de amostra (em miligramas)

A_I = água livre ou água intersticial + sobrenadante

V_1 = volume inicial do amido em mililitros

V_2 = volume de água intra-granular absorvida

V_3 = volume de inchamento dos grânulos

A_s - absorbância do sobrenadante

A_r - absorbância do tubo de referência

3.2.2.2 Avaliação funcional

3.2.2.2.1 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta dos amidos foram avaliadas em Rápido Viscoanalisador (RVA- Super 4, Newport Scientific, Austrália) utilizando-se o software Thermocline for Windows (versão 3.0, Newport Scientific, Warriewood, Austrália), em duplicata. A análise foi conduzida na programação *Standard Analysis 2*, utilizando-se 3 g de amostra em 25 g de água. A correção no peso da amostra e da água para se obter os 14 % de umidade foi fornecida pelo *software*.

A partir dos gráficos plotados pelo programa, os parâmetros avaliados foram: temperatura de pasta, viscosidade máxima, tempo de viscosidade máxima, quebra de

viscosidade, viscosidade final e tendência à retrogradação ou *setback*. As unidades de viscosidade geradas pelo equipamento estão em RVU (*Rapid Visco Units*).

3.2.2.2.2 Índice de absorção (IAA) e de Solubilidade em água (ISA)

Os índices de absorção de água (IAA) e de solubilidade em água (ISA) foram determinados segundo Linko et al. (1980). Em um tubo de centrífuga, de peso conhecido, foram colocados 2,5 g de amostra e 30 mL de água. Os tubos foram agitados por 30 min em agitador mecânico a 30 °C e, em seguida, centrifugados a 3000 rpm por 15 min. Do líquido sobrenadante, foram transferidos 10 mL para cadinho de porcelana e levados para estufa a 105°C. O cálculo foi feito de acordo com as eq. (9) e (10). Esta determinação foi realizada em triplicata.

$$IAA = \frac{PRC}{(PA - PRE)} \quad (9)$$

$$\% ISA = \frac{PRE}{PA} \cdot 100 \quad (10)$$

Sendo:

PRC= massa do resíduo de centrifugação (g)

PA= massa da amostra (g) (base seca)

PRE= massa do resíduo de evaporação (g).

3.2.2.2.3 Claridade das pastas

A claridade de pasta dos amidos foi determinada pelas medidas dos valores de transmitância (% T) de suspensões aquosas de amido a 1 % após a gelatinização das mesmas, conforme Craig et al. (1989) modificado por Aplevicz e Demiate (2007).

Foram realizadas triplicatas de suspensões de 0,2 g de amostra em 20 mL de água destilada em tubos de ensaio com tampa rosqueável. Os tubos foram levados ao banho com aquecimento até ebulição em banho térmico (Marconi, modelo MA 092, Piracicaba, Brasil) por 30 min e agitados individualmente (5 vezes) a cada 5 min. Após o aquecimento, os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente por 24 h e após esse período, foram realizadas as leituras das amostras em espectrômetro de feixe simples (Femto, modelo 600S, São Paulo, Brasil), com comprimento de onda de 650 nm. Esta determinação foi realizada em triplicata.

3.2.2.2.4 Capacidade de expansão da massa de amido durante o forneamento

Para a obtenção das massas visando avaliar a propriedade de expansão, 12 g de amido foram parcialmente gelatinizados em béquer de vidro pela adição de água destilada fervente, na quantidade requerida pela amostra (10-12 mL), ou seja, até se obter plasticidade macia e moldável. Esta plasticidade é obtida pela homogeneização da massa utilizando-se bastão de vidro, agregando os componentes da fórmula de modo que esta se desprenda totalmente do béquer e fique aderente ao bastão de mistura. Esta massa foi dividida em três porções iguais, boleadas e levadas a forno elétrico (Perfecta, VIPAO Coral 4, Curitiba, Brasil), pré-aquecido a 200 °C e assadas por 25 min. Após resfriarem, as esferas expandidas foram pesadas, impermeabilizadas pela imersão das mesmas em parafina fundida e colocadas para secar por 15 min. Os volumes dessas esferas foram medidos pelo deslocamento de água em proveta graduada. O resultado da expansão foi expresso em volume específico, em mL.g⁻¹ (DEMIATE et al., 2000). A capacidade de expansão das massas foi avaliada em duplicata.

3.2.2.3 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos para as análises dos amidos de milho e mandioca foram analisados estatisticamente pela ANOVA (análise de variância) e também a diferença entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey foram avaliados utilizando-se o software SAS (versão 9.2, Johannesburg, África do Sul). Os níveis descritivos dos testes foram determinados pelo mesmo software. A correlação de Pearson e também a análise de regressão linear múltipla (método *stepwise*) para os parâmetros que explicam a capacidade de expansão no forno também foram avaliados pelo SAS.

Para o conjunto dos espectros de FT-IR foi realizada a análise dos componentes principais das amostras com o auxílio do programa The Unscramble[®] (versão 9.1, Oslo, Noruega) aplicando-se a janela espectral de 400-1800 ondas.cm⁻¹.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físico-químicas, estruturais e funcionais dos amidos foram avaliadas antes e após o tratamento dos diferentes amidos com o ozônio.

4.1 ^1H -RMN das amostras de amidos

Similaridades de perfis espectrais de ^1H -RMN foram observadas entre as amostras em estudo. Foram encontrados 8 a 9 sinais de maior intensidade e 4 de menor intensidade (Figuras 3, 4, 5 e 6).

Figura 3 - Espectros de ^1H -RMN referentes aos amidos de milho de alta amilose oxidado (A) e não oxidado (B)

Figura 4 – Espectros de ^1H -RMN referentes aos amidos de milho ceroso oxidado (A) e não oxidado (B)

Figura 5 – Espectros de ^1H -RMN referentes aos amidos de milho normal oxidado (A) e não oxidado (B)

Figura 6 – Espectros de ^1H -RMN referentes aos amidos de mandioca (A) e amido de mandioca oxidado (B)

De um modo geral, nas amostras de amido de milho oxidadas, observou-se um perfil semelhante na região de hidrogênios anoméricos (5,20-5,30 ppm). Os prótons referentes às unidades de α -D-glucose foram observados em todos os espectros entre 3,00 e 5,50 ppm. Através das ressonâncias na região de hidrogênios anoméricos, estabeleceu-se os sinais em 5,27 e 5,19 ppm para H1 de glucose. Estes sinais indicam a ligação glicosídica α -(1 $\rightarrow$ 4) (amilose e amilopectina) e α -(1 $\rightarrow$ 6) (amilopectina) (JODELET et al., 1998; TIZZOTTI et al., 2011). Ainda, o sinal em 4,41 ppm refere-se aos hidrogênios pertinentes ao grupo OH das

unidades de glucose (KAJIWARA; MIYAMOTO, 1998). O conjunto de sinais observados entre 3,68-3,76 ppm refere-se aos H3, H5 e H6 das unidades de glucose e os sinais entre 3,47-3,42 ppm referem-se aos H2 e H4 destas unidades. A intensidade do sinal 3,47 ppm pode ser atribuída à ressonância de H4 livre e o sinal em 3,42 ppm a H4 ligados (TIZZOTTI et al., 2011). Cabe assinalar que não foi detectado sinal característico de próton para carboxilas.

Para as amostras de amido de mandioca não oxidado e amido de mandioca oxidado foram observadas diferenças na região de hidrogênios anoméricos, principalmente em 5,23 ppm e também na região de 3,50-3,45 ppm. Estas diferenças, no entanto, não foram suficientes para caracterizar uma mudança na estrutura do amido oxidado em relação ao normal. Em um trabalho semelhante realizado por Sandhu, Manthey e Simsek (2012), amido de trigo foi oxidado pela exposição a 1500 mg de ozônio por quilo de amido, a uma taxa de 2,5 L.min⁻¹ e este tratamento levou à despolimerização e formação de grupos carboxílicos quando analisados por ¹H-RMN. Os autores observaram a formação de grupos ceto [(1→4)-3 ceto] em H₂ e ácido glucurônico no H1 do C₁.

4.2 Espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à região do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas. O segmento da janela espectral de utilidade para a análise de compostos orgânicos situa-se entre 4000 e 400 cm⁻¹, sendo que as regiões do infravermelho próximo (14290 – 4000 cm⁻¹) e do infravermelho distante (700 – 200 cm⁻¹) também têm atraído a atenção (SILVERSTEIN et al., 2006).

A análise dos espectros de FT-IR das diversas amostras de amidos de milho e de mandioca e dos seus pares modificados por oxidação, revelou a existência de semelhança entre os espectros, com pequenas modificações da intensidade em algumas bandas (Figura 7).

Figura 7 – Espectros de FT-IR dos amidos de milho de alta amilose-AA, alta amilose oxidado-AAO (A), milho ceroso-C, ceroso oxidado-CO (B), milho normal-N, normal oxidado-NO (C), de mandioca-MA e mandioca oxidado-MAO (D), na região espectral de 400 a 4000 cm^{-1} . Do lado direito, ampliação da faixa espectral de 800 a 1500 cm^{-1}

O espectro é típico de um polissacarídeo, visto que ocorrem picos atribuídos ao anel de glucopiranoose na região de $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, além de outros picos característicos como 1645 cm^{-1} , mostrando a presença grupamentos carboxílicos em amidos (DEMIATE et al., 2000; DELVAL et al., 2004). O pico em 2925 cm^{-1} mostra o alongamento da ligação do hidrogênio de C-H. A banda larga em 3395 cm^{-1} está relacionada à presença de ligações hidrogênio de grupos -OH . Outras características que podem diferenciar os espectros entre si são observáveis entre as bandas de $900\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$. Diferenças nestas intensidades entre os espectros das amostras C e CO foram maiores que as dos pares A/AAO e N/NO. As amostras de amido MA/MAO mostraram diferenças na intensidade e no deslocamento em relação uma à outra na banda de 1220 cm^{-1} , o que poderia indicar uma alteração das ligações C-OH. Tal deslocamento ocorreu em todas as amostras submetidas ao tratamento de oxidação, o que sugere indícios de que o tratamento promoveu uma alteração na estrutura química das moléculas. A diminuição da intensidade relativa em 1158 cm^{-1} para algumas amostras não levou às alterações na característica ou na intensidade da banda na região de 2800 cm^{-1} , cuja região é caracterizada por grupos CH em ligações glicérficas. Da mesma forma, as ligações O-H observáveis na região de 3368 cm^{-1} apresentaram pouco deslocamento para transmitância mais elevada no par de amostras N/NO e diminuída na amostra AA. O espectro de FT-IR infere que houve alguma mudança em nível molecular, mesmo que em pequena intensidade, porém não é possível afirmar a localização ou o nível de modificação. Tal afirmação leva em conta o fato de que nos espectros de FT-IR um aumento nos valores de transmitância reflete a posição e a intensidade das bandas relativas aos grupamentos funcionais de uma determinada classe de compostos, permitindo a sua identificação e a análise comparativa de amostras (CERNÁ et al., 2003). As principais bandas de IR e suas designações são resumidas na Tabela 1.

A oxidação conduz à modificação de grupos hidroxila em grupos carbonila e carboxila nas moléculas de amido. A introdução de grupos carbonila pode ser confirmada por espectroscopia FTIR. Zhang et al. (2012) observaram uma banda na região de $1735,6\text{ cm}^{-1}$, que foi associada à formação de grupos carbonila e/ou carboxila. Entretanto, nos espectros dos amidos oxidados no presente trabalho, não foi possível identificar banda característica de carbonila (-C=O) dos grupos aldeídos e/ou carboxilas. O estudo de Demiate et al. (2000) constatou que as regiões espectrais de 1600 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} mostraram-se importantes para a predição da propriedade de expansão no forno. A de 1600 cm^{-1} se correlacionou positivamente com esta propriedade, enquanto que a de 1060 cm^{-1} foi associada a informações estruturais das amostras que não expandiram.

Tabela 1 - Sinais espectrais de FT-IR das amostras de amidos submetidos à modificação química

Sinal (cm^{-1})	Grupo funcional
3395	Deformação angular de grupos OH
2925	Deformação axial e angular do grupo metil ($-\text{CH}_3$) e/ou metileno (CH_2)
1645	Deformação axial do grupo OH (água)
1421	Deformação angular do grupo OH de ácidos carboxílicos ou de C-H
1370	Deformação angular do grupo C-H
1240	Deformação da ligação C-OH
1158	Deformação axial da ligação C-O, C-C, C-O-C (ligação glicosídica)
1082	Deformação axial da ligação C-O, C-C, C-O-C (ligação glicosídica)
1017	Deformação axial do grupo C-O e deformação angular do grupo C-OH
930	Deformação da ligação C-H (carbono anomérico α da D-glucose)
860	Deformação da ligação C-H (carbono anomérico α da D-glucose)
765	Vibração simétrica do anel dos açúcares
611	NI*
576	NI
529	NI
441	NI

* Não Identificado

Adaptado de Kuhnien (2007).

Os espectros dos amidos de mandioca não mostraram uma modificação significativa na estrutura em nível molecular que permita uma diferenciação dos demais. Tanto o espectro do amido nativo, como o submetido ao processo de oxidação, mostrou bandas na região $2900\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ (estiramento de CH), em 1158, 1124 e 1103 cm^{-1} (estiramentos das ligações de C-O, C-C e algumas contribuições C-OH), em 1082, 1051, 1021, 994 e 928 cm^{-1} (deformação angular de C-OH e C-CH₂) e em 859 cm^{-1} (estiramento de C-O-C e deformação de CH) (CAEL; KOENIG; BLACKWELL, 1973; CAEL; KOENIG; BLACKWELL, 1975).

Em processos de análise comparativa de amostras de matrizes complexas, discrepâncias mínimas nos perfis espectrais poderão ser significativas na discriminação dos materiais de interesse. Portanto, a análise do conjunto de perfis espectrais requer estratégias que permitam maximizar a extração de informações a partir dos dados coletados (espectros de FT-IR), não implicando, obviamente, no uso de técnicas de grande demanda de tempo e/ou

custos (KUHNEN, 2007). Aplicando a ferramenta de estatística de análise multivariada dos dados, através da determinação dos componentes principais (PCA) do conjunto de dados espectrais, foi possível inferir algumas características comuns às amostras estudadas. Numa primeira análise, utilizando a janela espectral de 400-1800 cm^{-1} obtida para os amidos de milho e de mandioca, determinaram-se os gráficos de distribuição e de contribuição fatorial (Figura 8).

Figura 8 – Distribuição fatorial (PCA) de PC1 e PC2 (A) e Contribuição fatorial (B) calculadas a partir dos dados espectrais de FT-IR das amostras amidos de milho de alta amilose (AA), alta amilose oxidado (AAO), milho ceroso (C), ceroso oxidado (CO), milho normal (N), normal oxidado (NO), mandioca (MA) e mandioca oxidado (MAO)

A análise dos escores (Figura 8A) explica 97% da distribuição das amostras. Como é observado, ocorreu a separação das amostras das diferentes fontes de amidos. As amostras AA e AAO situaram-se em PC1-/PC2-, indicando que quimicamente são semelhantes, inclusive foram as mais próximas entre si. Da mesma forma, N e NO, que se posicionaram em PC1+/PC2+ apresentaram comportamento químico similar. O comportamento observado nos pares C e CO diz respeito à localização em quadrantes diferentes, concomitante com as diferentes distâncias da origem. Devido ao comportamento diferenciado, observado pelos espectros de FTIR e pelo gráfico de distribuição fatorial, pode-se inferir que os amidos de alta amilose (AA) se mostraram mais resistentes ao processo oxidativo, pois apresentam maior proximidade entre a amostra natural e oxidada.

Quando analisado o gráfico de contribuição fatorial (Figura 8B) observa-se que as bandas relevantes na distribuição das amostras foram as 1174, 1154, 1113, 1063, 975 e 461 cm^{-1} no quadrante positivo. Estas bandas são principalmente relacionadas à região de impressão digital de carboidratos (900-1200 cm^{-1}). Nas condições do estudo, os resultados desta análise conjuntamente com as diferenças estruturais se mostraram mais relevantes para fontes de amido que para o efeito do processo oxidativo pelo ozônio. A fonte que se mostrou mais suscetível à ozonização, de acordo com a presente análise, foi a do amido de milho ceroso.

4.3 Teor de carbonilas e de carboxilas

De acordo com Wurzburg (1986), a oxidação do amido por halogênios em meios aquosos, pode acontecer de modos diferentes, podendo haver a) oxidação dos grupos aldeídicos dos terminais redutores da amilose e da amilopectina para grupos carboxílicos, b) oxidação das hidroxilas primárias no C6 formando unidades de ácidos urônicos, c) oxidações das hidroxilas secundárias nos C2 e C3 e C4, para grupos cetônicos e d) oxidação do grupo glicol para grupamentos aldeídicos e então carboxílicos. As reações que ocorrem nos grupos redutores, no caso do C1 e não redutores, no C4, provavelmente influenciam menos as propriedades do amido, considerando que são poucas as hidroxilas nestes carbonos se comparado com o número destas nos C2, C3 e C6. É lógico assumir que as oxidações que ocorrem nas hidroxilas destas unidades de carbono provavelmente desempenhem papéis mais determinantes nas propriedades do amido.

No caso do ozônio em solução aquosa a oxidação pode causar a degradação de carboidratos, gerando ácidos orgânicos (WANG; HOLLINSWORTH; KASPER, 1999 e Von

GUNTEN, 2003). Este gás, segundo Hoigné e Bader (1976), pode se decompor em água antes de reagir com o substrato. A decomposição gera espécies mais reativas, que determinarão as reações de oxidação subsequentes. Essas espécies podem ser a hidroxila, um radical superperóxido ou o peróxido de hidrogênio, conforme o pH do meio.

Os teores de carbonilas e carboxilas dos amidos são mostrados na Tabela 2. Após oxidação, o teor de carbonilas passou a variar entre 0,000 e 0,108 % e o de carboxilas entre 0,044 e 0,065 %. Considerando-se estes teores, pode-se caracterizar o tratamento efetuado neste experimento como brando, tendo em vista a afirmação de Wurzburg (1986) de que o teor de carboxilas para a maioria dos amidos comerciais oxidados pelo hipoclorito pode atingir até 1,1 %.

Tabela 2 - Teores (médias $\pm$ desvio padrão) de carbonilas e de carboxilas dos amidos de milho com diferentes teores de amilose e de mandioca, submetidos ao tratamento com ozônio

		Carbonilas (%)	Carboxilas (%)
Milho de alta amilose	Oxidado	0,108 $\pm$ 0,002 a	0,044 $\pm$ 0,0009 d
Milho ceroso	Oxidado	0,000 $\pm$ 0,000 d	0,062 $\pm$ 0,0004 b
Milho normal	Oxidado	0,031 $\pm$ 0,002 c	0,065 $\pm$ 0,0007 a
Mandioca	Oxidado	0,064 $\pm$ 0,002 b	0,058 $\pm$ 0,0005 c

* Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem entre si significativamente, em nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey

No presente estudo foi observada maior produção de carbonilas que de carboxilas no amido de alta amilose, indicativos de um processo oxidativo menos intenso.

No processo oxidativo do amido, de acordo com Wurzburg (1986), ocorre a formação primária dos grupos carbonilas e, posteriormente, estes se transformam em carboxilas. Estudos, como o de Kuakpetoon e Wang (2006), propuseram que no caminho das reações consecutivas os grupos hidroxilas das moléculas de amido são primeiramente oxidados a grupos carbonilas e, em seguida, para grupos carboxilas. No entanto, dependendo do tipo de oxidante usado e das condições de reação, podem existir caminhos de reações paralelas, nos quais os grupos carbonilas ou carboxilas são seletivamente formados pela oxidação dos grupos hidroxilas em certas posições no anel glicosídico (BRAGD; BESEMER; Van BEKKUM, 2000). Sangseethong, Termvejsayanon e Sriroth (2010) sugerem que o padrão de formação do grupo funcional em função do tempo de oxidação com hipoclorito ocorre por reações consecutivas, com os grupos carbonilas sendo os intermediários, e, posteriormente,

sendo oxidados a carboxílicos. Os passos iniciais antes de formarem os grupos carbonilas podem, provavelmente, serem os limitantes desta taxa. No entanto, uma vez que os grupos carbonilas são formados, rapidamente são convertidos em carboxilas. Em contraste, o mecanismo de oxidação pelo peróxido de hidrogênio produz primariamente carbonilas e um pequeno teor de carboxilas. Esta reação é muito rápida e todo o reagente é logo consumido para a captação de hidrogênio e muito pouco oxidante fica disponível para transformar carbonilas a carboxilas.

O percentual de variação de carbonilas e carboxilas com a oxidação por ozônio variou com a fonte de amido utilizada, em função das características que cada uma apresenta. Chan, Bhat e Karim (2009), por exemplo, citam que a presença de poros naturais em amido de milho pode elevar a possibilidade de oxidação uma vez que isto facilita a difusão do gás no interior dos grânulos. No presente estudo este amido foi o que apresentou teor mais elevado de carboxilas.

Fatores externos também afetam a formação destes grupamentos, como a taxa e tempo de exposição ao ozônio (CHAN; BHAT; KARIM, 2009; OLADEBEYE et al., 2013; DING et al., 2015). Após 10 min de oxidação de amidos utilizando tempos de geração de ozônio de 1 a 10 min Chan, Bhat e Karim (2009) constataram 0,250 e 0,061 % de carbonilas, respectivamente para mandioca e milho, e de 0,058 e 0,063 % de carboxilas, respectivamente, para mandioca e milho. Os teores de carbonilas foram superiores aos encontrados no presente estudo para os amidos de mandioca e milho normal e os de carboxilas foram semelhantes para ambos os amidos. Em estudo posterior, Chan et al. (2011) encontraram teores de carbonilas inferiores aos de carboxilas para amido de mandioca oxidado por ozônio (a seco) por 10 min. No estudo desses autores, sob tempos de geração de ozônio de 1 a 10 min, os teores variaram de 0,03 a 0,13 % e de 0,14 a 0,28 %, respectivamente, para carbonilas e carboxilas. Ou seja, o teor de carbonilas do presente estudo se situou dentro da faixa citada por estes autores, mas o de carboxilas foi inferior.

No estudo de Chan, Bhat e Karim (2009), comportamento semelhante ao do presente estudo foi observado após oxidarem (a seco) os amidos de mandioca e de milho regular, sendo que o primeiro apresentou maior formação de carbonilas e o segundo de carboxilas, atribuído às diferenças na morfologia e estrutura granular e ainda à presença de poros naturais no amido de milho.

Após a ozonização, o amido de milho de alta amilose apresentou o teor mais elevado de carbonilas e o menor de carboxilas. Pelo PCA (Figura 8A) estas amostras evidenciam menor oxidação, pela proximidade que apresentam. Em contraste, os amidos de milho ceroso

e regular oxidados apresentaram os menores de carbonilas e os mais elevados de carboxilas. Pela análise quimiométrica dos espectros por IFTR, o amido de milho ceroso oxidado foi o que apresentou maior distinção de seu par não oxidado, embora não seja apenas o teor de carboxilas a interferir na separação das amostras.

Teores de carboxilas inferiores para o amido de milho de alta amilose oxidado e superiores para os amidos de milho normal e ceroso foram observados por Kuakpetoon e Wang (2008). No estudo destes autores os amidos oxidados por hipoclorito apresentaram teores que decresceram com a elevação do teor de amilose para os amidos de milho ceroso, normal e alta amilose 70%. A oxidação naquele estudo pareceu produzir furos em alguns grânulos de amido de milho ceroso e comum, presumivelmente como resultado da oxidação extensiva. Também demonstraram que a localização da oxidação e as propriedades físico-químicas dos amidos oxidados são afetadas pelo arranjo molecular no interior dos grânulos.

Sandhu et al. (2008) compararam o amido de milho normal com o ceroso oxidados por hipoclorito de sódio e observaram que o amido de milho normal oxidado apresentou maior teor de carboxilas que o ceroso, contudo o teor de carbonilas foi semelhante. No presente estudo, embora o comportamento tenha sido semelhante para o teor de carboxilas, o resultado para carbonilas foi distinto.

Embora se considere que a amilose seja mais suscetível à oxidação, porque esta ocorre principalmente na lamela amorfa (FARLEY; HYXON, 1942; KUAKPETOON; WANG, 2001; WANG; WANG, 2003), no caso do amido de milho ceroso, que praticamente não apresenta esta macromolécula, o teor de carboxilas apresentado após processo de ozonização aconteceu pela oxidação da fração amilopectina. A exemplo do presente estudo, no estudo de Wang e Wang (2003) ocorreu maior teor de carboxilas no amido de milho normal oxidado que no ceroso oxidado. Esta maior suscetibilidade à oxidação, segundo aqueles autores, decorre do teor diferenciado de amilose, uma vez que ambos apresentam padrão cristalográfico A, tamanho e formato de grânulos semelhantes. Entretanto, de acordo com Kuakpetoon e Wang (2006) a formação de carboxilas ocorre mais próxima aos pontos de ramificação das cadeias A e B1 da amilopectina. Como a amilopectina apresenta elevado número de pontos de ramificação tem, conseqüentemente, mais sítios disponíveis para a formação de carboxilas.

Kuakpetoon e Wang (2008) oxidaram diversos amidos e em seguida gelatinizaram os grânulos superficialmente por diferentes tempos e as camadas gelatinizadas foram separadas dos grânulos, sendo o amido granular remanescente avaliado. Os amidos oxidados necessitaram menor tempo de reação que os não oxidados para alcançar um mesmo grau de

gelatinização superficial. A oxidação ocorreu principalmente na lamela amorfa, entretanto, grupos carboxilas foram encontrados nas diferentes camadas dos grânulos, decrescendo da superfície para o centro, uma vez que existem diferenças nos teores de amilose e amilopectina ao longo do eixo radial dos grânulos.

4.4 Teor de amilose

É importante conhecer a composição macromolecular do amido, bem como a organização física das macromoléculas dentro da estrutura granular, uma vez que estão ligados à funcionalidade do carboidrato (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006). A determinação do teor de amilose, entretanto, é bastante complexa. Nas metodologias de amilose aparente por coloração com iodo, as cadeias muito longas de amilopectina podem formar complexos com o iodo também, se colorindo de azul, podendo superestimar o teor de amilose (JANE et al., 1999) em alguns casos. Para se determinar a amilose absoluta foi utilizada metodologia que se baseia na ação da concanavalina (Kit Megazyme), a qual se complexa com polímeros ramificados (GIBSON; SOLAH; MCCLEARY, 1997), não havendo interferência das cadeias de amilopectina e nem dos possíveis fragmentos que podem estar presentes no meio analisado.

Os teores obtidos para amilose no amido das variedades de milho e de mandioca, antes e após oxidação com ozônio são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Teores (médias $\pm$ desvio padrão) de amilose absoluta e aparente do amido de milho de diferentes teores de amilose e de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

Amilose (%)			
		aparente	absoluta
Milho alta amilose	Não oxidado	62,53 $\pm$ 0,35 b	60,70 $\pm$ 0,30 b
	Oxidado	65,50 $\pm$ 0,31 a	63,02 $\pm$ 0,31 a
Milho ceroso	Não oxidado	4,11 $\pm$ 0,05 f	3,19 $\pm$ 0,16 e
	Oxidado	4,30 $\pm$ 0,09 f	4,13 $\pm$ 0,14 e
Milho normal	Não oxidado	24,28 $\pm$ 0,20 d	22,55 $\pm$ 0,20 c
	Oxidado	25,92 $\pm$ 0,48 c	23,36 $\pm$ 0,16 c
Mandioca	Não oxidado	19,16 $\pm$ 0,04 e	18,44 $\pm$ 0,04 d
	Oxidado	19,54 $\pm$ 0,30 e	18,09 $\pm$ 0,30 d

* Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem entre si significativamente, em nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Os teores de amilose aparente foram superiores aos de amilose absoluta para a maioria dos amidos não oxidados e oxidados.

As variedades de milho normal, de alta amilose e ceroso não oxidados, apresentaram diferentes teores desta macromolécula, tanto aparente como absoluta, conforme o esperado.

Garcia e Franco (2015) constataram teor de amilose absoluta de 24,7 % para milho normal e de 1,1 % para o milho ceroso. Jane et al. (1999) relataram teores de amilose aparente entre 52 (milho de alta amilose V) e 68 % (alta amilose VII), 29,4 % (milho normal), entre 0 e 2,1 % (milhos cerosos). Estes mesmos autores observaram para teores de amilose absoluta 27 % (alta amilose V), 40 % (alta amilose VII) e 20,5 % (milho normal). O amido de mandioca nativo, com 19,2 % de amilose aparente, foi de teor semelhante ao citado para esta mesma fonte de amido, de 19,8 % (PERONI et al., 2006) e de 19,2 % (FRANCO et al., 2010). Estudo mais amplo cita para este amido faixas entre 16,7 e 21,7 % (ALVARADO et al., 2013) para diferentes genótipos deste amido. Para o teor de amilose absoluta, Hoover (2001) encontrou valores entre 18,6 e 23,6 %, em função da idade da planta de mandioca. Faixa mais ampla foi registrada por Moorthy (2002), entre 13,6 e 23,8 %, para diferentes variedades de mandioca.

Os amidos de milho ceroso e de mandioca não evidenciaram alteração do teor de amilose após o processo oxidativo, entretanto, o teor de amilose aparente e absoluta dos amidos de milho de alta amilose se elevaram na proporção de 4,8 e 3,8 %, respectivamente, e a do milho normal se elevaram em 6,8 e 3,6 %, respectivamente, embora este último aumento não tenha sido estatisticamente significativo.

A influência da oxidação sobre o teor de amilose é contraditória na literatura, variando com a fonte de amido, o agente oxidante, o tempo e o pH do tratamento. Reduções do teor de amilose são mais frequentes na literatura. Zhu e Bertoft (1997) avaliaram o teor de amilose aparente do amido de batata, que passaram de 20,6 para 6,7 % após tratamento com hipoclorito de sódio e para 8,0 %, quando com peróxido de hidrogênio. E também Sandhu et al. (2008), ao oxidar amido de milho normal com hipoclorito, evidenciaram redução significativa da amilose aparente, justificando que a amilose reage prontamente com o oxidante (em baixa quantidade) e, portanto, menos hipoclorito estava disponível para oxidação da amilopectina. Os autores supõem que a estrutura linear e o arranjo aleatório da amilose tornam esta molécula mais suscetível à degradação oxidativa.

Os resultados da presente pesquisa são semelhantes aos relatados por Oladebeye et al. (2013), que observaram aumento do teor de amilose aparente ao oxidar amidos de inhame e de taro por ozônio, atribuída à despolimerização parcial da porção da lamela cristalina, que

consiste principalmente de cadeias de amilopectina. Tal despolimerização parcial da amilopectina também é citada por Kesselmans et al. (2004).

As diferenças na composição, estrutura e organização do amido ao longo do eixo radial do grânulo claramente influenciam a eficiência do processo oxidativo (KUAKPETOON; WANG, 2008). A região do grânulo composta basicamente de amilose e rodeada por amilopectina, corresponde à lamela amorfa dos anéis semi-cristalinos do amido, e é principalmente nesta região que ocorre o processo de oxidação, pela maior acessibilidade (KUAKPETOON; WANG, 2006; WANG; WANG, 2003). Segundo ZHANG et al. (2012), entretanto, a oxidação ocorre na lamela amorfa, próximo aos pontos de ramificação da cadeia de amilopectina. Após esta primeira degradação, rápida, da lamela amorfa, se ainda houver oxidante, este penetra e oxida também a lamela cristalina, mas mais lentamente (KUAKPETOON; WANG, 2006). Ainda, de acordo com estes autores, a despolimerização de amidos de milho por oxidação com hipoclorito ocorre mais no centro que na periferia do grânulo, e ainda preferencialmente na amilose, seguido das cadeias longas de amilopectina, cadeias curtas de amilopectina na lamela amorfa e, por último, das cadeias curtas da lamela cristalina.

4.5 Distribuição dos comprimentos das cadeias ramificadas da amilopectina

A distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina é uma importante ferramenta na caracterização da estrutura molecular do amido, possibilitando uma melhor compreensão da relação estrutura química e propriedades funcionais.

Os perfis de distribuição dos tamanhos das cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos nativos (não oxidados) e oxidados podem ser visualizados na Figura 9.

O processo oxidativo modificou o grau de polimerização (GP) de ocorrência dos picos (valor de GP citado acima de cada pico nos perfis apresentados na Figura 9). Após o tratamento com ozônio os cromatogramas dos amidos de milho ceroso e de mandioca foram os que mais se modificaram. No primeiro desapareceu o pico 2 do amido oxidado e no segundo o pico 2 do amido oxidado foi reduzido (de GP 44 para GP 41), demonstrando que houve quebra mais considerável das cadeias maiores de amilopectina.

Figura 9 - Perfis de distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos de milho e de mandioca, antes e após a ozonização

A modificação dos amidos de mandioca e de milho normal por ácido láctico e radiação UV não alterou a posição destes picos no estudo de Franco et al. (2010). O amido de mandioca por eles avaliado por HPAEC-ENZPAD apresentou nos picos 1 e 2 de cadeias com comprimento nos GPs 12 e 47, respectivamente, enquanto que o de milho normal mostrou esses picos em GPs 13 e 44, respectivamente.

Os amidos de milho de alta amilose e de mandioca evidenciaram distribuição com estrutura de ombro (elevação entre as faixas de GP 18-21), sendo que no amido de alta amilose este ombro ocorreu mais próximo à altura do primeiro pico. Estruturas de ombro são encontradas em grande parte dos amidos e sua intensidade é indicativa da proporção de cadeias curtas nos cristais (JANE et al., 1999). Segundo Genkina et al. (2007) as cadeias muito curtas ($GP < 10$) não são hábeis a formar duplas hélices, podendo estar nas regiões cristalinas como cadeias suspensas, produzindo defeitos na estrutura. De acordo com Hanashiro, Abe e Hizukuri (1996) e Jane et al. (1999) o GP 18-21 representa a extensão total da região cristalina e a taxa de intensidade do primeiro pico/ intensidade do ombro indica a proporção de cadeias curtas nos cristais que resultam em defeitos. No estudo Jane et al. (1999) o amido de milho normal não apresentou este ombro, mas o de mandioca (mais acentuado), milho ceroso *ae* e o de alta amilose apresentaram.

Após oxidação evidenciou-se suavização dos ombros nos amidos que apresentaram esta estrutura.

Para melhor descrever as cadeias de amilopectina quanto ao tamanho, estas foram agrupadas em categorias por unidades de glucose. Algumas divisões diferentes têm sido descritas por pesquisadores, e dependem do método aplicado na análise (PÉREZ; BERTOFT, 2010). Hanashiro, Abe e Hizukuri (1996) compararam fontes de amido descrevendo as cadeias como podendo ter GP 6-12 (denominado fa), representando as cadeias do tipo A. O grupo denominado fb1, com GP 13-24 é composto por cadeias B1, o grupo fb2 (GP 25-36) é assumido como cadeias B2 e o fb3 como cadeias de $GP \geq 37$.

As áreas relativas totais dos perfis foram usadas para calcular a percentagem de distribuição, sendo os resultados mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição (médias $\pm$ desvio padrão) dos comprimentos das cadeias ramificadas das amilopectinas presentes nos amidos com milho de diferentes teores de amilose e no amido de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

		Distribuição (%) por Grau de Polimerização (GP)					
		6-12 (A)	13-24 (B1)	25-36 (B2)	≥ 37 (B3)	GP médio*	>GP detectado
Milho alta amilose	Não oxidado	12,1 $\pm$ 0,67 c	43,1 $\pm$ 1,63 bc	19,1 $\pm$ 0,86 a	22,6 $\pm$ 0,79 a	26,5 $\pm$ 0,28 a	90 a
	Oxidado	15,2 $\pm$ 0,51 c	44,1 $\pm$ 0,16 c	18,4 $\pm$ 0,14 a	22,3 $\pm$ 0,21 a	26,7 $\pm$ 0,20 a	90 a
Milho ceroso	Não oxidado	26,4 $\pm$ 3,18 b	45,1 $\pm$ 2,47 b	14,0 $\pm$ 0,9 bc	14,4 $\pm$ 0,19 b	21,8 $\pm$ 0,34 b	86 c
	Oxidado	24,6 $\pm$ 0,03 b	48,4 $\pm$ 0,21 a	15,2 $\pm$ 0,11 b	11,8 $\pm$ 0,35 c	21,1 $\pm$ 0,13 bc	81 d
Milho normal	Não oxidado	25,5 $\pm$ 0,38 b	49,3 $\pm$ 0,30 a	13,9 $\pm$ 0,028 bc	11,3 $\pm$ 0,10 c	20,8 $\pm$ 0,08 bc	89 b
	Oxidado	24,9 $\pm$ 0,07 b	49,0 $\pm$ 0,08 a	13,9 $\pm$ 0,01 bc	12,2 $\pm$ 0,14 bc	21,2 $\pm$ 0,05 bc	89 b
Mandioca	Não oxidado	30,1 $\pm$ 0,72 a	43,7 $\pm$ 0,20 bc	14,0 $\pm$ 0,24 bc	12,2 $\pm$ 1,17 bc	20,6 $\pm$ 0,51 c	90 a
	Oxidado	31,4 $\pm$ 1,90 a	40,9 $\pm$ 0,39 cd	13,3 $\pm$ 0,40 c	14,4 $\pm$ 1,86 b	21,2 $\pm$ 0,87 bc	89 b

* Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem entre si significativamente, em nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey

As macromoléculas do amido, uma vez desramificadas geraram mistura de cadeias lineares longas e curtas, com ampla distribuição de massas moleculares. Cada amido apresentou seu próprio perfil de distribuição de tamanho de cadeias. A maior concentração dos tamanhos de cadeia está na faixa GP 13-24 para todos os amidos (Tabela 4), o que segundo Genkina et al. (2007) são as cadeias que apresentam o tamanho ideal para formar duplas hélices mais perfeitas, promovendo empacotamento mais denso da região cristalina. No presente estudo, o amido de milho normal nativo foi o que apresentou maior percentual de cadeias desta classe e os de alta amilose e mandioca os menores percentuais. Por outro lado, de acordo com Hanashiro, Abe e Hizukuri (1996) e Genkina et al. (2007), as cadeias curtas de GP <10 não são hábeis de formar duplas hélices, gerando defeitos estruturais na lamela cristalina dos grânulos e portanto, interferindo na organização dos cristais.

Dentre os amidos de milho nativos destaca-se o de alta amilose, por apresentar perfil com maiores proporções de cadeias de amilopectina com GP longo e muito longo (25-36 e ≥ 37) e menores proporções de cadeias menores (6-12 e 13-24). Seu GP médio é o mais elevado dentre os amidos estudados.

Os amidos de milho ceroso, milho normal e mandioca apresentam um pouco mais de similaridades entre si na distribuição do tamanho de cadeias da amilopectina, com maiores proporções de cadeias mais curtas e menores de mais longas que o de alta amilose. Rocha et

al. (2012) também constataram que os amidos de milho ceroso e normal apresentaram perfis de distribuição de comprimento de cadeias de amilopectina semelhantes. Algumas especificidades do amido de milho ceroso no presente estudo foram que suas cadeias laterais apresentaram o menor valor de $>GP$ detectado, GP médio semelhante ao do amido de milho normal e pouco maior que o de mandioca.

O amido de milho normal nativo se destaca pela maior proporção de GP 13-24 e baixa proporção de cadeias de $GP \geq 37$. Este amido apresentou a mesma relação de proporção comparativamente ao milho ceroso relatada em Rocha et al. (2012).

O amido de mandioca nativo se destaca, dentre os estudados, pela maior proporção de cadeias na faixa de GP 6-12. Também apresenta ombro na distribuição, entretanto, este ombro, diferentemente do amido de milho de alta amilose ocorre mais distante do primeiro pico.

O amido ceroso foi o único a apresentar alteração na proporção das classes de tamanho das cadeias laterais da amilopectina após o processo oxidativo. Houve aumento da proporção de cadeias na fração 13-24 (B1), decorrente da redução na proporção de cadeias da fração $GP \geq 37$ (B3), além de ter ocorrido redução no $>GP$ detectado para esta amostra. Seu GP médio, contudo, não foi alterado. Kuakpetoon e Wang (2008) também constataram que as cadeias longas da amilopectina ($GP \geq 37$) do amido de milho ceroso (também do amido de milho normal) foram as mais suscetíveis à despolimerização pela oxidação.

O amido de milho ceroso, com estruturação desenvolvida pela quase totalidade de amilopectina, pode ter sido oxidado primeiramente nas regiões amorfas do grânulo que, de acordo com Zhang et al. (2012), é onde esta macromolécula tem seus pontos de ramificação. E na sequência, na amilopectina da área cristalina, pois o amido apresentou alteração significativa na proporção das diferentes frações com o processo oxidativo.

De acordo com Kuakpetoon e Wang (2006), a despolimerização oxidativa da amilopectina dos amidos de milho normal, ceroso e alta amilose ocorreu preferencialmente nas cadeias B2 e B3+, por primeiramente atacar a lamela amorfa. As regiões cristalinas são principalmente constituídas por cadeias A e B1 (HIZUKURI, 1985; HIZUKURI; KANEKO; TAKEDA, 1983). As cadeias muito longas da amilopectina (B3), por se estenderem por vários *clusters* (HIZUKURI, 1986), também podem ser quebradas no local em que cruzam a lamela amorfa, assim como a fração amilose.

Wang e Wang (2003), pelos perfis de carboidratos (HPSEC) do sobrenadante do amido de milho ceroso aquecido a 90 °C, constataram que a oxidação claramente degradou a amilopectina em dois grupos de tamanhos moleculares, de modo similar ao que acontece para

o amido de milho normal, mas o segundo pico do ceroso necessitou menor tempo de retenção que o pico de amilose, porque foi gerado pela quebra da amilopectina.

O amido de milho ceroso oxidado foi o que mais diferiu do seu par não oxidado na análise quimiométrica dos espectros de IFTR (Figura 8). Apresentou o segundo maior teor de carboxilas determinado analiticamente (Tabela 2). A despolimerização pelo processo oxidativo, entretanto, não alterou o teor de amilose quando determinado analiticamente (Tabela 3), o que sugere que a quebra das moléculas muito longas da amilopectina pode originar apenas cadeias mais curtas deste polissacarídeo ramificado.

O processo oxidativo pelo ozônio não causou alteração significativa nas classes de distribuição de tamanho das cadeias dos amidos de milho de alta amilose, milho normal e mandioca. É possível que tenha ocorrido a despolimerização da amilopectina nos pontos de ramificação próximos à região amorfa dos amidos de milho de alta amilose, de milho normal e de mandioca, entretanto, isto não alterou a distribuição de tamanho das cadeias de amilopectina quando avaliado por esta metodologia.

O amido de mandioca, embora não tenha apresentado variação nas proporções de classes de cadeias, evidenciou redução do >GP detectado e o ombro continuou presente. Esse amido apresentou quebra (pico de GP, variando de 44 para 41) de cadeias muito longas da amilopectina gerando tamanhos de cadeias menores. De acordo com Hizukuri (1986) as cadeias muito longas (B3) de amilopectina se estendem por mais de uma zona cristalina, passando pelas zonas amorfas, onde teriam maior chance de serem acessadas e oxidadas.

Amidos de mandioca e de milho tratados com ácido láctico e radiação UV no estudo de Bertolini et al. (2001b) apresentaram redução da viscosidade intrínseca, indicando despolimerização. Entretanto, a intensidade de quebra somente se mostrou diferenciada entre as fontes de amido na segunda etapa do processamento, onde a luz UV quebrou mais o amido de mandioca que o de milho. Franco et al. (2010) procederam avaliação mais específica do nível de quebra de amidos destas mesmas fontes. Constataram que após os tratamentos com ácido láctico e UV as cadeias ramificadas longas da amilopectina de mandioca, com $GP \geq 37$, foram as mais degradadas. Já as cadeias do amido de milho tratado mantiveram perfil de cromatografia de permeação em gel similar ao obtido para amido nativo.

Resultados semelhantes para o amido de milho ceroso e diferentes para o milho normal foram observados por Wang e Wang (2003) ao oxidarem esses amidos com hipoclorito de sódio na concentração de 3% (mais elevada), constatando para o primeiro amido uma redução de 10,6 para 7,7 % das moléculas com $GP \geq 37$ e elevações de 33 para 34,1 % na classe GP 5-12 e de 41,8 a 43,3 %, no GP 13-24. Para o amido de milho normal a

proporção das cadeias com $GP \geq 37$ decresceram (9,3 para 6,6 %) e se elevaram na classe de GP 5-12 (35,2 a 38,4 %). O GP médio de ambos os amidos decresceu em aproximadamente 1 unidade de glucose com o tratamento químico. De acordo com estes autores a amilopectina degradou-se proporcionalmente com o aumento de concentração do oxidante.

4.6 Distribuição do tamanho molecular dos componentes do amido por cromatografia de permeação em gel

A massa molecular das macromoléculas pode afetar as propriedades estruturais, físico-químicas e funcionais do amido. Assim, a determinação da distribuição do tamanho molecular de um amido é importante e, quando um amido nativo contém ambas as macromoléculas, pela cromatografia de permeação em gel, é evidenciado um primeiro pico, que corresponde à amilopectina, de massa molecular mais elevada, eluída no volume vazio da coluna e um segundo pico, com alta resposta de *blue value* (BV) ou reação com o iodo, que corresponde à amilose. Os perfis cromatográficos por permeação em gel dos amidos de milho e de mandioca aqui estudados, antes e após a ozonização, estão apresentados na Figura 10 e os índices *Blue Value*/CHO calculados no pico da amilopectina são mostrados na Tabela 5.

No estudo de Rocha (2010) os valores obtidos para a razão *Blue Value*/CHO de 0,17, 0,30 e 0,28, respectivamente, para os amidos de milho ceroso, milho normal e mandioca foram mais elevados que os do presente estudo (0,06; 0,10 e 0,09), embora nesta mesma sequência (menor para ceroso e maior para normal).

Quanto mais elevada a relação *Blue Value*/CHO no pico da amilopectina, maior a proporção de cadeias ramificadas longas da amilopectina (FRANCO et al., 2002a). Deste modo, as cadeias mais longas de amilopectina seriam as do amido de alta amilose e as menores as do amido de milho ceroso. Isto correspondeu às maiores proporções de cadeias com elevados GP na distribuição por classes de tamanho.

No amido de milho de alta amilose aconteceu o primeiro pico, relativo à amilopectina, de baixa intensidade e o segundo pico, de alta intensidade, no volume de 232 mL, como o esperado, em função de ser rico em amilose. Este segundo pico mostrou base ampla, o que pode decorrer da presença não somente da amilose, mas também de materiais intermediários. De acordo com Baba et al. (1981) o amido de alta amilose é formado por amilose propriamente dita, amilopectina característica do amido de alta amilose e material intermediário.

— CHO BV (blue value)

Figura 10 - Perfis de eluição do amido de milho de diversos teores de amilose e de mandioca, antes e após ozonização, por cromatografia de permeação em gel

Tabela 5 – Índices (médias $\pm$ desvio padrão) de *Blue Value*/ CHO no pico da amilopectina dos amidos de milho e de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

		<i>BV/ CHO</i>
Milho alta amilose	Não oxidado	0,13
	Oxidado	0,27
Milho ceroso	Não oxidado	0,06
	Oxidado	0,05
Milho normal	Não oxidado	0,10
	Oxidado	0,10
Mandioca	Não oxidado	0,09
	Oxidado	0,09

Após o processo oxidativo do milho de alta amilose, o pico da amilopectina apresentou-se reduzido em intensidade (altura) com relação ao não oxidado. Pela Tabela 3 também observa-se elevação dos teores de amilose aparente e absoluta determinados analiticamente e, portanto, redução do teor de amilopectina. As cadeias laterais da amilopectina que, no caso deste amido são de elevado grau de polimerização relativamente aos demais amidos (Tabela 5), poderiam gerar moléculas de amilopectina de menor tamanho, moléculas intermediárias e, conforme a intensidade, fragmentos mais lineares, os quais seriam eluídos no segundo pico. O segundo pico (*Blue Value*) do amido oxidado, confirmando o comportamento exposto, mostrou intensidade ligeiramente maior que aquela do amido nativo, embora tenha ocorrido no mesmo volume (232 mL). A base deste pico, contudo, se mostrou mais ampla ou heterogênea, em função da produção de intermediários, principalmente, contudo bem ao final também evidenciou pequeno aumento de moléculas menores. Tais quebras podem ter ocorrido nas zonas amorfas dos grânulos, que são os locais preferenciais de oxidação. A amilopectina também pode ter sido despolimerizada e/ou desramificada na zona amorfa, uma vez que nesta região existem muitos pontos de ramificação. A desramificação reduziria sua massa total sem, contudo, alterar as classes de tamanho das cadeias laterais. Materiais intermediários também poderiam gerar materiais mais lineares.

O amido de milho ceroso apresentou pico elevado de amilopectina, evidenciando a quase exclusividade desta fração na composição dos grânulos. Esta macromolécula tem cadeias desramificadas de menor massa molecular que aquelas do amido de milho de alta amilose. Este amido apresentou, mais ao final do cromatograma, um segundo pico incipiente (resposta de *blue value* muito baixa), uma vez que seu conteúdo em amilose é muito baixo

(3,2 %). Após a oxidação, o pico de amilopectina se tornou mais intenso e estreito. Houve quebra das moléculas de amilopectina maiores em menores, constatada pela análise de tamanho das cadeias laterais, onde se observa redução da proporção de cadeias maiores (quebra das cadeias B3), com consequente elevação dos percentuais de cadeia B1. Observa-se também quebra das moléculas de amilopectina em moléculas intermediárias (eluidas em volumes entre a amilopectina e a amilose). Um segundo pico, um pouco mais elevado que o de seu par não oxidado, ocorreu ao final da coleta, ou seja, presença de moléculas lineares muito pequenas, oriundas das quebras pelo processo oxidativo. Os baixos conteúdos em amilose aparente e absoluta neste amido permaneceram inalterados após a oxidação e as alterações, portanto, incidiram mais sobre a amilopectina. Pelo PCA dos espectros de IFTR este amido evidenciou a maior diferenciação entre as amostras sem e com oxidação.

O amido de milho normal mostrou um primeiro pico, de amilopectina, e uma resposta de *BV* no segundo pico (no volume de 208 mL), o qual se mostrou bem definido e de intensidade mediana relativamente aos demais amidos de milho. Após a oxidação pelo ozônio, o amido passou a apresentar perfil diferenciado, tendo o primeiro pico menos intenso, sugerindo degradação parcial desta fração em moléculas que foram eluídas juntamente com o material intermediário e amilose. A curva de *BV*, por sua vez, foi suavizada na região do segundo pico, se mostrando menos intenso e mais amplo, sugerindo maior heterogeneidade dessas moléculas provenientes de materiais de maior massa molecular. Deste modo, o volume também foi deslocado de 208 para 216 mL. O teor de amilose aparente determinado analiticamente foi elevado com a oxidação (de 24,3 para 25,9 %), ou seja, houve redução da amilopectina. O teor de amilose absoluta, contudo, se elevou numericamente, mas não de modo significativo.

O amido de mandioca apresentou o pico de amilopectina, de formato mais agudo, enquanto o segundo pico, de resposta ao *Blue Value*, aconteceu no volume de 164 mL, com formato achatado (amplo) e de baixa intensidade se comparado com o do amido de milho normal. O volume de eluição, ocorrendo em menor volume (164 mL), evidencia maior massa molecular da amilose desse amido se comparado com aquelas dos amidos de milho. No estudo de Franco et al. (2010) o amido de mandioca também mostrou moléculas de amilose com maior massa molecular que o amido de milho normal. Após o tratamento com o ozônio houve redução do total de carboidratos no primeiro pico, pois este se apresentou com menor intensidade e mais amplo, sugerindo heterogeneidade dos tamanhos de cadeia. As moléculas de amilopectina passaram a eluir em volumes maiores, produzindo intermediários e elevando o pico referente às moléculas lineares. Este segundo pico (*BV*) se mostrou achatado

(heterogêneo), mais intenso, e ocorreu mais tardiamente, no volume de 228 mL, ou seja, o maior deslocamento (de 164 para 228 mL). O teor de amilose determinado analiticamente, entretanto, não variou com a oxidação.

Os amidos de milho de alta amilose, milho normal e mandioca apresentaram evidências de quebra da amilose e amilopectina quando avaliados por esta análise, contudo, não refletiu em alteração das classes de distribuição de tamanho pelo HPAEC-PAD. Talvez tenham ocorrido quebras, mas dentro dos intervalos de cada classe de GP, o que não afetaria a proporção na distribuição.

No estudo de oxidação do amido de milho normal e mandioca pela ação conjunta do ácido láctico e radiação UV por Franco et al. (2010) o comportamento foi diferente do presente estudo, utilizando o ozônio. Aqueles autores constataram redução leve do total de carboidratos no pico de amilopectina, sugerindo sua degradação parcial e redução da massa molecular da amilose. As amostras de polvilho azedo utilizadas para comparação exibiram perfis de eluição semelhantes ao amido de mandioca tratado com ácido láctico e luz UV. O amido de milho foi grandemente afetado pelo tratamento ácido e radiação UV, evidenciando intensa redução da amilopectina, aumento de materiais intermediários, além de pico de amilose mais elevado e com menor massa molecular. Estes resultados sugeriram aos autores que algumas cadeias laterais da amilopectina de mandioca localizadas mais no interior do grânulo foram provavelmente protegidas. Assim, a massa molecular das cadeias ramificadas da amilopectina do amido de mandioca foi preservada em sua maioria, o que forneceu alguma viscosidade para desenvolver a expansão durante cozimento. Os autores sugeriram que o ácido láctico e a radiação UV podem ter penetrado mais nos grânulos de amido de milho, porque estes apresentam poros e cavidades superficiais e maior proporção de grânulos com diâmetro menor do que o amido de mandioca.

4.7 Difração de raios X e cristalinidade relativa

Os perfis de difração de raios X dos amidos de milho e mandioca, antes e após a ozonização, podem ser visualizados na Figura 11.

Figura 11 - Difratomogramas de raios X dos amidos de milho e mandioca, antes e após a ozonização

Os amidos nativos de milho normal e de milho ceroso, assim como o de mandioca, apresentaram padrão cristalográfico do tipo A, de acordo com a classificação de Zobel (1964), com picos aos 15° , 17° , 18° e 23° . O amido de milho de alta amilose apresentou padrão B, com picos nos ângulos 5° , 17° , 19° , 22° e 23° . Os mesmos padrões foram observados por outros autores como Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009) e Kuakpetoon e Wang (2006) para amido de milho ceroso, regular e de alta amilose e por Cavallini e Franco (2010) e Rocha et al. (2011) para o amido de mandioca. Isto significa que os amidos estudados têm diferentes empacotamentos das duplas hélices.

O padrão de cristalinidade A se correlacionou no estudo de Hanashiro, Abe e Hizukuri (1996) com os amidos com quantidade relativamente abundante de cadeias A e o padrão cristalográfico B com a menor quantidade destas, enquanto que as frações B1, B2 e B3 pareceram estar menos relacionadas. Em estudos posteriores Hizukuri et al. (1997) e Shi et al. (1998) constataram que os amidos dos tipos A, B ou C são determinados principalmente pelo comprimento médio das cadeias da amilopectina. Para estes autores, os amidos com polimorfismo A tiveram maior proporção de cadeias curtas ($GP \leq 12$) e os polimorfos B apresentam grandes proporções de cadeias muito longas ($GP \geq 37$).

Segundo Jane et al. (1999) amidos com padrão cristalino B têm maior proporção de cadeias ramificadas longas de amilopectina e menor de curtas que o tipo A. Isto é confirmado no presente estudo, onde o amido de milho de alta amilose (padrão B) apresentou elevada proporção de cadeias de amilopectina com $GP \geq 37$ e os de padrão A apresentaram altas proporções relativas de cadeias menores.

As diferenças de cristalinidade, de acordo com Singh, Kaur e McCarthy (2007), decorrem das diferentes proporções de amilose e da presença de cadeias laterais curtas e longas da amilopectina. A amilose, no entanto, não parece ter efeito significativo sobre a cristalinidade dos amidos de milho normal e ceroso, sendo que este último pode ser praticamente livre de amilose. Ambos, contudo, mostram forte birrefringência sob luz polarizada (HOOVER, 2001; TESTER; KARKALAS, 2004). Nos amidos de alto teor de amilose o teor de amilose pode contribuir de forma significativa para a cristalinidade (TESTER et al., 2000). Para os amidos ricos em amilopectina, entende-se que a origem de cristalinidade decorre do entrelaçamento das cadeias externas de amilopectina (cadeias A e B1) em forma de duplas hélices. Estas se associam para formar regiões ordenadas ou cristalinas. Duplas hélices adjacentes dão origem a padrões geométricos regulares em 3 dimensões (TESTER; KARKALAS, 2004).

O tratamento com ozônio não alterou os padrões de cristalinidade de seus pares, nativos, corroborando o relatado no estudo de oxidação de amidos de milho por hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio no estudo de Kuakpetoon e Wang (2006) e por hipoclorito para o amido de taro em Lawal (2004). Ao oxidar amido de mandioca com ozônio, Klein et al. (2014) também não constataram alteração de padrão dos polimorfos, entretanto, a cristalinidade relativa foi alterada.

A oxidação não resultou em alteração do padrão de raios X do amido nativo, possivelmente porque isto ocorre principalmente na região amorfa do grânulo. Entretanto, foi observado que a cristalinidade relativa de todos os amidos foi alterada (Tabela 6).

Tabela 6 - Cristalinidade relativa (CR) (média $\pm$ desvio padrão) dos amidos de milho e de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

Cristalinidade relativa (%)		
Milho alta amilose	Não oxidado	18,6 $\pm$ 0,06 g
	Oxidado	20,1 $\pm$ 0,13 f
Milho ceroso	Não oxidado	43,5 $\pm$ 0,36 b
	Oxidado	46,8 $\pm$ 0,13 a
Milho normal	Não oxidado	35,0 $\pm$ 0,05 d
	Oxidado	33,1 $\pm$ 0,12 e
Mandioca	Não oxidado	33,3 $\pm$ 0,06 e
	Oxidado	39,3 $\pm$ 0,15 c

* Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem entre si significativamente, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Os amidos nativos apresentaram diferentes valores de CR. Estas diferenças entre os amidos têm sido atribuídas a: (1) tamanho do cristal, (2) quantidade de regiões cristalinas, que é influenciada pelo teor de amilopectina e comprimento de suas cadeias, (3) orientação das duplas hélices no interior da área cristalina, (4) extensão da interação entre as duplas hélices (HOOVER; RATNAYAKE, 2002).

O amido nativo de milho normal apresentou 35,0 % de CR e o ceroso 43,5 %, valores superiores aos constatados por Rocha et al. (2012), que foram de 32,6 % e 41,4 %, respectivamente. Já a CR do amido de mandioca (33,3 %) está abaixo dos 36,2 % no estudo de Rocha (2010) e acima dos 32,1 % constatado por Klein et al. (2014). Várias linhas de evidências indicam que a amilopectina é o principal contribuinte para a ordem cristalina no interior do grânulo (FRENCH, 1984). Assim, essa afirmação foi confirmada no presente estudo, pois dentre os amidos nativos, a maior CR foi a do amido milho ceroso (~ 97 % de amilopectina) e a menor, do amido de alta amilose (~40% de amilopectina). Resultados semelhantes foram encontrados por Cheetam e Tao (1998), sendo que o amido de milho ceroso apresentou a maior cristalinidade (42 %), enquanto aquele com 84 % de amilose mostrou a menor CR (17 %). Estes autores observaram que o grau de cristalinidade foi inversamente proporcional ao teor de amilose, linearmente entre as faixas de 0 a 40 % de amilose e após isto, decresceu de forma não linear. Esses autores sugeriram que o teor de amilose desempenha papel importante na redução da cristalinidade, ou, ao menos, não está envolvido na formação de cristalitos, até 40 %. Além do aumento do teor de amilose, o grau

de cristalinidade do amido diminuiu com o aumento do comprimento da cadeia média da amilopectina, parecendo ser diretamente proporcional à cadeia curta (fração de GP 10-13).

Após a ozonização, a CR dos amidos foi alterada, o que corrobora a análise anterior, que evidenciou degradação parcial das macromoléculas. O amido de milho normal foi o único a apresentar redução da CR (5,4 %) com o processo oxidativo. Os demais amidos, que apresentaram elevação da CR com o tratamento pelo ozônio, foram: mandioca (18 %) > milho alta amilose (8,0 %) > milho ceroso (7,6 %). Comportamentos distintos também são evidenciados na literatura, porque vários fatores estão envolvidos, como a fonte de amido e a intensidade do processo oxidativo. No estudo de Kuakpetoon e Wang (2006) o amido de milho ceroso apresentou elevação da CR sob menor nível de oxidação com hipoclorito e redução no processo oxidativo mais forte. As CR dos amidos de milho comum e de milho de alta amilose (70 %) não se alteraram no processo oxidativo mais brando e se elevaram no mais forte.

No estudo de Wang e Wang (2003), a amilose se mostrou mais suscetível à oxidação do que a amilopectina, explicada pela maior acessibilidade e linearidade desta macromolécula. Entretanto, tanto a amilose como a amilopectina podem ser degradadas na oxidação do amido, mas a primeira é mais suscetível (WANG; WANG, 2003, KUAKPETOON; WANG, 2006). O local de ocorrência preferencial da oxidação no grânulo tem sido discutido na literatura. Kuakpetoon e Wang (2001) concluíram que a oxidação atuou preferencialmente na lamela amorfa dos grânulos, a qual consiste principalmente de amilose e regiões de ramificação da amilopectina. Em estudo posterior, Kuakpetoon e Wang (2006) concluíram que o tamanho da lamela amorfa tem influência sobre a suscetibilidade à oxidação. De acordo com Jenkins e Donald (1995) o tamanho da lamela cristalina dos amidos de milho estudados (ceroso, normal e de alta amilose) aumenta sistematicamente com o teor de amilose. Desse modo, a ordem de tamanho das lamelas amorfas dos amidos de milho, no presente estudo, seria amido ceroso > normal > alta amilose, bem como esta seria a ordem esperada de suscetibilidade ao processo oxidativo, de acordo com Kuakpetoon e Wang (2006).

O amido de milho normal foi o único a apresentar redução da CR com a oxidação. Este amido apresentou elevação do teor de amilose aparente determinado pelo método iodométrico, o que significa redução da amilopectina. Como esta última ocorre preferencialmente nas regiões cristalinas, sugere que houve oxidação desta região, além da região amorfa. A distribuição das cadeias ramificadas de amilopectina, entretanto, não foi modificada pelo tratamento com o ozônio. Pela CPG, este amido apresentou abaixamento

considerável do pico de amilopectina, gerando cadeias menores desta macromolécula, eluindo como intermediários ou amilose. A amilose também foi quebrada, sendo que seu pico foi reduzido e seu volume deslocado. Estas constatações explicariam a redução da CR deste amido. Despolimerização da amilopectina nos *clusters* cristalinos foi também observada para alguns amidos em Kuakpetoon e Wang (2006), onde o processo oxidativo reduziu a cristalinidade. Além disto, segundo Jenkins e Donald (1995), a amilose pode romper o empacotamento das duplas hélices da amilopectina por co-cristalinização com as mesmas e puxar algumas cadeias de amilopectina, rompendo a estrutura cristalina.

O amido nativo de milho de alta amilose, de padrão polimorfo B, apresentou CR baixa. Para Shi et al. (1998), entretanto, baixa cristalinidade não é sinônimo de moléculas de amido pobremente ordenadas nos grânulos, mas isto poderia decorrer da presença de cristais de menor tamanho. Esse amido mostra baixo entumescimento, mas produz resíduos resistentes ao ácido. Especula-se que a amilose, componente predominante neste amido pode co-cristalizar entre si ou com cadeias longas de amilopectina (KUAKPETOON; WANG, 2006). Quando oxidado pelo ozônio, teve sua CR elevada. Apesar de existirem em menor quantidade, as cadeias laterais da amilopectina são mais longas (Tabela 4) e, após desramificação e análise por cromatografia de troca aniônica, a proporção de cadeias de diferentes GPs não se alteraram significativamente. Pela CPG (Figura 10) houve abaixamento da intensidade do pico de amilopectina, sendo compatível com a ligeira elevação do teor de amilose (ou redução da amilopectina) determinado analiticamente (Tabela 3). Houve produção de intermediários. O pico de amilose se elevou muito pouco e evidenciou redução da massa molecular, possivelmente decorrente da quebra da amilose e/ou desramificação da amilopectina.

O amido ceroso, constituído de amilopectina, apresentou a maior CR entre os amidos estudados, apresentando alta proporção de cadeias de amilopectina do tipo B1 e baixas quantidades de cadeias muito longas (Tabela 4). Após o tratamento com ozônio houve aumento da CR em proporção semelhante à ocorrida para amido de alta amilose. As alterações aqui decorreram da ação do ozônio sobre a amilopectina. Houve redução das cadeias B3 ($GP \geq 37$) e aumento das B1 ($GP 13-24$). Como houve quebra das cadeias B3, sugere-se despolimerização mais acentuada na região amorfa, local de mais fácil acesso. De acordo com Kuakpetoon e Wang (2006) as cadeias B1 são as principais responsáveis pela formação da lamela cristalina. O aumento da CR poderia decorrer tanto pela degradação do material amorfo dos grânulos, como pela maior associação das moléculas de amido (FERRINI et al., 2008).

O amido de mandioca nativo apresentou CR um pouco menor que a do amido de milho normal, e, dentre os amidos estudados, foi o que apresentou a maior elevação deste parâmetro (18 %) após a ozonização. Tal elevação sugere oxidação preferencial da região amorfa do grânulo. Observou-se haver redução das massas moleculares da amilopectina e da amilose, pela CPG. Como a amilose deste amido é de elevada massa molecular, pode ter ocorrido redução nesta fração, gerando amiloses de menor massa molecular. Quanto à amilopectina, as proporções de cadeias ramificadas não foram alteradas quando avaliadas pela cromatografia de troca aniônica, entretanto, foi evidenciada degradação dessa molécula por CPG e também da amilose. Pelos perfis da cromatografia aniônica (Figura 9), entretanto, observou-se redução do ombro e também redução do pico 2 da amilopectina de 44 para 41 após a oxidação. Tais evidências sugerem tamanhos de cadeias de amilopectina mais propícias a formarem duplas hélices mais associadas, ou seja, maior perfeição dos cristais, o que explicaria a elevação da intensidade da cristalinidade relativa deste amido. Klein et al. (2014) ao oxidarem amido de mandioca observaram elevação da intensidade dos picos no difratograma e explicaram que isto pode decorrer do deslocamento das duplas hélices adjacentes e rearranjo nas orientações para um arranjo paralelo mais perfeito.

Ferrini et al. (2008) avaliaram o amido de milho normal e mandioca, de padrão A, com índices de cristalinidade de 24,4 e 25,2 %, repectivamente. O tratamento com ácido e metanol evidenciou degradação da amilose de ambos os amidos, mas a amilose da mandioca foi atacada mais rapidamente que a do milho, sugerindo que os grânulos desse amido apresentam regiões menos organizadas ou maior facilidade dos reagentes penetrarem.

A suscetibilidade do amido à ação de enzimas também parece variar com a cristalinidade, uma vez que depende da penetração destes agentes na estrutura granular. Amidos granulares do tipo A são mais suscetíveis à ação das amilases do que os do tipo B (JANE, 2009; GÉRARD et al., 2001; HOOVER; ZHOU, 2003). Naqueles do tipo A, as cadeias curtas A e B1 da estrutura cristalina são menos estáveis e mais suscetíveis aos rearranjos, ao passo que os amidos do tipo B apresentam proporções superiores de cadeias longas B, que se estendem por dois ou mais *clusters* e estabilizam a estrutura interna de grânulos e tornando-a mais resistentes à ação enzimática (JANE, 2006). No presente estudo não se observa uma relação entre o padrão de cristalinidade e as alterações por processo oxidativo, pois o amido de milho de alta amilose (padrão B) não evidenciou comportamento distinto dos de padrão A.

4.8 Propriedades térmicas

O calorímetro diferencial de varredura durante a gelatinização dos amidos apresenta perfil com uma endoterma, que é função da cristalinidade granular. Algumas fontes de amido, contudo, apresentam também uma segunda endoterma, relacionada ao complexo amilose-lipídeo.

Os amidos de milho e de mandioca, antes e após oxidação pelo ozônio, apresentaram as propriedades térmicas de gelatinização mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 - Propriedades térmicas de gelatinização (médias $\pm$ desvio padrão) dos amidos de milho de diferentes teores de amilose e de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

		Ti (°C)	Tp (°C)	Tf (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
Milho alta amilose	Não oxidado	71,4 $\pm$ 0,55 a	90,7 $\pm$ 0,00 a	102,9 $\pm$ 0,08 b	31,53	11,5 $\pm$ 0,22 c
	Oxidado	70,0 $\pm$ 0,14 b	82,2 $\pm$ 0,08 b	104,8 $\pm$ 0,75 a	34,77	9,8 $\pm$ 0,23 d
Milho ceroso	Não oxidado	64,3 $\pm$ 0,03 c	70,3 $\pm$ 0,08 c	75,7 $\pm$ 0,10 c	11,80	14,9 $\pm$ 0,23 a
	Oxidado	64,0 $\pm$ 0,10 c	70,1 $\pm$ 0,10 c	75,7 $\pm$ 0,33 c	11,80	14,6 $\pm$ 0,15 a
Milho normal	Não oxidado	62,7 $\pm$ 0,07 d	67,5 $\pm$ 0,02 d	73,8 $\pm$ 0,21 d	11,10	11,4 $\pm$ 0,30 c
	Oxidado	62,3 $\pm$ 0,57 d	67,5 $\pm$ 0,60 d	72,7 $\pm$ 0,73d	10,40	12,0 $\pm$ 0,25 c
Mandioca	Não oxidado	62,4 $\pm$ 0,09 d	68,1 $\pm$ 0,17 e	74,7 $\pm$ 0,22 c	12,28	13,3 $\pm$ 0,25 b
	Oxidado	62,8 $\pm$ 0,19 d	68,3 $\pm$ 0,09 e	74,8 $\pm$ 0,38 c	12,05	14,2 $\pm$ 0,12 a

* Médias seguidas de mesma letra, nas colunas não diferem entre si significativamente para Ti, Tf e Entalpia, em nível de 5 % de probabilidade, e para Tp, em nível de 1 %, pelo teste de Tukey

Sendo:

Ti = Temperatura inicial

Tp = Temperatura de pico

Tf = Temperatura final

$\Delta T = T_f - T_i$

ΔH = variação de entalpia

Foi também observada uma segunda endoterma de gelatinização referente ao complexo amilose-lipídeo no amido de milho normal, cujos valores foram de 81,1 (Ti), 89,4 (Tp) e 93,8 °C (Tf), com um ΔT de 12,6 °C e ΔH de 1,57 J.g⁻¹. Após o processo oxidativo estes valores foram todos aumentados para 84,3 (Ti), 95,4 (Tp) e 101,8 °C (Tf), com um ΔT de 17,6 °C e ΔH de 1,90 J.g⁻¹.

Os valores de propriedades térmicas (primeira endoterma) dos amidos nativos no presente estudo foram similares a alguns da literatura. As temperaturas de transição observadas por Jane et al. (1999) para amido de alta amilose VII, foram 71,6°C (Ti), não detectado (Tp), 129 °C (Tf) e 16,2 J.g⁻¹ (entalpia), respectivamente. Para amidos de milho ceroso aqueles autores encontraram 64,2 °C (Ti), 69,2 °C (Tp), 74,6 °C (Tf) e 15,4 J.g⁻¹ (entalpia), para o amido de milho normal 64,1 °C (Ti), 69,4 °C (Tp), 74,9 °C (Tf) e 12,3 J.g⁻¹ (entalpia) e para o amido de mandioca 64,3 °C (Ti), 68,3 °C (Tp), 74,4 °C (Tf) e 14,7 J.g⁻¹ (entalpia).

As propriedades térmicas dos amidos dependem da microestrutura e do grau de cristalinidade dos grânulos, e também do tamanho do grânulo e proporção amilose/amilopectina (SANDHU et al., 2008). A entalpia de transição pode ser interpretada como sendo correspondente à quantidade de região cristalina (ou estrutura de duplas hélices) do amido em suspensão que são rompidas pelo aquecimento (LIU et al., 2006). A gelatinização envolve, portanto, o desenrolamento e a fusão das cadeias externas da amilopectina que estão empacotadas como duplas hélices nos *clusters* (LAWAL, 2004). Valores altos de energia ou temperaturas mais altas de gelatinização estão relacionados com estruturas cristalinas mais fortes (COOKE; GIDLEY, 1992).

As menores temperaturas de transição dentre os amidos nativos ocorreram para o amido de mandioca, o qual apresentou o menor teor de amilose depois do amido de milho ceroso, CR de 33 %, estrutura de ombro na distribuição das cadeias de amilopectina, característico de defeito na estrutura cristalina. Segundo Singh et al. (2003), o grau de perfeição cristalina, que está relacionada ao comprimento das duplas hélices, reflete nas temperaturas de gelatinização. De acordo com Jane et al. (1999) amido com ombro (faixa de GP 18-21) baixo em relação ao primeiro pico no perfil cromatografia de troca aniônica, é amido com baixa temperatura de gelatinização e amidos com elevada temperatura de gelatinização são, geralmente os que não apresentam ombro ou apresentam ombro de alta intensidade relativa. O amido de milho de alta amilose no presente estudo, cujo perfil de distribuição de tamanho de cadeias laterais de amilopectinas (Figura 9) evidenciou ombro mais elevado, ou próximo do pico, e maior temperatura de gelatinização.

As maiores temperaturas dentre os amidos nativos ocorreram para o de milho de alta amilose, o qual também apresentou 62,5 % de amilose, CR de 19 %, ombro de intensidade relativa elevada na distribuição dos tamanhos de cadeias da amilopectina e elevada quantidade de cadeias muito longas. De acordo com Jane et al. (1999), em geral, os amidos que apresentam elevadas temperaturas de gelatinização, tais como o de milho de alta amilose

V e VII, em geral, não apresentam ombro ou apresentam ombro de muito elevada intensidade relativa. Segundo Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009) o amido de alta amilose, que tem pouca mobilidade molecular, requer temperaturas elevadas no processo de gelatinização (128 °C) para que suas ligações sejam rompidas e se estabeleçam novas ligações com a água. Além disto, segundo Jane et al. (1999) os comprimentos das cadeias laterais da amilopectina e sua distribuição determinam a temperatura de gelatinização, a variação de entalpia e as propriedades de pasta. A temperatura de gelatinização se eleva com o aumento do comprimento da cadeia ramificada, o que é o caso deste amido.

A entalpia de gelatinização representa a quantidade de energia térmica envolvida no processo de gelatinização. Segundo Cooke e Gidley (1992), este parâmetro reflete primeiramente a perda da conformação das duplas hélices e depois a perda de cristalinidade dos amidos durante a gelatinização. O amido de milho ceroso teve o maior valor de variação de entalpia registrado e, em segundo lugar, o de mandioca. A entalpia para o amido de alta amilose foi inferior ao amido ceroso e similar ao de milho normal, embora as temperaturas de transição entre milho normal e de alta amilose sejam bem distintas. O resultado de entalpia para o amido de milho de alta amilose não foi o esperado, pois de acordo com Jane et al. (1999), amidos com cadeias ramificadas de comprimento mais longo, como de alta amilose V e VII, apresentam maiores variações de entalpia de gelatinização, indicando que necessitam maiores quantidades de energia para gelatinizar os cristais formados pelas cadeias mais longas. A CR deste amido foi baixa (18,6 %)

Os amidos cerosos são também conhecidos por apresentarem elevadas variações de entalpia de gelatinização (JANE et al., 1999), refletindo o elevado percentual de cristalinidade da amilopectina. No presente estudo, a CR desse amido foi a mais elevada (43,5 %). No estudo de Liu et al (2006) a entalpia de gelatinização se elevou com o aumento do conteúdo em amilopectina e assim, o amido rico nesta macromolécula (ceroso) apresenta, em geral, valores mais elevados que o do rico em amilose.

No presente estudo as propriedades térmicas pela oxidação com o ozônio foram alteradas no amido de milho de alta amilose, com redução da T_i e T_p e aumento da T_f , o que ocasionou aumento de ΔT e também redução da ΔH_G . Para o amido de mandioca houve apenas elevação do ΔH . A redução da variação de entalpia pela oxidação com ozônio no amido de milho de alta amilose ocorreu porque os grânulos foram enfraquecidos neste processo e, por conseguinte, foi necessária menos energia para a gelatinização. No caso do amido de mandioca o aumento pode decorrer da quebra mais intensa das macromoléculas,

com possível rearranjo das duplas hélices, dificultando a dissociação destas para a gelatinização.

Alguns estudos não evidenciaram alteração das propriedades térmicas quando os amidos são oxidados pelo ozônio. Chan et al. (2011) observaram que os amidos de milho e mandioca oxidados por ozônio (de 1 a 10 min) não apresentaram diferenças nas temperaturas de gelatinização. O estudo de Oladebeye et al. (2013) também não constatou alterações nestas propriedades ao tratar amido com ozônio por diferentes tempos de tratamento. Outros estudos mostram efeitos diversificados da oxidação sobre estas propriedades. Sangseethong, Lertphanich e Sriroth (2009) constataram que a ozonização do amido de mandioca resultou em menor T_i e entalpia de gelatinização, e a redução na T_i se correlacionou fortemente com o teor de grupos carboxilas nas amostras. Estudo posterior de Sangseethong, Termvejsayanon e Sriroth (2010) evidenciou que a T_i do amido de mandioca oxidado com hipoclorito diminuiu, enquanto aquela com peróxido de hidrogênio aumentou, sugerindo que os produtos químicos trabalham por mecanismos diferentes. O hipoclorito, além de degradar o amido, introduz elevados teores de carboxilas. Estes grupos com cargas negativas poderiam prontamente absorver água e facilitar a hidratação, o que enfraqueceria o grânulo e o levaria a gelatinizar em temperatura mais baixa. As entalpias de gelatinização de ambos os tipos de amidos oxidados diminuíram em comparação com o amido nativo. No presente estudo, contudo, não se observa correlação entre teor de carboxilas e as temperaturas de transição ou entalpia de gelatinização.

Sangseethong, Termvejsayanon e Sriroth (2010) sugerem que as oxidações pelo hipoclorito e o peróxido causam o enfraquecimento do grânulo por degradar parcialmente as moléculas na lamela cristalina. A T_{iG} do amido oxidado por peróxido ocorreu em temperatura mais elevada, o que foi atribuído à despolimerização da região amorfa, que tem efeito desestabilizante sobre a lamela cristalina. Uma vez que as regiões amorfas são degradadas, seu efeito desestabilizante sobre o domínio cristalino é reduzido e a gelatinização passa a ocorrer em temperaturas mais elevadas.

No estudo de Wang e Wang (2003), os amidos de milho normal e ceroso oxidados por hipoclorito apresentaram T_i e T_p mais elevadas, entretanto, as entalpias foram semelhantes, sugerindo que houve degradação da lamela amorfa, quando se utilizou até 1,25% de cloro ativo. Acima desta concentração a T_i e T_p foram reduzidas, possivelmente pela degradação das lamelas cristalinas. A entalpia, no entanto, permaneceu inalterada, possivelmente porque a quantidade de cristais não foi afetada pela oxidação. O detectado por esses autores parece não se aplicar ao amido de milho de alta amilose no presente trabalho, pois apesar de evidenciar as

mais significativas alterações nas propriedades térmicas, não foi o que mais alterou os valores de CR ou os perfis cromatográficos por CPG. O amido de mandioca, que teve um incremento de 18 % na CR com a oxidação, também apresentou elevação da variação de entalpia. No presente estudo a variação de entalpia se correlacionou positivamente com a CR (0,84) e negativamente com o teor de amilose (-0,84) dos amidos. Já as temperaturas de transição se correlacionaram negativamente com a CR (T_i -0,77, T_p - 0,79 e - T_f 0,84) e positivamente com o teor de amilose (T_i 0,85, T_p 0,85 e T_f 0,91).

Em Sandhu et al. (2008) o amido de milho ceroso oxidado por hipoclorito de sódio apresentou maior variação das temperaturas de transição do que o amido de milho normal oxidado. A variação das temperaturas de gelatinização (ΔT_G) do amido de milho oxidado foi mais baixa para o ceroso e mais elevada para o milho normal, o que sugere que neste último haja a presença de cristalitos de estabilidade variável dentro dos domínios cristalinos de seus grânulos. No estudo destes autores, os amidos oxidados de milho normal e ceroso mostraram temperaturas de transição inferiores aos de seus pares nativos, o que pode decorrer do enfraquecimento dos grânulos de amido, levando a uma ruptura precoce das duplas hélices de amilopectina.

Camargo et al. (1988) não observaram diferenças entre as propriedades térmicas dos amidos de mandioca nativos e os fermentados e secos ao sol. Mestres e Rouau (1997) relataram o mesmo para amidos fermentados secos ao sol e em estufa, sugerindo que a estrutura cristalina do amido de mandioca não foi modificada pela acidificação e exposição à radiação UV. Em Franco et al. (2010) as temperaturas de gelatinização e a variação da entalpia dos amidos estudados não foram significativamente alteradas com o tratamento fotoquímico, com exceção da T_i do amido de milho que foi reduzida.

Vários estudos têm mostrado correlação entre as temperaturas de gelatinização do amido e a distribuição das cadeias ramificadas da amilopectina. Por exemplo, a proporção de cadeias de GP 6-12 se correlaciona negativamente com a temperatura de gelatinização dos cristais, enquanto que as de GP 13-24 se correlacionam positivamente (PÉREZ; BERTOFT, 2010). No presente estudo, contudo, as cadeias do tipo A se correlacionaram negativamente com todas as temperaturas de transição (T_i -0,90, T_p -0,86 e T_f -0,88) e as B3 positivamente (T_i 0,95, T_p 0,93 e T_f 0,94), enquanto que as B1 não interferiram.

Durante o armazenamento os géis de amido passam por mudanças estruturais. Assim, a verificação da transição endotérmica durante o reaquecimento de géis de amido armazenados reflete uma medida geral da estrutura ordenada desenvolvida a partir da recristalização da amilopectina durante o armazenamento refrigerado (KARIM; NORZIAH;

SEOW, 2000). As propriedades térmicas de retrogradação dos amidos de milho e de mandioca, antes e após oxidação pelo ozônio são mostradas Tabela 8.

Tabela 8 - Propriedades térmicas (médias $\pm$ desvio padrão) de retrogradação (11 dias a 4 °C) dos amidos de milho com diferentes teores de amilose e de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

		Ti (°C)	Tp (°C)	Tf (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)	% R
Milho alta amilose	Não oxidado	49,5 $\pm$ 0,47 a	56,6 $\pm$ 0,25 a	64,5 $\pm$ 0,25 b	15,01	1,40 $\pm$ 0,07 d	12
	Oxidado	47,6 $\pm$ 0,96 b	55,3 $\pm$ 0,83 ab	67,3 $\pm$ 0,84 a	19,63	1,53 $\pm$ 0,16 d	16
Milho ceroso	Não oxidado	40,7 $\pm$ 0,76 d	51,6 $\pm$ 1,41 c	60,8 $\pm$ 0,31 cd	20,10	5,32 $\pm$ 0,40 b	36
	Oxidado	40,4 $\pm$ 0,31 d	51,0 $\pm$ 1,61 c	60,8 $\pm$ 0,06 cd	20,50	6,17 $\pm$ 0,91b	42
Milho normal	Não oxidado	40,9 $\pm$ 0,47 d	50,3 $\pm$ 0,00 c	59,6 $\pm$ 0,02 cd	18,70	5,15 $\pm$ 0,52 b	45
	Oxidado	41,0 $\pm$ 0,48 d	50,5 $\pm$ 0,20 c	59,2 $\pm$ 0,32 cd	18,20	5,34 $\pm$ 0,26 b	45
Mandioca	Não oxidado	44,6 $\pm$ 0,49 c	54,6 $\pm$ 0,20 b	61,5 $\pm$ 0,25 c	16,94	3,28 $\pm$ 0,05c	25
	Oxidado	37,0 $\pm$ 0,20 e	49,6 $\pm$ 0,60 d	56,7 $\pm$ 0,60 e	19,70	6,85 $\pm$ 0,27 a	48

* Médias seguidas de mesma letra, nas colunas não diferem entre si significativamente, em nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Sendo:

Ti = Temperatura inicial

Tp = Temperatura de pico

Tf = Temperatura final

$\Delta T = T_f - T_i$

ΔH = variação de entalpia

% R = ($\Delta H_{ret} / \Delta H_{gel}$) x 100

Nesta análise foi detectado também um segundo pico de endoterma para o amido de milho normal, referente ao complexo amilose-lipídeo. Os valores de Ti, Tp, Tf e ΔH_r foram respectivamente 81,1, 90,4, 99,2 °C e 0,99 J.g⁻¹. Após a oxidação a endoterma mostrou redução da Ti para 86,0 °C e aumento da Tp (91,1 °C), Tf (103,2 °C) e ΔH (1,1 J.g⁻¹).

No presente estudo observa-se que as temperaturas de transição para dissociação dos amidos nativos e também a entalpia (Tabela 8) foram significativamente menores que aquelas da gelatinização (Tabela 7). O mesmo foi observado por Sandhu et al. (2008) para amidos de milho normal e ceroso e em Jane et al. (1999) para os amidos de milho de alta amilose, normal, ceroso e de mandioca. Karim et al. (2000) relatam que no amido retrogradado, o valor de ΔH fornece uma medida quantitativa da energia de transformação que ocorre durante a fusão da amilopectina recristalizada, bem como medidas precisas das temperaturas de

transição deste evento. Este resultado indica que a retrogradação resulta da reassociação das moléculas de amido gelatinizado, mas de modo menos ordenado e assim, menos estável que aqueles que existem nos grânulos de amido nativo (YUAN; THOMPSON; BOYER, 1993).

Tem sido sugerido que a fração responsável pela retrogradação, quando avaliada pelo DSC, é a amilopectina (KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000). Por conseguinte, a entalpia aqui observada durante a fusão das amostras retrogradadas representa os graus relativos da retrogradação desta fração. A retrogradação da amilopectina envolve o processo de cristalização das ramificações mais externas (GP 14-18). Em contraste ao que é observado com a amilose, a cristalização da amilopectina é um processo lento, continuando ao longo de um período de vários dias ou semanas. Devido às limitadas dimensões das cadeias, a estabilidade destes cristais é menor que aquela dos cristais de amilose (KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000).

As temperaturas de transição e entalpia para retrogradação observadas para os amidos nativos no presente estudo foram diferentes dos obtidos por Jane et al. (1999) para amido de alta amilose com 70 % desta macromolécula, que foram 46,6°C (Ti), não detectado (Tp), 115,4°C (Tf) e 9,9 J.g⁻¹ (entalpia). Para amido de milho ceroso os resultados desses autores foram próximos, sendo encontrados 40,2°C (Ti), 51,3°C (Tp) e 60,2°C (Tf), exceto para a entalpia, que foi de 7,3 J.g⁻¹ (entalpia); para o amido de milho normal 39,0°C (Ti), 50,0°C (Tp), 59,4°C (Tf), 5,8 J.g⁻¹ (entalpia) e para o amido de mandioca 42,1°C (Ti), 51,2°C (Tp), 58,8°C (Tf) e 3,7 J.g⁻¹ (entalpia).

Os resultados do presente estudo também diferiram daqueles observados por Kuakpetoon e Wang (2006), onde as amostras nativas apresentaram Ti, Tp, Tf e ΔH_r , respectivamente, de 47,2, 57,1, 59,1 °C e 0,49 J.g⁻¹ para amido de alta amilose e de 44,6, 57,6, 68,7 °C e 7,36 J.g⁻¹ para milho ceroso. O amido de milho normal apresentou valores mais próximos (44,4, 54,5 65,8 °C e 6,82 J.g⁻¹, respectivamente) aos encontrados neste trabalho.

Os percentuais de retrogradação (% R) no trabalho de Jane et al. (1999) para os amidos nativos de milho de alta amilose, milho ceroso e milho normal foram de 61, 47 e 48%, respectivamente. Para o amido de mandioca esses autores encontraram 25%. E no estudo de Kuakpetoon e Wang (2006) os percentuais de retrogradação para os amidos nativos de milho de alta amilose, milho ceroso e milho normal foram de 5, 49 e 48 %, respectivamente.

Os resultados do presente estudo mostraram que os amidos de milho, exceto o de alta amilose, retrogradaram mais rapidamente do que o de mandioca. No presente estudo, a entalpia de retrogradação se correlacionou negativamente com o teor de amilose (-0,84) e, de acordo com Jane et al. (1999), a presença de lípidios e fosfolípidios nos amidos de cereais

também pode restringir o inchamento e a dispersão do grânulo de amido, acelerando a retrogradação.

As temperaturas de transição para retrogradação foram alteradas pela oxidação nos amidos de milho de alta amilose e no de mandioca, mas de modos distintos. Para o amido de alta amilose ocorreu redução da T_i e elevação da T_f , entretanto, não alterou a entalpia. Para o amido de mandioca ocorreu redução da T_i , T_p , T_f e aumento da entalpia de retrogradação.

No trabalho de Sangseethong, Lertphanich e Sriroth (2009) o amido de mandioca oxidado por hipoclorito também apresentou aumento de entalpia, justificado por duas hipóteses, a maior formação de carboxilas próximas aos pontos de ramificação da amilopectina e assim, não repeliram moléculas, ou porque a oxidação despolimeriza as moléculas de amido produzindo dextrinas de tamanhos apropriados à reassociação. O amido de mandioca oxidado no presente estudo não foi o que apresentou o maior teor de carboxilas, entretanto, pela CPG, evidenciou quebras da amilopectina e da amilose, produzindo moléculas menores, as quais poderiam se reassociar mais facilmente durante o envelhecimento. Neste amido também se constatou ~18 % de aumento da CR após a oxidação, atribuído à quebra das macromoléculas, com possibilidade de deslocamento das duplas hélices adjacentes e rearranjo nas orientações para um arranjo mais paralelo.

No presente estudo as temperaturas de transição de retrogradação se correlacionaram positivamente com os teores de amilose (T_i 0,82, T_p 0,72 e T_f 0,75) e com as cadeias de GP 25-36 (T_i 0,87, T_p 0,81 e T_f 0,86) e de $GP \geq 37$ (T_i 0,76, T_p 0,74 e T_f 0,77) e negativamente com a cristalinidade relativa (T_i -0,85, T_p -0,76 e T_f -0,72) e com as cadeias de GP 6-12 (T_i -0,80 e T_f -0,84). A variação de entalpia de retrogradação se correlacionou positivamente com a CR (0,88) e com as cadeias de GP 6-12 (0,76) e negativamente com o teor de amilose (-0,84) e com as cadeias de GP 25-36 (-0,83) e de $GP \geq 37$ (-0,77) dos amidos.

Como resultado da oxidação pelo ozônio os percentuais de retrogradação relativamente à gelatinização no presente estudo se elevaram para todos os amidos (mandioca > alta amilose > milho ceroso), exceto para o amido de milho normal, que não foi alterado.

A taxa de retrogradação está diretamente relacionada ao grau de reassociação das cadeias ramificadas muito longas da amilopectina, e inversamente relacionada à fração de cadeias ramificadas curtas com GP 6-12 (JANE et al., 1999; SINGH et al., 2003). Ou seja, amidos que apresentam maiores teores de cadeias curtas são as que apresentam menores valores de retrogradação. No presente estudo o amido de alta amilose, que apresentou os menores valores de cadeias de GP 6-12, também apresentou os menores valores de retrogradação, contradizendo os autores citados no início do parágrafo. Aqui há que se

considerar que as correlações não são simples, pois pode existir mais de um fator interferindo em uma mesma propriedade do amido.

Segundo Sandhu et al. (2008) a formação de duplas hélices (durante o armazenamento) entre moléculas adjacentes de cadeias de amilopectina dos amidos oxidados é muito mais lenta e menos extensa que no amido nativo, considerando que a cristalinidade dos grânulos é interrompida durante a oxidação, provocando maior separação entre as camadas adjacentes mais externas da amilopectina. E a introdução de vários grupos funcionais que se seguem à modificação química também impede a formação de duplas hélices por prevenir o alinhamento adequado das cadeias ramificadas mais externas da amilopectina durante o armazenamento. A oxidação converte o rearranjo das cadeias de macromoléculas para uma nova estrutura após a gelatinização, menos ordenada, e isto explica o decréscimo na entalpia de retrogradação dos amidos oxidados. Ambos os amidos de milho, normal e ceroso, mostraram menores retrogradações que seus pares nativos em Sandhu et al. (2008), possivelmente por causa da restrita possibilidade de reassociação durante o resfriamento.

4.9 Propriedades de pasta

Os perfis viscoamilográficos das suspensões dos amidos (Figura 12) apresentaram-se distintos, sendo característicos para cada fonte estudada. O amido de alta amilose (em azul) não apresentou viscosidade aparente, sendo uma característica inerente a este amido. O de milho ceroso, composto basicamente por moléculas de amilopectina empastou um pouco antes do milho normal e apresentou o maior pico de viscosidade dentre os amidos de milho, contudo, inferior ao da mandioca e com muito baixo *setback* ou tendência à retrogradação. O amido de mandioca apresentou perfil característico de amidos de raízes, com alta viscosidade de pico e elevada quebra.

Os efeitos das características estruturais sobre as propriedades de pasta de amido são bastante complexos. As propriedades de pasta do amido são afetadas pelo teor de amilose e de lípidos e pela distribuição dos comprimentos de cadeia laterais de amilopectina (JANE et al., 1999). De acordo com estes autores, no amido de milho normal, a presença de complexos amilose-lipídeo pode causar elevação da temperatura de pasta e da resistência das pastas à agitação sob altas temperaturas (quebra).

Figura 12 – Viscoamilogramas obtidos em Rapid Visco Analyser de suspensões (9,2%) de amido de milho e mandioca, antes e após a modificação por ozônio. Curvas pretas (mandioca), vermelhas (milho ceroso), verdes (milho normal), azuis (milho de alta amilose). Linhas contínuas são para os amidos nativos e as pontilhadas se referem aos tratados com ozônio

A ozonização alterou de modos distintos os perfis de viscosidade dos amidos que apresentaram esta propriedade. Isto porque o efeito da oxidação sobre as propriedades de pasta depende grandemente das características de cada amido (isto é, fonte botânica, regiões amorfas e cristalinas (CHAN et al., 2009) e razão amilose/amilopectina (ÇATAL; IBANOGLU, 2014). Os amido do milho ceroso e o de mandioca oxidados apresentaram picos mais elevados que seus pares não modificados. A viscosidade final do amido de milho ceroso, entretanto, continuou a mesma e a do amido de mandioca decresceu, pois teve maior quebra e menor tendência a retrogradar. O amido de milho normal apresentou pico e viscosidade final inferiores após a ozonização. Tais alterações podem ser melhor avaliadas pelos parâmetros críticos de viscosidade (Tabela 9).

A amilopectina contribui para o inchamento dos grânulos de amido e empastamento, enquanto a amilose inibe o intumescimento, assim como a presença de lipídeos, pois estes podem formar complexos insolúveis com algumas moléculas de amilopectina (TESTER; MORRISON, 1990). Além disso, o comprimento de cadeia da amilopectina e o tamanho molecular da amilose produzem efeitos sinérgicos sobre a viscosidade de pastas de amido (JANE; CHEN, 1992).

Tabela 9 - Propriedades de pasta (médias $\pm$ desvio padrão) das suspensões (9,2 %) de amido de milho com diversos teores de amilose e de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

		Temp. Pasta (TP) (°C)	Pico (PV) (RVU)	Quebra (QV) (RVU)	Visc. Final (VF) (RVU)	Setback (SB) (RVU)	Tempo de pico (min)
Milho alta amilose	Não oxidado	-	-	-	-	-	-
	Oxidado	-	-	-	-	-	-
Milho ceroso	Não oxidado	69,6 $\pm$ 0,02c	313 $\pm$ 3,3d	195 $\pm$ 0,0d	150 $\pm$ 1,7c	30 $\pm$ 1,8d	5,9 $\pm$ 0,03b
	Oxidado	68,8 $\pm$ 0,30d	405 $\pm$ 3,1c	274 $\pm$ 2,6c	146 $\pm$ 3,6c	14 $\pm$ 2,6e	5,6 $\pm$ 0,02bc
Milho normal	Não oxidado	72,8 $\pm$ 0,42a	277 $\pm$ 0,4e	115 $\pm$ 3,1e	292 $\pm$ 0,6a	130 $\pm$ 2,9a	8,2 $\pm$ 0,04a
	Oxidado	71,6 $\pm$ 0,56b	219 $\pm$ 0,1f	90 $\pm$ 2,4e	224 $\pm$ 0,5b	95 $\pm$ 1,7b	8,3 $\pm$ 0,03a
Mandioca	Não oxidado	63,8 $\pm$ 0,58e	476 $\pm$ 0,6b	342 $\pm$ 1,0b	229 $\pm$ 0,0b	95 $\pm$ 0,4b	5,4 $\pm$ 0,04c
	Oxidado	61,3 $\pm$ 0,52f	489 $\pm$ 9,5a	388 $\pm$ 28,1a	141 $\pm$ 26,8c	40 $\pm$ 6,2c	4,9 $\pm$ 0,02c

* Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem entre si significativamente, em nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey

O amido de milho de alta amilose não desenvolveu as propriedades de pasta. Este amido não gelatiniza completamente sob as condições de cozimento no RVA (JANE et al., 1999), devido aos teores de amilose muito elevados, os quais não contribuem para o inchamento, e, portanto, exibem muito baixa viscosidade. Neste estudo, o amido de alta amilose apresentou 60,7 % de amilose e temperaturas de gelatinização entre 71,4 e 102,9 °C quando avaliado pelo calorímetro diferencial de varredura (Tabela 7), não se gelatinizando completamente, portanto, sob as condições de temperatura em que o RVA trabalha (até 95 °C). No estudo de Song e Jane (2000) o amido de cevada com alta amilose não apresentou curva de viscosidade em viscoamilógrafo, o que foi atribuído ao baixo teor de amilopectina e à formação do complexo amilose-lípidos.

O amido de milho ceroso nativo, por apresentar quase que exclusivamente amilopectina, expandiu-se mais que os demais amidos de milho, mas não atingiu o mesmo máximo de viscosidade que o amido de mandioca e também apresentou o menor *setback*. Por praticamente não conter amilose o inchamento dos grânulos desse amido não é restringido pela formação do complexo amilose-lípido e ainda, apresentam *setback* (propriedade que reflete a formação da rede de gel de amilose) geralmente baixo (JANE et al., 1999).

O amido de milho normal apresentou a maior temperatura de pasta e o menor pico de viscosidade dentre os três que apresentaram viscosidade e, ainda, sua viscosidade final foi alta por apresentar *setback* elevado.

O amido de mandioca apresentou menor temperatura de pasta e maior expansão que os amidos de milho. Amidos de tubérculos e raízes, com menores teores de amilose dentre os normais, podem, por ter alto PV e baixa resistência ao cisalhamento (QV) em comparação com os amidos normais de cereais, apresentarem temperaturas de pasta mais baixas, menor resistência à quebra, e menor *setback* (JANE et al., 1999). Estas propriedades foram atribuídas à ausência de lípidos e fosfolipídios nos amidos de raízes e tubérculos (LIM et al., 1994).

Os maiores teores de amilose e lipídeos elevam significativamente a temperatura de pasta, decrescem o pico de viscosidade e a quebra e elevam o *setback* dos amidos. A temperatura de gelatinização de um amido se eleva com o aumento do comprimento das cadeias ramificadas. Aqueles com ombro em GP 18-21, em geral, apresentam menores temperaturas de gelatinização (JANE et al., 1999). Tais considerações explicam bem as diferenças encontradas nos diferentes amidos nativos aqui estudados.

A oxidação afetou as propriedades de pasta dos amidos. Esta é uma das propriedades mais frequentemente alteradas em processos oxidativos clássicos e nas oxidações por radiação UV (acompanhada ou não de acidificação prévia) e também pelo ozônio. Para Oladebeye et al. (2013) as propriedades de pasta dos amidos oxidados por ozônio durante 10 min de tempo de geração foram semelhantes àsquelas obtidas pelos amidos oxidados pelo método do hipoclorito alcalino convencional.

No presente estudo as alterações serão discutidas por propriedade viscoamilográfica.

Após oxidação pelo ozônio as temperaturas de pasta dos três amidos passaram a ocorrer em menores temperaturas. Tal redução foi de 4 % (mandioca) > 2 % (milho normal) e > 1 % (milho ceroso). A redução da temperatura de pasta devido à oxidação, de acordo com Lawal (2004), é consequência do enfraquecimento estrutural e da despolimerização do amido.

Assim como no presente estudo, também foram relatadas reduções na TP nos amidos de milho normal e ceroso oxidados por hipoclorito (SANDHU et al., 2008) e no amido de milho normal oxidado por hipoclorito em várias concentrações (WANG; WANG, 2003). Em outros estudos a TP se manteve inalterada após oxidação do amido de milho ceroso por hipoclorito em várias concentrações (WANG; WANG, 2003) e do amido de mandioca oxidado por ozônio (KLEIN et al., 2014). Para o amido de mandioca oxidado por ozônio em Chan et al. (2009) foi observada elevação deste parâmetro.

A viscosidade máxima ou pico de viscosidade (PV) dos amidos também foi alterada. Para o amido de milho normal houve decréscimo (20 %) do PV, assim como constatado por Sandhu et al. (2008) ao oxidarem este amido por hipoclorito.

O pico de viscosidade reflete o grau de degradação molecular ou a integridade granular do amido oxidado, pois o grânulo é tratado por calor, sob agitação mecânica (DIAS et al., 2011a; 2011b). A diminuição do pico de viscosidade do amido oxidado é atribuída à clivagem parcial de ligações glicosídicas, resultando em decréscimo da massa molecular do amido (SANDHU et al., 2008; CHAN et al., 2009). Os grânulos de amido, não tão resistentes ao cisalhamento, não mantêm sua integridade original, produzindo viscosidade inferior (ÇATAL; IBANOGLU, 2014). A presença de grupamentos carbonílicos e carboxílicos, maiores que os grupamentos hidroxilas, na estrutura granular do amido também contribui para essa diminuição (KUAKPETOON; WANG, 2001; LAWAL et al., 2005). O amido de milho normal foi o que apresentou maior teor de grupamentos carboxílicos após a oxidação pelo ozônio.

Para os demais amidos foi observada elevação do PV, sendo que para o de milho ceroso esta foi de 29 % e para o de mandioca 3 %.

Embora os amidos ligeiramente oxidados por hipoclorito de sódio tenham também apresentado picos de viscosidades mais elevados do que os não modificados no estudo de Wang e Wang (2003), os seus valores de poder de inchamento a 95 °C foram menores, particularmente para o amido de milho ceroso. Estes propõem que o amido oxidado tenha uma estrutura esponjosa, porosa, capaz de absorver água durante o aquecimento, mas não de reter a água absorvida sob centrifugação, enquanto que o amido não modificado retém a água absorvida muito mais fortemente.

O efeito da oxidação sobre a viscosidade máxima do amido pode depender da fonte do polissacarídeo e do tipo e intensidade do tratamento oxidativo. O estudo de Chan et al. (2009) constatou redução do PV para o amido de sagú tratado com ozônio nos tempos de 1 e 3 min, entretanto, maiores tempos de tratamento provocaram aumento do PV. Em contraste, estes autores observaram que o amido de mandioca oxidado apresentou aumento de PV no menor tempo de tratamento e redução aos 10 min. E, de acordo com Wurzburg (1986), quando se oxida sob baixa concentração de hipoclorito, em condições ligeiramente ácidas, ou nas fases iniciais da oxidação, por eletrólise em solução alcalina de cloreto de sódio, a viscosidade do amido se eleva. Após 0,2 equivalentes de cloro/ glucose, entretanto, a viscosidade cai continuamente. Na oxidação em condições alcalinas, os picos decrescem.

Vários estudos têm considerado as hipóteses para explicar as elevações da massa molecular ou do pico de viscosidade após o processo oxidativo. Uma maior capacidade de inchamento pode se originar da elevação do teor de carboxilas pelo processo oxidativo. De acordo com Wurzburg (1986), dentre as várias reações desencadeadas na oxidação, alguns poucos grupos dialdeídos podem ser introduzidos em quantidades traços durante a oxidação com hipoclorito e estes apresentam a capacidade de formar ligações cruzadas. Com base nisto, Wang e Wang (2003) especularam que os grupos ceto ou aldeídos de uma cadeia de amido, produzidos pela oxidação, poderiam formar estruturas acetálicas e hemiacetálicas com grupos hidroxilas das cadeias vizinhas, o que poderia ser um tipo de ligação cruzada. Tais ligações não seriam estáveis, porque são passíveis de reversão em água, embora estruturas em anéis acetálicos e hemiacetálicos sejam mais estáveis do que sob a forma de cadeias abertas. Estas ligações estabilizariam o inchamento dos grânulos e se sobreporiam aos efeitos do abaixamento pela despolimerização (SEIB, 1997 *apud* WANG; WANG, 2003). A pasta a quente desse amido com ligação cruzada poderia, entretanto, perder rapidamente a viscosidade e o amido de ligação cruzada obtido por grupos fosfatos não.

Wang e Wang (2003) avaliaram as moléculas não desramificadas do amido e a amilopectina desramificada pela isoamilase por cromatografia de troca aniônica de alta *performance* (HPSEC) dos amidos de milho normal e ceroso e observaram que estes foram degradados em grande extensão, até mesmo em baixos níveis de oxidação (hipoclorito). No entanto, ocorreram ombros na distribuição de tamanho de cadeias laterais da amilopectina para os amidos de milho ceroso oxidado a 0,75 e 1,0% de cloro ativo e especularam a possibilidade de ocorrerem ligações transversais inter-moleculares, o que resulta no aumento de massa molecular. Consideraram o que tem sido sugerido (JENKINS; DONALD, 1995; KASEMSUWAN; JANE, 1996) de que a amilose forma complexo com a amilopectina dentro da lamela cristalina. Para Wang e Wang (2003), quando amilose e amilopectina são oxidadas, principalmente os grupos carboxilas das amilopectinas, poderiam ser capazes de formar ligações hemiacetálicas com moléculas próximas, sugerindo a formação de ligações cruzadas, o que elevaria a massa molecular. As alterações por HPSEC da massa molecular das cadeias laterais da amilopectina desramificadas não foram tão evidentes como as constatadas nas moléculas não desramificadas. O comprimento médio de cadeia e a proporção de cadeias de B1 e B2 permaneceram praticamente inalterados, ao passo que a percentagem de cadeia A foi aumentada e as cadeias B3 reduzidas sob intensidades elevadas de oxidação. No presente estudo também foi verificado algo similar para o amido de milho ceroso, justamente o que teve elevação do pico em 18 %. Este amido oxidado foi também o que se mostrou mais

distinto de seu par nativo pela análise de componentes principais dos espectros de IFTR. O teor de carboxilas, embora tenha sido o segundo dentre os quatro, pode ser justificado pela maior tendência à formação destes grupos funcionais pela amilopectina.

Outros autores também apontam evidências da formação de ligações cruzadas entre as moléculas de amido. Fiedorowicz et al. (1999) observaram que entre 5 e 15 h de irradiação UV o amido de milho passou a apresentar evidências de formação de ligações cruzadas entre as moléculas. Chan et al. (2011) e Klein et al. (2014) também observaram o mesmo para amido de mandioca tratado com ozônio.

A quebra de viscosidade (QV) é uma medida da ruptura do grânulo, ou a menor habilidade do amido em resistir à força de cisalhamento durante o aquecimento. No presente estudo, a oxidação alterou a quebra de viscosidade do amido de milho ceroso e de mandioca, se elevando 40 % e 13 %, respectivamente. Para o amido de milho normal, contudo, não se alterou significativamente. Entretanto, se for considerada a proporção de quebra em relação ao pico de viscosidade (QV/PV) para cada tipo de amido, não oxidado e oxidado, os valores são de, respectivamente, 62 e 68 % para o amido de milho ceroso, 72 e 79 % para o de mandioca e 41 e 41 % para o milho normal. Isto confirma que os percentuais relativos de quebra se elevaram para o amido de milho ceroso e o de mandioca e o de milho normal não se alterou.

Na literatura, as QVs dos amidos apresentam diferentes resultados frente ao processo oxidativo. Em Sandhu et al. (2008) a quebra de viscosidade (QV) foi reduzida para o amido de milho normal oxidado, enquanto que o inverso foi observado para o milho ceroso oxidado; em Çatal e Ibanoglu (2014) a QV para o amido de trigo ozonizado também foi reduzida. Alguns estudos constataram aumento da QV após a oxidação de amidos com ozônio (AN; KING, 2009; CHAN et al., 2009; OLADEBEYE et al., 2013).

A presença de grupos funcionais também pode afetar esta propriedade. A oxidação de amido de trigo (a seco) por Sandhu, Manthey e Simsek (2012), pela exposição a 1500 mg de ozônio por quilo de amido, a uma taxa de $2,5 \text{ L.min}^{-1}$, resultou em altos teores de grupos carboxílicos nas frações de amilopectina do amido oxidado, determinados pelo teste do ácido urônico e análise por RMN de hidrogênio. As cargas negativas dos grupos carboxílicos se repelem causando elevação do inchamento dos grânulos de amido durante o aquecimento em água e subsequente elevação da quebra de viscosidade.

Em Wang e Wang (2003), quando o pH foi ajustado para 3, os perfis de viscosidade de ambos os amidos (normal e ceroso) foram similares àqueles de pH 7. Quando,entretanto, o pH foi ajustado para 11, ambos os amidos mostraram elevação da quebra e decréscimo da

viscosidade final. Tais resultados demonstram que os grupos carboxilas desempenham importante papel na formação de ligações cruzadas hemiacetálicas que colaboram na manutenção da integridade do grânulo, enquanto que os grupos carboxílicos ionizados não mostraram essa capacidade, possivelmente devido às cargas negativas causarem repulsão. De acordo com Nelson e Cox (2002), entretanto, as ligações hemiacetálicas em carboidratos se formam com os grupamentos álcool, aldeídos e cetonas, e não com carboxilas.

O *setback* (SB) indica o grau ou tendência à retrogradação do amido. Este parâmetro está mais associado à tendência à reassociação da amilose (KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000), pois esta tem maior capacidade de se reorganizar após a gelatinização do que a amilopectina, porque a amilose apresenta apenas 1 % de ligações glicosídicas alfa-(1,6), enquanto que a amilopectina apresenta cerca de 5 % (KLEIN et al., 2013). Este parâmetro é influenciado pela lixiviação da amilose, tamanho dos grânulos e presença de grânulos inchados não fragmentados (LAN et al., 2008).

O menor valor de SB foi observado para milho ceroso nativo. Do lado oposto, apresentando o maior valor de SB, está o amido de milho nativo, com o maior percentual (23 %) de amilose, dentre os amidos comuns. Após o tratamento com o ozônio o *setback* de todos os amidos estudados decresceu, sendo de 57 % (mandioca) > 53 % (milho ceroso) > 27 % (milho normal).

Reduções do *setback* também ocorreram em processos oxidativos efetuados por Kuakpetoon e Wang (2006) e Chan et al. (2009). Em Çatal e Ibanoglu (2014) menores valores de *setback* também foram observados para amido de trigo ozonizado em comparação com o nativo, sendo a redução proporcional ao tempo de ozonização. No estudo de Sandhu et al. (2008), entretanto, o SB foi elevado no amido milho ceroso oxidado.

A oxidação pode interferir na retrogradação do amido por dois mecanismos distintos, sendo o primeiro pela degradação das amilopectinas de cadeias longas, ou mesmo das moléculas de amilose das lamelas amorfas, o que produziria dextrinas com comprimentos mais adequados à reassociação. O segundo mecanismo é pela formação de grupos carboxilas ou carbonilas, o que dificultaria novas associações entre as cadeias, também reduzindo a tendência à retrogradação (KUAKPETOON; WANG, 2006). Estes mesmos mecanismos são propostos por Matsuguma et al. (2009) e por Chan et al. (2009); Oladebeye et al. (2013), respectivamente. Wurzburg (1986) também sugere que os grupos carboxilas formados nas moléculas do amido oxidado são mais volumosos que os grupos hidroxilas, resultando na redução da tendência à associação enquanto os carbonilas exercem um papel menor na prevenção da retrogradação. Entretanto, para Sangseethong, Lertphanich e Sriroth (2009),

estes dois mecanismos poderiam ter lugar simultaneamente nos grânulos de amido durante processo de modificação, assim, o mecanismo predominante determinaria o efeito predominante da oxidação nesta propriedade.

A viscosidade final (VF) foi reduzida pelo processo oxidativo dos amidos de milho normal e de mandioca, em comportamento que decorre da redução do *setback* desses amidos.

O resultado da cisão das ligações glicosídicas durante a despolimerização da amilose e da amilopectina do amido fermentado de mandioca pela oxidação com peróxido de hidrogênio diminui o poder de inchamento e a viscosidade das pastas (DIAS et al., 2011b). Estes autores atribuem a redução na viscosidade final da pasta à introdução de grupos carbonilas e carboxilas, o que outros autores também já haviam relatado para outras fontes de amido (LI; VASANTHAN, 2003; MARTINEZ-BUSTOS et al., 2007).

Havendo elevação da viscosidade das amostras oxidadas do milho ceroso e mandioca, foi considerada a hipótese da formação de ligações cruzadas, como várias pesquisas da literatura têm citado. Cabe ressaltar, entretanto, que o comportamento destes amidos para outras propriedades de pasta não é o mesmo de um amido típico com ligações cruzadas, ou seja, apresentaram elevação da quebra (ambos os amidos) e a viscosidade final não foi alterada ou foi reduzida. De acordo com Wurzburg (1986) o amido com ligação cruzada por reagentes bi ou polifuncionais, em relação ao seu par não modificado, apresenta geralmente redução do PV, maior resistência à agitação durante o aquecimento (menor QV), menor capacidade de inchamento e VF. E ainda, gera temperaturas de pasta mais elevadas (WANG; WANG, 2003).

No polvilho azedo e no amido de mandioca submetido à acidificação láctica e radiação UV, a menor viscosidade se relacionou com a elevada solubilidade dos mesmos em água quente, o que tem sido atribuída, principalmente à solubilização mais elevada da amilopectina (MESTRES; ROUAU, 1997). Segundo Vatanasuchart et al. (2003) estes tratamentos podem causar despolimerização parcial das moléculas de amilose e formar estrutura de rede por ligações de hidrogênio (FRANCO et al., 2010).

4.10 Índice de solubilidade em água e índice de absorção de água

Os índices de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA) dos grânulos de amido de milho com teores diversos de amilose e do amido de mandioca, antes e após oxidação com ozônio são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Índices médios de solubilidade (ISA) e de absorção de água (IAA) pelos grânulos dos amidos de milho com diferentes teores de amilose e de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

		IAA ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	ISA (%)
Milho alta amilose	Não oxidado	$2,3 \pm 0,00$ c	$0,14 \pm 0,02$ bc
	Oxidado	$2,5 \pm 0,05$ a	$0,62 \pm 0,30$ a
Milho ceroso	Não oxidado	$2,4 \pm 0,03$ b	$0,29 \pm 0,03$ abc
	Oxidado	$2,4 \pm 0,04$ b	$0,47 \pm 0,05$ ab
Milho normal	Não oxidado	$2,0 \pm 0,01$ e	$0,21 \pm 0,03$ bc
	Oxidado	$2,2 \pm 0,02$ d	$0,31 \pm 0,12$ abc
Mandioca	Não oxidado	$1,7 \pm 0,02$ f	$0,30 \pm 0,04$ abc
	Oxidado	$2,3 \pm 0,05$ c	$0,11 \pm 0,07$ c

* Médias seguidas de mesma letra, na vertical para IAA e ISA, não diferem entre si significativamente, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

No presente estudo os índices de absorção de água e de solubilidade em água foram avaliados nos amidos em temperatura ambiente. A absorção de água pelos grânulos de amido em temperatura ambiente decorre da difusão e absorção das moléculas de água nas regiões amorfas (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006). O índice de solubilidade em água (ISA) está relacionado à quantidade de sólidos solúveis em uma amostra seca, decorrente da severidade do tratamento químico ou físico (MERCIER; FEILLET, 1975).

Nos amidos nativos, o IAA foi maior nos amidos de milhos (ceroso > alta amilose > regular) e menor no amido de mandioca. O processo oxidativo por ozônio não alterou o IAA do amido de milho ceroso, mas elevou os IAAs dos amidos de alta amilose (8,7%), milho normal (10%) e mandioca (35%). Estes resultados apontam para uma maior ocorrência de degradação da zona amorfa, e em alguns casos, cristalina, nestes amidos, sendo novamente, o amido de mandioca o mais afetado. A maior capacidade de se ligar à água não parece decorrer da introdução de grupamentos carboxilas, pois esta não se correlacionou com o IAA.

Para os amidos nativos, o ISA foi o mais elevado para os amidos de milho ceroso e mandioca e menor para os de milho de alta amilose e o regular. Após o processo oxidativo, constata-se redução deste parâmetro para o amido de mandioca (-63 %) e elevação para o de milho de alta amilose (342 %) e também para o ceroso (62 %) e (47 %) para o amido de milho normal.

De acordo com Leonel, Martins e Mischon (2010) o ISA normalmente é utilizado para avaliar a degradação dos componentes moleculares, havendo uma relação do IAA com a disponibilidade de hidroxilas que se ligam a moléculas de água. Para Marcon et al. (2009) a interação amido-água de produtos como o polvilho azedo depende dos grupos carboxilas e hidroxilas disponíveis para formar ligações com hidrogênios livres, formando assim ligações com a água.

O ISA não se correlacionou com o teor de carboxilas e com nenhum dos parâmetros estudados. Entretanto, os percentuais de redução ou aumento com o processo oxidativo podem estar relacionados com a intensidade do processo de degradação dos componentes moleculares. Chama a atenção o percentual de aumento observado para o milho ceroso, o qual não teve afetado o seu IAA.

4.11 Transparência das pastas

A transparência/opacidade das pastas dos amidos estudados, avaliada pelo percentual de transmitância a 650 nm, é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 - Transmitância (média $\pm$ desvio padrão) das pastas dos amidos de milho com diferentes teores de amilose e de mandioca, a 1 % (p/v), antes e após o tratamento com ozônio

Transmitância (%) a 650 nm		
Milho alta amilose	Não oxidado	1,06 $\pm$ 0,05 g
	Oxidado	1,60 $\pm$ 0,00 f
Milho ceroso	Não oxidado	32,96 $\pm$ 0,15 c
	Oxidado	37,40 $\pm$ 0,00 b
Milho normal	Não oxidado	9,76 $\pm$ 0,05 d
	Oxidado	10,46 $\pm$ 0,15 e
Mandioca	Não oxidado	38,50 $\pm$ 0,12 b
	Oxidado	64,70 $\pm$ 1,48 a

* Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem entre si significativamente, em nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Dentre os amidos não oxidados do presente estudo a ordem decrescente de % T, medida indireta da claridade/opacidade das pastas, se mostrou mandioca > milho ceroso > milho normal > milho de alta amilose. A mesma ordem foi encontrada por Craig et al. (1989), embora os valores tenham sido diferentes: amido de mandioca (73 % de transmitância) > o

milho ceroso (61 %) > milho normal (41 %) > milho de alta amilose (5 %). Estes autores consideram que os amidos de mandioca e milho ceroso se dispersam quase que completamente em água quente, resultando em maior claridade de suas pastas. Já a pasta do amido de milho normal pode conter grânulos intumescidos em diferentes extensões e, quando a luz passa através destas, contendo grânulos de diferentes formas e densidades, não reflete uniformemente, não sendo clara.

A claridade da pasta correlacionou-se positivamente com o pico de viscosidade (0,89) dos amidos, mostrando que é um fator a interferir neste parâmetro. Deste modo, o amido de milho de alta amilose apresentou muito baixa transmitância (1,1 %), pelo fato de a estrutura física granular restringir o inchamento e solubilização na temperatura utilizada nesta determinação, gerando pastas muito opacas. Neste amido a luz é mais refletida ao invés de ser transmitida, resultando em menor claridade. Resultados totalmente opostos ocorreram para o amido de mandioca (38 %), que apresentou maior transmitância, ou pastas mais claras.

O tratamento oxidativo pelo ozônio elevou todos os percentuais de transmitância, em diferentes intensidades. O aumento da claridade é um comportamento desejável para determinados usos do amido, constituindo um dos objetivos desta modificação química.

A transmitância (%) das pastas dos amidos oxidados seguiu a mesma ordem dos não modificados: mandioca > ceroso > normal > alta amilose, entretanto, os aumentos percentuais de transmitância com a oxidação foram: mandioca (68 % de aumento) > milho de alta amilose (51 %) > milho ceroso (13 %) > milho normal (7 %). Esta elevação evidencia menores intensidades de reassociação molecular dos amidos oxidados se comparado com os nativos. Assim o de mandioca mostrou maior incremento de transparência e o de milho o menor. Esses resultados corroboram a pesquisa de Sandhu et al. (2008), que constataram que os amidos de milho normal e ceroso apresentaram aumento do percentual de transmitância após oxidação com hipoclorito, sendo este aumento maior para milho ceroso.

A transmitância das pastas, de acordo com Xiao et al. (2012), também está associada com a solubilidade do amido a quente. Elevada transmitância é indicativo de uma expansão mais completa dos grânulos. Estes autores atribuíram a claridade da pasta à ruptura dos grânulos de amido dilatados. No caso dos amidos oxidados, o aumento da claridade é devido à desintegração estrutural no interior dos grânulos. No presente estudo o percentual de transmitância se correlacionou com a quebra (0,96) da viscosidade ocasionada pela fragmentação granular.

O aumento da transmitância (%) após a oxidação também tem sido atribuído à substituição química dos grupos hidroxilas nas moléculas de amido por grupamentos

funcionais carbonilas e carboxilas (CRAIG et al. 1989; LAWAL, 2004). Isto faz com que haja repulsão entre as moléculas adjacentes e, aparentemente, reduzem a associação intercadeias, o que promove uma maior transmitância (LAWAL, 2004). Para Sangseethong, Lertphanich e Sriroth (2009) a presença de grupos hidrofílicos (especialmente carboxilas) nos amidos oxidados pode ser responsável por transmitâncias mais elevadas. Tais grupos são capazes de melhorar a combinação entre as moléculas de amido e as de água. No presente estudo as transmitâncias das pastas dos amidos se elevaram com a oxidação, uma vez que todos apresentaram grupamentos carboxilas, entretanto, o teor destes grupamentos não se correlacionou com o aumento da transmitância.

O amido de milho normal apresentou o segundo menor valor de transmitância, mostrando-se opaco. Além de não expandir muito, este amido apresenta lipídeos em sua composição. De acordo com Craig et al. (1989) a presença de fosfolipídeos nos amidos de cereais podem reduzir a claridade da pasta por reduzir sua capacidade de intumescimento.

4.12 Fator de inchamento dos grânulos

O fator de inchamento dos grânulos dos amidos de milho e do amido de mandioca, antes e após oxidação com ozônio (Tabela 12) foi avaliado a 95 °C a fim de se verificar sua correspondência com a capacidade de expansão no forno, uma vez que o amido primeiramente é pré-gelatinizado com água fervente, para formação da massa.

Tabela 12 - Fatores de inchamento a 95°C (médias $\pm$ desvio padrão) dos grânulos do amido de milho de diferentes teores de amilose e de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

		Fator de inchamento
Milho alta amilose	Não oxidado	6,79 $\pm$ 0,32 f
	Oxidado	3,85 $\pm$ 0,13 g
Milho ceroso	Não oxidado	28,37 $\pm$ 0,02 b
	Oxidado	21,32 $\pm$ 0,04 c
Milho normal	Não oxidado	20,43 $\pm$ 0,06 d
	Oxidado	17,42 $\pm$ 0,06 e
Mandioca	Não oxidado	30,03 $\pm$ 0,05 a
	Oxidado	6,42 $\pm$ 0,10 f

* Médias seguidas de mesma letra, na vertical não diferem entre si significativamente, em nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O fator de inchamento foi mais elevado para os amidos nativos de mandioca e milho ceroso e menor para o de alta amilose. De acordo com Singh et al. (2003) a ação da amilose

no comportamento de gelatinização do amido é ao mesmo tempo diluente e inibidor do inchamento. O baixo fator de inchamento para o amido de alta amilose está relacionado com alta temperatura de gelatinização. Esse amido não apresentou intumescimento ou aumento de viscosidade devido ao denso empacotamento de suas moléculas.

Todas as amostras apresentaram redução do fator de inchamento após a ozonização, entretanto, a mais pronunciada foi no amido de mandioca (79 %), possivelmente pela intensidade da degradação das moléculas de amilose e amilopectina. Para o amido de milho de alta amilose foi de 43 %, para o ceroso de 25 % e para o normal de 15 %. Esta redução indica enfraquecimento da estrutura granular pelo processo oxidativo, inibindo o seu intumescimento. O mesmo foi observado por Lawal et al. (2005), que constataram redução no poder de expansão de amidos de híbridos de milho, justificada pela desintegração estrutural no interior do grânulo pelo hipoclorito de sódio.

O fator de inchamento correlacionou-se negativamente com o teor de amilose absoluta (-0,75) e cadeias muito longas ($GP > 37$) (-0,71). Por isto o amido de milho de alta amilose inchou menos.

Os efeitos dos processos oxidativos sobre o inchamento dos grânulos (não exclusivamente o fator de inchamento, mas também o poder de inchamento) na literatura são bastante divergentes. A oxidação do amido de taro por hipoclorito de sódio reduziu o poder de inchamento na temperatura de 95°C e melhorou a solubilidade do amido (LAWAL, 2004). Oladebeye et al. (2013) constataram elevação do poder de inchamento para amidos de inhame ozonizados, mas que nem sempre foram proporcionais ao aumento do tempo de geração de ozônio. Sandhu et al. (2008) compararam variedades de milho oxidados por hipoclorito com seus pares não modificados. No estudo destes autores o amido milho ceroso modificado apresentou menor poder de inchamento e entalpia de gelatinização, porém maior viscosidade de pasta e o amido oxidado de milho normal mostrou redução da viscosidade de pasta. A diferença entre estes resultados foi justificada pelo fato deste último ser mais suscetível à oxidação, por causa da linearidade da amilose. Ao oxidarem amidos de milho, mandioca e sagú por tempos de geração de até 10 min e de exposição de 10 min, Chan, Bhat, Karim (2009) constataram despolimerização e degradação da amilose, o que influenciou o inchamento dos grânulos, pois puderam absorver água mais facilmente, e inchar. Isto também elevou a solubilidade dos amidos de mandioca oxidados em relação ao não oxidado.

No estudo de Wang e Wang (2003) o poder de inchamento (95 °C) dos amidos oxidados de milho comum e ceroso foi reduzido. Na fase inicial de oxidação, a amilose foi preferencialmente hidrolisada, e o poder de expansão aumentou em 75 e 85°C. No entanto,

quando a amilopectina foi hidrolisada, o amido perdeu a capacidade de reter a água absorvida, especialmente a 95°C. Segundo Tester e Morrison (1990) a amilopectina contribui para o empastamento dos grânulos de amido, enquanto que a amilose e lípidos inibem o inchamento. Os resultados de Wang e Wang (2003) também suportam a hipótese de Jenkins e Donald (1995), que a amilose isoladamente não teria exercido impacto tão significativo no inchamento do amido, mas distribuída aleatoriamente rompe o empacotamento da lamela cristalina por co-cristalizar com a amilopectina. Por ser longa, sua estrutura se estende por várias lamelas cristalinas, reforçando a integridade do amido (quando associada com a amilopectina).

4.13 Capacidade de expansão da massa amido/água durante o cozimento ao forno

A capacidade de expansão da massa dos amidos estudados, avaliada pelo volume de expansão é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13 - Volume de expansão da massa amido/água dos amidos de milho com diferentes teores de amilose e de mandioca, antes e após o tratamento com ozônio

Volume de expansão (mL.g ⁻¹)		
Milho alta amilose	Não oxidado	1,70 ± 0,020 e
	Oxidado	1,58 ± 0,062 e
Milho ceroso	Não oxidado	8,42 ± 0,210 c
	Oxidado	10,45 ± 0,530 b
Milho normal	Não oxidado	1,56 ± 0,005 e
	Oxidado	1,49 ± 0,700 e
Mandioca	Não oxidado	4,08 ± 0,000 d
	Oxidado	11,43 ± 0,520 a

* Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem entre si significativamente, em nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey

A capacidade de expansão pode ser avaliada pela medida de volume de uma massa de polvilho azedo e água, após escaldamento e forneamento sob condições pré-definidas, sendo aplicado inicialmente para avaliar a propriedade de expansão do polvilho azedo (CEREDA, 1983). A literatura cita expansão ao forno para amido de mandioca tratado com ácido e radiação UV (BERTOLINI; MESTRE; COLONNA, 2000; BERTOLINI et al., 2001a; VATANASUCHART et al., 2003; VATANASUCHART et al., 2005), por tratamento ácido e secagem ao sol (PLATA-OVIEDO; CAMARGO, 1998), por tratamento com peróxido de

hidrogênio (APLEVICZ; DEMIATE, 1997; DIAS et al., 2011b, DIAS et al., 2007) e por tratamento com hipoclorito (DIAS et al., 2011a). Nenhum estudo foi encontrado, entretanto, correlacionando capacidade de expansão e tratamento por ozônio. Também foi encontrado trabalho (SHIRAI et al., 2007) mostrando aumento na capacidade de expansão de amido de milho ceroso oxidado com peróxido de hidrogênio.

Os volumes de expansão dos amidos nativos estudados foram superiores aos obtidos por Shirai et al. (2007) no amido de mandioca e ceroso e semelhante para o de milho normal, onde os valores foram de, respectivamente, 2,1, 5,1 e 1,5 mL.g⁻¹. No presente estudo, destaca-se a elevada expansão do amido de milho ceroso nativo ao forno (8,4 mL.g⁻¹). Após o tratamento com ozônio observou-se elevação considerável da expansão no forno para os amidos de milho ceroso e de mandioca. O volume de expansão após oxidação do amido de mandioca foi superior ao obtido para o amido de milho ceroso. O percentual de aumento também foi maior para o amido de mandioca, considerando que o do amido ceroso já apresentava certa expansão quando nativo, seu aumento de volume não foi tão elevado quanto ao do amido de mandioca.

No estudo de Shirai et al. (2007), após o processo oxidativo com peróxido de hidrogênio os amidos de amido de mandioca, milho normal e milho ceroso passaram a apresentar volumes específicos de, respectivamente, 9,2, 2,3 e 11,5 mL.g⁻¹. No estudo de Franco et al. (2010) as massas preparadas com amidos nativos de mandioca e de milho não mostraram capacidade de expansão no assamento, apresentando volumes específicos muito baixos (2,35 e 1,21 mL/g, respectivamente). As massas preparadas com amido de mandioca e de milho tratados com ácido láctico e radiação UV apresentaram 8,08 e 1,33 mL.g⁻¹, respectivamente e aquelas preparadas com amostras de polvilho azedo comercial apresentaram aparência inflada, estrutura alveolar, crosta crocante e alto volume específico (12,10 e 13,05 mL/ g) (FRANCO et al., 2010).

De acordo com os trabalhos de Bertolini, Mestre e Colonna (2000) e Bertolini et al. (2001a) o processo de expansão do polvilho azedo em altas temperaturas é similar ao observado em amidos extrusados, onde a força de expansão da massa deve-se primeiramente à pressão de vapor causada pelo aquecimento da água presente, seguido da formação de uma rede com baixa permeabilidade na superfície da massa e das modificações nas propriedades termodinâmicas da massa.

O amido de milho ceroso foi o único a apresentar capacidade de expansão mais significativa enquanto no estado nativo. Em processo de extrusão, visando a expansão de materiais amiláceos, Mercier e Feillet (1975) constataram que um teor elevado de

amilopectina conduziu às texturas expandidas leves, elásticas e homogêneas, enquanto que os de alta amilose estão associados a extrusados mais duros e menos expandidos. Os amidos ricos em amilopectina expandem mais do que os amidos a base de amilose porque as cadeias lineares deste polímero se alinham no campo de cisalhamento e, assim, são difíceis de separar durante a expansão.

Dias et al. (2007) avaliaram a capacidade de expansão do amido de mandioca e milho tratados com peróxido de hidrogênio (2,5 %) e exposição solar (8 h), após diferentes tempos de fermentação (0 a 50 dias). A capacidade de expansão do amido de milho oxidado dos diversos tratamentos não foi satisfatória, mas a do amido de mandioca, após o 10º dia de fermentação, seguido de tratamento UV ou químico, passou a apresentar aumento desta capacidade. Após 50 dias de fermentação, seguido de tratamento químico, o volume de expansão desse amido atingiu $15,04 \text{ mL.g}^{-1}$, superior ao do amido com tratamento UV.

Bertolini, Mestre e Colonna (2000), Bertolini et al. (2001a) e Vatanasuchart et al. (2003) relataram que no processo de oxidação do amido de mandioca ocorre despolimerização parcial das moléculas de amilose, formando uma estrutura de rede ligada através de interações de hidrogênio. De acordo com Alvarado et al. (2013) as propriedades de expansão dos amidos de massa molecular reduzida são melhoradas, pois durante o processo de gelatinização possibilitam colapso mais intenso dos grânulos e, conseqüentemente, melhor formação de filmes, os quais envolvem as bolhas de vapor de água, auxiliando o crescimento da massa. Segundo Bertolini et al. (2000) a expansão das massas pode estar relacionada com a reassociação das macromoléculas (amilose e amilopectina) parcialmente degradadas na região amorfa.

No presente estudo foram constatadas importantes alterações no amido de mandioca, o amido que mais se expandiu. Foi o que apresentou as maiores reduções de massa molecular, detectado pela cromatografia de permeação em gel. O amido de milho ceroso, embora não tenha se evidenciado grandes alterações pelo CPG, foi o único a apresentar alteração nas classes de distribuição de tamanho da amilopectina.

Para Vatanasuchart et al. (2003) a despolimerização parcial da amilose e da amilopectina permite a formação de uma estrutura em rede com ligações de hidrogênio, a qual seria mais acessível à absorção de água. Machado, Araujo, Pereira, (2010) relatam que no processo de obtenção da massa o escaldamento inicia o processo de gelatinização, causando alterações sutis na cristalinidade das amostras, sugerindo gelatinização parcial dos grânulos. Bertolini et al. (2001a) atribuíram a expansão à pressão exercida pelo vapor de água, e à baixa viscosidade da massa, que reduz a força necessária para expandir as bolhas na massa. A

expansão no forno seria produzida pela formação de uma estrutura matricial amorfa com ligações de hidrogênio (VATANASUCHART et al., 2003). No caso do amido de milho normal, a alta temperatura de gelatinização e a baixa capacidade de intumescimento diminuíram a viscosidade do amido, evitando assim a capacidade de expandir desse amido. Para Vatanasuchart et al. (2005) o amido despolimerizado, apresenta baixa viscosidade e isso facilitaria o crescimento da massa. Segundo estes autores, entretanto, quando a degradação é demasiadamente intensa as paredes da bolha perdem sua integridade mais cedo, se rompendo sob tensões mais baixas, sem causar expansão dos amidos tratados com energia de alta intensidade.

Um modelo de expansão da massa ao forno foi proposto por Fan, Mitchell, e Blanshard (1999), com os estágios do crescimento das bolhas no fluido viscoso. Ou seja, à medida que a viscosidade aumenta, a correspondente pressão interna da bolha aumenta dramaticamente e isso dá origem a maiores tensões de tração na superfície celular, o que resulta em ruptura das células no final do crescimento no forno.

A correlação de Pearson não foi significativa entre o volume de expansão e o teor de carboxilas para os amidos estudados. De acordo com Demiate et al. (2000) os grupos carboxilas dos amidos de mandioca modificados por tratamento químico oxidativo estão relacionados com a expansão da massa durante o assamento. Tavares et al. (2010) constataram que as farinhas de arroz oxidadas por peróxido de hidrogênio após acidificação tiveram despolimerização das moléculas de amilose e de amilopectina, produzindo teores mais elevados de carboxilas e carbonilas nos amidos de baixo teor de amilose (11,86 %) que nos de alto (30,57 %) e médio (23,06 %) teores, promovendo a capacidade de expansão unicamente na farinha de baixo teor de amilose.

Vatanasuchart et al. (2005) constataram que as T_i e T_p de gelatinização do amido de mandioca se elevaram pelo tratamento com ácido láctico e radiação UVBA (280- 420 nm), UVB ou UVC por 9 ou 15 h. Este aumento foi atribuído à maior estabilidade da estrutura cristalina induzida pela modificação ocorrida. Neste mesmo trabalho a entalpia de transição não foi afetada pelos tratamentos e o HPSEC indicou que as moléculas de amilose (principalmente) e amilopectina foram degradadas pela radiação UVB e UVC por períodos de 7 e 9 h, de modo a proporcionar a expansão no forno. As alterações estruturais pela radiação UV podem ter proporcionado pequenos fragmentos lineares que facilitaram a formação da estrutura de matriz amorfa da massa de amido durante o forneamento e, conseqüentemente, uma boa expansão. O amido tratado por 15 horas (tempo prolongado) não expandiu.

A análise de regressão linear múltipla para estimativa do volume específico, ou poder de expansão, das amostras de milho e mandioca é apresentada na Tabela 14, gerando a equação (Eq. 11) por *stepwise*.

Tabela 14 - Modelos de regressão linear múltipla para prever o volume de expansão (VE) por procedimento *stepwise* a partir de análises físicas e físico-químicas dos amidos de milho com teores de amilose distintos e do amido de mandioca

Variável	Parâmetro estimado	Desvio Padrão	P > F ¹	R ² da variável
Intercepção	-5,29251	2,60334	0,1312	
Entalpia de Gelatinização	0,26860	0,09882	0,0216	0,7171
Teor de carbonilas	6,96678	1,70899	0,0022	0,9083
Fator de Inchamento	-0,14100	0,00529	<0,0001	0,9376
Teor de carboxilas	-20,83613	1,40083	<0,0001	0,9600
Quebra de viscosidade	0,01053	0,0003	<0,0001	0,9890
<i>Setback</i>	-0,03588	0,00316	<0,0001	0,9971
Cristalinidade Relativa	0,30253	0,01453	<0,0001	0,9988
GP 25-36	-0,15361	0,04744	0,0089	0,9994
GP ≥ 37	0,16712	0,05005	0,0075	0,9996
GP médio	-0,25614	0,12424	0,0662	0,9998

Expansão no forno = - 5,293+ 0,269 Entalpia de Gelatinização + 6,967 Carbonila - 0, 141 fator de inchamento - 20,836 carboxila + 0,011 Quebra de viscosidade - 0,036 *Setback* + 0,303 Cristalinidade Relativa - 0,154 GP 25-36 + 0,167 GP≥37 - 0,256 GP médio. (11)

O crescimento da massa está relacionado com a diferença entre a pressão interna do fluido inicialmente e a pressão externa da bolha, sendo que é a pressão interna que fornece a força motriz para o crescimento. No entanto, esta é apenas a força motriz inicial. Uma vez que a bolha começa a crescer, esta pressão irá mudar. De acordo com Qin e Khayat (2002) a pressão na bolha irá depender da massa do material, da temperatura e do tamanho da bolha. Outro fator é o efeito da viscoelasticidade sobre o crescimento da bolha. Além da viscoelasticidade, a viscosidade do material é também importante, especialmente a viscosidade de alongamento, uma vez a deformação da bolha é essencialmente biaxial. Para Fan, Mitchell e Blanshard (1999) um dos fatores importantes no crescimento da massa em

sistema panar é a resistência que a viscosidade da massa oferece. Massas com menores viscosidades apresentariam velocidade de crescimento maior.

Segundo Hailemariam, Okos e Campanella (2007) a resistência inercial da massa é importante na formação da bolha é de grande importância, pois está ligada ao crescimento ordenado da bolha ou o colapso da mesma. De acordo com Fan, Mitchell e Blanshard (1994) o crescimento dessa massa irá cessar após alcançar a transição vítrea. Segundo Eliasson (2006), a transição de vidro do amido só irá ocorrer após a fusão do cristalito durante a gelatinização. De acordo com esses autores, a massa forneada irá crescer até alcançar sua transição vítrea, onde a mudança de estado irá diminuir sua mobilidade cessando o crescimento das bolhas internas da massa. Esse crescimento está relacionado com a força exercida pelo vapor de água para vencer a resistência oferecida pela viscosidade da massa. Assim o crescimento está relacionado com a capacidade desta massa liberar o vapor de água, esse vapor encontrar resistência inicial, que consiga manter a estrutura da bolha, que tenha inercia baixa. E que consiga fundir a região cristalina com maior dificuldade, para que a massa tenha mais tempo de expandir antes que seja alcançada a transição vítrea.

Esse comportamento é semelhante ao modelo sugerido pelo *stepwise*, onde a expansão foi influenciada pelo aumento da entalpia de gelatinização e da cristalinidade relativa, fatores estes associados à transição vítrea da massa. E a quebra de viscosidade e o fator inchamento estariam relacionados com a resistência inercial oferecida pela da massa.

A massa do amido de mandioca oxidado no presente trabalho apresentou a maior expansão em forno, também apresentou maior entalpia de gelatinização (possibilitando maior tempo para alcançar a transição vítrea). A capacidade de intumescimento e a quebra de viscosidade sugerem que este amido apresentou estrutura mais frágil após a gelatinização, e conseqüentemente, viscosidade menor, característica essa que facilitaria o crescimento da massa, por ter resistência inercial menor.

No presente estudo a primeira variável do *stepwise* a alterar o volume de expansão (de modo diretamente proporcional) foi a entalpia de gelatinização. Marcon et al. (2009) observaram o mesmo efeito após fermentação e secagem solar do amido de mandioca, onde houve redução da entalpia de gelatinização de modo diretamente proporcional à sua capacidade de expansão no forno. Outras constatações daqueles autores foram os padrões de raios-X não alterados, mas com algumas diferenças na intensidade dos picos, evidenciando modificações estruturais. Estes autores consideraram ainda que os parâmetros físico-químicos estudados foram insuficientes para estabelecer uma boa correlação com as propriedades de expansão, sugerindo que um modelo de comportamento deva ser desenvolvido, considerando

em conjunto, os parâmetros volume específico, acidez, grau de polimerização, pH e número de grupos carboxílicos e carbonílicos.

No estudo de Mestres et al. (1996) o potencial de expansão do amido de mandioca fermentado e exposto à secagem solar se correlacionou com o aumento da tendência à retrogradação (*setback*) e com a redução da viscosidade máxima.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O amido de milho de alta amilose nativo apresentou alto teor de amilose (61 % de amilose e 39 % de amilopectina), sendo parte destas macromoléculas alguns componentes de tamanhos intermediários. Mostrou um ombro bem próximo ao pico na distribuição por tamanho de cadeias de amilopectina e apresentou, relativamente aos demais amidos, a maior proporção de cadeias ramificadas muito grandes de amilopectina, o menor CR, as maiores temperaturas de transição e menores variações de entalpia de gelatinização e de retrogradação, além de não gelatinizar nas temperaturas utilizadas no Rapid Visco Analyser (baixo intumescimento), e por isto mesmo, foi a pasta menos clara. A oxidação desse amido de milho de alta amilose elevou seus teores de carbonila (maior teor dentre os amidos), de carboxila (menor teor dentre os amidos) e de amilose aparente e absoluta (redução de amilopectina). Como este amido apresentou um CR baixo relativamente aos demais amidos, permitiu certa despolimerização e/ou desramificação da amilopectina em intermediários e amilose, ou de intermediários a amilose (CPG), provavelmente pela ação sobre a zona amorfa. Com a redução desta, ocorreu acréscimo da zona cristalina (~ 8 % de aumento do CR). Porque suas lamelas amorfas, pela literatura, são menores que as dos demais milhos, a oxidada pode não ter sido mais intensa. O amido também teve sua TiG, TpG e ΔH_G reduzidas, entretanto, a característica de expansão no forno não foi adquirida.

O amido nativo de milho ceroso se caracterizou por apresentar 3 % de amilose e 97 % de amilopectina (tendo cadeias desramificadas de menor massa molecular que a do amido de alta amilose), a maior CR (~44 %), as maiores entalpias de gelatinização e retrogradação e, considerável capacidade de expandir ao forno. Após a oxidação este amido foi o único a se separar, ou se mostrar distinto, pela análise quimiométrica dos espectros de infravermelho por transformada de Fourier, do amido original, não oxidado. Não apresentou carbonilas, mas seu teor de carboxilas foi alto e seu teor de amilose (determinado analiticamente) se manteve constante, contudo, pela CPG houve uma pequena diminuição da intensidade do pico da amilopectina, macromolécula que, pela cromatografia de troca aniônica, teve alteração na distribuição das classes de tamanho. Neste amido, as quebras incidiram sobre a amilopectina, justificada pela alteração das classes de GP, ou seja, as cadeias B3 se quebraram e as B1 foram elevadas. As quebras de B3 e, possivelmente da B2 para formarem B1, porém, podem ocorrer na amilopectina da região amorfa, onde passam, mas também poderiam ocorrer na região cristalina, em menor intensidade. Como houve redução da região amorfa relativamente à região cristalina, isto justificaria a elevação da CR em ~8 %. Nas propriedades térmicas de

gelatinização teve apenas redução da T_i e na de retrogradação em nenhuma temperatura de transição ou entalpia. A sua viscosidade máxima foi elevada pela oxidação, sugerindo a possibilidade de ligações cruzadas mais fracas que aquelas obtidas por modificação química por agentes polifuncionais. Outra possível explicação seria que a introdução de grupos carboxilas, com suas cargas negativas, que se repelem, poderia provocar aumento do PV, por permitir maior interação entre as moléculas do amido e a água, e também do QV. O seu percentual de retrogradação, contudo, se elevou em 17 %, a transmitância (claridade) de sua pasta se elevou em 61 % e sua capacidade de expansão no forno passou para 10,4 mL.g⁻¹.

O amido nativo de milho normal apresentou teor de amilose de 24 %, maior proporção de cadeias laterais curtas que longas de amilopectina, formação de complexo amilose-lipídeo. Sua CR foi intermediária, apresentou menores temperaturas de transição para gelatinização, embora mais elevadas temperaturas de pasta. Após a oxidação este amido passou a apresentar o segundo menor teor de carbonilas e o maior de carboxilas, o teor de amilose se elevou (e, portanto, o de amilopectina diminuiu). Embora pela cromatografia de troca aniônica, as proporções das classes de tamanhos das cadeias de amilopectina não passaram por alterações significativas, pela CPG houve redução da massa molecular tanto da amilopectina como da amilose. Assim, ambas as regiões parecem ter sido atacadas, sendo esperada uma redução da entalpia, mas a presença de complexos amilose-lipídeos pode ter influenciado não permitindo alteração da entalpia após a oxidação. Sua CR foi reduzida em 5 %, bem como sua viscosidade máxima, embora suas temperaturas de transição e entalpia e % de retrogradação não tenham sido alterados. O percentual de transmitância da pasta se elevou em 41 %. A massa deste amido oxidado não adquiriu a capacidade de expansão em forno.

O amido nativo de mandioca se caracterizou por apresentar 19 % de amilose, sendo esta macromolécula de massa molecular mais elevada relativamente aos demais amidos, pois eluiu em volume menor. Apresentou ombro em sua distribuição de tamanho de cadeias laterais de amilopectina. Sua CR foi intermediária (33 %), bem como sua ΔH_G e ΔH_R . Apresentou a maior transparência de pasta. Após o processo oxidativo, este amido passou a apresentar teores intermediários de carbonilas e de carboxilas. Seu teor de amilose determinado analiticamente se manteve constante após oxidação. As cadeias da amilopectina não tiveram alteração na proporção das classes de tamanho pela cromatografia de troca aniônica, contudo apresentaram redução do GP maior da amilopectina (pico 2) (Figura 9). Observa-se pela CPG, contudo, que este amido oxidado apresentou uma redução da intensidade do pico de amilopectina, que eluiu em volumes maiores, e também um deslocamento mais intenso do segundo pico (BV) pela CPG, evidenciando redução da massa

molecular da amilose. Além das quebras nas regiões amorfas, para este amido possivelmente tenham ocorrido quebras na amilopectina gerando cadeias menores, as quais permitem uma melhor reassociação e formação de duplas hélices, o que justificaria a elevação da cristalinidade relativa em 18 % e de ter sido a única fonte em que houve aumento da ΔH_G . Suas propriedades térmicas de gelatinização evidenciaram mesmas temperaturas de transição. As temperaturas de transição na retrogradação foram todas reduzidas e a ΔH_R elevada, bem como o percentual de retrogradação, que foi engrandecido em 92 %. Sua viscosidade máxima também foi elevada, a exemplo do ocorrido com o amido de milho ceroso. Sua claridade de pasta foi elevada em 73 % e sua capacidade de expansão no forno (volume específico) passou a ser $11,4 \text{ mL.g}^{-1}$, um pouco mais elevado que para o milho ceroso. Este amido foi o que evidenciou as alterações mais intensas com o processo oxidativo.

6 CONCLUSÕES

A oxidação por ozônio se mostrou branda considerando os espectros obtidos para a ressonância magnética nuclear e por infra vermelho com transformada de Fourier. A oxidação, contudo, se mostrou efetiva em alterar diversas propriedades e funcionalidades dos diversos amidos de milho e do amido de mandioca, sendo tais alterações distintas para as diferentes fontes. Tais diferenças decorrem de serem amidos com composição e estrutura granular diferenciadas, promovendo diferentes taxas de degradação das lamelas amorfas e cristalinas e da presença de grupos carbonilas e carboxilas formados.

A análise quimiométrica dos espectros de infra vermelho por transformada de Fourier para os amidos estudados destacou apenas a oxidação do amido de milho ceroso com resultados mais distintos do original. A maior parte dos parâmetros avaliados, contudo, evidenciou maiores alterações para o amido de mandioca.

Considerando a proposta da modificação por oxidação, o ozônio no presente estudo causou redução de viscosidade apenas para o amido de milho normal. Os de milho ceroso e de mandioca tiveram sua viscosidade elevada. Todos os amidos tiveram elevação da claridade das pastas. O *setback* foi reduzido nos três amidos (milho ceroso, milho normal e mandioca).

A ozonização do amido causou alterações no amido de milho ceroso e no de mandioca, de modo a evidenciarem capacidades de expansão próximas àquelas de amostras comerciais de polvilho azedo. Os demais amidos não se expandiram significativamente ao forno. Esta propriedade foi afetada principalmente pelas propriedades relacionadas com o empastamento do amido, notadamente pela variação de entalpia de gelatinização, mas também pelo teor de carboxilas e de carbonilas, cristalinidade relativa e tamanho das cadeias ramificadas de amilopectina (cadeias B2 e B3 e tamanho médio).

REFERÊNCIAS

- ALVARADO, P. M.; GROSMIRE, L.; DUFOUR, D.; TORO, A. G.; SANCHEZ, T.; CALLE, F.; SANTANDER, M. A. M.; CEBALLOS, H.; DELARBRE, J. L.; THIERRY, T. Combined effect of fermentation, sun-drying and genotype on breadmaking ability of sour cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 98, p. 1137– 1146, 2013.
- AMORIM, C.C.; LEÃO, M. M. D.; MOREIRA, R. F. P. M. M. Comparação entre diferentes processos oxidativos avançados para degradação de corante azo. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 54, p. 543-550, 2009.
- AMORIM, E. O. C.; DOVAL, V. C.; CRISTIANINI, M. Effect of ozonation on the sensory characteristics and pasting properties of cassava starch. **Procedia Food Science**, Barking, v. 1, p. 914-919, 2011.
- AN, H. J.; KING, J. M. Using ozonation and amino acids to change pasting properties of rice starch. **Journal of Food Science**, Oxford, v. 74, p. 278-283, 2009.
- APLEVICZ, K. S.; DEMIATE, I. M. Caracterização de amidos de mandioca nativos e modificados e utilização em produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 478-484, 2007.
- ARTS, S. J. H. F.; MOMBARG, E. J. M.; VAN BEKKUM, H.; SHELDON, R. A. Hydrogen peroxide and oxygen in catalytic oxidation of carbohydrates and related compounds. **Synthesis**, Bucarest, v. 6, p.597–613, 1997.
- BABA, T.; YAMAMOTO, T.; ARAI, Y.; YOKOTA, M.; ITOH, T. Starch biosynthesis of amylomaize during endosperm development. **Phytochemistry**, New York, v. 20, p.1513-1517, 1981.
- BELLO-PÉREZ, L. A.; MONTEALVO, M. G. M.; ACEVEDO, E. A. Almidón: definición, estructura y propiedades. In: LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. **Carbohidratos em alimentos regionales iberoamericano**. São Paulo: Edusp, 2006. cap. 1, p. 17-46.
- BERTOLINI, A. C.; MESTRES, C.; COLONNA, P. Rheological properties of acidified and UV-irradiated starches. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 52, p. 340–344, 2000.

- BERTOLINI, A. C.; MESTRES, C.; LOURDIN, D.; VALLE, G. D.; COLONNA, P. Relationship between thermomechanical properties and baking expansion of sour cassava starch (polvilho azedo). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, p. 429-435, 2001a.
- BERTOLINI, A.C.; MESTRES, C.; RAFFI, J.; BULE, A.; LERNER, D.; COLONNA, P. Photodegradation of cassava and corn starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 675-682, 2001b.
- BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 69, p. 60 -78, 1991.
- BLAZEK, J.; GILBERT, E.P. Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 85, p.281-293, 2011.
- BRAGD, P. L.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H. Bromide-free TEMPO-mediated oxidation of primary alcohol groups in starch and methyl α -d-glucopyranoside. **Carbohydrate Research**, Barking, v. 328, p. 355-362, 2000.
- BULEON, A.; COLONA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Mini review starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 23, p. 85–112, 1998.
- CAEL, S. J.; KOENIG, J. L.; BLACKWELL, J. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates: Part III: raman spectra of the polymorphic forms of amylose. **Carbohydrate research**, Barking, v. 29, p. 123-134, 1973.
- CAEL, S. J.; KOENIG, J. L.; BLACKWELL, J. Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates. Part VI: Normal coordinate analysis of V-amylose. **Biopolymers**, Weinheim, v. 14, p. 1885-1903, 1975
- CAMARGO, C.; COLONNA, P.; BULÉON, A.; RICHARD-MOLAR, D. Functional properties of sour cassava (*Manihot utilissima*) starch: Polvilho azedo, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 45, p.273-289, 1988.

ÇATAL, H.; İBANOĞLU, Ş. Effect of aqueous ozonation on the pasting, flow and gelatinization properties of wheat starch. **LWT-Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 59, p. 577-582, 2014.

CAUVAIN, S. P. Breadmaking processes. In: CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **Technology of breadmaking**. Springer, New York, p. 21-50, 2007. 420 p.

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

CEREDA, M. P. (Ed.). **Propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, 2001. v. 1, 224 p. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas).

CEREDA, M. P. Padronização para ensaios de qualidade da fécula fermentada (Polvilho azedo). I. Formulação e preparação de biscoitos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, p. 287-295, 1983.

CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. C.; VILPOUX, O.; NUNES, O. L. G. S. Biotecnologia industrial. In: _____. **Modificação de fécula por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher. 2001. p . 413-460.

CERNÁ, M.; BARROS, A.S.; NUNES, A.; ROCHA, S.M.; DELGADILLO, I.; COPÍKOVÁ, J.; COIMBRA, M. A. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 51, p. 383–389, 2003.

CHAN, H. T.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Physicochemical and functional properties of ozone-oxidized starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 5965-5970, 2009.

CHAN, H. T.; LEH, C. P.; BHAT, R.; SENAN, C.; WILLIAMS, P. A.; KARIM, A. A. Molecular structure, rheological and thermal characteristics of ozone-oxidized starch. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, p. 1019-1024, 2011.

CHATTOPADHYAY, S.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Optimisation of conditions of synthesis of oxidised starch from corn and amaranth for use in film-forming applications. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 34, p. 203-212, 1997.

CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 36, p. 277-284, 1998.

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

CRAIG, S. A.; MANINGAT, C. C.; SEIB, P. A.; HOSENEY, R. C. Starch paste clarity. **Cereal Chemistry**, Saint Paul v. 66, p. 173-182, 1989.

DELVAL, F.; CRINI, G.; BERTINI, S.; MORIN-CRINI, N.; BADOT, P. M.; VEBREL, J.; TORRI, G. Characterization of crosslinked starch materials with spectroscopic techniques. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 93, p. 2650-2663, 2004.

DEMIATE, I. M.; DUPUY B. N.; HUVENNE, J. P.; CEREDA M. P.; WOSIACKI, G. Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 42, p. 149-158, 2000.

DIAS, A. R. G.; ELIAS, M. C.; OLIVEIRA, M.; HELBIG, E. Oxidação dos amidos de mandioca e de milho comum fermentados: desenvolvimento da propriedade de expansão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 794-799, 2007.

DIAS, A. R. G.; ZAVAREZEA, E. R.; ELIAS, M. C.; HELBIG, E.; SILVA, D. O.; CIACCO, C. F. Pasting, expansion and textural properties of fermented cassava starch oxidized with sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 84, p. 268–275, 2011a.

DIAS, A. R. G.; ZAVAREZEA, E. R.; HELBIG, E.; MOURA, F. A.; VARGAS C. G.; CIACCO, C. F. Oxidation of fermented cassava starch using hydrogen peroxide. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 86, p. 185-191, 2011b.

DING, W.; WANG, Y.; ZHANG, W.; SHI, Y.; WANG, D. Effect of ozone treatment on physicochemical properties of waxy rice flour and waxy rice starch. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 50, p. 744-749, 2015.

DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-353, 1956.

ELIASSON, A. C. **Starch in food – Structure, function and applications**. New York: Boca Raton, CRC, 2004. 605p.

ELIASSON, A. N.; GUDMUNDSSON, M. Starch: Physicochemical and functional aspects. In: ELIASSON, A.N. (Ed.) **Carbohydrates in food**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. chap. 9, p. 391-469.

FAN, J.; MITCHELL, J. R.; BLANSHARD, J. M. V. A computer simulation of the dynamics of bubble growth and shrinkage during extrudate expansion. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 23, p. 337-356, 1994.

FAN, J.; MITCHELL, J. R.; BLANSHARD, J. M. V. A model for the oven rise of dough during baking. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 41, p. 69-77, 1999.

FARLEY, F. F.; HIXON, R. M. Oxidation of raw starch granules by electrolysis in alkaline sodium chloride solution. **Industrial and Engineering Chemistry**, Washington, v. 34, p. 677-681, 1942.

FERRINI, L. M. K.; ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M., FRANCO, C. M. L. Effect of acid-methanol treatment on the physicochemical and structural characteristics of cassava and maize starches. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 60, p. 417-425, 2008.

FIEDOROWICZ, M.; TOMASIK, P.; SANGGUAN, Y.; SEUNG, T. L. Molecular distribution and pasting properties of UV-irradiated corn starches. **Starch/Stärke**, Weinheim v. 51, p. 126–131, 1999.

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

FRANCO, C. M. L.; OGAWA, C.; RABACHINI, T.; ROCHA, T. S.; CEREDA, M. P.; JANE, J. L. Effect of lactic acid and UV irradiation on the cassava and corn starches. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, p. 443-454, 2010.

- FRANCO, C. M. L.; WONG, K. S.; YOO, S. AND JANE, J., Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, Saint Paul v. 79, p. 243-248, 2002b.
- FRENCH, D. Organization of starch granules. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHAL, E. F. **Starch: Chemistry and Technology**. London: Academic Press. 1984. p. 183-247.
- GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 32, p. 177-191, 1997.
- GARCIA, M. C.; FRANCO, C. M. L. Effect of glycerol monostearate on the gelatinization behavior of maize starches with different amylose contents. **Starch/Starke**, Weinheim, v. 67, p. 107-116, 2015.
- GENKINA, N. K.; WIKMAN, J.; BERTOFT, E.; YURYEV, V. P. Effects of structural imperfection on gelatinization characteristics of amylopectin starches with A- and B-type crystallinity. **Biomacromolecules**, Washington, v. 8, p. 239-2335, 2007.
- GÉRARD, C.; BARRON, C.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V. Amylose determination in genetically modified starches. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 44, p. 19-27, 2001.
- GIBSON, T. S.; SOLAH, V. A.; MCCLEARY, B. V. A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. **Journal of Cereal Science**, London, v. 25, n. 2, p. 111-119, 1997.
- HAILEMARIAM, L.; OKOS, M.; CAMPANELLA, O. A mathematical model for the isothermal growth of bubbles in wheat dough. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 82, p. 466-477, 2007.
- HANASHIRO, I.; ABE, J.; HIZUKURI, S. A. Periodic distribution of chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. **Carbohydrate Research**, Barking, v. 283, p. 151-159, 1996.
- HIZUKURI, S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. **Carbohydrate Research**, Barking, v. 147, p. 342-347, 1986.

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

HIZUKURI, S.; KANEKO, T.; TAKEDA, Y. Measurement of the chain length of amylopectin and relevance to the origin of crystalline polymorphism of starch granules. **Biochemical and Biophysical Acta**, Barking, v. 760, p. 188–191, 1983.

HOIGNÉ, J.; BADER, H. The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. **Water Research**, Barking, v. 10, p. 377-386, 1976.

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

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

HOOVER, R.; ZHOU, Y. In vitro and in vivo hydrolysis of starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes - a review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 54, p. 401-417, 2003.

HUANG, Z. Q.; LU, J. P.; LI, X. H.; TONG, Z. F. Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 68, p. 128-135, 2007.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: Métodos físicos e químicos para análises de alimentos, São Paulo, 2008. v. 1, 1020p.

JANE, J. Starch: Structure and properties. In: TOMASIK, P. (Ed.). **Chemical and functional properties of food saccharides**. Boca Raton: CRC Press, 2004. chap. 7, p. 81-101.

JANE, J. Structural features of starch granules II. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. (Ed.). **Starch**: chemistry and technology. 3. ed. Burlington: Academic Press, 2009. chap. 6, p. 193-236.

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

- JANE, J.; CHEN, Y. Y.; LEE, L. F.; McPHERSON, A. E.; WONG, K.S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAN, T. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 76, p. 629-637, 1999.
- JENKINS, P. J.; DONALD, A. M. The influence of amylose on starch granule structure. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 17, p. 315-321, 1965.
- JODELET, A.; RIGBY, N. M.; COLQUHORIN, I. J. Separation and NMR structural characterization of singly branched α -dextrins which differ in the location of the branch point. **Carbohydrate Research**, Barking, v. 312, p. 139-151, 1998.
- JULIANO, B. O. A simplified assay for milled-rice amylose. **Cereal Science Today**, Minneapolis, v. 16, p. 334-340, 1971.
- KAJIWARA, K.; MIYAMOTO, T. Progress in structural characterization of functional polysaccharides. In: DUMITRIU, S. (Ed.). **Polysaccharides**. New York: Marcel Dekker Inc., 1998. p. 1-40.
- KARIM, A. A., NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, Barking, v. 71, p. 9-36, 2000.
- KASEMSUWAN, T., JANE, J., SCHNABLE, P., STINARD, P., ROBERTSON, D. Characterization of the dominant mutant amylase-extender (Ael-5180) maize starch. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.75, p.457-464, 1995.
- KASEMSUWAN, T.; JANE, J. L. Quantitative method for the survey of starch phosphate derivatives and starch phospholipids by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 73, p. 702-707, 1996.
- KLEIN, B.; PINTO, V. Z.; VANIERA, N. L.; ZAVAREZE, A. R.; COLUSSIA, 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 pinhão starches. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 98, p. 1578-1584, 2013.
- KLEIN, B.; VANIER, N. L.; MOONMAND, K.; PINTO, V. Z.; COLUSSI, R.; ZARAVEZE, R. E. R.; DIAS, A. R. G. Ozone oxidation of cassava starch in aqueous solution at different pH. **Food Chemistry**, Barking, v. 155, p. 167-173, 2014.

KORTSTEE A. J.; SUURS L. C. J. M.; VERMEESCH, A. M. G.; KEETELS C. J. A. M.; JACOBSEN E.; VISSER R. G. F. The influence of an increased degree of branching on the physicochemical properties of starch from genetically modified potato. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 37, p.173-184, 1998.

KUAKPETOON, D.; WANG, Y. J. Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. **Starch/Stärke**, Weinheim v. 53, p. 211-218, 2001.

KUAKPETOON, D.; WANG, Y. J. Structural characteristics and physicochemical properties of oxidized corn starches varying in amylose content. **Carbohydrate Research**, Barking, v. 341, p. 1896-1915, 2006.

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

KUHNEN, S. **Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* L.)**. 2007. 243 p. Tese de Doutorado. Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

LAN, H.; HOOVER, R.; JAYAKODY, L.; LIU, Q.; DONNER, E.; BAGA, M.; ASARE, E. K.; HUCL, P.; CHIBBAR, R. N. Impact of annealing on the molecular structure and physicochemical properties of normal, waxy and high amylose bread wheat starches. **Food Chemistry**, Barking, v. 111, p. 663–675, 2008.

LAWAL, O. S. Composition, physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidized, acetylated and acid-thinning new cocoyam starch. **Food Chemistry**, Barking, v. 87, n. 2, p. 205-218, 2004.

LAWAL, O. S.; ADEBOWALE, K. O.; OGUNSANWO, B. M.; BARBA, L. L.; ILO, N. S. Oxidized and acid thinned starch derivatives of hybrid maize: functional characteristics, wide-angle X-ray diffractometry and thermal properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 35, p. 71-79, 2005.

LEONEL, M.; MARTINS, J. C.; MISCHAN, M. M. Produção de *snacks* funcionais à base de farinha de soja e polvilho azedo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1418-1423, 2010.

- LI, J. H.; VASANTHAN, T. Hypochlorite oxidation of field pea starch and its suitability for noodle making using an extrusion cooker. **Food Research International**, Essex, v. 36, p. 381-386, 2003.
- LIM, S. T.; KASEMSUWAN, T.; JANE, J. L. Characterization of phosphorous in starch by p-31 nuclear magnetic-resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 71, p. 468-472, 1994.
- LINKO, Y.Y.; VUORIEN, H.; OLKKU, J.; LINKO, P. The effect of HTST on retention of cereal alfa-amylase activity and enzymatic hydrolysis of barley starch. In: LINKO, P.; LARINKARI, J. (Eds.). **Food processing engineering**. London: Elsevier Applied Science, 1980. v. 2, p. 210-223.
- LIU, H.; YU, L.; XIE, F.; CHEN, L. Gelatinization of cornstarch with different amylase/amylopectin content. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 65, p. 357–363, 2006.
- MACHADO, A. V.; ARAUJO, F. M. M. C.; PEREIRA, J. Efeito do escaldamento nas propriedades microscópicas e de cristalinidade do polvilho azedo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa**, Mossoró, v. 5, p. 169-174, 2010.
- MARCON, M. J. A.; KURTZ, D J .; RAGUZZONI, J. C.; DELGADILLO, I.; MARASCHIN, M.; SOLDI, V.; REGINATTO, V.; AMANTE, E. R. Expansion properties of sour cassava starch. Variables related to its practical application in bakery. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 61, p. 716–726, 2009.
- MARTÍNEZ-BUSTOS, F.; AMAYA-LLANO, S. L.; CARBAJAL-ARTEAGA, J. A.; CHANG, Y. K.; ZAZUETA-MORALES, J. J. Physicochemical properties of cassava, potato and jicama starches oxidized with organic acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 1207-1214, 2007.
- MASSCHELEIN, W. J.; BLAICH, L.; LANGLAIS, B.; THIEBEN, E.; BELL, J.; READING, A. Ozone science and engineering special issue on quality assurance in ozone practice. **Ozone Science & Engineering**, Cincinnati, v. 20, p. 433-437, 1998.
- MATSUGUMA, L. S.; LACERDA, L. G.; SCHNITZLER, E.; CARVALHO, M. A. S. F.; FRANCO, C. M. L.; DEMIATE, I. M. Characterization of native and oxidized starches of two varieties of peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*, B.) from two production areas of

Paraná state, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 701-713, 2009.

MERCIER, C.; FEILLET, P. Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 52, n. 3, p. 283-297, 1975.

MESTRES, C.; ROUAU, X. Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 74, p. 147-155, 1997.

MESTRES, C.; ROUAU, X.; ZHAKIA, N.; BRABET, C. Physicochemical properties of cassava sour starch. In: DUFOUR, D.; O'BRIEN, G. M. (ED). **Cassava flour and starch: progress in research and development**. Cali: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1996. Cap 17. p. 143-149.

MOORTHY, S. N. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches. A review. **Starch/Starke**, Weinheim, v.54, p.559-592, 2002.

MUNHOZ, M. P.; WEBER, F. H.; CHANG, Y. K. Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, p. 403-406, 2004.

NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the relationship between water saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 35, p. 407-410, 1983.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger-Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

NEWTON, J. M.; PECKHAM, G. T. J. Oxidation of starch. In: KERR, R. W. **Chemistry and industry of starch**. New York: Academic Press, 1944. p. 325-343.

OLADEBEYE, A. O.; OSHODI, A. A.; AMOOB, I. A.; ALIAS ABD KARIM, A. A. Functional, thermal and molecular behaviours of ozone-oxidised cocoyam and yam starches. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, p. 1416–1423, 2013.

OTT, M.; HESTER, E. E. Gel formation as related to concentration of amylose and degree of starch swelling. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 42, p. 476-484, 1965.

PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch/ Stärke**, Weinheim, v. 62, p. 389-420, 2010.

PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology International**, London, v. 12, p. 505-513, 2006.

PLATA-OVIEDO, M.; CAMARGO, C. Effect of acid treatments and drying processes on physico-chemical and functional properties of cassava starch. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v. 77, p. 103-108, 1998.

QIN, X.; KHAYAT, R. Influence of non-isothermal fluid properties on the growth of spherical fluid shells. **International Journal of Numerical Methods for Heat and Fluid Flow**, Bingley, v. 12, p. 142–162, 2002.

ROCHA, T. S.; FELIZARDO, S. G.; JANE, J.; FRANCO, C. M. L. Effect of annealing on the semicrystalline structure of normal and waxy corn starches. **Food Hydrocolloids**, Barking, v. 29, p. 93-99, 2012.

ROCHA, T. S.; CUNHA, V. A. G.; JANE, J.; FRANCO, C. M. L. Structural characterization of peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) starch and the effect of annealing on its semicrystalline structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 4208-4216, 2011.

RUTENBERG, M. W.; SOLAREK, D. Starch derivatives: production and uses. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. **Starch chemistry and technology**. New York: Academic Press .1984. p. 311-388.

SANDHU, H. P. S.; MANTHEY, F. A.; SIMSEK, S. Ozone gas affects physical and chemical properties of wheat (*Triticum aestivum* L.) starch. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, p. 1261-1268, 2012.

SANDHU, K.S.; KAUR, M.; SINGH, N.; LIMA, S. T. A. Comparison of native and oxidized normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. **Lwt-Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 41, p. 1000–1010, 2008.

SANGSEETHONG, K.; LERTPHANICH, S.; SRIROTH, K. Physicochemical properties of oxidized cassava starch prepared under various alkalinity levels. **Starch/ Stärke**, Weinheim, v. 61, p. 92–100, 2009.

SANGSEETHONG, K.; TERMVEJSAYANON, N.; SRIROTH, K. Characterization of physicochemical properties of hypochlorite- and peroxide-oxidized cassava starches. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, p. 446-453, 2010.

SCHOCH, T. J. Iodometric determination of amylose, potentiometric titration: standard method. In: WHISTLER, R.L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. Starch. New York: Academic Press, 1964a. v. 4. p. 106-109.

SHI, Y. C.; CAPITANI, T.; TRZASKO, P.; JEFFCOAT, R. Molecular structure of a low-amylopectin starch and other high-amylose maize starches. **Journal of Cereal Science**, London, v. 27, p. 289-299, 1998.

SHIRAI, M. A.; HAAS, A.; FERREIRA, F.; MATSUGUMA, L. S.; FRANCO, C. M. L.; DEMIATE, I. M. Características físico-químicas e utilização em alimentos de amidos modificados por tratamento oxidativo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 239-247, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, R. M.; FRANCIS, X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 387p.

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

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, Barking, v. 81, p. 219-231, 2003.

SMITH, R. J. Characterization and analysis of starches. In: WHISTLER, R. L.; PASCHALL, E. F. **Starch: chemistry and technology**, New York: Academic Press. pp. 620-625, 1967.

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

SOUZA, B. M. **Avaliação de processos oxidativos avançados acoplados com carvão ativado granulado com biofilme para re-uso de efluentes de refinaria de petróleo.** 2010. 160p. Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2010.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **SAS/ INSIGHT.** User's guide. Versão 9.2 - versão para Windows. Cary: SAS Institute, 2004/2008.

TAKEDA, C.; TAKEDA, Y.; HIZUKURI, S. Structure of the amylopectin fraction of amylomaize. **Carbohydrate Research**, Barking, v. 246, p. 273-281, 1993.

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

TAVARES, A. C. K.; ZANATTA, E.; ZAVAREZE, E. R., HELBIG, E.; DIAS, A. R. G. The effects of acid and oxidative modification on the expansion properties of rice flours with varying levels of amylose. **Food Science and Technology**, London, v. 43, p. 1213-1219, 2010.

TEIXEIRA, C.; JARDIM, W. F. Processos oxidativos avançados: conceitos teóricos. **Caderno Temático.** Campinas, V. 3. 2004. Disponível em: <http://lqa.iqm.unicamp.br>. Acessado em: 29 jul. 2012

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

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

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. **Practical for guides the food industry – Starch.** Saint Paul: Eagan Press, 1999.94 p.

TIZZOTTI, M. J.; SWEEDMAN, M.; TANG, D.; SCHAEFER, C.; GILBERT, R. G. New ¹H NMR procedure for the characterization of native and modified food-grade starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 6913-6919, 2011.

TORNEPORT, L. J.; SALOMONSSON, B. A. C.; THEANDER, O. Chemical characterization of bromide oxidized potato starch. **Starch/ Stärke**, Weinheim, v. 42, n. 11, p. 413-417, 1990.

VATANASUCHART, N., NAIVIKUL, O.; CHAROENREIN, S.; SRIROTH, K. Effects of different UV irradiations on properties of cassava starch and biscuit expansion. **Kasetsart Journal Natural Science**, Bangkok v. 37, p. 334 – 344, 2003.

VATANASUCHART, N.; NAIVIKUL, O.; CHAROENREIN, S.; SRIROTH, K. Molecular properties of cassava starch modified with different UV irradiations to enhance baking expansion. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 61, p. 80-87, 2005.

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water. Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, Barking, v. 37, p. 1443-1467, 2003.

WANG, Y. J.; WANG, L. Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 52, p. 207–217, 2003.

WANG, Y. J.; WHITE, P.; POLLAK, L.; JANE, J. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh43 inbred line background. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 70, p. 171-171, 1993.

WANG, Y.; HOLLINGSWORTH, R. I.; KASPER, D. L. Ozonolytic depolymerization of polysaccharides in aqueous solution. **Carbohydrate Research**, Barking, v. 319, p. 141–147, 1999.

WEBER, F.H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 748-753, 2009.

WHISTLER. R.L.; LINKE, E.G.; KAZENIAC, S. Action of alkaline hypochlorite on corn starch amylose and methyl 4-O-methyl-d-glucopyranoside. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 78, p. 4704–4709, 1956.

WING, R. E., WILLETT, J. L. Water soluble oxidized starches by peroxide reactive extrusion. **Industrial Crops and Products**, Barking, v. 7, p. 45-52, 1997.

WING, R. E. Oxidation of starch by thermochemical processing. **Starch/ Stärke**, Weinheim, v. 46, p. 414-418, 1994.

WORD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION (United States). Ronald Peter Wilhelmus Kesselmans, Ido Pieter Bleeker. **Method for oxidizing dry starch using ozone.** WO/1997/032902. 04. Mar.1997. 12. Set. 1997.

WURZBURG, O. B. **Modified starches: properties and uses.** Boca Raton: CRC Press, 1986. 277 p.

XIAO, H.; LIN, Q.; LIU, G. Q. Effect of cross-linking and enzymatic hydrolysis composite modification on the properties of rice starches. **Molecules**, Barking, v. 17, p. 8136-8146, 2012.

YUAN, R. C.; THOMPSON, D. B.; BOYER, C. D. Fine structure of amylopectin in relation to gelatinization and retrogradation behavior of maize starches from three wx-containing genotypes in two inbred lines **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 70, p. 81-89, 1993.

ZHANG, Y. R.; WANG, X. L.; ZHAO, Z. M.; WANG, Y. Z. Preparation and properties of oxidized starch with high degree of oxidation. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, p. 2554– 2562, 2012.

ZHU, Q.; BERTOFT, E. Enzymatic analysis if the structure of oxidized potato starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxford, v. 21, p. 131-135, 1997.

ZOBEL, H. F. X-ray analysis of starch granules In: WHISTLER, R. L. (Ed.). **Methods in carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1964. v. 4, chap. 29, p. 109-143.