Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Síntese e caracterização da carboximetil amilopectina com vários graus de substituição”

André Riul

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Síntese e caracterização da carboximetil amilopectina com vários graus de substituição”

André Riul

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química

Orientadora: Prof. Dra. Laura Tiemi Okano

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Riul, André

Síntese e caracterização da carboximetil amilopectina com vários graus de substituição. - Ribeirão Preto, SP, 2013.

101 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Okano, Laura Tiemi.

1. Carboximetil amilopectina.
2. Amido.
3. Grau de substituição.
4. Tipo de substituintes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tornar menos penoso todos os meus caminhos. E que ao fim da minha jornada, que eu possa ter um espírito mais evoluído em amor e sabedoria.

A minha família, pela constante dedicação, carinho e apoio. Gostaria de agradecer também minha namorada Aline pelo amor, paciência e companheirismo durante todos esses anos.

A professora Laura Tiemi Okano, pela orientação, amizade e apoio. E por contribuir na minha formação como pessoa.

Aos professores Luis Gustavo Dias, Ana Paula Ramos, Luiz Alberto Beraldo, Pietro Ciancaglini, Maria Elisabete Darbello Zaniquelli e Paulo Marcos Donate, por serem muito solícitos quanto ao compartilhamento dos equipamentos utilizados neste trabalho e acima de tudo, pelo conhecimento transmitido.

Agradeço também aos técnicos, Lourivaldo do DFRX, Rodrigo do MEV, Mércia do HPLC e Janaína pelos trabalhos realizados que tanto auxiliaram na conclusão deste projeto.

As amigas Ana Paula Ferranti Peti e Ana Flávia Canovas Martinez pelo auxílio e ajuda nas análises de LC-MS, além da amizade e solidariedade demonstradas.

Aos colegas do laboratório LSO, Jader Barbosa, Pedro H., Daniel P., Marcos Pinatto e ao amigo Paulo Siani, por não pouparem esforços como ouvintes e amigos.

E por fim, quero agradecer a Aline Brito, Patrícia Lorencini, Bianca Maniglia, João Paulo San Gregório, Roberta Lopes e Julianas Higino e Raveli pelo apoio e amizade.

Senhor: Fazei de mim um instrumento de vossa Paz.

Onde houver Ódio, que eu leve o Amor,

Onde houver Ofensa, que eu leve o Perdão.

Onde houver Discórdia, que eu leve a União.

Onde houver Dúvida, que eu leve a Fé.

Onde houver Erro, que eu leve a Verdade.

Onde houver Desespero, que eu leve a Esperança.

Onde houver Tristeza, que eu leve a Alegria.

Onde houver Trevas, que eu leve a Luz!

Ó Mestre,

fazei que eu procure mais:

consolar, que ser consolado;

compreender, que ser compreendido;

amar, que ser amado.

Pois é dando, que se recebe.

Perdoando, que se é perdoado e

é morrendo, que se vive para a vida eterna!

Amém

Oração de São Francisco de Assis

"Nenhum homem alguma vez atingiu sucesso valioso quem não tenha, uma vez ou outra, se encontrado com pelo menos um pé balançado bem em cima da beira do fracasso."

Napoleon Hill

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
1. Introdução.....	1
1.1 Amido.....	3
1.1.1 <i>Composição, estrutura e propriedades</i>	3
1.1.2 <i>Reações químicas</i>	8
1.1.2.1 <i>Carboximetil amido</i>	9
1.2 Potencial zeta.....	11
1.2.1 <i>Potencial isoelétrico (PIE)</i>	14
1.3 Espalhamento de luz.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1 Materiais.....	20
3.1.1 <i>Biopolímeros</i>	20
3.1.2 <i>Solventes e Reagentes</i>	20
3.2 Métodos.....	21
3.2.1 <i>Síntese da carboximetil amilopectina (CMAm)</i>	21
3.2.2 <i>Determinação do grau de substituição (GS) por titulação condutimétrica</i>	22
3.2.3 <i>Hidrólise das amostras para análise cromatográfica</i>	23
3.2.4 <i>Determinação dos substituintes carboximetílicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)</i>	23
3.2.5 <i>Determinação do grau de substituição por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	24
3.2.6 <i>Medidas de potencial zeta e espalhamento de luz</i>	25
3.2.7 <i>Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	26
3.2.7.1 <i>Microscopia óptica</i>	26
3.2.7.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	26
4. Resultados e Discussão.....	27
4.1 Planejamento sintético.....	28
4.2 Determinação do grau de substituição (GS) por condutimetria.....	32

4.3	Caracterização e determinação do grau de substituição por HPLC e LC-MS.....	37
4.3.1	<i>Determinação dos substituintes carboximetílicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS).....</i>	38
4.3.2	<i>Determinação do grau de substituição por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....</i>	43
4.4	Perfil das reações de carboximetilação.....	46
4.5	Análise dos tipos de substituintes carboximetílicos.....	49
4.6	Medidas de potencial zeta e espalhamento de luz.....	61
4.6.1	<i>Determinação do ponto isoelétrico (PIE).....</i>	61
4.6.2	<i>Determinação do raio hidrodinâmico (Rh).....</i>	63
4.7	Microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV).....	70
4.7.1	<i>Microscopia óptica.....</i>	70
4.7.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	76
5.	Conclusões.....	80
6.	Referencia Bibliográfica.....	83
7.	Anexos.....	93
7.1	Anexo I.....	94
7.2	Anexo II.....	98

RESUMO

RIUL, A. **Síntese e Caracterização da Carboximetil Amilopectina com Vários Graus de Substituição**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química - Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O amido, encontrado abundantemente na natureza, é formado por dois polímeros: a amilopectina e a amilose. Ambos polímeros possuem excelentes qualidades industriais tais como, a biodegradabilidade e o baixo custo de obtenção. Entretanto, a amilopectina possui baixa solubilidade em solução aquosa. Para expandir a gama de aplicações deste polímero como, por exemplo, a produção de filmes biodegradáveis solúveis em água e que possam ser usados como revestimento de proteção no transporte de alimentos, ainda se faz necessário alguns estudos. Um deles é tentar correlacionar como a funcionalização do seu esqueleto polimérico pode afetar a reação de formação destes filmes. Neste sentido, o objetivo desta Dissertação de Mestrado foi estudar a síntese da carboximetil amilopectina (CMAm) variando-se a pressão, temperatura e razão entre água e solvente orgânico. Sintetizamos várias CMAm a partir da amilopectina de milho ceroso, por meio de uma reação heterogênea utilizando hidróxido de sódio e ácido cloroacético. Empregou-se uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e água como solvente, com uma proporção variável entre 0 a 50% de água, para as pressões ambiente (758,3 mmHg) e reduzida (80 ± 20 mmHg) e para as temperaturas 70 e 80 °C. Para cada uma das condições sintéticas estudadas, obtivemos CMAm com graus de substituição (GS) diversos. Os GS foram determinados por titulações condutimétricas com hidróxido de amônio e para as amostras sintetizadas com 0 a 40% de água foram confirmados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), obtendo-se uma boa correlação entre estes valores (R^2 de 0,94263). Atribuiu-se os picos referentes às estruturas monossobstituídas (2-; 3- ou 6-mono-*O*-carboximetil glicose), dissobstituídas (2,3-; 2,6- ou 3,6-di-*O*-carboximetil glicose) e trissobstituídas (2,3,6-tri-*O*-carboximetil glicose) por meio da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). A síntese realizada a 70 °C, pressão reduzida apresenta uma distribuição de CMAm substituída mais homogênea do que as demais condições sintéticas estudadas. Por medidas de potencial zeta em função do pH, determinaram-se para as CMAm de GS 0,86 e 0,43 o ponto isoelétrico no pH de 3,6 e 4,6; respectivamente. O espalhamento estático de luz mostrou que a funcionalização da amilopectina com grupos carboximetílicos levou a abertura da sua estrutura inicial, extremamente ramificada, permitindo a formação de agregados maiores em solução aquosa para as amostras sintetizadas a 80 °C sob pressão reduzida. Em contraste, as sínteses a 70 °C nas pressões ambiente e reduzida provocaram uma diminuição no tamanho dos agregados em solução aquosa em função do GS. Por fim, a análise por microscopia ótica e eletrônica de varredura dos filmes de CMAm sintetizadas neste trabalho mostraram que são totalmente dependentes do GS, tipo de substituinte e o tamanho dos agregados em solução aquosa.

PALAVRAS-CHAVE: Carboximetil amilopectina, grau de substituição, tipo de substituintes, filmes.

ABSTRACT

RIUL, A. **Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Amylopectin with Several Degrees of Substitution.** 2013. 101 f. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química - Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Starch is abundant in nature and composed by two polymers: amylopectin and amylose. Both biopolymers have excellent industrial characteristics, such as biodegradability and low cost. However, amylopectin has a very low solubility in aqueous solution. In order to expand the uses this biopolymer, for instance, the production of aqueous soluble and biodegradable films for food packing, there are still many open fields to study. One of them is to find the correlation between how the functionalization of the polymer backbone can affect the film formation process. For this reason, the goal of this work was to study the synthesis of carboxymethyl amylopectin (CMAM) varying the employed pressure, temperature and the ratio of water and organic solvent. Several CMAM were synthesized using amylopectin from maize, by means of an heterogeneous reaction using sodium hydroxide and chloroacetic acid. We have used a mixture of dimethyl sulfoxide (DMSO) and water as reaction solvent with variable ratio of 0 to 50% of water, employed ambient (758,3 mmHg) or reduced (80 ± 20 mmHg) pressure and temperatures of 70 and 80 °C. The degree of substitution (DS) were determined for every synthetic condition studied in this work. The DS were determined through conductometric titration with ammonium hydroxide. The DS of the samples synthesized with 0 to 40% of water, were confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC), with good correlation between these values (R^2 of 0,94263). The peaks of the monosubstituted structures (2-, 3- ou 6-mono-*O*-carboxymethyl glucose), disubstituted (2,3-, 2,6- ou 3,6-di-*O*-carboxymethyl glucose) e trisubstituted (2,3,6-tri-*O*-carboxymethyl glucose) were attributed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). The synthesis made at 70 °C, reduced pressure, showed a more even distribution of substituted CMAM than the other synthetic conditions analyzed in this work. The isoelectric point of CMAM of DS of 0.86 and 0.43 were determined by zeta potential as function of pH. They were, respectively of pH 3.6 and 4.6. The static light scattering showed that the functionalization of the amylopectin with carboxymethyl groups has opened the initial branched polymer backbone, for samples synthesized at 80 °C under reduced pressure, forming large aggregates in aqueous solution. On the other hand, the synthesis at 70 °C at ambient and reduced pressures has caused a reduction of the aggregates sizes in aqueous solution as function of increasing DS. The optic and electronic scan microscopies of the CMAM films showed that they are completely dependent on DS, sort of substituents and sizes of the aggregates in aqueous solution.

KEYWORDS: Carboxymethyl amylopectin, degree of substitution, sort of substituent, films.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA: acetato de celulose
CAB: acetato butirato celulose
CAP: acetato ftalato de celulose
CAS: acetato succinato de celulose
CMAm: carboximetil amilopectina
CMC: carboximetil celulose
CTA: triacetato de celulose
DLS: espalhamento dinâmico de luz
DMSO: dimetil sulfóxido
EC: etil cellulose
ESI+: ionização por electrospray no modo positivo
ESI-: ionização por electrospray no modo negativo
GS: grau de substituição
HEC: hidroxietil cellulose
HPC: hidroxipropil celulose
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
HPMC: (hidroxipropil)-metil-celulose
LC-MS: cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa
MC: metil celulose
PIE: potencial isoelétrico
R_h: raio hidrodinâmico
UAG: unidade de anidro glicose

1. Introdução

1. Introdução

Atualmente, a preservação do meio ambiente impulsionou vários esforços para a utilização de matérias primas biodegradáveis e não tóxicas. Em outras palavras, materiais que possam ser degradados por meio de micro-organismos e enzimas (Oromiehie, Lari & Rabiee, 2013) e, portanto, evitam o aumento da poluição prejudicial aos diversos ecossistemas. Neste contexto, os biopolímeros, como celulose ou amido e seus derivados, são compostos químicos apropriados para substituir os polímeros sintéticos de difícil degradação, como as poliolefinas (polietileno, polipropileno e poliestireno) que se tornaram tão importante para o dia a dia (Vieyra, Aguilar-Mendez & Martin-Martinez, 2013). No cotidiano encontramos ainda a utilização do politereftalato de etileno (PET), poli(metacrilato de metila) (PMMA) e o politetrafluoretileno (PTFE) que não são biodegradáveis. Estes três últimos polímeros, na ausência de estabilização por aditivos, podem levar anos para serem degradados se estiverem submetidos somente à exposição à luz solar na presença de oxigênio (Fechine, dos Santos & Rabello, 2006). Por outro lado, há estudos na literatura que investigaram se misturas de plásticos como o polietileno de baixa densidade com amido (El-Rehim, Hegazy, Ali, & Rabie, 2004) ou celulose (Kaczmarek & Oldak, 2006), podem torná-los mais biodegradáveis. Estes estudos indicam que a presença do amido favorece a biodegradabilidade do material, enquanto a celulose não exibe tanta sinergia. A literatura também relata a obtenção bem sucedida de blendas de polímeros sintéticos com amido, que possuem um maior grau de biodegradação, diretamente relacionado com o teor do biopolímero (Shi, Shlepr & Palfery, 2011; Roy, Ramaraj, Shit, & Nayak, 2011). Hoje, encontra-se estudo que relata a evolução da biodegradação de misturas de polietileno-amido através de microscopia eletrônica de varredura (Vieyra et al., 2013).

Biopolímeros podem ser utilizados em aplicações médicas como implantes, suturas e carreadores de fármacos. São importantes como materiais mistos, compostos pela mistura de duas ou mais fases. Estes compostos híbridos podem substituir metais em várias aplicações da engenharia, tendo como vantagem a redução do peso do material, com simultâneo ganho de melhorias das propriedades mecânicas, como descrito no estudo de compostos de polietileno de baixa densidade combinado com amido de milho (Oromiehie et al., 2013).

1.1 Amido

1.1.1 *Composição, estrutura e propriedades*

O amido é sintetizado pelas plantas como reserva energética, sua estrutura é granular semicristalina. Quando observados em microscópio óptico e expostos à luz polarizada, os grânulos de amido apresentam birrefringência (luz de malta). O tamanho e a forma dos grânulos variam de acordo com a espécie e a maturidade da planta fonte (Tester, Karkalas, & Qi, 2003). Do ponto de vista econômico, o amido possui um alto valor agregado e baixo custo de obtenção. Os diferentes padrões e composições do amido influenciam fortemente o seu potencial para ser utilizado como agente espessante ou ligante na indústria (Jobling, 2004; Kurakake, Hagiwara & Komaki, 2004; Liu, Wang, Yu, Tong, Chen, Liu & Li, 2013).

Os dois polissacarídeos que compõe o amido são: a amilose, um polímero linear constituído por milhares de resíduos de D-glicose ligados entre si por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4), embora existam evidências de pequenas ramificações na sua estrutura, e a amilopectina, um polímero ramificado formado por ligações glicosídicas α -D-(1 $\rightarrow$ 4) e com pontos de

ramificações α -D-(1 $\rightarrow$ 6) a cada 24 a 30 unidades da D-glicose (Figura 1) (Manners, 1989; Liu, Himmelsbach & Barton, 2004; Belitz, Grosch & Schieberle, 2009; Zhang, Li, Liu, Xie & Chen, 2013). A amilopectina pode conter até um milhão de resíduos glicosídicos, sendo uma das maiores moléculas da natureza. A presença de 4 a 5% de unidades de D-glicose envolvidas nas ramificações da amilopectina confere uma conformação complexa, em formato de duplas hélices (Vermeulen, Goderis, Reynaers, & Delcour, 2004), que afeta profundamente as características físicas, químicas e biológicas deste polissacarídeo.

Figura 1: (A) Amilose e (B) amilopectina

O conteúdo relativo de amilose e de amilopectina constitui aproximadamente 98 a 99% do peso do grão seco utilizado como fonte de obtenção do amido. A proporção entre amilose e amilopectina depende exclusivamente de sua fonte natural, que pode ser a batata, o trigo, o milho, a lentilha, a ervilha, várias espécies de arroz, entre muitos outros (Manners, 1989; Belitz, Grosch & Schieberle, 2009), como mostra a Tabela 1 (Heinze, T., Liebert, Heinze, U. & Schwikal, 2004).

Tabela 1: Fontes de amido e os respectivos teores de amilose.

Fonte de Amido	Teor de Amilose (%)
Trigo	25
Ervilha	90
Fécula de Batata	28
Milho Ceroso	1

O amido apresenta baixa solubilidade em água fria, porém quando aquecido em solução aquosa diluída, absorve uma grande quantidade de água e intumescce aumentando muitas vezes seu tamanho original. A absorção de água promove a ruptura da estrutura cristalina do amido de forma irreversível. A água se liga por meio de ligações de hidrogênio com as hidroxilas presentes na D-glicose, monômero dos biopolímeros do amido, causando um aumento da sua solubilidade. Este fenômeno é denominado gelatinização (Munhoz, Webber & Chang, 2004). A gelatinização é dependente de fatores como: quantidade de água (Butarelo, Beleia, Fonseca & Ito, 2004), pH da solução, presença de sais (Luallen, 2004), da fonte do amido e tamanho do grânulo (Sarmiento, Reis, Ferreira, Cereda, Penteado & Dos Anjos, 1999).

A atuação do amido em diversos campos industriais depende do processo de solubilização do seu grânulo. Se esta solubilização ocorrer em uma solução aquosa sob aquecimento, os grânulos estão susceptíveis ao fenômeno de gelatinização, ou seja, as hélices da amilopectina se dissociam e fundem-se, aumentando a viscosidade desta solução (Jobling, 2004; Kurakake et al., 2004). O posterior aquecimento e agitação da solução provocam a desintegração da estrutura do grânulo. O amido se solubiliza e ocorre a diminuição da viscosidade da solução. Após o resfriamento, as cadeias lineares movimentam-se, associam-se em agregados que precipitam e formam um gel, levando a retrogradação. O controle destes processos é um fator fundamental para aumentar a funcionalidade do amido (Jobling, 2004; Kurakake et al., 2004). Neste sentido, várias

técnicas têm sido utilizadas para obter uma melhor descrição da estrutura do amido e como isto afeta os processos de hidratação, plastificação, gelatinização, congelação, hidrólise ácida entre outros (Bertoft, 2007; Waigh, Kato, Donald, Gidley, Clarke & Riekkel, 2000; Tian, Li, Xu & Jin, 2011).

Medidas de espalhamento elástico de nêutrons na amilose e amilopectina determinaram que a configuração de duplas hélices não permite a entrada de água no canal interno destas estruturas. Por outro lado, o arranjo regular destas hélices em superestruturas hexagonais deixa um poro central com um diâmetro médio de aproximadamente 19 Å, onde várias moléculas de água podem ser acomodadas. Durante o processo de hidratação, o solvente pode gradualmente preencher estes poros até um ponto de saturação de 27% de moléculas de água (Di Bari, Deriu, Albanese & Cavatorta, 2003).

A retrogradação do amido vem sendo investigada através do estudo da interação do amido com diversos aditivos como, por exemplo, o açúcar (Perry & Donald, 2002), tensoativos (Svensson, Gudmundsson & Eliasson, 1996; Lundqvist, Eliasson & Olofsson, 2002a, 2002b) e ciclodextrinas (Karlberg, Piculell & Ragout, 2006). O esqueleto da amilopectina é afetado pela ligação com dodecil sulfato de sódio, diminuindo o efeito da retrogradação, enquanto que uma complexação da amilopectina com o brometo de hexadeciltrimetilamônio confere a ela uma característica como se fosse uma coleção de cadeias curtas e independentes de amilose (Lundqvist, Nilsson, Eliasson, & Gorton, 2002a). Outros estudos mostram que a amilose pode formar complexos com um grande número de moléculas anfifílicas de baixo peso molecular como os detergentes, lipídios e emulsificantes (Gelders, Goesart & Delcour, 2006; Nimz, Gessler, Uson, Sheldrick, & Saenger, 2004; Chronakis, Egermayer & Piculell, 2002; Tufvesson, Wahlgren, Eliasson, 2003a, 2003b). A habilidade de formação destes

complexos varia entre as diversas moléculas ligantes, pois está relacionada com a hidrofobicidade, o impedimento estérico e o comprimento da cadeia hidrocarbônica da molécula hóspede. O complexo formado possui o ligante dentro da cavidade central da hélice da amilose. Conforme necessário, a hélice pode se expandir ou contrair para acomodar melhor a molécula ligante, formando cavidades de diferentes diâmetros (Jane, Robyt, 1984). Estudos com moléculas ligantes pequenas têm sido feitos para determinar se ocorrem associações inter- ou intra-helicoidais na amilose (Rondeau-Mouro, Le Bail, & Buleon, 2004).

Em nosso laboratório de pesquisa, resultados de um trabalho de Doutorado (Miranda, Cacita & Okano, 2007; Miranda, 2008) do espectro do pireno nas soluções de amilopectina revelaram que quando a sonda fotofísica é aquecida junto com o biopolímero há a formação de agregados. A adição de tensoativo não-iônico à solução de amilopectina promove a saída do pireno para um ambiente mais polar, aumentando a intensidade da relação excímero/monômero do pireno. Atingindo-se a cmc do detergente não-iônico, a razão excímero/monômero diminui devido à formação de micelas do tensoativo. Este tipo de comportamento é observado somente com a amilopectina e não com os derivados de celulose, como a carboximetil celulose, um polímero linear.

Estudos recentes neste laboratório de pesquisa mostraram também que é muito fácil ocorrer uma formação de geis em solução aquosa com os derivados aquo-solúveis de celulose (carboximetil celulose e 2-hidroxietil celulose) (Miranda, 2008). Entretanto, a amilopectina em solução aquosa dificilmente atinge uma boa solubilização em concentrações superiores a 0,8% (m/m). Desta forma, é bastante apropriado recorrer a modificações químicas na sua estrutura.

1.1.2 Reações Químicas

A funcionalização dos grupos hidroxilas das unidades de D-glicose da celulose e dos componentes presentes no amido (amilose e amilopectina) depende da finalidade para a qual o produto será destinado. Várias funções podem ser inseridas nos biopolímeros, visando alterar e melhorar suas características físicas e químicas. Estas reações promovem alterações na estrutura do polímero, como por exemplo, a inserção de grupos mais volumosos no esqueleto polimérico, aumento na ramificação do polímero ou a obtenção de produtos de menor massa molar. O Esquema 1 mostra algumas das possíveis funcionalizações da celulose encontradas na literatura. (Belitz, Grosch & Schieberle, 2009; Heinze, 2005).

Esquema 1: Diversas alternativas para síntese de derivados de celulose.

1.1.2.1 Carboximetil amido

Das várias reações possíveis no Esquema 1, existem muitos estudos já realizados sobre a síntese do carboximetil amido (Spychaj, Wilpiszewska & Zdanowicz, 2013). O carboximetil amido é um polímero de grande importância nas áreas: farmacêutica, medicina, de cosméticos, da indústria alimentícia, de proteção ambiental, entre outras. A adição de grupos hidrofílicos volumosos no esqueleto polimérico dos constituintes do amido diminui a sua tendência de retrogradar (ou recristalizar) e torna-o mais resistente aos danos provocados pela ação do calor e ataque microbiano (Lee, Kim, Pant, Kwen, Song, Lee, K. & Nehete, 2010). A solubilidade do carboximetil amido em água fria aumenta a sua capacidade de absorver água, a sua capacidade de adesão e a característica de formação de filmes (Zhou, Yang & Gu, 2007). A transparência do filme e da pasta, além da estabilidade no armazenamento em gel também aumenta (Tatongjai & Lumdubwong, 2010). Os derivados de carboximetil amido exibem menor temperatura de gelatinização, mudanças específicas nas propriedades reológicas e estabilidade em pH (Bhattacharyya, Singhal & Kulkarni, 1995; Lawal, Lechner, Hartmann & Kulicke, 2007).

Os trabalhos na literatura relatam o grau de substituição, viscosidade e algumas propriedades térmicas do carboximetil amido obtido em função do solvente usado, normalmente, misturas de álcoois (isopropanol, etanol) e água (Spychaj, Wilpiszewska & Zdanowicz, 2013). Entretanto, ainda há muito a ser estudado para ampliar a utilização do carboximetil amido. A revisão de 2013 de Sychaj, Wilpiszewska & Zdanowicz cita alguns itens, tais como: a avaliação da influência dos parâmetros da síntese na massa molecular do carboximetil amido, a relação entre massa molecular e propriedades físico-químicas como viscosidade, estabilidade das soluções aquosas, entre outras.

Podemos acrescentar, também, que a indústria normalmente utiliza a farinha do cereal para obtenção de filmes biodegradáveis contendo amido. Neste processo, muitos biofilmes são obtidos através de reações da farinha com glicerol ou sorbitol (Tapia-Blácido, Sobral & Menegalli, 2011). O problema é que a farinha contém lipídeos e proteína além do amido (Tapia-Blácido, Sobral & Menegalli, 2013). Portanto, o estudo do mecanismo da reação de formação de filmes com este tipo de material é bastante complexo e praticamente inexistente (Volkert, Lehmann, Greco & Nejad, 2010). Os filmes obtidos por estas reações são caracterizados por técnicas de microscopia eletrônica de varredura, capacidade reológica e propriedades mecânicas.

Por este motivo, optamos por trabalhar nesta Dissertação com a reação da carboximetilação da amilopectina. Apesar de ser encontrada abundantemente em diversas fontes naturais, tais como, tubérculos e cereais, a amilopectina apresenta uma baixa solubilidade em solução aquosa, o que limita a sua aplicação como agente espessante ou solubilizante em formulações alimentícias e farmacêuticas (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009). Entretanto, os grupos hidroxilas dos carbonos 2, 3 e 6 da unidade glicosídica são passíveis de reações de substituição nucleofílica (Figura 2). A substituição destes grupos hidroxilas por outros mais hidrofílicos, como os carboximetílicos, pode aumentar a solubilização deste biopolímero em soluções aquosas e ampliar a sua gama de aplicações. Um dos exemplos seria a síntese de um biopolímero biodegradável, que possa formar uma camada de filme plástico solúvel em água e sirva para a proteção na embalagem e transporte de frutas ou outros alimentos (Akoh, Chang, Lee, & Shaw, 2008; Vermeulen, Goderis, Reynaers & Delcour, 2004, Nafchi, Moradpour, Saeidi & Alias, 2013).

Figura 2: Unidade glicosídica da amilopectina ou da amilose.

Propusemos o estudo da carboximetilação da amilopectina usando uma mistura variável de proporção entre DMSO e água, temperatura e pressão reacional. A carboximetil amilopectina sintetizada teve seu grau de substituição determinado por condutimetria e cromatografia líquida de alta eficiência. Os polímeros sintetizados foram avaliados por potencial zeta e espalhamento de luz. Nos próximos parágrafos, citaremos alguns breves aspectos do potencial zeta e espalhamento de luz.

1.2 Potencial Zeta

Quando uma partícula coloidal entra em contato com um meio polar, como em um sistema aquoso, ocorre um aparecimento de cargas elétricas na sua superfície. Isto se deve a efeitos como a ionização dos grupos presentes na superfície do colóide ou da adsorção de íons que fornecem as cargas superficiais (Jafelicci & Varanda, 1999). Os tipos de interação entre partículas coloidais podem ser: (I) forças eletrostáticas de repulsão, (II) forças atrativas de Van der Waals, (III) forças de Born (de pequeno alcance e repulsivas), (IV) forças estéricas que são dependentes da conformação e da geometria (principalmente nas macromoléculas) nas interfaces das partículas e (V)

forças de solvatação (Atwood & Florence, 2003).

A distribuição dos íons da solução é afetada pelas cargas da superfície do colóide. Ocorre uma atração de contraíons (íons de cargas opostas) pela superfície e a repulsão de coíons (íons de cargas iguais) para mais longe desta. Esta distribuição de íons desde a superfície da partícula até o interior da solução gera diferentes potenciais (Jafelicci & Varanda, 1999). A camada de Stern ou dupla camada difusa aparece ao redor da superfície do colóide em consequência da formação de uma camada rígida, devido à atração de alguns íons positivos pela partícula. O equilíbrio dinâmico do sistema é determinado quando alguns íons positivos são atraídos pelo colóide de carga negativa e, ao mesmo tempo, sofrem repulsão devido à camada de Stern ou quando outros íons positivos que tentam se aproximar da partícula. Este equilíbrio dinâmico resulta na formação de uma camada de contraíons, o qual possui uma concentração elevada próxima a superfície que diminui gradualmente com a distância. Na camada difusa há uma deficiência de íons negativos, denominados coíons, e sua concentração aumenta gradualmente com a distância oposta ao colóide (Bueno, 2007). A Figura 3 traz a representação esquemática do modelo de dupla camada, assim como os seus respectivos potenciais.

Figura 3: Esquema de distribuição de cargas ao redor de uma partícula coloidal e seus respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido. (Jafelicci & Varanda, 1999).

O potencial zeta é medido no plano ao qual ocorre o cisalhamento entre a partícula e a solução quando os dois estão em movimento relativo na presença de um campo elétrico.

A equação de Helmholtz-Smoluchowski (Eq. 1) relaciona o potencial zeta com a mobilidade eletroforética que é a relação entre a velocidade da partícula e o campo elétrico aplicado (Bueno, 2007; Weiner, Tscharnuter & Fairhurst, 1993; Lima & Quirino, 2003):

$$\zeta = \frac{4\pi\eta v}{\epsilon_r \epsilon_0} \quad (\text{Eq. 1})$$

sendo que: ζ é o potencial zeta (mV); η , a viscosidade do meio de dispersão; v , mobilidade eletroforética ($\mu\text{ms}^{-1}/\text{V.cm}^{-1}$); ϵ_r , a constante dielétrica e ϵ_0 , a permissividade do ar no vácuo ($8,854 \times 10^{-12} \text{ C}^2\text{J}^{-1}\text{m}^{-1}$).

1.2.1 Potencial Isoelétrico (PIE)

A determinação do potencial zeta é de extrema importância no estudo da estabilidade de suspensões coloidais, pois este reflete o potencial de superfície das partículas. É influenciado diretamente pelas mudanças da interface com o meio dispersante (Schaffazick, Guterres, Freitas & Pohlmann, 2003). Os valores de potencial zeta estão intimamente associados à variação do pH do meio, tendo valores normalmente positivos em regiões ácidas e negativo em regiões básicas. O ponto de intersecção de pH onde o potencial zeta é nulo, é denominado ponto isoelétrico (PIE) e compreende a região de menor estabilidade das suspensões do ponto de vista eletrostático (Soares, 2009).

1.3 Espalhamento de Luz

O espalhamento de luz é uma técnica valiosa que vem sendo muito utilizada para a caracterização e análise de materiais poliméricos em solução. O Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering - DLS) ou Espectroscopia de Correlação de Fótons (Photon Correlation Spectroscopy - PCS) pode fornecer o coeficiente de difusão translacional (D_T) e o raio hidrodinâmico (R_h) dos polímeros em soluções.

O campo elétrico oscilante de uma radiação eletromagnética que incide sobre uma molécula qualquer induz a formação de um dipolo elétrico oscilante. Este momento de dipolo então emite uma radiação secundária na qual é espalhada por uma molécula em todas as direções, quando esta é irradiada por uma luz monocromática. Esta radiação espalhada possui intensidade que se relaciona com o ângulo de espalhamento, com a direção de polarização da luz incidente e com outros parâmetros intrínsecos da solução irradiada. A intensidade de luz espalhada por determinada partícula com dimensões muito menor que o comprimento de onda incidente é dado por (Rodembusch, 2001):

$$I_S = \frac{4\pi^2 M^2 (\sin^2 \phi) \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{N_A^2 \lambda_0^4 R_0^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde: dn/dc é o incremento do índice de refração; M é a massa molar da molécula; N_A é o número de Avogadro; λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente no vácuo; ϕ é o ângulo entre a direção de propagação do feixe de luz incidente e o eixo de coordenadas z e R_0 é a distância entre o ponto de espalhamento e o observador (Rodembusch, 2001).

Na técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz, o fotodetector capta a intensidade da radiação espalhada em função do tempo, calculando uma distribuição

estatística de tamanho de uma população de partículas.

A partir da equação de Stokes-Einstein (Eq. 3) pode-se determinar o raio hidrodinâmico (R_H) das partículas de dispersão, se a temperatura (T) da amostra e a viscosidade (η) do solvente for conhecido para determinado coeficiente de difusão medido por DLS. Leva-se em consideração que R_H é o raio equivalente a uma esfera (Schärftl, 2007).

$$D = \frac{RT}{N_A 6\pi R_H \eta} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde: R é a constante dos gases e N_A é o número de Avogadro.

2. Objetivos

2. Objetivos

Este projeto teve como objetivo principal fazer um estudo sistemático dos parâmetros reacionais envolvidos na funcionalização da amilopectina. As variáveis estudadas foram pressão, temperatura e fração de água no meio reacional. Foi proposto um método de determinação do grau de substituição a partir de uma pequena quantidade do produto, empregando uma base fraca como titulante. O grau de substituição (GS) obtido foi comparado com um segundo método de análise: a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Por esta última técnica a natureza dos tipos de substituintes em função da condição sintética foi analisada.

A caracterização de determinadas carboximetil amilopectina (CMAm) sintetizadas foram feitas pela técnica de espalhamento de luz e potencial zeta. As análises de microestrutura dos grãos de amilopectina e CMAm e a análise da formação de filmes de CMAm foram determinados por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1 Biopolímeros

- Amilopectina do amido de milho ceroso (Lote: 1342253 - *Fluka*), utilizada sem purificação prévia.
- Carboximetil celulose (CMC) (Lote: A017165101, $M_w = 90.000$, $GS = 0,7$ *Acros Organics*), GS determinado pelo fabricante.
- Carboximetil celulose (CMC) (Lote: A016900501, $M_w = 250.000$, $GS = 0,9$ *Acros Organics*), GS determinado pelo fabricante.

3.1.2 Solventes e reagentes diversos

- Ácido acético glacial (PA) - *J.T. Baker*
- Ácido clorídrico - *Dinâmica*
- Ácido cloroacético (99%) - *Acros Organics*
- Ácido fórmico (PA) – *Nuclear*
- Ácido perclórico (70%) - *Sigma-Aldrich*
- Ácido sulfúrico (PA) - *Dinâmica*
- Ácido sulfúrico deuterado D_2SO_4 (99,5% D) - *Sigma-Aldrich*
- Água destilada Milli-Q – Sistema Millipore
- Água deuterada D_2O (99,8% D) - *Acros Organics*
- DMSO (99%) - *Synth Brasil*

- Etanol (PA) - *Synth Brasil*
- Hidróxido de amônio (25%) – *Merck*
- Hidróxido de potássio (85%) – *Qhemis*
- Hidróxido de sódio – *Mallinckrodt*
- Metanol (PA) – *Mallinckrodt*

3.2. Métodos

3.2.1 Síntese da carboximetil amilopectina (CMAm)

As reações de carboximetilação da amilopectina foram realizadas em um balão de três bocas de 50 mL acoplado a uma bomba de vácuo (Marconi Modelo: Ma 059). Cerca de 1 g de amilopectina foi dispersa em 35 mL de solvente DMSO/H₂O, cuja proporção variou de 0 a 50% de água. 4,9 g de NaOH sólido foi adicionado ao meio reacional, mantendo-se sob agitação e temperatura constante de 70 ou 80 °C, durante 30 min. Após este período, adicionou-se cerca de 7,1 g do ácido cloroacético sólido, sendo que este momento foi considerado o início da reação. As reações foram realizadas a pressão ambiente e pressão reduzida. Para as sínteses a pressão reduzida, após 30 min do início da reação com a temperatura do meio reacional estabilizada, ligou-se a bomba de vácuo e esta permaneceu ligada por mais 2,5 horas, perfazendo um total de 3 horas reacionais.

Ao final da reação, 100 mL de metanol foram adicionados ao meio reacional e a solução filtrada a vácuo. Para purificação, o sólido obtido foi solubilizado em 20 mL de água, ajustou-se o pH para 7 com adição de ácido acético glacial e, posteriormente,

precipitou-se o polímero com 80 mL de etanol. A CMAM foi novamente filtrada a vácuo e lavada com etanol até que o filtrado não apresentasse mais precipitado com a adição de AgNO_3 . Por fim, secou-se o sólido obtido em estufa a 50 °C para posterior armazenamento.

3.2.2 Determinação do grau de substituição (GS) por titulação condutimétrica

A determinação do grau de substituição do biopolímero (quer seja a carboximetil celulose (CMC) ou da CMAM sintetizada) foi feita por titulação condutimétrica a 25 °C e agitação contínua por duas formas. Para ambas, o biopolímero previamente obtido e armazenado foi seco novamente em estufa com ventilação a 105 °C até massa constante. Cerca de 100 mg do biopolímero foram solubilizados em 100 mL de água Mili-Q. Esta solução teve o seu pH diminuído até 2,8 com a adição de uma solução aquosa de HCl 0,30 mol/L.

No primeiro modo de determinação do GS por titulação condutimétrica, a solução do biopolímero foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio $2,5 \times 10^{-2}$ mol/L com purga de nitrogênio gasoso (Capitani, Porro & Segre, 2000). No segundo modo, a titulação foi realizada com uma solução de $3,0 \times 10^{-2}$ mol/L de hidróxido de amônio aquoso sem a purga de nitrogênio gasoso. Em ambas as titulações, o GS foi calculado utilizando-se a equação 4 (Stojanovic, Jeramics, Jovanovic & Lechner, 2005):

$$GS = \frac{162 \times n_{\text{COOH}}}{m - 58 \times n_{\text{COOH}}} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde: 162 g/mol é a unidade de anidro glicose teórica (UAG); n_{COOH} é a quantidade de grupos carboxílicos calculados através da titulação com unidades em mol; m é a massa

seca em gramas do polímero titulado e 58 g/mol é o incremento de massa dos grupos carboxílicos adicionados por UAG.

3.2.3 Hidrólise das amostras para análise cromatográfica

Para a determinação da natureza dos substituintes das unidades glicosídicas por LC-MS e para a análise do GS por HPLC, hidrolisou-se inicialmente 100 mg do polímero com 2 mL de ácido perclórico (HClO_4) 70% por 10 min a temperatura ambiente. Após este período adicionou-se 18 mL de água e a reação de hidrólise prosseguiu por 16 horas a 100 °C. Ao final da reação, neutralizou-se com adição de solução aquosa de hidróxido de potássio 2 mol/L. As amostras foram mantidas a temperatura de aproximadamente 4 °C por 1 hora para total precipitação do perclorato de potássio (KClO_4). O sal precipitado foi retirado por filtração com membrana Millipore 0,45 μm e a solução foi concentrada por aquecimento até atingir um volume próximo a 5 mL (Heinze & Pfeiffer, 1999).

3.2.4 Determinação dos substituintes carboximetílicos por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS)

A atribuição correta dos picos referentes a mono-*O*-carboximetil amilopectina, di-*O*-carboximetil amilopectina, tri-*O*-carboximetil amilopectina e da amilopectina não modificada foi feita pela técnica de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (LC-MS). As análises foram realizadas no laboratório do Prof. Luiz Alberto Beraldo de Moraes – DQ– FFCLRP-USP através do equipamento HPLC Pro Star 210 com auto injetor Pro Star 410 e com detector de massas da marca Varian 1200L onde a

energia do cone usada foi 40 V e a temperatura de dessolvatação foi 300 °C. A coluna utilizada foi Aminex e a fase móvel utilizada foi uma solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) com fluxo de 0,5 mL/min.

3.2.5 Determinação do grau de substituição por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para a determinação do GS por HPLC, utilizou-se um cromatógrafo HPLC Shimadzu com bombas LC 10ADVP, coluna Aminex HPX-87H, detector de índice de refração diferencial Shimadzu RID-10A, software Class VP e forno Shimadzu CTO-10ASVP o qual manteve a temperatura da coluna em 65 °C. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L com fluxo de 0,5 mL/min (Heinze, 1999).

O grau de substituição foi calculado a partir da equação 5 (Tijssen, Kolk, Stamhuis & Beenackers, 2001):

$$GS = \frac{\sum_{i=0}^3 \frac{iA_i}{Mw_i}}{\sum_{i=0}^3 \frac{A_i}{Mw_i}} \quad (\text{Eq. 5})$$

onde: A_i é a área relativa referente a área dos picos e Mw_i é a massa molar referente ao monômero produto da hidrólise. Para os vários picos da equação 2, i é igual a 0 para a amilopectina não modificada, 1 para a mono-, 2 para a di- e 3 para a tri-*O*-carboximetil amilopectina.

A distribuição binomial primeiramente aplicada por Spurlin (1939) e por Reuben & Conner (1983) para o calculo teórico dos substituintes da carboximetil celulose, foi

aplicada neste trabalho utilizando-se da equação 6 (Salmi, Damlin, Mikkola & Kangas, 2011; Heinze, Pfeiffer & Lazic, 2001):

$$C_i = y_k \left(\frac{GS}{3} \right)^k \left(1 - \frac{GS}{3} \right)^{3-k} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde: C_i é a fração molar de glicose não modificada e de mono, di e trissubstituintes; k é o número de substituintes por UAG ($k = 0,1,2,3$) e GS é o grau de substituição determinado por HPLC. O coeficiente y_k é obtido a partir da terceira linha do triângulo de Pascal, mostrado pela equação 7.

$$y_k = \binom{3}{k} = \frac{3!}{k!(3-k)!} \quad (\text{Eq. 7})$$

3.2.6 Medidas de potencial zeta e Espalhamento de luz:

Para as análises de tamanho de partícula e de potencial zeta foram preparadas soluções aquosas poliméricas 1% (m/m). Para as medidas em função do pH, adicionou-se pequenas alíquotas de soluções aquosas de HCl (0,2 mol/L) ou NaOH (0,2 mol/L) para variar-se o pH. Nas medidas em função do contraíon utilizou-se cloreto de sódio de modo a se obter soluções com concentrações entre 0,025 a 0,5 mol/L. As amostras foram medidas em um analisador de potencial zeta e de espalhamento de luz modelo Zetasizer 3000HSA da Malvern Instruments do laboratório da Profa. Maria Elisabete D. Zaniquelli – DQ– FFCLRP-USP. As medidas foram realizadas em duplicatas para o

espalhamento dinâmico de luz e triplicatas para o potencial zeta, sendo apresentado como resultado a média dessas medidas.

3.2.7 Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microestrutura dos grãos de amilopectina e CMAM e a análise da formação de filmes de CMAM (5%) foram determinados por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.

3.2.7.1 Microscopia Óptica

Para as análises de microscopia óptica foram preparadas dispersões 5% (m/m) do polímero em água, as amostras foram deixadas entre as lamina de vidro por um dia, para que o filme fosse formado entre as lâminas. As medidas foram realizadas em um microscópio modelo Axiovert 25 da marca Carl Zeiss.

3.2.7.2 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizados em um equipamento de marca Zeiss modelo EVO 50. Foi utilizado um pulverizador de ouro da marca Bal-Tec modelo SCD 050 Sputter Coater, e o tempo de recobrimento das amostras com ouro foi de 150 segundos.

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

4.1. Planejamento Sintético

A carboximetilação da amilopectina foi feita através de uma reação de substituição nucleofílica em meio básico (Esquema 2), como acontece com as reações de carboximetilação do amido.

Esquema 2: Mecanismo da carboximetilação do amido pelo método de Williamson, onde o grau de substituição pode variar entre 0 a 3.

Em meio básico, as 3 hidroxilas das unidades de D-glicose da amilopectina ou da amilose, polímeros constituintes do amido, podem ser desprotonadas e reagir com o agente de eterificação, geralmente, o ácido cloroacético, para fornecer o amido substituído. Dependendo da quantidade de ácido cloroacético utilizado pode-se obter um produto com grau de substituição entre 0 a 3. (Tijssen, Kolk, Stamhuis & Beenackers, 2001; Tijssen, Scherpenkate, Stamhuis & Beenackers, 1999). O solvente utilizado nestas preparações é uma mistura de água com isopropanol, etanol ou metanol.

O meio aquoso é crucial na reação, pois favorece a hidratação dos grânulos do amido, tornando as hidroxilas das unidades de D-glicose dos polímeros do amido mais acessíveis à desprotonação por ação dos íons hidróxidos (Tijssen, Kolk, Stamhuis & Beenackers, 2001; Tijssen, Scherpenkate, Stamhuis & Beenackers, 1999; Volkert, Loth,

Lazik & Engelhardt, 2004). Porém, o uso de água em excesso pode provocar a aglomeração das partículas do amido dificultando a reação de substituição nucleofílica, além de solvatar os íons hidróxidos deixando-os menos reativos. A quantidade ideal de água para obtenção de uma reação efetiva depende de diversos fatores, tais como, a fonte do amido, temperatura reacional, presença e tipo de solventes orgânicos adicionais, entre outros.

Muitos trabalhos na literatura demonstraram a influência da proporção solvente/água em busca de uma condição ideal. Tijssen et al., 2001, fez um estudo sistemático das melhores condições reacionais da carboximetilação no amido de batata e mostrou que a proporção ideal é cerca de 10 a 20% de água em isopropanol, para a produção da carboximetil amido, obtendo produtos com valores de GS próximos a 1,3.

Volkert, Loth, Lazik & Engelhardt, 2004, sugerem ainda a destruição do ácido cloroacético em meio básico, produzindo o cloroacetato de sódio com a produção de mais água no meio reacional. Ocorre ainda uma reação entre o cloroacetato de sódio em meio básico produzindo o glicolato de sódio, que compete com a reação de carboximetilação, diminuindo assim a eficiência da substituição no amido (Esquema 3).

Esquema 3: Reação lateral do ácido cloroacético em meio básico aquoso.

Poucos trabalhos relatam a utilização de DMSO como solvente. Um deles é a síntese do carboximetil amido por “separação de fase induzida”, onde Heinze, Liebert,

Heinze, & Schwikal (2004) utilizaram somente o DMSO. A adição de hidróxido de sódio sólido forma um gel que se separa no decorrer da reação.

A mistura de água e DMSO como solvente nesta síntese é pouco relatada na literatura. Uma característica interessante do DMSO em relação aos álcoois (isopropanol, metanol ou etanol) já utilizados na síntese de carboximetilação do amido (Bhattacharya, Singhal & Kulkarni, 1995; Tijssen, Kolk, Stamhuis & Beenackers, 2001), é o seu alto ponto de ebulição (189 °C) (Lide, 2005). A diferença entre o ponto de ebulição da água e do DMSO sugere que a reação pode ser realizada inicialmente com uma quantidade de água suficiente para hidratar a amilopectina sólida, ativando-a para a reação de substituição nucleofílica. Posteriormente, a água pode ser retirada do meio reacional visando tornar os íons hidróxidos mais reativos para a formação da CMAM. Por outro lado, o DMSO é um solvente aprótico enquanto que a água, um solvente prótico. A diminuição da quantidade de água presente em uma mistura com solvente aprótico, como o DMSO, pode favorecer a reação lateral mostrada no Esquema 3.

Neste sentido, para avaliar a influência da água no meio reacional em uma mistura de DMSO/água, modificou-se a metodologia proposta por Heinze, Liebert, Heinze & Schwikal, 2004, a fim de retirar-se a água do meio reacional. Para isso, aplicou-se uma pressão de 80 ± 20 mmHg, por meio de uma bomba a vácuo. Como não se encontram dados na literatura sobre a síntese da CMAM utilizando este procedimento, propusemo-nos a estudar o efeito de cada condição reacional: razão variável entre água e DMSO, temperatura e pressão aplicada na síntese. Foi feito um planejamento da síntese da CMAM para fornecer o grau de substituição em função da fração de água em DMSO, para as temperaturas de 70 e 80 °C e para as pressões reduzidas ou ambiente e tempo constante de 3 horas. Todas as reações foram realizadas

em duplicatas, totalizando 48 sínteses. A Tabela 2 apresenta as condições experimentais sintéticas estudadas.

Tabela 2: Condições sintéticas e variáveis de cada grupo de experimentos.

Grupo	Fração H ₂ O (%)	T (°C)	Pressão (mmHg)	t (horas)
I	0 a 40	70 ± 2	80 ± 20	3
II	0 a 40	80 ± 3	80 ± 20	3
III	0 a 40	70 ± 2	758,3*	3
IV	0 a 40	80 ± 3	758,3*	3

* Pressão atmosférica de Ribeirão Preto.

Para obtenção de resultados reprodutíveis foi feito um rigoroso controle do tempo de cada etapa reacional. Por exemplo, para cada síntese, 1 g de amilopectina foi solubilizada em 35 mL do solvente água-DMSO. Adicionou-se o hidróxido de sódio sob agitação, com controle de temperatura de 70 ou 80 °C durante 30 min, tempo suficiente para que a amilopectina fosse solubilizada (Naganine & Konae, 1996; Miranda, Cacita & Okano, 2007). Somente depois desta meia hora é que se adicionou o ácido cloroacético, observando-se uma elevação brusca de temperatura. Aguardou-se 30 min para a temperatura reacional estabilizar-se e aplicou-se uma pressão reduzida para retirar a água da mistura.

O sólido obtido após a adição do metanol pode conter um pouco de base, ácido cloroacético que não reagiram ou até mesmo o glicolato de sódio, subproduto da reação. Por este motivo, o produto foi solubilizado em água e o excesso de base neutralizado com ácido acético. O excesso de cloreto de sódio foi retirado através de lavagens sucessivas com etanol até que o filtrado mostrasse ausência de precipitado com a adição de nitrato de prata.

O parâmetro comparativo entre as sínteses foi o grau de substituição dos grupos carboxílicos adicionados na amilopectina. Para determinação do grau de substituição foram utilizadas as técnicas de condutimetria e de HPLC, sendo os substituintes determinado por LC-MS que serão discutidos em sequência.

4.2. Determinação do grau de substituição por Condutimetria

Iniciou-se a análise do grau de substituição (GS) pela titulação condutimétrica de dois tipos de carboximetil celulose (CMC) comercial, empregando uma base forte (hidróxido de sódio) (Capitani, Porro & Segre, 2000). As CMC possuíam um grau de substituição de 0,7 e 0,9, e massa molecular média por peso de 90.000 e 250.000, respectivamente, definida pelo fornecedor *Acros Organics*. Para isso, inicialmente, secou-se a CMC em estufa com ventilação a 105 °C até massa constante, para retirar qualquer traço de umidade que pudesse interferir na determinação do GS. O pH foi diminuído a 2,8 para garantir que todos os grupos carboxílicos estivessem protonados. O uso do nitrogênio gasoso se fez necessário para diminuir a interferência do CO_{2(g)}. A Figura 4A mostra o perfil representativo desta titulação. Para todas as titulações multiplicou-se o valor da condutividade por um fator de correção (equação 8) para minimizar o efeito da diluição na condutividade (Vogel, 1981).

$$FC = \frac{(V_1 + V_2)}{V_1} \quad (\text{Eq. 8})$$

onde: V₁ é o volume original da solução e V₂ é o volume do reagente adicionado.

Figura 4: Perfil característico da titulação condutimétrica da CMC comercial de GS $0,53 \pm 0,04$ com adição de base forte (A) e GS $0,58 \pm 0,02$ com adição de base fraca (B).

Nota-se pela Figura 4A que a titulação começa com valor alto de condutividade devido a presença dos íons H^+ em excesso. A neutralização e consequente diminuição da condutividade ocorrem com a adição da solução de hidróxido de sódio, até a formação de um pequeno platô. A extensão deste patamar contínuo de condutividade indica a neutralização dos prótons ligados aos fracos ácidos carboxílicos. A partir do ponto que todos os prótons do ácido fraco foram neutralizados, observa-se um aumento

na condutividade, correspondendo ao excesso do NaOH adicionado. Conhecendo-se a quantidade de hidróxido de sódio adicionado exclusivamente na região do platô, calcula-se a quantidade de grupos carboxílicos com unidades em mol. Aplicando-se a equação 4, obtém-se o GS do biopolímero (Capitani, Porro & Segre, 2000; Stojanovic, Jeramics, Jovanovic & Lechner, 2005) que está descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Valores do Grau de Substituição (GS) da CMC comercial determinados pelo método condutimétrico usando bases forte e fraca e por HPLC.

	Grau de substituição		
	Condutividade		HPLC
	Base forte	Base fraca	
CMC GS 0,7	0,53 ± 0,04	0,58 ± 0,02	0,63 ± 0,01
CMC GS 0,9	0,68 ± 0,03	0,72 ± 0,01	0,75 ± 0,02

Observa-se pela Tabela 3 que o GS determinado pela titulação condutimétrica com o hidróxido de sódio forneceram valores razoavelmente próximos aos descritos pelo fornecedor da CMC comercial. A pequena discrepância pode ser devida a falta de homogeneidade das amostras comerciais.

Além disso, observamos que os métodos de titulação para determinação de GS descritos na literatura, normalmente, usam uma massa de biopolímero superior a 0,5 gramas. Porém, nem sempre havia produto sintetizado neste trabalho em abundância para as titulações e demais caracterizações.

Com a finalidade de diminuir a quantidade de produto utilizado na titulação e de obter uma boa definição do platô referente aos grupos carboxílicos (Figura 4A), foi proposto um método de titulação em que uma pequena quantidade de CMAM fosse utilizada sem alterar a eficiência da análise. Modificou-se, também, o tipo de agente titulante, empregando uma base fraca (hidróxido de amônio) a qual dispensa o uso do

nitrogênio gasoso purgado na solução titulada (Vogel, 1981). A Figura 4B mostra o perfil representativo da titulação da CMC de GS $0,58 \pm 0,02$ com base fraca. Nesta, o valor de condutividade, também, inicia-se alto, devido ao excesso de íons H^+ . Conforme se adiciona a base fraca, a condutividade atinge um valor mínimo e, posteriormente, eleva-se até atingir um novo patamar. A quantidade de base necessária para titular os fracos prótons dos ácidos carboximéticos é dada por esta elevação até atingir o patamar superior (Figura 4B). Em um terceiro momento, a curva se mantém constante devido à formação do cloreto de amônio, o qual não altera significativamente o valor da condutividade.

Foram feitas duplicatas das medidas condutimétricas e os dados médios estão apresentados na Tabela 3. Por esta Tabela, nota-se que o grau de substituição da CMC comercial determinado por titulação condutimétrica, utilizando uma base fraca ou forte são concordantes entre si, mas o valor medido pela primeira, possui um erro menor. A CMC comercial com GS de 0,7 e 0,9 teve GS determinado com base fraca de $0,58 \pm 0,02$ e $0,72 \pm 0,01$, respectivamente. O GS determinado com o hidróxido de sódio foi de $0,53 \pm 0,04$ e $0,68 \pm 0,03$, respectivamente.

Devido a concordância entre os valores experimentais de GS, podemos concluir que a CMC que o laboratório possui apresenta o GS determinado por este trabalho por dois métodos distintos de titulação condutimétrica e confirmados, posteriormente, pela técnica de HPLC (Tabela 3), que será discutida logo a seguir.

Por utilizar uma massa menor de polímero para determinação do GS, por dispensar o uso de nitrogênio para purga e eliminação do $CO_{2(g)}$ presente na solução do biopolímero, os demais dados de GS para a CMAM sintetizada, foram determinados pelo método de titulação com o hidróxido de amônio. A Figura 3 mostra a curva de titulação de duas amostras de CMAM sintetizadas a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pressão $80 \pm 20\text{ mmHg}$ com

fração de 0% (A) e 40% (B) de água. As curvas das titulações referentes a uma das CMAM sintetizadas em duplicata para cada síntese, estão apresentadas no Anexo I.

Aplicando a equação 4 o GS determinado foi respectivamente de $0,36 \pm 0,01$ (A) e $1,03 \pm 0,01$ (B).

Figura 5: Perfil característico da titulação condutimétrica de duas amostras de CMAM com GS de $0,36 \pm 0,01$ (A) e GS de $1,03 \pm 0,01$ (B) sintetizadas a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pressão 80 ± 20 mmHg com fração de 0% (A) e 40% (B) de água.

Tabela 4: Valores do GS determinado por condutimetria e por HPLC para os grupos experimentais mostrados na Tabela 2.

Pressão 80 ± 20 mmHg				Pressão 758,3 mmHg			
T (°C)	Fração de água (%)	Grau de substituição		T (°C)	Fração de água (%)	Grau de substituição	
		Condutimetria	HPLC			Condutimetria	HPLC
70	0	$0,16 \pm 0,01$	0,12	70	0	$0,39 \pm 0,04$	0,10
	10	$0,52 \pm 0,01$	0,48		10	$0,65 \pm 0,03$	0,71
	20	$0,59 \pm 0,01$	0,57		20	$0,85 \pm 0,02$	0,85
	30	$0,67 \pm 0,02$	0,62		30	$0,90 \pm 0,01$	0,88
	40	$0,82 \pm 0,01$	0,79		40	$0,91 \pm 0,01$	0,90
	50	$0,68 \pm 0,06$	-		50	$0,78 \pm 0,01$	-
80	0	$0,35 \pm 0,01$	0,13	80	0	$0,37 \pm 0,02$	0,10
	10	$0,60 \pm 0,04$	0,52		10	$0,66 \pm 0,03$	0,59
	20	$0,64 \pm 0,04$	0,59		20	$0,67 \pm 0,04$	0,61
	30	$0,76 \pm 0,03$	0,70		30	$0,79 \pm 0,03$	0,74
	40	$1,01 \pm 0,03$	1,08		40	$0,92 \pm 0,03$	0,93
	50	$0,70 \pm 0,01$	-		50	$0,73 \pm 0,05$	-

Antes da discussão sobre a relação entre os parâmetros reacionais de síntese e o GS determinado por condutimetria, descrita na Tabela 3, convém explicar que o GS também foi determinado por HPLC com o auxílio do LC-MS.

4.3. Caracterização e determinação do grau de substituição por HPLC e LC-MS

As amostras padrões de CMC comercial e algumas amostras de CMAM sintetizadas que tiveram seu GS determinado por condutimetria, foram submetidas a hidrólise com ácido perclórico 70% durante 16 horas, a 100 °C e analisadas por HPLC. Um cromatograma típico está representado na Figura 6 da CMAM que foi sintetizada com 100% de DMSO, a 70 °C e pressão reduzida e apresentou GS de $0,15 \pm 0,01$ por condutimetria.

Figura 6: Cromatograma do HPLC para a CMAM sintetizada a 70 °C e pressão reduzida com 0% de água de GS $0,15 \pm 0,01$ por condutimetria.

A análise da Figura 6 mostra a necessidade de atribuição dos picos obtidos pela análise cromatográfica que foi feita através de LC-MS (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa).

4.3.1 Determinação dos substituintes carboximetílicos por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS)

Para a caracterização dos substituintes carboximetílicos, as amostras do biopolímeros sintetizados foram submetidas à hidrólise ácida durante 16 horas e caracterizadas através do equipamento HPLC Pro Star 210 com coluna Aminex HPX-87H. A fase móvel foi uma solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) com fluxo de 0,5 mL/min. Para cada pico cromatográfico, foram obtidos espectros de massa por

ionização por electrospray no modo positivo (ESI+) e modo negativo (ESI-). Foi escolhida uma faixa de massa molecular entre m/z 150 e 800 suficiente para a detecção das estruturas 2-, 3-, 6- mono-*O*-carboximetil glicose (238 g/mol); 2,3- 2,6- 3,6 di-*O*-carboximetil glicose (296 g/mol) e 2,3,6 tri-*O*-carboximetil glicose (354 g/mol) e a glicose não modificada (180 g/mol).

O espectro de massa ESI+ gerado a partir do pico cromatográfico 1 (Figura 7) referente à glicose não modificada (Figura 8) apresentou pico m/z 181 que se refere a glicose não modificada protonada e m/z 163 referente à perda de água.

Figura 7: Cromatograma do LC-MS para a CMAM sintetizada a 70 °C e pressão reduzida com 0% de água de GS $0,15 \pm 0,01$ por condutimetria. Pico 1 referente a glicose não modificada.

Glicose não modificada

Figura 8: Estrutura da glicose não modificada

O pico cromatográfico 2 mostrado na Figura 9 se refere as estruturas 2-, 3- e 6-mono-*O*-carboximetil glicose (Figura 10) e o pico cromatográfico 3 mostrado na Figura 11 é referente às estruturas 2,3-2,6-3,6 di-*O*-carboximetil glicose (Figura 12). Estas estruturas apresentaram no espectro ESI- pico m/z 237 e 219 para a mono-*O*-carboximetil glicose e pico m/z 295 e 277 para a di-*O*-carboximetil glicose referente às suas estruturas desprotonadas e as respectivas perdas de água.

Figura 9: Cromatograma do LC-MS para a CMAM sintetizada a 70 °C e pressão reduzida com 0% de água de GS $0,15 \pm 0,01$ por condutimetria. Pico 2 referente a 2-, 3-, 6- mono-*O*-carboximetil glicose.

Figura 10: Estruturas da 2-, 3-, 6- mono-*O*-carboximetil glucose.

Figura 11: Cromatograma do LC-MS para a CMAM sintetizada a 70 °C e pressão reduzida com 0% de água de GS $0,15 \pm 0,01$ por condutimetria. Pico 3 referente a 2,3-2,6-3,6 di-*O*-carboximetil glucose.

Figura 12: Estruturas da 2,3-2,6-3,6 di-*O*-carboximetil glicose.

Por fim o pico cromatográfico 4 mostrado na Figura 13, apresentou espectro ESI+ com pico m/z 377 referente a estrutura 2,3,6 tri-*O*-carboximetil glicose (Figura 14) com uma molécula de sódio (23 g/mol).

Figura 13: Cromatograma do LC-MS para a CMAM sintetizada a 70 °C e pressão reduzida com 0% de água de GS $0,15 \pm 0,01$ por condutimetria. Pico 4 referente a 2,3,6 tri-*O*-carboximetil glicose.

2,3,6-tri-*O*-carboximetil glicose

Figura 14: Estrutura da 2,3,6 tri-*O*-carboximetil glicose.

A partir da determinação dos picos referente a cada estrutura, pode-se determinar o GS por HPLC que será discutido a seguir.

4.3.2 Determinação do grau de substituição por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Com a finalidade de se minimizar o problema da coeluição apresentado pelos picos de interesse, conforme observado pela Figura 6, as curvas foram ajustadas através de uma equação Gaussiana com o auxílio do programa Origin[®] 8.0.

A Figura 15 mostra os cromatogramas ajustados das amostras de CMAM, ambas sintetizada com pressão reduzida. A primeira sintetizada com 20% de água a 70 °C (A) e a segunda com 40% de água a 80 °C (B). Os demais cromatogramas são mostrados no Anexo II.

Figura 15: Cromatograma do HPLC com ajuste Gaussiano para a CMAM de GS 0,57 sintetizada com 20% de água a 70 °C e pressão reduzida (A) e a amostra de GS 1,08 sintetizada com 40% de água a 80 °C e pressão reduzida (B).

As curvas ajustadas da Figura 15 possibilitaram o cálculo da área de cada pico. Aplicando a Equação 5, determinou-se o GS por HPLC. Os dados de GS por HPLC da CMC estão mostrados na Tabela 3. Observa-se que os GS medidos por esta técnica

estão mais próximos aos valores comerciais, o que indica uma boa concordância entre os métodos.

A Tabela 4 inclui os valores dos GS calculados por HPLC para a CMAM sintetizadas neste trabalho. Podemos notar uma boa convergência dos valores referentes ao método de determinação do grau de substituição por condutimetria e por HPLC. A correlação entre os valores de GS determinados por condutimetria e HPLC são mostrados na Figura 16. Os dados da Figura 16 podem ser ajustados por uma reta, cujo desvio entre ambas as medidas pode ser avaliada pelo R^2 que foi de 0,94263. O maior desvio sofrido para os valores baixos de GS podem ser explicados pela baixa taxa de substituição nestes polímeros. Como os picos referentes aos substituintes são muito menores que o pico referente à glicose não modificada, o erro embutido no ajuste Gaussiano é maior para esses GS.

Figura 16: Gráfico da correlação entre os GS determinados por titulação condutimétrica e por HPLC. ($R^2 = 0,94263$).

4.4. Perfil das reações de carboximetilação

O GS é um dos melhores parâmetros para avaliar a eficácia das reações de funcionalização de um polímero (Spychaj, 2013). Desta forma, os resultados de GS da Tabela 4, permitem estabelecer qual foi a relação obtida entre as condições sintéticas aplicadas de razão entre água/DMSO, temperatura e pressão com a CMAM resultante. Inicialmente, analisou-se o GS obtido quando as reações foram feitas a pressão ambiente (758,3 mmHg), variando-se somente a temperatura reacional de 70 e 80 °C em função da fração de água em DMSO. A Figura 17 ilustra este tipo de comportamento, considerando-se os dados de GS por condutimetria somente.

Figura 17: Grau de substituição obtido em função da fração de água para as temperaturas de 70 e 80 °C, a pressão ambiente 758,3 mmHg.

Como dito anteriormente, nota-se que a quantidade de água influencia fortemente a reação de carboximetilação da amilopectina, sendo os valores de GS em função da fração água/DMSO sempre crescente no intervalo de 0 a 40%, obtendo-se com 40% de água o maior GS de $0,91 \pm 0,01$ e $0,92 \pm 0,03$ para 70 e 80 °C, respectivamente. Quando o procedimento sintético foi feito na presença de 100% de DMSO, obtiveram-se os menores GS; $0,39 \pm 0,04$ a 70 °C e $0,37 \pm 0,02$ a 80 °C. Isso nos leva a concluir que o principal motivo para uma efetiva funcionalização na amilopectina, depende principalmente da sua solubilização em solução aquosa e disponibilização das unidades de hidroxila da D-glicose (seu monômero) para sofrer o ataque nucleofílico. O DMSO sozinho, por ser um solvente aprótico deveria intensificar o poder nucleofílico dos íons hidróxidos, mas não consegue solubilizar perfeitamente a amilopectina. Outra característica do DMSO é que pode também favorecer a reação lateral de formação de glicolato de sódio, produzindo um GS menor.

A presença de 10% de água é o suficiente para aumentar o GS ($0,65 \pm 0,03$ e $0,66 \pm 0,03$ a 70 e 80 °C, respectivamente), mas é insuficiente para obter alguma variação entre as temperaturas de trabalho utilizadas. Para as frações de 20 e 30% de água, o aumento da temperatura promove uma diminuição nos valores de GS.

A Figura 18 mostra que o perfil de GS em função da porcentagem de água utilizada no procedimento sintético a 80 °C (758,3 mmHg) é bastante semelhante a curva de GS a pressão reduzida 80 ± 20 mmHg, independente da temperatura reacional de 70 ou 80 °C (Figura 18). Estas curvas contrastam com a curva da síntese a 70 °C pressão ambiente (758,3 mmHg), pois apresentam um ponto de inflexão.

Figura 18: Grau de substituição em função da fração de água, nas temperaturas de 70 e 80 °C, a pressão de 80 ± 20 mmHg e a 80 °C, a pressão ambiente 758,3 mmHg.

Na Figura 18, entre 10 a 30% de água, o GS aumenta, porém com uma taxa muito menor do que o aumento produzido nos intervalos 0 a 10% e 30 a 40%, a Tabela 5 mostra a taxa de variação do GS entre os intervalos 0-10%, 10-30% e 30-40% para as sínteses realizadas a 70 e 80 °C a pressão de 80 ± 20 mmHg e a 80 °C a pressão 758,3 mmHg.

Tabela 5: Taxa de variação do GS entre os intervalos 0-10%, 10-30% e 30-40% para as curvas mostradas na Figura 18.

Pressão (mmHg)	Temperatura (°C)	Taxa de Variação		
		0-10%	10-30%	30-40%
80 ± 20	70	0,036	$0,007 \pm 0,001$	0,015
	80	0,025	$0,008 \pm 0,002$	0,025
758,3	80	0,029	$0,007 \pm 0,003$	0,013

A 40% de água, Figura 18, observa-se o maior GS ($1,01 \pm 0,03$) entre todas as sínteses, para a reação sintetizada a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $80 \pm 20\text{ mmHg}$. Aumentando a quantidade de água para 50%, nota-se a diminuição no GS. Isto pode ser devido à baixa reatividade dos íons hidróxidos melhores solvatados nesta condição. Além disso, há a possibilidade de aglomeração da amilopectina no estado sólido, que diminui sua reatividade.

É descrito na literatura que misturas binárias de solventes, por exemplo, água e DMSO apresentam propriedades dependentes da fração molar dos seus componentes. Vishnyakov, Widmalm & Laaksonen, 2000, estudaram os efeitos de solvatação de um dissacarídeo ($\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Glcp-OMe}$) em uma mistura 1:3 de DMSO em água. Esta mistura de solventes possui características diferentes a dos solventes puros DMSO e água. Eles mostraram que tanto a água quanto o DMSO competem como aceptores de ligações de hidrogênio. Porém, apenas a água pode atuar como doador de ligação de hidrogênio aos átomos de oxigênio das hidroxilas do dissacarídeo. A formação de complexos coordenados entre a água e o íon hidróxido e o mecanismo de transporte de íons hidróxidos em meio aquoso foram estudados através de cálculos *ab initio* por Tuckerman, Marx & Parrinello, 2002. Como o deslocamento do íon hidróxido depende da água, isso comprova que o mecanismo de ativação das hidroxilas do polímero deve ser dependente das regiões solvatadas por água e não pelo DMSO, o que explica os resultados obtidos.

4.5. Análise dos tipos de substituintes carboxíméticos

A grande vantagem da determinação do GS por HPLC é que esta técnica possibilita calcular a relação entre os substituintes glicosídicos para cada condição sintética estudada nesta Dissertação. As Tabelas 6 e 7 mostram a quantidade e tipos de

substituintes para as amostras de CMAM sintetizadas.

Tabela 6: Frações molares dos substituintes obtidos para a síntese a pressão reduzida (80 ± 20 mmHg), a 70 e 80 °C, na presença de 0 a 40% de água e seus respectivos valores de GS determinados por HPLC.

Pressão reduzida (80 ± 20 mmHg)						
Temperatura (°C)	Fração de água (%)	Grau de substituição (HPLC)	Não substituído	Monos-substituído	Dis-substituído	Tris-substituído
70	0	0,12	0,884	0,060	0,045	0,010
	10	0,48	0,537	0,311	0,152	0,000
	20	0,57	0,483	0,322	0,172	0,023
	30	0,62	0,450	0,344	0,156	0,049
	40	0,79	0,285	0,505	0,208	0,000
80	0	0,13	0,848	0,121	0,030	0,000
	10	0,52	0,496	0,361	0,132	0,011
	20	0,59	0,507	0,241	0,200	0,052
	30	0,70	0,421	0,296	0,228	0,055
	40	1,08	0,169	0,471	0,318	0,042

Tabela 7: Frações molares dos substituintes para a síntese a pressão ambiente (758,3 mmHg), a 70 e 80 °C, na presença de 0 a 40% de água e seus respectivos valores de GS determinados por HPLC.

Pressão ambiente (758,3 mmHg)						
Temperatura (°C)	Fração de água (%)	Grau de substituição (HPLC)	Não substituído	Monos-substituído	Dis-substituído	Tris-substituído
70	0	0,10	0,887	0,089	0,024	0,000
	10	0,71	0,365	0,408	0,217	0,011
	20	0,85	0,302	0,409	0,242	0,047
	30	0,88	0,342	0,306	0,260	0,092
	40	0,90	0,295	0,373	0,272	0,059
80	0	0,10	0,883	0,104	0,013	0,000
	10	0,59	0,470	0,331	0,168	0,030
	20	0,61	0,489	0,270	0,178	0,063
	30	0,74	0,396	0,320	0,206	0,077
	40	0,93	0,283	0,368	0,276	0,074

Através dos dados apresentados nas Tabelas 6 e 7 foi possível plotar os gráficos das frações de substituintes em função da fração de água utilizada na síntese. As Figuras 19 a 22 são referentes aos gráficos da fração de glicose não substituída, as estruturas monossustituídas (2-; 3- ou 6-mono-*O*-carboximetil glicose), dissustituídas (2,3-; 2,6- ou 3,6 di-*O*-carboximetil glicose) e trissustituídas (2,3,6-tri-*O*-carboximetil glicose), respectivamente.

A medida que a amilopectina é convertida em CMAM, as unidades glicosídicas não substituídas do biopolímero diminuem, de um modo inversamente proporcional com o GS. Portanto, assim como o GS, observa-se um perfil de diminuição similar entre a síntese realizada a 80 °C nas pressões ambiente e reduzida e 70 °C pressão reduzida (Figura 19), proporcionalmente ao perfil das curvas da Figura 18. O perfil que contrasta com os demais é o da síntese a 70 °C a pressão ambiente, assim como esperado na

Figura 17. A Figura 20 mostra a fração produzida de padrões de monossustituição (2-; 3- ou 6-mono-*O*-carboximetil glicose).

Figura 19: Fração molar de glicose não substituída em função da fração de água para todas as condições sintéticas estudadas (pressão reduzida ou ambiente, 70 ou 80 °C).

Figura 20: Fração molar dos monossustituídos (2-; 3- ou 6-mono-*O*-carboximetil) em função da fração de água para as condições sintéticas estudadas (pressão reduzida ou ambiente, 70 ou 80 °C).

Na Figura 20, nota-se que ao utilizar 40% de água, a pressão ambiente a 80 °C ou pressão reduzida a 70 ou 80 °C, há um favorecimento de produtos monossustituídos referente as estruturas 2-; 3- ou 6-mono-*O*-carboximetilamilopectina. Quando a síntese é feita a 70 °C a pressão ambiente, os produtos monossustituídos são favorecidos empregando-se uma menor quantidade água, entre 10 e 20%.

A Figura 21 refere-se à fração dos dissustituídos (2,3-; 2,6- ou 3,6 di-*O*-carboximetil glicose) em função das condições sintéticas aplicadas nesta Dissertação.

Figura 21: Fração molar dos dissustituídos (2,3-; 2,6- ou 3,6 di-*O*-carboximetil glicose) em função da fração de água para as condições sintéticas estudadas (pressão reduzida ou ambiente, 70 ou 80 °C).

A fração molar dos dissustituídos sintetizados a 80 °C, sob pressão reduzida (Figura 21), possui um perfil quase linear, diferindo das demais sínteses. Outro fato interessante é que para as sínteses realizadas na fração 40% de água para as sínteses realizadas a 70 e 80 °C a pressão ambiente, a fração molar de dissustituídos coincidem. Nota-se ainda que a maior quantidade de água utilizada na síntese, 40%, aumenta a quantidade de dissustituídos em qualquer situação sintética estudada (pressões reduzidas ou ambiente, temperaturas 70 ou 80 °C).

A Figura 22 exibe o perfil das frações trissustituídas 2,3,6-tri-*O*-carboximetil glicose nas condições de síntese deste trabalho.

Figura 22: Fração molar dos trissustituídos 2,3,6-tri-*O*-carboximetil glicose em função da fração de água condições sintéticas estudadas (pressão reduzida ou ambiente, 70 ou 80 °C).

Por fim, a Figura 22 e as Tabelas 6 e 7 mostram que a quantidade de trissubstituídos é menor do que as demais substituições. Porém, existe um favorecimento deste padrão de substituição quando se utiliza 30% de água.

Os perfis do padrão de funcionalização obtidos por HPLC exibido nas Tabelas 6 e 7 e Figuras 19 a 22 foi comparado com um modelo estatístico teórico inicialmente proposto por Spurlin (1939). O modelo considera que no decorrer da reação de carboximetilação da amilopectina, as quantidades de monômeros não substituídos diminuem ocorrendo a funcionalização do polímero. Estatisticamente, ocorre preferencialmente a formação do produto monossustituído no início da reação. Conforme a reação se processa, são formados os produtos dissustituídos e trissubstituídos, uma vez que pode ocorrer também a quebra do esqueleto polimérico da amilopectina. Portanto, para um GS teórico de 3, temos apenas produtos trissubstituídos. O modelo aplicado considera ainda que durante as reações de carboximetilação, as reatividades das três hidroxilas do polímero (posição C-2, C-3 e C-6) são equivalentes e constantes. Em outras palavras, o modelo assume que todas as hidroxilas do polímero são uniformemente acessíveis durante o decorrer da síntese (Salmi, 2011; Heinze, 2001).

Entretanto, este modelo estatístico se mostra simplista, pois a reatividade das hidroxilas varia e é altamente determinada pelo tipo de reação de substituição e das condições de síntese utilizadas (solvente, pressão e temperatura). Assim, a previsão teórica de como se comportam a reatividade das hidroxilas do monômero da amilopectina torna-se mais complexa (Salmi, 2011). Apesar desta simplificação, o modelo estatístico se mostra eficaz para determinadas condições e tem sido utilizado ao longo dos anos por vários de autores (Petzold, 2006; Heinze, 2001). Na literatura, podemos encontrar uma boa concordância onde os dados experimentais convergiram

muito bem em relação a este modelo teórico, como, por exemplo, na síntese da carboximetil xilana a partir de uma solução aquosa de 25% de NaOH em 2-propanol (Petzold, 2006) e para a síntese da carboximetil celulose em 2-propanol aquoso com concentrações de 8, 10, 15 e 20% de NaOH. Porém, Heinze et al. (2001), relatou que na síntese de carboximetilação do amido de batata em metanol, os valores obtidos das frações dos substituintes sofreram desvios em relação ao modelo estatístico. Apresentaram um desvio positivo para os monossobstituintes, negativo para os dissobstituintes e apenas resquícios de trissobstituintes.

Nesta Dissertação de Mestrado, as curvas teóricas foram calculadas a partir das equações 6 e 7. Estas curvas teóricas e os dados experimentais são mostrados nas Figuras 23 para as sínteses realizadas a 70 °C a pressão reduzida, e nas Figuras 24 a 26 para as sínteses realizadas a 80 °C a pressão reduzida; 70 °C, pressão ambiente e 80 °C, pressão ambiente, respectivamente.

Figura 23: Fração molar dos substituintes (teórica e experimental) em função do GS para as sínteses realizadas a 70 °C a pressão reduzida.

Figura 24: Fração molar dos substituintes (teórica e experimental) em função do GS para as sínteses realizadas a 80 °C a pressão reduzida.

Figura 25: Fração molar dos substituintes (teórica e experimental) em função do GS para as sínteses realizadas a 70 °C a pressão ambiente.

Figura 26: Fração molar dos substituintes (teórica e experimental) em função do GS para as sínteses realizadas a 80 °C a pressão ambiente.

Nesta Dissertação, obtivemos no máximo CMAM com GS próximos a 1,0, apesar de que as curvas teóricas terem sido calculadas até o máximo de substituição, 3,0. Levando-se isso em consideração, observam-se em todas as Figuras 23 a 26, que a fração molar experimental da glicose não substituída diminui concordando com o modelo teórico para as sínteses a pressão ambiente entre 0 a 40% de água e para as sínteses a pressão reduzida entre 0 a 30% de água. Já a fração molar dos monossustituídos para a síntese a 70 °C, pressão reduzida é bastante próxima ao modelo teórico de distribuição estatística de substituição. Para as demais condições sintéticas, nota-se pelas Figuras 23 a 26 comparando com a Figura 20 (Fração molar dos monossustituídos (2-; 3- ou 6-mono-*O*-carboximetil glicose) em função da fração de água) que quanto mais acentuada a inflexão observada na Figura 20, maior o desvio entre a fração molar dos monossustituídos experimental em relação a curva teórica. A pressão ambiente, a 70 ou 80 °C, o desvio dos valores experimentais para a fração molares dos monossustituídos é menor do que o teórico.

Nas Figuras 23 a 26, observam-se que as frações molares dos dissustituídos experimentais foram sempre maiores do que as curvas teóricas. Porém, os valores experimentais que mais se aproximam dos valores teóricos é novamente a síntese feita a 70 °C, pressão reduzida. Comparando os resultados das Figuras 23 a 26 com a Figura 21 (Fração molar dos dissustituídos (2,3-; 2,6- ou 3,6 di-*O*-carboximetil glicose) em função da fração de água usada na síntese), percebe-se que a fração molar dos dissustituídos que possui inflexão menos acentuada em relação a quantidade de água empregada é a desta síntese, 70 °C, pressão reduzida.

Para as frações molares dos trissustituídos experimentais e teóricos, das Figuras 23 a 26, notamos que todos os pontos experimentais estão acima da curva teórica. Voltando para a Figura 22 (Fração molar dos trissustituídos 2,3,6-tri-*O*-carboximetil

glicose em função da fração de água usada na síntese), notamos que há um ponto de máximo desta fração de trissubstituídos obtida com 30% de água, fazendo com que todas as sínteses em pressão ambiente ou reduzida, a 70 ou 80 °C, tenham uma inflexão muito acentuada. Por um outro lado, novamente os valores teóricos parecem prever melhor o comportamento dos valores experimentais para a síntese a pressão reduzida, a 70 °C.

Estes dados contrastam com os resultados obtidos por Heinze et al. (2001) e, mais uma vez, demonstra a importância das condições reacionais na obtenção dos diferentes substituintes. Podemos concluir também, que a 70 °C, sob pressão reduzida, tivemos uma condição sintética onde as hidroxilas dos monômeros de glicose da amilopectina estiveram submetidas a um padrão mais uniforme de acessibilidade e reatividade, diferente das demais condições estudadas. A 80 °C e pressão reduzida, teve uma maior retirada de água, essencial para a reação de carboximetilação se processar. Isto favoreceu um maior padrão de dissusstituídos e de trissubstituídos do que o calculado teórico. A pressão ambiente, tanto a 70 ou 80 °C, nota-se novamente um aumento de produtos dissusstituídos e trissubstituídos, em detrimento dos monossusstituídos.

É importante ressaltar que, atualmente, há um interesse muito grande na produção de materiais biodegradáveis. O amido, por sua abundância, é uma fonte renovável de baixo custo e pode ser utilizado para a produção de filmes biodegradáveis. Na literatura, a formação de filmes a partir do amido já é descrita (Tapia-Blácido, 2011), porém, um ponto para ser esclarecido é como se processa o mecanismo da reação de formação de filmes a partir do amido.

Como dito na introdução, a farinha do cereal tem na sua composição além da amilopectina e a amilose, lipídeos e proteínas (Tapia-Blácido, 2013) que variam em

razão da fonte botânica. Isto torna a determinação do mecanismo da reação química de formação de filmes usando a farinha e sorbitol, glicerol ou epicloridrinas bastante complexo. Com o estudo dos parâmetros sintéticos da reação de carboximetilação da amilopectina, obtivemos várias CMAM com GS e padrão de substituição bem determinado. Isto pode facilitar a encontrar relações entre as condições reacionais de síntese da CMAM e o tipo de filme que poderá ser obtido posteriormente.

Com o estudo dos parâmetros sintéticos da reação de carboximetilação da amilopectina, obtivemos várias CMAM com GS e padrão de substituição bem determinado. Isto pode facilitar a encontrar relações entre as condições reacionais de síntese da CMAM e o tipo de filme que poderá ser obtido posteriormente.

Neste sentido, algumas amostras sintetizadas de CMAM foram analisadas por medidas de potencial zeta, espalhamento de luz e microscopia ótica e de varredura eletrônica, que são descritos a seguir.

4.6. Medidas de Potencial Zeta e Espalhamento de Luz

4.6.1 Determinação do ponto isoelétrico (PIE)

As medidas de potencial zeta foram realizadas para duas amostras de CMAM sintetizadas a 70 °C, a pressão ambiente com 0 e 20% de água, de GS de 0,43 e 0,86, respectivamente. A influência do potencial zeta em função do pH foi analisada para, obter o ponto isoelétrico (PIE) de cada amostra. Os valores experimentais das médias do potencial zeta em função do pH estão representados na Tabela 8 e Figura 27.

Tabela 8: Valores experimentais das médias do potencial zeta (mV) em função do pH para as CMAM de GS de $0,86 \pm 0,01$ e $0,43 \pm 0,01$.

pH	Potencial zeta (mV)	
	GS 0,43	GS 0,86
2	2,40	2,30
3	2,00	2,10
4	1,37	-1,30
5	-0,93	-13,77
6	-16,57	-14,13
7	-17,43	-14,37
8	-19,27	-14,63

Figura 27: Gráfico do potencial zeta (mV) em função do pH para as CMAM de GS de $0,86 \pm 0,01$ e $0,43 \pm 0,01$.

Observam-se na Figura 27 que os pontos isoelétricos das CMAM de GS $0,86 \pm 0,01$ e $0,43 \pm 0,01$ ocorreram em pH de 3,60 e 4,60, respectivamente. Em solução aquosa, os grupos carboximetílicos das CMAM sintetizadas tendem a estar dissociados em solução e quanto maior o GS, maior a quantidade de cargas negativas presente na estrutura do polímero. Nesta situação torna-se necessária uma maior a quantidade de prótons (cargas positivas) para igualar o balanço entre cargas negativas dos grupos carboximetílicos. Por isso, o ponto isoelétrico do polímero de maior GS tende a ser em menor pH. Notamos, também, a CMAM que possui menor GS é a que apresenta menor solubilidade em solução aquosa. Porém, as duas amostras analisadas solubilizam bem em água, uma vez que o pH do PIE são menores do que o pH da água.

4.6.2 Determinação do raio hidrodinâmico (R_h)

Os experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizados para amostras de CMAM sintetizadas a 70 °C, às pressões reduzida e ambiente e a 80 °C, sob pressão reduzida com o emprego de 0 a 40% de água. A equação de Stokes-Einstein leva em consideração o cálculo do coeficiente de difusão de moléculas enoveladas de formato esférico (Schärtl, 2007). Porém, na prática, as macromoléculas em solução não permanecem estáticas, há um equilíbrio dinâmico, são solvatadas e, portanto, não são perfeitamente esféricas. Assim, o raio hidrodinâmico (R_h) calculado a partir dos valores do coeficiente de difusão da macromolécula em solução indica apenas o tamanho aparente da partícula solvatada. Outro fator a ser considerado é que com o aumento do GS, a repulsão entre os grupos aniônicos pode fazer com que o esqueleto da CMAM se abra, distanciando-se ainda mais do modelo esférico. Apesar destas observações, o espalhamento de luz dinâmico ainda pode ser utilizado comparativamente para a

determinação do raio hidrodinâmico (ou raio de Stokes) da molécula. Os dados de raio hidrodinâmico das amostras de CMAM sintetizadas encontram-se nas Tabelas 9 e 10 e as Figuras 28 e 29 mostram a relação entre Rh e o GS.

Tabela 9: Raio hidrodinâmico médio, Rh (nm), em função do grau de substituição para as CMAM sintetizadas a 70 °C, às pressões reduzida e ambiente com uso de 0 a 40% de água.

Pressão 80 ± 20 mmHg				Pressão 758,3 mmHg			
T (°C)	Fração de água (%)	GS	Rh (nm)	T (°C)	Fração de água (%)	GS	Rh (nm)
70	0	0,16 ± 0,01	46,5 ± 5,4	70	0	0,39 ± 0,04	34,9 ± 2,8
	10	0,52 ± 0,01	29,0 ± 1,3		10	0,65 ± 0,03	32,9 ± 0,3
	20	0,59 ± 0,01	27,6 ± 3,1		20	0,85 ± 0,02	31,1 ± 4,2
	30	0,67 ± 0,02	26,4 ± 0,4		30	0,90 ± 0,01	30,4 ± 0,8
	40	0,82 ± 0,01	22,5 ± 0,7		40	0,91 ± 0,01	29,0 ± 4,9

Figura 28: Raio hidrodinâmico médio (nm) em função do GS, para amostras de CMAM sintetizadas a 70 °C às pressões reduzida e ambiente, com uso de 0 a 40% de água.

Tabela 10: Raio hidrodinâmico médio, R_h (nm), em função do grau de substituição para as CMAM sintetizadas a 80 °C, às pressões reduzida com emprego de 0 a 40% de água.

Pressão 80 ± 20 mmHg			
T (°C)	Fração de água (%)	GS	Rh (nm)
80	0	0,35 ± 0,01	19,6 ± 0,5
	10	0,60 ± 0,04	29,4 ± 3,7
	20	0,64 ± 0,04	32,3 ± 4,4
	30	0,76 ± 0,03	37,8 ± 2,9
	40	1,01 ± 0,03	85,6 ± 4,1

Figura 29: Raio hidrodinâmico médio (nm) em função do GS, para amostras de CMAM sintetizadas a 80 °C a pressão reduzida com 0 a 40% de água.

Para as reações realizadas a 70 °C a pressão reduzida, Figura 28, podemos observar que amostras com GS semelhantes possuem Rh distintos. Por exemplo, com GS aproximado de 0,65, o Rh é $32,9 \pm 0,3$ nm e $26,4 \pm 0,4$ nm para a síntese a pressões ambiente e reduzida, respectivamente. Através das Figuras 17 e 18 (Grau de substituição em função da quantidade de água usada em cada síntese, para 70 °C em pressões ambiente e reduzida) nota-se uma diferença de comportamento entre ambas as sínteses. A síntese que emprega a pressão reduzida a 70 °C, exibe uma inflexão na curva do GS em função da fração de água e isto não é notado na síntese a pressão ambiente. Além disso, através das Figuras 19 a 22 (Frações molares da glicose não substituída; das estruturas monossustituídas 2-, 3- ou 6-mono-*O*-carboximetil glicose; dissustituídas 2,3-, 2,6- ou 3,6 di-*O*-carboximetil glicose e trissustituídas 2,3,6-tri-*O*-carboximetil glicose) e Tabelas 6 e 7 (Frações molares dos tipos de substituintes em função da quantidade de água empregada em cada síntese) percebemos que mesmo para polímeros de GS semelhantes, a fração dos substituintes não são necessariamente iguais. A 70 °C, pressão reduzida possui menor quantidade de estruturas dissustituídas e trissustituídas do que a pressão ambiente. Isto faz com que a solvatação de cada polímero seja diferente, provocando esta diferença do Rh para amostras de GS semelhantes.

Outro ponto a ser observado é que como a pressão ambiente, a 70 °C temos um polímero com uma maior quantidade de grupos carboximetílicos no mesmo monômero, do que a pressão reduzida na mesma temperatura. Desta forma, se compararmos o raio hidrodinâmico médio entre as duas sínteses, a pressão ambiente sempre possui um raio hidrodinâmico maior devido a repulsão entre os grupos substituintes presentes no esqueleto polimérico.

Por fim, o que os dados obtidos indicam na Tabela 9 e Figura 28 (Rh em função de GS) é que o aumento da solubilidade da CMAm em solução aquosa diminui o tamanho da partícula, contrariamente ao que se espera devido ao aumento de repulsão aniônica entre a funcionalização do esqueleto polimérico. Como as amostras foram purificadas e o excesso de sal proveniente da síntese foi retirado da solução, podemos descartar a interferência de contra-íon nessas medidas. Uma explicação possível seria que o polímero de menor GS por ser menos solúvel tende a se aglomerar. A medida que o GS aumenta, ou seja, a quantidade de grupos aniônicos aumenta, o polímero passa a ter uma maior afinidade com o solvente, tendendo a não estar mais aglomerado.

Por sua vez, para as sínteses realizadas a 80 °C a pressão reduzida, Tabela 10 e Figura 29, observou-se um aumento exponencial do Rh das partículas. Os dados obtidos podem ser explicados pelo fato que o polímero de maior GS possui uma grande quantidade de grupos carboximetílicos (aniônico) que podem ocasionar uma repulsão devido às cargas negativas do polímero em solução aquosa, aumentando o raio hidrodinâmico do polímero.

Para avaliar a hipótese do aumento do tamanho da partícula devido a repulsão dos grupos carboximetílicos presentes na estrutura da CMAm, realizou-se um experimento onde se avaliou o Rh variando-se a concentração de um contra-íon, no caso o cloreto de sódio. A Figura 30 mostra o perfil da variação do raio hidrodinâmico em função da concentração do contra-íon para a amostra de CMAm de GS $1,03 \pm 0,01$ sintetizada a 80 °C a pressão reduzida com 40% de água.

Figura 30: Raio hidrodinâmico (nm) em função da concentração do cloreto de sódio (mol/L) para a amostra de GS de $1,03 \pm 0,01$ sintetizada a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pressão reduzida com 40% de água.

Podemos notar que o tamanho do Rh decaiu exponencialmente com a adição do cloreto de sódio em aproximadamente 1/3 do tamanho do polímero sem contraíon. Este fato corrobora a hipótese levantada sobre a repulsão dos grupos carboxílicos da CMAm, pois o aumento da concentração do contraíon proporciona a estabilização das forças repulsivas dos grupos aniônicos. Notamos também, que adições superiores a concentração de 0,3 mol/L de cloreto de sódio não possui efeito significativo na redução do Rh, indicando que nesta concentração de NaCl se alcançou a máxima estabilização dos grupos carboximetílicos.

Por fim foi analisado a variação do raio hidrodinâmico em função do pH da solução para a amostra de CMAM de GS $0,93 \pm 0,01$ sintetizada a 70 °C a pressão ambiente com 40% de água, Figura 31.

Figura 31: Raio hidrodinâmico (nm) em função do pH para a amostra de GS 0,93 sintetizada a 70 °C a pressão ambiente com 40% de água.

A Figura 31 mostra que para baixo do pH 4 há uma diminuição acentuada do Rh. Isso se deve ao fato que a alta concentração de prótons ácidos ajuda na estabilização do polímero, diminuindo as forças repulsivas dos grupos carboximetílicos. Em contrapartida para pH acima de 7, a repulsão dos grupos carboximetílicos começa a ser favorecida pelo aumento da quantidade de íons hidróxido em solução.

4.7. Microscopias óptica e eletrônica de varredura (MEV)

4.7.1 Microscopia óptica

As análises de microscopia óptica foram realizadas para verificar a possível formação de filmes a partir de suspensões 5% (m/m) da CMAm e da amilopectina em água, as amostras foram solubilizadas sem aquecimento. Estas suspensões foram dispersas em lâminas de vidro e foram deixadas em temperatura ambiente de um dia para o outro para que fosse seco o excesso de água. As imagens obtidas na microscopia óptica são de filmes secos obtidos destas suspensões sem a adição de corantes. A ampliação de todas as imagens foi de 200 vezes o tamanho original. Foi analisada a microestrutura dos filmes formados a partir das CMAm sintetizadas com 0, 20 e 40% de água para as temperaturas de 70 e 80 °C nas pressões reduzida e ambiente. A Figura 32 mostra, inicialmente, a imagem da amilopectina não modificada.

Figura 32: Microscopia óptica da amilopectina.

A estrutura apolar da amilopectina faz com que os grânulos em solução aquosa formem aglomerados devido às interações hidrofóbicas. Isso leva a formação de microdomínios de amilopectina. Na literatura, encontramos trabalhos que relatam a micrografia de filmes formados por amido de batata ou composição variável de amilose e amilopectina (Rindlav-Westling, Stading & Gatenholm, 2002; Rindlav-Westling & Gatenholm, 2003). Porém, as micrografias desta Dissertação não são totalmente comparáveis às da literatura devido ao modo de preparo dos filmes. Nos trabalhos citados, (Rindlav-Westling et al., 2002; Rindlav-Westling et al., 2003), os filmes são formados a partir da dissolução de 3% (m/m) do polímero (amido ou amilopectina ou amilose) em água por um aquecimento em um forno de autoclave, com temperatura de 135 a 145 °C por duas horas. As soluções obtidas foram colocadas em placas de Petri e deixadas para secar em uma sala climatizada com 50% de umidade relativa a 23 °C. O filme de amilopectina obtido nestas condições foi analisado por microscopia de força atômica, que indicou uma superfície bastante áspera, enquanto a imagem de microscopia ótica do amido também indica a presença de vários microdomínios (Rindlav-Westling et al., 2002).

Nesta Dissertação, observa-se pela Figura 32 que as suspensões de 5% (m/m) da amilopectina em água não são suficientes para a degradação da estrutura dos grânulos (processo de gelatinização). Trabalhos encontrados na literatura (Souza & Andrade, 2000) relatam que para a obtenção de um material termoplástico composto de amido, a estrutura do grânulo do amido precisa ser destruída (geralmente pelo processo de gelatinização ou extrusão), originando uma matriz polimérica homogênea e essencialmente amorfa.

A Figura 33 exibe a microscopia óptica de suspensões de 5% (m/m) de CMAM sintetizada a 70 °C, a pressão reduzida para as frações 0% (A), 20% (B) e 40% (C) de água com GS determinados por HPLC de 0,12 (A), 0,57 (B) e 0,79 (C).

Figura 33: Microscopia óptica de 5% (m/m) CMAM sintetizada a 70 °C a pressão reduzida com o emprego de 0 (A), 20 (B) e 40% (C) de água com GS de 0,12 (A), 0,57 (B) e 0,79 (C).

A análise das microscopias das amostras sintetizadas a 70 °C sob pressão reduzida, mostra um aumento do grau de homogeneidade dos filmes em relação ao aumento do GS. A Figura 33A mostra a perda da estrutura granular da amilopectina. Com a inserção de grupos hidrofílicos, ocorre o início da solubilização da amilopectina em água, o que favorece a formação de uma matriz mais homogênea para o filme. Porém, como o GS é baixo (0,12) nota-se ainda a presença de microdomínios hidrofóbicos. As Figuras 33B e C mostra a redução dos microdomínios hidrofóbicos, em função do aumento do GS. Para a amostra de GS 0,57 ainda se evidencia a presença de sítios hidrofóbicos em forma de vesículas, ocorrendo a completa homogeneização para a amostra de GS 0,79.

A Figura 34 mostra a microscopia óptica de 5% (m/m) de CMAM sintetizada 80 °C a pressão reduzida para as frações de 0 (A), 20 (B) e 40% (C) de água com GS determinados por HPLC de 0,13 (A), 0,59 (B) e 1,08 (C).

Figura 34: Microscopia óptica de 5% (m/m) de CMAM sintetizada 80 °C a pressão reduzida para as frações 0 (A), 20 (B) e 40% (C) de água com GS de 0,13 (A), 0,59 (B) e 1,08 (C).

As amostras sintetizadas a pressão reduzida a 80 °C (Figura 34) mostram um comportamento diferente das obtidas a 70 °C. A amostra de menor GS (0,13) formou um filme completamente homogêneo de modo similar ao filme formado pela amostra de maior GS (0,79) sintetizada a 70 °C e pressão reduzida. Para a amostra de GS 0,59 notou-se a presença de cavidades na formação dos filmes, o que evidencia a sua heterogeneidade. Por fim, a amostra de GS 1,08 apresentou uma estrutura interessante, semelhante a um hidrogel. Segundo Reis (2007) hidrogéis são redes de polímeros hidrofílicos, química ou fisicamente reticuladas capazes de absorver grande quantidade de água e/ou fluidos biológicos sem perder a sua estrutura dimensional (3D).

A análise dos tipos de substituintes pode esclarecer alguns pontos na formação diferentes entre os filmes obtidos de amostras sintetizadas a pressão reduzida, assim como a análise do Raio hidrodinâmico das amostras.

As Figuras 35 e 36 mostram a microscopia óptica de 5% (m/m) de CMAM sintetizada 70 e 80 °C, respectivamente, a pressão ambiente para as frações 0 (A), 20 (B) e 40% (C).

Figura 35: Microscopia óptica de 5% (m/m) de CMAM sintetizada 70 °C a pressão ambiente para as frações 0 (A), 20 (B) e 40% (C) de água com GS de 0,10 (A), 0,85 (B) e 0,90 (C).

Figura 36: Microscopia óptica de 5% (m/m) CMAM sintetizada 80 °C a pressão ambiente para as frações 0 (A), 20 (B) e 40% (C) de água com GS de 0,10 (A), 0,61 (B) e 0,93 (C).

As sínteses realizadas nas condições de 70 e 80 °C a pressão ambiente, mostram um comportamento dos filmes e suspensões independente do GS. Por exemplo, para as

amostras da síntese com 100% de DMSO, apesar de possuírem GS (0,10) iguais, apresentam propriedades muito distintas. Para a amostra sintetizada a 70 °C, pressão ambiente (Figura 35A) ocorreu a formação de uma suspensão de alta viscosidade, o que não se evidenciou no filme sintetizado a 80 °C (Figura 36A). Isto pode estar relacionado com o padrão de substituição obtido entre estas duas amostras. A primeira possui um pouco mais de estruturas dissustituídas do que a segunda, ocasionando o aumento de viscosidade.

Por fim, os filmes elaborados com 40% de água, a pressão ambiente, apresentaram a formação de duas estruturas distintas. A primeira sintetizada a 70 °C e com GS de 0,90 ($29,0 \pm 1,3$ nm) exibe um filme com superfície irregular com a formação de estrias, enquanto que a segunda produzida a 80 °C, com GS de 0,93 mostra uma estrutura semelhante ao hidrogel da amostra de GS 1,08 ($85,6 \pm 4,1$). Estes valores indicam que o hidrocolóide pode ser favorecido pelos produtos que apresentam maiores valores de Rh, em contraste das amostras que tenderam a formar filmes com Rh entre 20 nm a 40 nm.

Estes fatos sugerem que a distribuição dos tipos de substituintes ao longo do biopolímero apresenta grande influência nas propriedades mecânicas e morfológicas dos filmes e suspensões. A princípio podemos sugerir através da análise das Figuras 23 a 26 e 33 a 36 que polímeros com maior fração di- e trissubstituintes, possuem grande tendência a formar estruturas semelhantes a um hidrocolóide ou hidrogel. Enquanto que os polímeros com maior fração de monossustituíntes apresentam maior tendência a formar filmes heterogêneos.

4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é útil na avaliação da morfologia do grânulo de amilopectina e das modificações estruturais que ocorre no sólido após a funcionalização do polímero.

Nas Figuras 37 a 40 apresentam-se as micrografias referentes a amilopectina, a CMAM sintetizadas a 70 °C a pressão ambiente para as frações 0 e 30% de água e a 70 °C pressão reduzida com 30% de água.

Figura 37: Microscopia eletrônica de varredura de um aglomerado de amilopectina com ampliação de 2000x (A), e dos grânulos individuais de amilopectina com ampliação de 2000x (B) e 1000x (C).

A estrutura poliédrica e polimórfica do grânulo de amilopectina (Figura 37) condiz com as estruturas provenientes do milho ceroso, de tamanho entre 5 a 20 μm , descritas na literatura (Cereda et al. 2002).

Figura 38: Microscopia eletrônica de varredura da CMAm de GS 0,35 sintetizada a 70 °C, pressão ambiente e fração 30% de água, com ampliação de 2000x (A) e 1000x (B).

As micrografias referentes as CMAm mostram a perda da estrutura granular bem definida característica da amilopectina sem modificação. A Figura 38 mostra a formação de novas partículas de até 10 vezes o tamanho do grânulo original. Nota-se também a presença de microporos muito bem definidos. Estes microporos podem ter sido formados devido a presença de água de hidratação na superfície do polímero.

Figura 39: Microscopia eletrônica de varredura da CMAM de GS 0,62 sintetizada a 70 °C, pressão reduzida e fração 30% de água, com ampliação de 2000x (A) e 1000x (B).

Figura 40: Microscopia eletrônica de varredura da CMAM de GS 0,90 sintetizada a 70 °C, pressão ambiente e fração 30% de água, com ampliação de 1000x (A), 2000x (B) e 2000x (C).

As micrografias referentes a Figura 39, apresentaram superfície rugosa, com presença de poros e de aglomerados, em comparação, os tamanhos dos poro são maiores dos que os encontrados para as partículas referentes a Figura 38 (GS 0,12). O maior valor do GS (0,62) para estas partículas (polímero mais hidrofílico) pode explicar esse fato, se os poros forem relacionados a água de hidratação do polímero. Por fim, as partículas de CMAM com GS 0,88 (Figura 40) não apresentaram poros, porém nota-se uma grande presença de fragmentos agregados.

5. Conclusões

5. Conclusões

Apresentamos neste trabalho, um método de síntese da carboximetil amilopectina utilizando uma mistura de DMSO-água com adição de reagentes sólidos (hidróxido de sódio e ácido cloro-acético) e remoção de água por meio da variação da pressão no sistema reacional, inédito na literatura. Foram obtidos produtos de GS variados com valores no máximo próximos a 1,0. As CMAM sintetizadas tiveram seu grau de substituição analisados por meio de uma titulação condutimétrica com base fraca, cujos resultados foram confirmados por HPLC, apresentando boa concordância entre os métodos. Porém a grande vantagem do método de determinação do GS por cromatografia foi a possibilidade da análise dos tipos de substituintes carboximetílicos produzido por cada condição reacional, mostrando que além das variáveis pressão e temperatura, a solubilização da amilopectina e a reatividade dos íons hidróxidos definem os tipos de substituintes nos produtos.

Determinou-se por potencial zeta o PIE de duas amostras de CMAM sintetizadas a 70 °C e pressão ambiente, de grande interesse comercial devido a facilidade de produção, obtendo-se os PIE no pH de 3,60 e 4,60 para a amostra de GS 0,86 e 0,43 respectivamente. As medidas de espalhamento dinâmico de luz sugeriram que a funcionalização da amilopectina com grupos carboximetílicos, levou a abertura da sua estrutura inicial, extremamente ramificada, devidos a repulsão dos grupos aniônicos provenientes da inserção dos grupos carboximetílicos, permitindo a formação de agregados maiores para as amostras sintetizadas a 80 °C pressão reduzida, enquanto que para as sínteses a 70 °C a pressão ambiente e reduzida, houve um aumento do Rh em função do GS. Por fim, realizou-se suspensões 5% das CMAM e formou-se filmes através destas soluções. Foi verificado que a formação dos filmes é altamente

dependente de fatores como tipos de substituinte e do Rh dos polímeros em solução. As análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram que os produtos sintetizados não exibiram a estrutura granular bem definida característica da amilopectina sem modificação.

6. Referências bibliográficas

6. Referencias Bibliográficas

- Abd El-Rehim, H. A., Hegazy, E.-S. A., Ali, A. M., & Rabie, A. M. (2004). Synergistic effect of combining UV-sunlight–soil burial treatment on the biodegradation rate of LDPE/starch blends. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 163(3), 547-556.
- Akoh, C. C., Chang, S. W., Lee, G. C., & Shaw, J. F. (2008). Biocatalysis for the Production of Industrial Products and Functional Foods from Rice and Other Agricultural Produce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10445-10451.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (Eds.). (2009). *Food Chemistry* (4th revised and extended ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Bertoft, E. (2007). Composition of clusters and their arrangement in potato amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 433-446.
- Bhattacharyya, D., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (1995). Physicochemical properties of carboxymethyl starch prepared from corn and waxy amaranth starch. *Carbohydrate Polymers*, 27(3), 167-169.
- Bueno, B. Y. M. (2007). *Remoção de Pb, Cr e Cu por Processo Combinado Biossorção/Bioflotação utilizando a Cepa Rhodococcus Opacus*. Tese de Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Butarelo, S. S., Beleia, A., Fonseca, I. C. d. B., & Ito, K. C. (2004). Hidratação de tecidos de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) e gelatinização do amido durante a cocção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24, 311-315.

- Capitani, D., Porrob, F., & Segrea, A. L. (2000). High field NMR analysis of the degree of substitution in carboxymethyl cellulose sodium salt. *Carbohydrate Polymer*, 42, 283–286.
- Chronakis, I. S., Egermayer, M., & Piculell, L. (2002). Thermoreversible Gels of Hydrophobically Modified Hydroxyethyl Cellulose Cross-Linked by Amylose. *Macromolecules*, 35(10), 4113-4122.
- Di Bari, M., Deriu, A., Albanese, G., & Cavatorta, F. (2003). Dynamics of hydrated starch saccharides. *Chemical Physics*, 292(2–3), 333-339.
- Fechine, G. J. M., Santos, J. A. B. d., & Rabello, M. S. (2006). Avaliação da fotodegradação de poliolefinas através de exposição natural e artificial. *Química Nova*, 29, 674-680.
- Florence, A. T., & Attwood, D. (2003). *Princípios físico químicos em farmácia*. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo.
- Gelders, G. G., Goesart, H., & Delcour, J. A. (2006). Amylose–Lipid Complexes as Controlled Lipid Release Agents during Starch Gelatinization and Pasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1493-1499.
- Heinze, T. (Ed.). (2005). *Polysaccharides I. Structure, Characterization and Use*. Berlin: Springer-Verlag.
- Heinze, T., Liebert, T., Heinze, U., & Schwikal, K. (2004). Starch derivatives of high degree of functionalization 9: carboxymethyl starches. *Cellulose*, 11(2), 239-245.
- Heinze, T., Pfeiffer, K., Liebert, T., & Heinze, U. (1999). Effective approaches for estimating the functionalization pattern of carboxymethyl starch of different origin. *Starch/Stärke*, 51, 11-16.
- Heinze, T. H., Pfeiffer, K., & Lazik, W. (2001). Starch derivatives with high degree of functionalization. III. Influence of reaction conditions and starting materials on

- molecular structure of carboxymethyl starch. *Journal of Applied Polymer Science*, 81(8), 2036-2044.
- Heinze, U., Heinze, T., & Klemm, D. (1999). Synthesis and structure characterization of 2,3-O-carboxymethylcellulose. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 200(4), 896-902.
- Jafelicci, J. M., & Varanda, L. C. O. (1999). O Mundo dos Colóides. *Química Nova na Escola*, 9, 9-13.
- Jane, J.-L., & Robyt, J. F. (1984). Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydrate Research*, 132(1), 105-118.
- Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 210-218.
- Kaczmarek, H., & Oldak, D. (2006). The effect of UV-irradiation on composting of polyethylene modified by cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 91(10), 2282-2291.
- Karlberg, M., Piculell, L., & Ragout, S. (2006). Gels of Hydrophobically Modified Hydroxyethyl Cellulose Cross-Linked by Amylose. Competition with Cyclodextrin. *Langmuir*, 22(5), 2241-2248.
- Kurakake, M., Hagiwara, H., & Komaki, T. (2004). Effects of Various Surfactants on Rheological Properties of Maize Starch Granules. *Cereal Chemistry Journal*, 81(1), 108-114.
- Lawal, O. S., Lechner, M. D., Hartmann, B., & Kulicke, W.-M. (2007). Carboxymethyl Cocoyam Starch: Synthesis, Characterisation and Influence of Reaction Parameters. *Starch - Stärke*, 59(5), 224-233.

-
- Lee, S., Kim, S. T., Pant, B. R., Kwen, H. D., Song, H. H., Lee, S. K., & Nehete, S. V. (2010). Carboxymethylation of corn starch and characterization using asymmetrical flow field-flow fractionation coupled with multiangle light scattering. *Journal of Chromatography A*, 1217(27), 4623-4628.
- Lide, D. R. (2005). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (85th ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Lima, R. M. F., & Quirino, L. (2003). Efeito da adsorção de amina no potencial zeta da hematita e do quartzo. *Rem: Revista Escola de Minas*, 56, 45-49.
- Liu, X., Wang, Y., Yu, L., Tong, Z., Chen, L., Liu, H., & Li, X. (2013). Thermal degradation and stability of starch under different processing conditions. *Starch - Stärke*, 65(1-2), 48-60.
- Liu, Y., Himmelsbach, D. S., & Barton, F. E. (2004). Two-dimensional Fourier transform Raman correlation spectroscopy determination of the glycosidic linkages in amylose and amylopectin. *Applied Spectroscopy*, 58(6), 745-749.
- Luallen, T. (2004). Utilizing starches in product development. In A. C. Eliasson (Ed.), *Starch in food: structure, function and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Lundqvist, H., Eliasson, A. C., & Olofsson, G. (2002a). Binding of hexadecyltrimethylammonium bromide to starch polysaccharides. Part I. Surface tension measurements. *Carbohydrate Polymers*, 49(1), 43-55.
- Lundqvist, H., Eliasson, A. C., & Olofsson, G. (2002b). Binding of hexadecyltrimethylammonium bromide to starch polysaccharides. Part II. Calorimetric study. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 109-120.
- Manners, D. J. (1989). Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers*, 11(2), 87-112.

-
- Miranda, J. A. (2008). *Avaliação dos Agregados ("Clusters") da Amilopectina em Solução Aquosa*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Miranda, J. A., Cacita, N., & Okano, L. T. (2007). Evaluation of amylopectin clusters and their interaction with nonionic surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60(1), 19-27.
- Munhoz, M. P., Weber, F. H., & Chang, Y. K. (2004). Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24, 403-406.
- Nafchi, A. M., Moradpour, M., Saeidi, M., & Alias, A. (2013). Thermoplastic starches: Properties, challenges, and prospects. *Starch-Starke*, 65(1-2), 61-72.
- Nagamine, T., & Komae, K. (1996). Improvement of a method for chain-length distribution analysis of wheat amylopectin. *Journal of Chromatography A*, 732(2), 255-259.
- Nimz, O., Gessler, K., Usón, I., Sheldrick, G. M., & Saenger, W. (2004). Inclusion complexes of V-amylose with undecanoic acid and dodecanol at atomic resolution: X-ray structures with cycloamylose containing 26 d-glucoses (cyclohexaicosaoose) as host. *Carbohydrate Research*, 339(8), 1427-1437.
- Oromiehie, A. R., Iari, T. T., & Rabiee, A. (2013). Physical and thermal mechanical properties of corn starch/LDPE composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(2), 1128-1134.
- Perry, P. A., & Donald, A. M. (2002). The effect of sugars on the gelatinisation of starch. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 155-165.
- Petzold, K., Schwikal, K., & Heinze, T. (2006). Carboxymethyl xylan--synthesis and detailed structure characterization. *Carbohydrate Polymers*, 64(2), 292-298.

- Reuben, J., & Conner, H. T. (1983). Analysis of the carbon-13 n.m.r. spectrum of hydrolyzed O-(carboxymethyl)cellulose: monomer composition and substitution patterns. *Carbohydrate Research*, 115(0), 1-13.
- Rodembusch, F. S. (2001). *Espalhamento de luz estático e dinâmico em polímeros do tipo polimetacrilato, fluorescentes por transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (TPIEE)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Rondeau-Mouro, C., Bail, P. L., & Buléon, A. (2004). Structural investigation of amylose complexes with small ligands: inter- or intra-helical associations? *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(5), 251-257.
- Roy, S. B., Ramaraj, B., Shit, S. C., & Nayak, S. K. (2011). Polypropylene and potato starch biocomposites: Physicomechanical and thermal properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 120(5), 3078-3086.
- Salmi, T., Damlin, P., Mikkola, J.-P., & Kangas, M. (2011). Modelling and experimental verification of cellulose substitution kinetics. *Chemical Engineering Science*, 66(2), 171-182.
- Sarmiento, S. B. S., Reis, M. M., Ferreira, M. M. C., Cereda, M. P., Pentead, M. V. C., & Dos Anjos, C. B. (1999). Análise quimiométrica de propriedades físicas, físico-químicas de féculas de mandioca. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2(1,2), 131-137.
- Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. d. L., & Pohlmann, A. R. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26, 726-737.
- Schärftl, W. (2007). *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Berlin: Springer.

- Shi, B., Shlepr, M., & Palfery, D. (2011). Effect of blend composition and structure on biodegradation of starch/ecoflex-filled polyethylene films. *Journal of Applied Polymer Science*, 120(3), 1808-1816.
- Soares, V. F. (2009). *Dispersão e estabilização de partículas submicrométricas de óxido de alumínio em sistemas líquidos destinados à produção de materiais refratários*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Spurlin, H. M. (1939). Arrangement of Substituents in Cellulose Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 61(8), 2222-2227.
- Spychaj, T., Wilpiszewska, K., & Zdanowicz, M. (2013). Medium and high substituted carboxymethyl starch: Synthesis, characterization and application. *Starch-Starke*, 65(1-2), 22-33.
- Stojanović, Ž., Jeremić, K., Jovanović, S., & Lechner, M. D. (2005). A Comparison of Some Methods for the Determination of the Degree of Substitution of Carboxymethyl Starch. *Starch - Stärke*, 57(2), 79-83.
- Svensson, E., Gudmundsson, M., & Eliasson, A.-C. (1996). Binding of sodium dodecylsulphate to starch polysaccharides quantified by surface tension measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 6(4-5), 227-233.
- Tapia-Blácido, D. R., do Amaral Sobral, P. J., & Menegalli, F. C. (2011). Optimization of amaranth flour films plasticized with glycerol and sorbitol by multi-response analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8), 1731-1738.
- Tapia-Blácido, D. R., Sobral, P. J. D., & Menegalli, F. C. (2013). Effect of drying conditions and plasticizer type on some physical and mechanical properties of amaranth flour films. *Lwt-Food Science and Technology*, 50(2), 392-400.

-
- Tatongjai, J., & Lumdubwong, N. (2010). Physicochemical properties and textile utilization of low- and moderate-substituted carboxymethyl rice starches with various amylose content. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 377-384.
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165.
- Tian, Y., Li, Y., Xu, X., & Jin, Z. (2011). Starch retrogradation studied by thermogravimetric analysis (TGA). *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 1165-1168.
- Tijssen, C. J., Kolk, H. J., Stamhuis, E. J., & Beenackers, A. A. C. M. (2001). An experimental study on the carboxymethylation of granular potato starch in non-aqueous media. *Carbohydrate Polymers*, 45(3), 219-226.
- Tijssen, C. J., Scherpenkate, H. J., Stamhuis, E. J., & Beenackers, A. A. C. M. (1999). Optimisation of the process conditions for the modification of starch. *Chemical Engineering Science*, 54(13–14), 2765-2772.
- Tuckerman, M. E., Marx, D., & Parrinello, M. (2002). The nature and transport mechanism of hydrated hydroxide ions in aqueous solution. *Nature*, 417(6892), 925-929.
- Tufvesson, F., Wahlgren, M., & Eliasson, A.-C. (2003a). Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 1. Monoglycerides. *Starch - Stärke*, 55(2), 61-71.
- Tufvesson, F., Wahlgren, M., & Eliasson, A.-C. (2003b). Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 2. Fatty Acids. *Starch - Stärke*, 55(3-4), 138-149.
- Vermeulen, R., Goderis, B., Reynaers, H., & Delcour, J. A. (2004). Amylopectin Molecular Structure Reflected in Macromolecular Organization of Granular Starch. *Biomacromolecules*, 5(5), 1775-1786.

- Vieyra, H., Aguilar-Méndez, M. A., & San Martín-Martínez, E. (2013). Study of biodegradation evolution during composting of polyethylene–starch blends using scanning electron microscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(2), 845-853.
- Vishnyakov, A., Widmalm, G., & Laaksonen, A. (2000). Carbohydrates Exhibit a Distinct Preferential Solvation Pattern in Binary Aqueous Solvent Mixtures. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(1), 140-142.
- Vogel, A. (1981). *Análise Inorgânica Quantitativa* (4th ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Volkert, B., Lehmann, A., Greco, T., & Nejad, M. H. (2010). A comparison of different synthesis routes for starch acetates and the resulting mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 571-577.
- Volkert, B., Loth, F., Lazik, W., & Engelhardt, J. (2004). Highly Substituted Carboxymethyl Starch. *Starch - Stärke*, 56(7), 307-314.
- Waigh, T. A., Kato, K. L., Donald, A. M., Gidley, M. J., Clarke, C. J., & Riekkel, C. (2000). Side-Chain Liquid-Crystalline Model for Starch. *Starch - Stärke*, 52(12), 450-460.
- Weiner, B. B., Tscharnuter, W. W., & Fairhurst, D. (1993). *Zeta potential: A new approach*. Paper presented at the Canadian Mineral Analysts Meeting, Winnipeg Manitoba, Canada.
- Zhang, B., Li, X., Liu, J., Xie, F., & Chen, L. (2013). Supramolecular structure of A- and B-type granules of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 31(1), 68-73.
- Zhou, X., Yang, J., & Qu, G. (2007). Study on synthesis and properties of modified starch binder for foundry. *Journal of Materials Processing Technology*, 183(2–3), 407-411.

7. Anexos

7.1 Anexo I

Figura AI: Perfil característico da titulação condutimétrica de amostras de CMAM sintetizadas a 70 °C pressão reduzida (80 ± 20 mmHg) com fração de 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E) e 50% (F) de água.

Figura AII: Perfil característico da titulação condutimétrica de amostras de CMAM sintetizadas a 80 °C pressão reduzida (80 ± 20 mmHg) com fração de 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E) e 50% (F) de água.

Figura AIII: Perfil característico da titulação condutimétrica de amostras de CMAM sintetizadas a 70 °C pressão ambiente (758,3 mmHg) com fração de 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E) e 50% (F) de água.

Figura AIV: Perfil característico da titulação condutimétrica de amostras de CMAM sintetizadas a 80 °C pressão ambiente (758,3 mmHg) com fração de 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E) e 50% (F) de água.

7.2 Anexo II

Figura BI: Cromatograma obtido por HPLC com ajuste Gaussiano para as CMAM sintetizadas a 70 °C e pressão reduzida (80 ± 20 mmHg) com fração de 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D) e 40% (E) de água.

Figura BII: Cromatograma obtido por HPLC com ajuste Gaussiano para as CMAM sintetizadas a 80 °C e pressão reduzida (80 ± 20 mmHg) com fração de 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D) e 40% (E) de água.

Figura BIII: Cromatograma obtido por HPLC com ajuste Gaussiano para as CMAM sintetizadas a 70 °C e pressão ambiente (758,3 mmHg) com fração de 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D) e 40% (E) de água.

Figura BIV: Cromatograma obtido por HPLC com ajuste Gaussiano para as CMAM sintetizadas a 80 °C e pressão ambiente (758,3 mmHg) com fração de 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D) e 40% (E) de água.