UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SANTIAGO RAMÍREZ LÓPEZ

**Modificação do amido de *cañihua* (*Chenopodium pallidicaule*) para
aplicação como estabilizante em emulsão *Pickering***

Pirassununga

2020

SANTIAGO RAMÍREZ LÓPEZ

**Modificação do amido de *cañihua* (*Chenopodium pallidicaule*) para
aplicação como estabilizante em emulsão *Pickering***

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia e Ciências de Materiais.

Área de Concentração: Engenharia e Ciência de Materiais - Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais Voltados à Agroindústria.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

Pirassununga

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R173m Ramírez-López, Santiago
Modificação do amido de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) para aplicação como estabilizante em emulsão Pickering / Santiago Ramírez-López ; orientador Izabel Cristina Freitas Moraes ; coorientador Paulo José do Amaral Sobral. -- Pirassununga, 2020.
128 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Amido modificado. 2. OSA. 3. Pseudocereais. 4. Propriedades físico-químicas. 5. Estabilidade de emulsão. I. Moraes, Izabel Cristina Freitas, orient. II., Paulo José do Amaral Sobral, coorient. III. Título.

ATA DE DEFESA

Aluno: 74133 - 8836622 - 2 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Tese do(a) Senhor(a) Santiago Ramirez López no Programa: Engenharia e Ciência de Materiais, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 07 dias do mês de abril de 2020, no(a) Sala de Defesas realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Santiago Ramirez López, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulada:

"Modificação do amido de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) para aplicação como estabilizante em emulsão Pickering"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Izabel Cristina Freitas Moraes	Presidente	FZEA - USP	<u>APROVADO</u>
Cynthia Ditchfield	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADO</u>
Manoel Divino da Matta Junior	Titular	Externo	<u>APROVADO</u>
Carmen Eloisa Velezmoro Sánchez	Titular	UNALM - Externo	<u>APROVADO</u>
Andresa Gomes Brunassi	Titular	Externo	<u>APROVADO</u>

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 07 dias do mês de abril de 2020.

P/ Cynthia Ditchfield

P/ Manoel Divino da Matta Junior

P/ Carmen Eloisa Velezmoro Sánchez

P/ Andresa Gomes Brunassi

Izabel Cristina Freitas Moraes
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 08/04/2020 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutor em Ciências obtido no Programa Engenharia e Ciência de Materiais - Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais voltados à Agroindústria.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Prof. Dr. Rosemary Aparecida de Carvalho
FZEA / USP

DEDICATÓRIA

Esse trabalho está dedicado para todas as pessoas que acreditam que os sonhos podem tornar-se realidade com base no trabalho e no esforço. Às pessoas que continuam lutando pelos seus nobres objetivos, ainda que as suas forças possam faltar. Para aqueles que fazem da perseverança, associada à disciplina e acompanhada da paciência, seus valores para enfrentar os maiores desafios.

Com profundo apreço, dedico essa pesquisa para aqueles que procuram incrementar o conhecimento, entregando suas energias e utilizando seu intelecto para o crescimento e desenvolvimento da ciência. Cientes que a educação forjada na investigação é um caminho abnegado e muitas vezes incompreendido ou desestimado, porém de vital importância para a formação do pensamento crítico das pessoas. Também para aqueles que consideram que o avanço do conhecimento científico das diversas áreas do conhecimento aporta ao bem-estar da sociedade e a qualidade de vida das pessoas.

De maneira especial dedico esse trabalho para os pesquisadores e pessoas apaixonadas pelo potencial dos recursos naturais encontrados no Peru. O desejo é que elas possam encontrar nesta tese, além de informação técnica, a necessária motivação para empreender projetos destinados ao aproveitamento e uso sustentável das riquezas naturais do Peru, contribuindo ao desenvolvimento socioeconômico.

AGRADECIMENTOS

Porque tanto o querer como o efetuar provém de Deus, por isso que meu humilde agradecimento é para Ele.

Todas as palavras de reconhecimento às pessoas que acreditaram e apoiaram a realização deste projeto. O presente trabalho é o resultado de um esforço conjunto de pessoas admiráveis e únicas, que constantemente me incentivaram em continuar ainda que quando tudo parecia impossível. Foi reconfortante sentir o estímulo incondicional de cada uma delas. Foram muitas pessoas que de maneira direta ou indireta me acompanharam no caminho da pesquisa e que nas seguintes linhas gostaria de mencionar.

Minha família foi meu porto seguro em todo momento, que apesar da distância e do tempo separados, os laços de amor permaneceram fortes. Minha mãe Lidia e minha irmã Claudia me transmitiram coragem e afeto que renovaram minhas esperanças. Muito obrigado pelas suas orações também.

À professora Dra. Izabel C. Freitas que com seu ajuda, paciência e amizade me forneceu grande suporte acadêmico. Os anos de trabalho juntos foram um caminho de aprendizagem e constante crescimento acadêmico e profissional. Suas ações me envolveram e me fizeram sentir como um filho. A meu co-orientador professor Dr. Paulo Sobral que, desde antes de chegar a Brasil, me mostrou com carisma e desinteressadamente seu apoio. Para a professora Cynthia Ditchfield, pelas sugestões e revisões nos trabalhos de pesquisa.

Meus queridos colegas do laboratório muito obrigado pela amizade. Paula Figueredo, Monique Chung e Giselle Vallin obrigado por compartilhar bons momentos. Assim também para Layane Barbosa e Bruno Spacca. Agradeço aos técnicos Rodrigo Lourenço e Camila Velludo pela disponibilidade nos laboratórios.

Ao professor Dr. Owen e ao professor Dr. Yao de *Purdue University*, USA. por me permitir trabalhar dentro dos laboratórios do departamento de Ciências de

Alimentos. A Yi Chang por me guiar na adaptação e trabalho no laboratório. A Randol Rodriguez quem desinteressadamente me ajudou durante minha estadia.

À professora Dra. Marilyn Rayner por me receber tão gentilmente no departamento de Tecnologia de Alimentos, Engenharia e Nutrição da Faculdade de Engenharia de *Lund University*, Suécia. Suas orientações foram de muita utilidade para a pesquisa. Assim também agradeço a Ali Marefati, uma das pessoas mais extraordinárias que conheci. Aos meus colegas de laboratório, Nabilah Abdul quem sempre estava sorridente e disposta a me ajudar. Sareh foi uma inspiração de coragem e determinação. Aos amigos que fiz no departamento, Sander Perez, Pamela Canaviri, Claudia Lazarte e Atma Sol.

A meus compatriotas e amigos Palmer, José, Hubert, Victor, Heber, Lía, Diana, Mariana, Gilda, Julio G., Agustin, Julio C., Luis, Felipe, muito obrigado pela amizade.

Ao pessoal administrativo da FZEA - USP que amavelmente atenderam meus requerimentos, guiaram meus processos e muitas vezes resolveram meus problemas. A Maria Cecilia por receber com muita gentileza os documentos acadêmicos na seção de pós-graduação. Muito obrigado a Keithy Domingos quem me facilitou informação e documentação para realizar com sucesso meus estágios no exterior. Assim também a Clélia Godoy por seu profissionalismo e sugestões nos processos administrativos.

Agradeço ao FONDECYT-CONCYTEC (contrato de concessão número 240-2015-FONDECYT) e também agradeço à CAPES - Brasil (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, processo nº 88881.190627 / 2018-01) pelo apoio financeiro.

A ciência sem a religião é manca,

a religião sem a ciência é cega

(Albert Einstein, 1941)

RESUMO

RAMÍREZ-LÓPEZ, S. **Modificação de amido de *cañihua* (*Chenopodium pallidicaule*) para aplicação como estabilizante em emulsão *Pickering*.** 2020. 128 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP.

O interesse por pesquisas sobre materiais de origem biológica para a estabilização de emulsões tem aumentado, e entre esses materiais destaca-se o amido. A *cañihua* pode ser uma fonte de amido interessante nessa área. Assim, o objetivo desta tese foi estudar a modificação química do amido de *cañihua* por anidrido octenil succínico (OSA) e aplicá-lo como estabilizante de uma emulsão *Pickering*. Para isso, inicialmente, se estudou a extração e a purificação do amido de *cañihua* verificando-se o efeito de diferentes solventes e da solução de NaOH (0,3%) com e sem NaCl, com especial interesse na redução do teor de proteínas do amido. Em seguida, estudou-se a modificação química do amido obtido após a purificação com solução de NaOH, a 20, 30 ou 40 °C e em dois intervalos de pH (7,5-8,0 ou 8,5-9,0). Em função dos resultados da habilidade desses amidos estabilizarem emulsões O/A, foi realizado outro experimento de modificação do amido com OSA, modificando-se o pH do meio de reação a 35 °C. Na sequência, foram conduzidos experimentos de produção da emulsão O/A *Pickering*, tendo o óleo de soja, como a fase dispersa, e um tampão fosfato, como fase aquosa, em dois experimentos: i) emulsões com proporção O:A 10:90, e com 100 a 800 mg de amido OSA/mL de óleo, ii) diferentes proporções O:A (10:90, 20:80, 40:60, 60:40) com 200 mg de amido OSA/mL de óleo. A extração do amido com a solução de NaOH ou com água produziram amidos com teores de proteína similares. Assim, escolheu-se a água como solvente para as etapas seguintes, sendo que a melhor purificação do amido foi obtida com duas lavagens do amido com solução de NaOH, seguida de três lavagens com água. O amido de *cañihua* nativo foi modificado usando 3% (m/m) OSA. A temperatura foi o principal fator na redução do teor de proteínas no amido durante o processo de modificação. Os maiores valores para o grau de substituição (DS= 0,0187) no amido e para a eficiência da reação (ER= 85,1%) foram obtidos na faixa de pH 8,5-9,0 e a 40 °C. A solubilidade e o poder de inchamento aumentaram com a modificação do amido de *cañihua* com OSA, em todos os tratamentos (pH e T). Os valores de viscosidade de pico das amostras dos amidos modificados foram inferiores aos do amido de *cañihua* nativo, com exceção do tratamento mais rigoroso (pH 8,5-9,0/ 40 °C). Todas as amostras de amido modificado apresentaram capacidade de emulsificação, mas apenas o tratamento em pH 7,5-8,0 e 30 °C manteve o tamanho da gota por mais de 10 dias de armazenamento (78 µm). No estudo do preparo das emulsões *Pickering* foi estudado o efeito da concentração de amido OSA (100-800 mg/mL de óleo), e da proporção O:A (10:90-40:60). Duas amostras de amido foram usadas, OSA-S1 e OSA-S2 com 0,98±0,01% e 0,62±0,01% de teor de proteínas, respectivamente. Os processos de homogeneização foram a agitação mecânica (UT) e o ultrassom (US). As emulsões preparadas com US apresentaram menores tamanhos de gota quando comparadas àquelas preparadas com UT. As emulsões produzidas com UT e estabilizadas com o amido contendo o maior teor de proteínas (OSA-S1), tiveram

menores tamanhos de gota quando comparado ao amido com menor teor de proteínas (OSA-S2). Contrariamente, as emulsões preparadas com US e estabilizadas com o amido OSA-S2 apresentaram menores tamanhos de gota quando comparado às emulsões estabilizadas com o amido OSA-S1. Em conclusão, o amido de *cañihua* modificado com OSA tem potencial para emprego como estabilizante em emulsões *Pickering*, mas mais pesquisas são necessárias.

Palavras chaves: Amido modificado, OSA, pseudocereais, propriedades físico-químicas, estabilidade de emulsão.

ABSTRACT

RAMÍREZ-LÓPEZ, S. **Modification of *Cañihua* starch (*Chenopodium pallidicaule*) for application as a stabilizer in *Pickering* emulsion.** 2020. 128 p. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP.

Stabilization of emulsions by employing biological materials has recently presented research interest and starch is prominent among those materials. *Cañihua* can be an interesting starch source in this area. Thus, the objective of this thesis was to study the chemical modification of *cañihua* starch by octenyl succinic anhydride (OSA) and apply it as a *Pickering* emulsion stabilizer. For this, initially, the extraction and purification of *cañihua* starch were studied, verifying the effect of different solvents and NaOH solution (0.3%) with and without NaCl, with special interest in reducing starch protein content. Then, the chemical modification of the starch obtained after purification with NaOH solution, at 20, 30 or 40 °C and two pH ranges (7.5-8.0 or 8.5-9.0) was studied. Due to the results on the ability of these starches to stabilize O/W emulsions, another experiment in starch modification with OSA was carried out, changing the pH of the reaction medium at 35 °C. Then, experiments were carried out to produce O/W *Pickering* emulsions, using soybean oil, as the oil phase, and a phosphate buffer, as the aqueous phase, in two experiments: i) emulsions with an O/W ratio 10:90, and with 100 to 800 mg of OSA starch/mL of oil, ii) different O:W ratios (10:90, 20:80, 40:60, 60:40) with 200 mg of OSA starch/mL of oil. Starch extraction with NaOH solution or water produced starch with similar protein contents. Thus, water was chosen as the solvent for the subsequent steps, with the best starch purification obtained by washing starch twice with NaOH solution, followed by washing with water three times. Native *cañihua* starch was modified using 3% (w/w) OSA. Temperature was the main factor in reducing starch protein content during the modification process. The highest values for the degree of substitution (DS=0.0187) in starch and for the reaction efficiency (ER=85.1%) were obtained in the pH range 8.5-9.0 and at 40 °C. *Cañihua* starch modified by OSA presented increased solubility and swelling power, in all treatments (pH and T). The peak viscosity values of the modified starch samples were lower than those of native *cañihua* starch, except for the most rigorous treatment (pH 8.5-9.0 / 40 °C). All samples of modified starch showed emulsification capacity, but only the treatment at pH 7.5-8.0 and 30 °C maintained the droplet size for more than 10 days of storage (78 µm). The effect of the concentration of OSA starch (100-800 mg/mL of oil) and O:W ratio (10:90 - 60:40) were studied in the preparation of *Pickering* emulsions. Two starch samples were used, OSA-S1 and OSA-S2 with $0.98 \pm 0.01\%$ and $0.62 \pm 0.01\%$ protein content, respectively. The homogenization processes were mechanical agitation (UT) and ultrasound (US). Emulsions prepared by US showed smaller drop sizes when compared to those prepared with UT. The emulsions produced by UT and stabilized with the starch containing the highest protein content (OSA-S1), had smaller drop sizes when compared to the starch with the lowest protein content (OSA-S2). In contrast, emulsions prepared with US and stabilized with OSA-S2 starch showed smaller droplet sizes when compared to emulsions stabilized with

OSA-S1 starch. In conclusion, *cañihua* starch modified with OSA has the potential to be used as a stabilizer in *Pickering* emulsions, but more research is needed.

Key words: Modified starch, OSA, pseudo-cereals, physicochemical properties, emulsion stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografia de a) grãos de <i>cañihua</i> Cupi e b) sua superfície	24
Figura 2 - Micrografia dos grãos de <i>cañihua</i> (A) e dos grânulos de amido (B, C e D) com aumentos de 30x, 1kx, 3kx e 10kx, respectivamente.	27
Figura 3 - Firmeza da pasta de diferentes amidos de <i>cañihua</i> e quinoa	28
Figura 4 - Esquema das principais modificações químicas em amidos	30
Figura 5 - Esquema de reação de esterificação de moléculas de amido com OSA.....	31
Figura 6 - Representação dos mecanismos físicos de separação de fases nas emulsões alimentícias.	38
Figura 7 - Publicações por ano encontradas com o <i>Sci-finder</i> usando as palavras “emulsões <i>Pickering</i> ” e “emulsões estabilizadas por partículas”.....	40
Figura 8 - Representação esquemática da seção transversal de uma gota de óleo estabilizada por partículas sólidas com diferentes ângulos de contato	42
Figura 9 - Ponte de gotas: (a) representação esquemática, (b) posição da partícula ao conectar duas gotas.	45
Figura 10 - Etapas da extração e purificação do amido de <i>cañihua</i>	50
Figura 11 - Micrografias de varredura eletrônica do amido de <i>cañihua</i> : (a) nativo e (b) modificado (pH 8,5-9,0 / 40 °C). Ampliação 5000x.....	71
Figura 12 - Difrátogramas de raios X do amido nativo (controle) e os amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = pH 7,5-8,0 e D,E,F = pH 8,5-9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C).....	73
Figura 13 - Espectrogramas FTIR do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = pH 7,5-8,0 e D,E,F = pH 8,5-9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C).....	74

Figura 14 - a) Valores da área abaixo da curva dos picos 1567, 1645 e 1718 cm^{-1} calculados da deconvolução do espectro FTIR da região 1800 - 1500 cm^{-1} e b) relação entre as áreas de absorção de R1047/1022 e R1000/1022 cm^{-1} do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = pH 7,5-8,0 e D,E,F = pH) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C)	75
Figura 15 - (a) Solubilidade (%) e (b) poder de inchamento (g/g) dos amidos nativo e modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = 7,5≤pH≤8,0 e D,E,F = 8,5≤pH≤9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C)	78
Figura 16 - Perfil de viscosidade do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = 7,5≤pH≤8,0 e D,E,F = 8,5≤pH≤9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C)	82
Figura 17 - Distribuição do tamanho de gotas para as emulsões O/A preparadas com amidos nativo e modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = 7,5≤pH≤8,0; D,E,F = 8,5≤pH≤9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C): (a)(c) emulsão inicial e (b)(d) após 10 dias de estocagem.	85
Figura 18 - Aspecto das emulsões preparadas com amidos nativo (controle) e modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = 7,5≤pH≤8,0; D,E,F = 8,5≤pH≤9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C) após 10 dias de armazenamento.....	88
Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura de amidos nativos (a, b) e modificados (c, d) de <i>cañihua</i> com diferentes teores de proteína: (a) S1 (0,98%); (b) S2 (0,62%); (c) OSA-S1 (0,85%) e (d) OSA-S2 (0,58%). Amplificação 15000x	91
Figura 20 - Micrografias ópticas (x20) das emulsões preparadas com a proporção O:A (10:90) emulsificadas por ultraturrax com diferentes concentrações de amido OSA-S1 ou OSA-S2	93

Figura 21 - Micrografias ópticas (x20) das emulsões preparadas com a proporção O:A (10:90) emulsificadas por ultrassom com diferentes concentrações de amido OSA-S1 2 ou OSA-S2.....	94
Figura 22 - Micrografias ópticas (x20) das emulsões preparadas com diferentes proporções O:A (10:90; 20:80; 40:60 e 60:40) emulsificadas por ultraturrax com 200 mg de OSA-S1 ou OSA-S2 / mL óleo	95
Figura 23 - Micrografias ópticas (x20) das emulsões preparadas com diferentes proporções O:A (10:90; 20:80 e 40:60) emulsificadas por ultrassom com 200 mg de OSA-S1 ou OSA-S2 / mL óleo	96
Figura 24 - Distribuição do tamanho das gotas das emulsões preparadas com diferentes concentrações de amido OSA-S1 ou OSA-S2 usando ultraturrax ou ultrassom e uma proporção O:A (10:90)	98
Figura 25 - Distribuição do tamanho das gotas das emulsões preparadas com diferentes proporções O:A (10:90; 20:80; 40:60 e 60:40) e 200 mg de OSA-S1 ou OSA-S2 / mL de óleo usando ultraturrax ou ultrassom	99
Figura 26 - Perfil Turbiscan (BS) das emulsões preparadas com 10% de óleo e diferentes concentrações de amido (C _A) OSA-S1 ou OSA-S2 usando ultraturrax ou ultrassom .	104
Figura 27 - Perfil Turbiscan (BS) das emulsões preparadas com diferentes proporções óleo:água e 200 mg de OSA-S1 ou OSA-S2/ mL de óleo usando ultraturrax ou ultrassom	105
Figura 28 - Emulsões preparadas com amido OSA-S1 ou OSA-S2 usando UT ou US, como processo de emulsificação, após 7 dias de armazenamento. (1,2,3 e 4 = emulsão preparada com proporção O:A (10:90) e 100 (1), 200 (2), 400 (3) ou 800 (4) mg de amido/ mL de óleo), (5 e 6 = emulsão preparada com 200 mg de amido/ mL de óleo e proporção O:A (20:80)-(5) e (40:60)-(6)	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de diferentes variedades de <i>cañihua</i> em base seca (% m/m) comparadas a outros cereais	25
Tabela 2 - Modificações químicas em diferentes fontes de amido	32
Tabela 3 - Modificação química utilizando OSA em diferentes fontes de amido.....	35
Tabela 4 - Amido modificado com OSA para a estabilização das emulsões <i>Pickering</i>	43
Tabela 5 - Formulação das emulsões <i>Pickering</i>	60
Tabela 6 - Valores de umidade e dos teores de cinzas e de proteínas no amido, após etapa de purificação com diferentes solventes*	65
Tabela 7 - Efeito do número de lavagens com solução de hidróxido de sódio (0,3% m/v) sobre a umidade, teores de cinzas e de proteínas no amido, após a etapa de purificação.	67
Tabela 8 - Efeito da adição de cloreto de sódio (NaCl) em soluções de NaOH com diferentes números de lavagens sobre a umidade, teores de cinzas e de proteína* do amido purificado	68
Tabela 9 - Umidade, proteína, grau de substituição (DS) e eficiência da reação (RE) dos amidos OSA*	69
Tabela 10 - Propriedades térmicas do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = $7,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$ e D,E,F = $8,5 \leq \text{pH} \leq 9,0$) e T (A, D = 20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C).....	80
Tabela 11 - Propriedades de pasta do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = $7,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$; D,E,F = $8,5 \leq \text{pH} \leq 9,0$) e T (A, D = 20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C).....	83
Tabela 12 - Índice de polidispersidade (PDI) e tamanho de gotas das emulsões no primeiro dia (inicial) e após 10 dias de armazenamento preparadas com amidos nativo e	

modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = $7,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$; D,E,F = $8,5 \leq \text{pH} \leq 9,0$) e T (A, D = 20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C).	87
Tabela 13 - Umidade, teor de proteína, grau de substituição (DS) e eficiência de reação (RE%) para os amidos nativos e modificados de <i>cañihua</i>	89
Tabela 14 - Propriedades do tamanho de gotas das emulsões com preparadas com diferentes concentrações de amido OSA-S1 ou OSA-S2 e proporções O:A usando ultraturrax .	100
Tabela 15 - Propriedades do tamanho de gotas das emulsões com preparadas com diferentes concentrações de amido OSA-S1 ou OSA-S2 e proporções O:A usando ultrassom ..	101
Tabela 16 - Valores de TSI e EI% das emulsões preparadas com diferentes concentrações de amido (OSA-S1 ou OSA-S2) e de óleo usando ultraturrax ou ultrassom.....	109

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Amido nativo de <i>cañihua</i>	24
3.2 Modificação do amido	29
3.2.1 Modificação do amido com anidrido octenil succínico (OSA)	31
3.3 Emulsões <i>Pickering</i>	37
3.4 Métodos de emulsificação	46
3.4.1 Agitação mecânica	46
3.4.2 Ultrassom	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Material	49
4.2 Extração e purificação do amido de <i>cañihua</i>	49
4.2.1 Efeito do tipo de solvente na extração do amido	50
4.2.2 Avaliação do número de lavagens na purificação do amido selecionado na etapa descrita na seção 4.2.1	51
4.3 Modificação química do amido purificado com solução de NaOH	52
4.4 Metodologias de análises do amido	53
4.4.1 Composição química do amido extraído e purificado	53
4.4.2 Características e propriedades do amido modificado	54
4.5 Amido modificado e desenvolvimento de emulsões <i>Pickering</i>	59

4.6	Caracterização do amido para emulsões e das emulsões <i>Pickering</i>	60
4.6.1	<i>Amido para emulsões</i>	60
4.6.2	<i>Caracterização de emulsões Pickering</i>	61
4.7	Análise estatística	63
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	Características dos amidos extraído e purificado	65
5.2	Caracterização do amido de <i>cañihua</i> modificado com OSA	68
5.2.1	<i>Umidade e teor de proteínas</i>	68
5.2.2	<i>Grau de substituição (DS) e eficiência de reação (RE)</i>	70
5.2.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	71
5.2.4	<i>Difração de raios X</i>	72
5.2.5	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	73
5.2.6	<i>Solubilidade e poder de inchamento</i>	77
5.2.7	<i>Propriedades térmicas</i>	79
5.2.8	<i>Propriedades de pasta</i>	81
5.2.9	<i>Capacidade emulsificante avaliada por tamanho e distribuição de gotas</i>	84
5.3	Características do amido modificado para o desenvolvimento das emulsões óleo em água	89
5.3.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	90
5.4	Características das emulsões óleo em água	91
5.4.1	<i>Microscopia óptica das gotas de emulsão</i>	92
5.4.2	<i>Distribuição do tamanho de gota e diâmetro médio</i>	97
5.4.3	<i>Estabilidade física</i>	104
6.	CONCLUSÕES	112
7.	SUGESTÕES DE PESQUISA	114
	REFERÊNCIAS	115

1. INTRODUÇÃO

O amido é um dos polissacarídeos naturais mais abundantes com características biodegradável e renovável. Ele representa a reserva energética de muitas plantas. De maneira geral, o amido está conformado quimicamente por cadeias lineares de glicose unidas por ligações α (1 $\rightarrow$ 4) e cadeias ramificadas unidas por ligações α (1 $\rightarrow$ 6) (BEMILLER; WHISTLER, 2009). As propriedades do amido são função da sua origem botânica, da morfologia e da estrutura do grânulo, da composição e da proporção das cadeias de amilose e amilopectina (FUENTES et al., 2019; HOOVER, 2001). Na etapa de extração do amido, é necessária a separação do amido das diversas frações de material biológico, entre as quais destacam-se as proteínas e as fibras (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004; TANAKA et al., 1980). Na extração do amido são utilizados diversos métodos, sendo o mais comum o uso de soluções alcalinas, como por exemplo solução de hidróxido de sódio. A vantagem deste método, além da facilidade de obter a solução, é obter amostras de amido nativo com alta pureza (BINDAR; EFAN; RAHMI, 2013). No entanto, amidos nativos geralmente apresentam restrições, como baixa solubilidade na água, suscetibilidade a pH extremo, instabilidade térmica, alta tendência à retrogradação e baixa capacidade emulsificante (AGAMA-ACEVEDO; BELLO-PEREZ, 2017; SWEEDMAN et al., 2013).

Por essas razões, o amido em sua forma nativa geralmente tem uso limitado como ingrediente nos sistemas alimentares. A modificação química altera as características estruturais e melhora as propriedades funcionais do amido. Um tipo de modificação química é a incorporação de anidrido octenil succínico (OSA) através de uma reação de esterificação em meio aquoso sob condições alcalinas suaves (KRÓLIKOWSKA et al., 2017; SHARMA et al., 2016). A alcalinidade reduz a força de ligação do hidrogênio entre as cadeia de amido e favorece a difusão das moléculas de OSA no grânulo de amido inchado (SWEEDMAN et al., 2013). Quando modificado com OSA, o amido normalmente hidrofílico ganha um elemento hidrofóbico devido à incorporação de grupos octenil. Grupos OSA (substituintes ligados covalentemente) reagem usualmente com qualquer fração hidroxila disponível de glicose, conferindo alguma qualidade desejável ao substrato de amido, resultando em moléculas de

caráter anfílico (AGAMA-ACEVEDO; BELLO-PEREZ, 2017). Este polissacarídeo anfílico tem várias aplicações como filmes e revestimentos, formação de gel, encapsulamento e emulsificação (ASHOGBON; AKINTAYO, 2014; SWEEDMAN et al., 2013).

O aproveitamento da capacidade emulsificante dos grânulos amido OSA se enquadram na área de pesquisa das emulsões *Pickering*, uma vez que o grânulo de amido é considerado uma partícula sólida. A emulsão *Pickering* é um sistema de gotas dispersas de um líquido imiscível em outro, estabilizada por partículas sólidas (SONG et al., 2015). As primeiras experiências foram orientadas no uso de partículas sólidas inorgânicas, como por exemplo, as sílicas, que apresentam forma bem definida, disponibilidade em diferentes tamanhos e distribuições, além da capacidade de modificação química da sua superfície. Porém, as partículas inorgânicas apresentam dificuldades nas aplicações que precisam de biocompatibilidade ou de biodegradabilidade (XIAO; LI; HUANG, 2016). Para superar essas dificuldades, nos últimos anos o enfoque das pesquisas está concentrado no estudo de materiais de origem biológica ou de grau alimentício para a estabilização das emulsões, com o intuito de usar em aplicações nas indústrias alimentícia e/ou farmacêutica (LAM; VELIKOV; VELEV, 2014). Nesse sentido, a habilidade do amido OSA para se adsorver na superfície da interface óleo/água é de interesse na ciência de materiais pela alta estabilidade conferida ao sistema e pelo potencial de desenvolvimento de novas estruturas (BON, 2014; CHEVALIER; BOLZINGER, 2013; DUFFUS et al., 2016; LAM; VELIKOV; VELEV, 2014; RAYNER et al., 2014).

Como alternativa de nova fonte de amido encontra-se a *cañihua*, um pseudocereal pertencente à família *Chenopodium*. Os cultivos de *cañihua* estão localizados nos Andes (Peru - Bolívia), zonas de altitude superior aos 4000 metros, conseguindo se adaptar a condições extremas (FUENTES et al., 2019; STEFFOLANI; LEÓN; PÉREZ, 2013). Os carboidratos representam entre 55% - 60% da massa do grão (VILLA et al., 2014), e essa fração é constituída por 95% de amido (RAMÍREZ-LÓPEZ, 2016). O amido está localizado, como no caso de outros grãos alto-andinos, principalmente no perisperma (PREGO; MALDONADO; OTEGUI, 1998). A configuração física do amido é representada como grânulos poligonais individuais com

tamanhos entre 0,63 - 1,8 μm , padrão cristalino tipo A e teor de amilose entre 15% - 20% (FUENTES et al., 2019; SCHOENLECHNER; SIEBENHANDL; BERGHO, 2008; STEFFOLANI; LEÓN; PÉREZ, 2013). A *cañihua* foi reconhecida como cultivo nativo prioritário, com necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de técnicas para o aproveitamento deste grão e também para agregar valor a essas matérias-primas.

É nesse sentido que o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e caracterizar emulsões *Pickering* estabilizadas com amido modificado de *cañihua*. Para atingir o objetivo proposto, a pesquisa foi organizada e executada em três etapas. A primeira correspondeu à extração e purificação do amido de *cañihua*, na qual foram avaliados o uso de diferentes solventes nas etapas de extração e purificação do amido. O atributo usado como referência na pureza das amostras foi o teor de proteínas do material purificado, pois o teor proteico dos grãos de *cañihua* era elevado. Na etapa seguinte, o amido nativo purificado foi modificado com OSA em diferentes condições de pH e temperatura. O efeito das condições de modificação foi avaliado sobre os aspectos estruturais e as propriedades físico-químicas do amido modificado. Finalmente, a terceira etapa compreendeu a preparação de emulsões *Pickering* com amidos modificados com diferentes teores de proteínas. A preparação das emulsões considerou distintas formulações e diferentes processos de emulsificação, por agitação mecânica, utilizou-se um equipamento do tipo rotor-estator (ultraturrax), e por sonificação (ultrassom). As emulsões foram caracterizadas quanto à morfologia, distribuição de tamanho das gotas e a estabilidade física.

A hipótese desta tese foi a seguinte: o amido de *cañihua* modificado por OSA tem potencial para ser utilizado como partícula estabilizadora de uma emulsão *Pickering*.

2. OBJETIVOS

Geral

O objetivo principal desta tese foi estudar a modificação do amido de *cañihua* por OSA e aplicá-lo como estabilizante de emulsão *Pickering*.

Objetivos específicos:

1. Extrair o amido de *cañihua* com diferentes reagentes para diminuir o teor de proteína em sua composição centesimal.
2. Purificar o amido extraído mediante sucessivas lavagens (ressuspensões /centrifugações) para obter amostras com menor teor de proteínas.
3. Determinar os efeitos da temperatura e do pH de reação na modificação do amido com OSA sobre as propriedades físicas, morfológicas, funcionais do amido modificado de *cañihua*.
4. Produzir emulsões *Pickering* utilizando amidos-OSA com diferentes teores de proteínas por dois processos de emulsificação.
5. Determinar os efeitos da concentração de amido OSA e da proporção óleo de soja:água sobre as características físicas e de estabilização da emulsão.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Amido nativo de *cañihua*

A *cañihua* pertence ao grupo dos grãos alto-andinos e é reconhecida pelo alto valor nutricional. Foi utilizada na alimentação do Império Inca, como uma importante fonte de energia, superada somente pelo consumo de milho. A *cañihua* é cultivada em áreas localizadas entre 3.800 - 4.100 m de altitude, e o centro de origem da espécie é o altiplano do Peru e da Bolívia. Nesta região os grãos geralmente são torrados e moídos para produzir uma farinha chamada “*cañihuaco*”, que é a forma mais comum para o consumo (APAZA-MAMANI, 2010).

Os grãos de *cañihua* apresentam forma circular ou elipsoide com diâmetro ao redor de 1,0 - 1,2 mm e envoltório de material celulósico, como pode ser observado na Figura 1-a. Na superfície do grão observa-se uma camada celulósica fortemente unida à estrutura principal (Figura 1-b). Esses grãos podem conter saponina, no entanto, a concentração é muito baixa, e o sabor amargo associado a esse componente é imperceptível (REPO-CARRASCO et al., 2009).

Figura 1 - Micrografia de a) grãos de *cañihua* Cupi e b) sua superfície

Fonte: Ramírez-López (2016).

Essas características próprias da *cañihua* requerem o desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento, desde o agrônomo até o nutricional ou funcional, desse cultivo. A composição química dos grãos de *cañihua* é apresentada na Tabela 1, na qual se observa que o teor de proteínas da *cañihua* é maior que os obtidos em arroz e trigo. A quantidade de fibra está associada às camadas celulósicas observadas na Figura 1.

Villa et al. (2014) avaliaram a composição química da *cañihua* e encontraram que o perfil proteico contém muitos dos aminoácidos essenciais e em concentrações superiores aos recomendados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO). Repo-Carrasco, Espinoza e Jacobsen (2003) indicaram que a fração lipídica da *cañihua* é de aproximadamente 72% de ácidos graxos insaturados, com altas concentrações de ácido linoleico (42%) e ácido oleico (24%). Outras pesquisas foram feitas para avaliar os compostos ativos nos grãos de *cañihua*, concluindo que a concentração de flavonoides é alta (até 144 mg/100 g) e a concentração de compostos fenólicos (27,9 mg/100 g) é similar à da aveia, cevada, milho ou arroz (REPO-CARRASCO et al., 2010).

Tabela 1 - Composição química de diferentes variedades de *cañihua* em base seca (% , m/m) comparadas a outros cereais

Composição	<i>Cañihua</i> Illpa ^(a)	<i>Cañihua</i> Cupi ^(a)	<i>Cañihua</i> Kello ^(b)	<i>Cañihua</i> Wila ^(b)	Arroz ^(c)	Trigo ^(c)
Umidade	6,43	5,98	10,37	9,61	11,97	12,42
Proteína	20,77	19,67	17,16	14,70	7,23	9,61
Lipídios	0,62	3,67	8,21	8,21	2,78	1,95
Fibra	11,84	9,77	5,95	5,95	4,60	13,10
Cinzas	4,30	4,97	3,97	3,97	-	-
Carboidratos	58,69	58,43	64,71	64,71	76,49	74,48

Fonte:^(a) Ramírez-López (2016); ^(b) Repo-Carrasco et al. (2010), ^(c) USDA (2016)

O amido representa a maior fração (em torno de 60%) da composição dos grãos de *cañihua*. Devido ao pequeno tamanho dos grãos e a quantidade de material celulósico ao redor do grão recomenda-se utilizar ciclos de moagem úmida em soluções alcalinas para a extração e a caracterização do amido (PUMACAHUA RAMOS, 2014). Porém, é desejável evitar condições que possam alterar o estado nativo do amido, evidenciando a necessidade de otimizar o rendimento de extração do amido em condições mais próximas ao pH neutro. Steffolani, León e Pérez (2013) reportaram quantidades pequenas de teor de proteína na composição do amido extraído pelo método úmido, as quais podem afetar a pureza ou a funcionalidade do material obtido. Lindeboom, Chang e Tyler (2004) observaram que um problema encontrado nas separações proteína-amido é o aprisionamento de pequenos grânulos nos sedimentos de proteínas e fibras finas gerados durante a centrifugação.

Os amidos nativos obtidos de diferentes variedades de *cañihua* foram caracterizados por Steffolani, León e Pérez (2013) e Ramírez-López (2016) quanto às suas características estruturais e propriedades, tais como: composição, morfologia, cristalinidade, propriedades térmicas (gelatinização e retrogradação), propriedades de pasta e de textura, encontrando similaridades com os grãos de quinoa, especialmente na característica de cristalinidade. O grânulo do amido nativo de *cañihua* é de forma poliédrica com diâmetro médio em torno de 0,85 - 1,24 μm (Figura 2) e superfície com maior rugosidade quando comparado ao amido de batata (PUMACAHUA RAMOS, 2014).

O padrão de difração de raios X do amido de *cañihua* é do tipo A, padrão característico do amido de cereais, e pelo cálculo das áreas dos picos encontrados no difratograma, a cristalinidade está ao redor de 28% - 35%. As cadeias de amilose interagem com os lipídios formando complexos que são identificados no difratograma de raios X com picos no ângulo 20° (PUMACAHUA RAMOS, 2014; RAMÍREZ-LÓPEZ, 2016; STEFFOLANI; LEÓN; PÉREZ, 2013).

Figura 2 - Micrografia dos grãos de *cañihua* (A) e dos grânulos de amido (B, C e D) com aumentos de 30x, 1kx, 3kx e 10kx, respectivamente.

Fonte: Pumacahua Ramos (2014)

As propriedades térmicas do amido nativo de *cañihua* apresentam variações de entalpias entre 7 - 11 (J/g), a temperatura pico de gelatinização desse amido está na faixa entre 63 - 66 °C (RAMÍREZ-LÓPEZ, 2016; STEFFOLANI; LEÓN; PÉREZ, 2013). A solubilidade está entre 3% - 13% na faixa de temperatura de 50 - 90 °C, respectivamente, e o poder de inchamento máximo é de 9% na temperatura de 90 °C (RAMÍREZ-LÓPEZ, 2016).

As propriedades de pasta apresentaram diferenças entre as variedades de *cañihua* e os valores de viscosidade de pico estão na faixa de 2000 - 3500 cP, *breakdown* entre 215 - 920 cP e viscosidade final entre 2800 - 3900 cP. Ensaios de textura feitos por Steffolani, León e Pérez, (2013) e apresentados na Figura 3 mostram que as pastas formadas por amido de *cañihua* têm maior firmeza, 4 vezes (80 gf) maior do que as pastas de amido de quinoa (20 gf).

As diferenças entre os valores encontrados na firmeza de pasta dos amidos podem ser explicadas pelos distintos teores de amilose. Os teores de amilose na *cañihua* e na quinoa dependem da variedade e estão no intervalo de 10% - 18% e 8,2 - 9,3%, respectivamente (STEFFOLANI; LEÓN; PÉREZ, 2013). Li, Wang e Zhu (2016) avaliaram 26 tipos de amido de quinoa comerciais de diferentes países encontrando que a diferença do teor de amilose aparente é altamente significativo, e essa variação influencia na lixiviação da amilose, solubilidade em água e nas propriedades de pasta.

Figura 3 - Firmeza da pasta de diferentes amidos de *cañihua* e quinoa

Fonte: Steffolani, León e Pérez (2013).

Embora cada tipo de amido apresente características próprias e muitas vezes únicas, a utilização industrial do amido nativo é restrita devido à baixa solubilidade em água fria, tendência à retrogradação e formação de sinérese produzindo pastas ou géis instáveis (ASHOGBON; AKINTAYO, 2014).

A modificação do amido nativo pode melhorar suas propriedades funcionais, tais como reduzir a retrogradação e a sinérese, melhorar sua estabilidade ao aquecimento sob cisalhamento, melhorar solubilidade, ampliando assim seu espectro para aplicações industriais. Entre as aplicações de amido modificado estão as

emulsões *Pickering* que têm despertado, nos últimos anos muito interesse pela sua alta estabilidade física (LOPEZ-SILVA et al., 2019; MAREFATI et al., 2015; WU; MA, 2016). O tamanho muito pequeno do grânulo de amido de *cañihua* representa uma característica importante na estabilização das emulsões *Pickering*, uma vez que pesquisas feitas com amido de quinoa ($\approx 2 \mu\text{m}$) mostraram resultados promissores para aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica (MAREFATI et al., 2017a; RAYNER et al., 2012a; TIMGREN et al., 2011).

3.2 Modificação do amido

Amido nativo pode apresentar propriedades funcionais indesejáveis, tais como alta viscosidade ou baixa capacidade emulsificante, etc., e nesses casos a modificação do amido pode ser uma alternativa para o uso industrial. BeMiller (1997) considera que a modificação do amido tem o potencial de melhorar as propriedades e que o uso do amido modificado abrange diversas indústrias tais como: de alimentos, farmacêutica, papel, têxtil entre outras.

A modificação do amido revolucionou as novas tecnologias de processamentos de alimentos, tendências de mercado e conferiu vantagem competitivas aos novos produtos (KAUR et al., 2012). A modificação do amido nativo é a mudança parcial ou total da estrutura desse polímero mediante métodos físicos, químicos, enzimáticos ou alterações na genética da planta que produz esse polissacarídeo para atender às necessidades específicas da indústria (MASINA et al., 2017).

A modificação física é empregada como alternativa ao uso de reagente químico (PERSIN et al., 2011). Entre as tecnologias emergentes encontra-se a modificação de amido usando plasma, os quais apresentam mudanças na sua estrutura (redução da umidade e redução do teor de amilose) (ZHU, 2017). Por outro lado, Castanha, Matta Junior e Augusto (2017) modificaram amido de batata com ozônio e obtiveram amidos oxidados, que apresentaram mudanças das suas propriedades de pasta, textura do gel e claridade da pasta. Os tratamentos térmicos moderados (120 °C) ou forte (180 - 220 °C) também podem modificar a superfície dos grânulos de amido de quinoa ou

batata, respectivamente (STEENEKEN; WOORTMAN, 2009; TIMGREN et al., 2013). Sujka (2017) estudou o efeito do ultrassom nos amidos de arroz, milho, trigo e batata com frequência de 20 kHz e 170 W por 30 min e observou que a porosidade na superfície do amido aumentou significativamente nos grânulos.

Por outro lado, a modificação química envolve a incorporação de grupos funcionais na molécula de amido mediante o uso de reagentes químicos. O intuito da modificação química é facilitar as ligações aleatórias intra e intermoleculares da estrutura do amido (ASHOGBON; AKINTAYO, 2014). Essas reações categorizadas estão apresentadas na Figura 4.

Figura 4 - Esquema das principais modificações químicas em amidos

Fonte: Masina et al. (2017)

A esterificação do amido converte os três grupos hidroxila da glicose em derivados de alquila ou arila, alterando as propriedades de retrogradação pela

limitação das interações entre as cadeias de amilose. A acetilação é o processo mais comum de esterificação do amido, e isso pode ser feito com anidrido acético ou acetato de vinila em meio alcalino como catalisador (ASHOGBON; AKINTAYO, 2014). O tamanho do grupo acetil ($-\text{COCH}_3$), que substitui o grupo hidroxila ($-\text{OH}$), promove repulsão entre as cadeias de amilose/amilopectina, aumentando o poder de inchamento e a solubilidade do amido pela lixiviação das cadeias de amilose (MASINA et al., 2017). Algumas pesquisas de modificações químicas feitas nos últimos anos e em diferentes fontes de amido são apresentadas na Tabela 2.

3.2.1 Modificação do amido com anidrido octenil succínico (OSA)

O processo da esterificação de amido, descrito anteriormente, pode ser realizado em meio aquoso, utilizando OSA e catalisado com um álcali, conforme descrito na Figura 5.

Figura 5 - Esquema de reação de esterificação de moléculas de amido com OSA

Fonte: Sweedman et al., (2013)

Tabela 2 - Modificações químicas em diferentes fontes de amido

Processo	Condições de estudo	Resultados	Referência
Modificação ácida	40 g amido de <i>Panicum miliaceum</i> , HCl (0,14 mol/L), 8h, 50 °C. Ajuste final de pH 6,5 com NaOH (1 mol/L).	Redução do teor de amilose, retenção de água, das propriedades térmicas, das propriedades de pasta e aumento da solubilidade.	(SINGH; ADEDEJI, 2017).
Acetilação	Dispersão amido de aveia em água (1:5), pH 8,0 (NaOH 1 mol/L), 7,65 g de anidrido acético. Ajuste final de pH 4,5 (HCl 0,5 mol/L).	Grupo de acetil 0,64 - 1,50%; Grau de substituição 0,02- 0,05; formação de poros na superfície do grânulo; redução da cristalinidade e viscosidade.	(SHAH et al., 2017).
Carboxi- metilação	Dispersão amido de milho em etanol (40%) (1:4), aquecimento (60 - 85 °C) por 2 h e mais 500 mL da solução de etanol.	Aumento da porosidade na superfície do grânulo, mudança da estrutura cristalina a 85 °C, grau de substituição 0,66 e eficiência de reação 36,7 %.	(ZHANG et al., 2017).
Oxidação - Acetilação	Oxidação: Dispersão de amido de batata 40% com solução NaClO (1 - 3%, em base amido), pH 10. Acetilação: dispersão de amido de batata oxidado 1:3, pH 8 - 9, 15 cm ³ anidrido acético (1 cm ³ /min).	Altos teores de amilose e altos níveis de oxidação permitem a destruição da estrutura do amido e favorecem a geração de radicais e processo de acetilação.	(PIETRZYK et al., 2017).

Continúa...

Processo	Condições de estudo	Resultados	Referência
Modificação ácida-Oxidação	Dispersão de amido de sorgo 1:3; solução ácido láctico 3% (em base amido). Oxidação: dispersão de amido acidificado 35%, 40 °C, pH 9,5, NaClO 1,5% (em base amido).	A dupla modificação (acidificação e oxidação) dá maior rigidez e resistência à tração, aumenta a permeabilidade ao vapor de água dos filmes sem mudança na solubilidade.	(BIDUSKI et al., 2017).
Acetilação - oxidação - fosforilação	Acetilação: Dispersão de amido de aveia 1:2,25; pH 8; anidrido acético (0,1g/1g de amido). Oxidação: NaClO. Fosforilação: Tripolifosfato de sódio e fosfato de sódio.	Mudanças nas características da gelatinização foram mais significativas nos amidos acetilados. A fosforilação mudou o comportamento reológico.	(BERSKI et al., 2011)
Carboxilação - <i>Cross linked</i>	Carboxilação: Dispersão de amido de batata 1:10 em solução de etanol 53% e aquecida a 94 °C por 20 min. Ligações cruzadas: dispersão de amido modificado 1:5 e Na ₂ SO ₄ em pH 11,5 e solução 99:1 de trimetafosfato de sódio e tripolifosfato de sódio.	A carboxilação aumentou a viscosidade da pasta e poder de inchamento, a solubilidade foi maior que nos amidos com <i>ligações cruzadas</i> . A outra modificação, devido às ligações desenvolvidas, a solubilidade, poder de inchamento e propriedade de pasta foram reduzidas.	(KIM et al., 2017).

A introdução dos grupos OSA na molécula de amido produz ésteres que fornecem à molécula comportamento hidrofílico e hidrofóbico (AGAMA-ACEVEDO; BELLO-PEREZ, 2017). A propriedade anfifílica é caracterizada pela hidrofobicidade

dos grupos octenil succínicos na estrutura do amido e pela hidrofiliçidade oriunda dos grupos hidroxil da macromolécula do amido (WANG et al., 2011).

Normalmente, a reação entre o OSA e os grânulos de amido é retardada devido à fraca penetração das gotas grandes oleosas desse reagente nos grânulos em suspensão aquosa. Além disso, o local de reação é limitado à superfície dos grânulos. Como consequência, os grupos octenil succínicos não são uniformemente distribuídos em todo o grânulo do amido (CHEN et al., 2014).

O processo de modificação por OSA é favorecido na presença de hidróxido de sódio, devido ao melhoramento da atividade reativa dos grupos hidroxila com o OSA (HUI et al., 2009). O meio alcalino favorece o deslocamento dos hidrogênios e, portanto, reduz as ligações de hidrogênio entre as cadeias do amido, e em consequência o poder de inchamento do grânulo e a difusividade das moléculas de OSA no amido são aumentadas (SWEEDMAN et al., 2013).

O substituinte OSA tem uma fração de ácido carboxílico carregado negativamente e poderia ser considerado como um polieletrólito fracamente carregado. Seu grau de substituição (DS) para a aplicação em alimentos é tipicamente baixa (0,01-0,03) (DOKIĆ; KRSTONOŠIĆ; NIKOLIĆ, 2012). A estrutura molecular de amido-OSA tem capacidade de modificar a viscosidade aquosa e estabilizar emulsões de óleo em água (BERSKI et al., 2011; SHAH et al., 2017).

A concentração permitida de OSA pela *Food and Drug Administration* (FDA) é de até 3% para aplicações alimentícias destinadas ao consumo humano. A eficiência da modificação com OSA pode ser quantificada com a determinação do grau de substituição (DS), que é o número médio de octenil succínicos incorporado na unidade de glicose; e a eficiência da reação (RE), que é a relação entre o grau de substituição experimental e o teórico (AGAMA-ACEVEDO; BELLO-PEREZ, 2017).

As principais mudanças nas propriedades funcionais dos amidos modificados com OSA são: redução nas temperaturas de gelatinização e do processo de retrogradação, aumento de claridade das pastas e na estabilidade ao congelamento (SINGH; KAUR; MCCARTHY, 2007). Pesquisas sobre a esterificação do amido com OSA encontraram que os principais parâmetros de modificação são: dispersão do

amido em água; pH de reação, temperatura e tempo de reação, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Modificação química utilizando OSA em diferentes fontes de amido

Fonte de amido	Variáveis estudadas	Principais resultados	Referência
Batata	Dispersão de amido (20 - 40%); pH 7 a 9,5; tempo de reação 2-6 h; Conc. OSA = 2-10% T= 25-45 °C.	Parâmetros adequados para modificação: dispersão 35% de amido; pH 8;; tempo de reação 3 h; temperatura 35 °C.	(HUI et al., 2009).
Milho	Pré-tratamento de amido com α -amilase pH 6; 60 °C; 7 h. Dispersão de amido (1:1,5); pH 8,5; Conc. OSA = 4%; tempo de reação = 7h; T = ambiente.	O tratamento com enzima reduziu o grau de substituição (DS) e influenciou a distribuição dos grupos OSA no grânulo de amido.	(HUANG et al., 2010).
Milho ceroso	Dispersão amido (1:1,5); pH 7,5 - 9,5; Conc. OSA = 3 - 50%; T = 25 °C; tempo reação = até pH estabilizar.	Maiores concentrações de OSA proporcionaram maiores valores de DS, porém a eficiência de reação (RE) diminuiu.	(BAI; SHI, 2011).
Quinoa	pH 7,6 Conc. OSA 3 - 10%; tempo reação = até pH estabilizar.	Concentração de OSA ótima foi de 3%. O DS tem leve e moderado impacto sobre o tamanho das gotas de emulsão.	(RAYNER et al., 2012a).

Continúa...

Fonte de amido	Variáveis estudadas	Principais resultados	Referência
Milheto (<i>Pennisetum typhoides</i>)	Dispersão de amido = 35%; pH = 8; tempo de reação 2 - 5 h; T = 35 °C; Conc. OSA = 3%.	O DS aumentou com maiores tempos de reação. Conforme aumentou DS, aumentou o amido resistente e capacidade de absorção de óleo. Diminuiu os valores das propriedades térmicas.	(SHARMA et al., 2016).
Arroz – Tapioca	Dispersão de amido 1:2,5; pH 8,5 - 9,0; OSA 3%; tempo de reação 6 h.	Foi observado mudanças na cadeia de amilopectina, com redução do grau de polimerização. Modificação acontece principalmente nas cadeias de amilose.	(WHITNEY et al., 2016).
Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i>)	Dispersão do amido = 35%; Conc. OSA = 1,5 - 3%, tempo de reação = 8 h; pH 8,5.	Mudanças na massa molar e densidade molar das cadeias de amido. Propriedades térmicas reduziram com o incremento do DS. A modificação com OSA aconteceu nas regiões amorfas.	(ZHENG et al., 2017).

Embora a modificação química de amido utilizando OSA seja uma área bem definida de pesquisa, para cada nova fonte de amido é necessário estudar as condições ótimas de modificação (HUI et al., 2009; SWEEDMAN et al., 2013).

Amido modificado com OSA pode ser mais resistente à digestão, conforme encontrado por Han e BeMiller (2007), que concluíram que a modificação do amido com OSA incrementa os valores de amido lentamente digerido (SDS) para amido

resistente (RS), o qual pode ser aproveitado para o transporte de nutrientes no organismo. Wang et al. (2011) também demonstraram que a modificação do amido de milho com OSA, promove a formação de amido resistente, sendo que, quanto maior o grau de substituição, maior a fração de amido resistente formado. Esse material pode ser considerado um carreador potencial de compostos bioativos para liberação no colón de acordo com os ensaios de liberação controlada. A obtenção de frações de RS, devido à modificação do amido com OSA, representa uma opção para aplicações no campo da indústria alimentícia, especificamente no desenvolvimento de emulsões *Pickering*.

Lindeboom, Chang e Tyler (2004) ressaltaram o potencial dos grânulos muito pequenos de amido como carreadores de componentes ativos, e a eventual liberação controlada, devido à maior relação de área/volume. No caso específico do uso do amido como estabilizador de emulsões, Xiao, Li e Huang (2016) mencionaram que o tamanho da partícula usada na estabilização deve ser 10 vezes menor que a gota da emulsão esperada. Portanto, a estabilidade da gota da emulsão está diretamente relacionada ao tamanho da partícula empregada (DICKINSON, 2012).

3.3 Emulsões *Pickering*

As emulsões são misturas de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, onde uma fase está dispersa na outra em forma de pequenas gotas (MCCLEMENTS, 2007; WINDHAB et al., 2005). Diferentes tipos de emulsões podem ser produzidos dependendo da distribuição espacial de diferentes fases, como por exemplo: O/A que são gotas de óleo dispersas em água e A/O que são gotas de água dispersa em óleo.

Também é possível produzir diferentes tipos de emulsões múltiplas, em que uma fase dispersa contém ainda outra fase dispersa, por exemplo as mais comuns são: A/O/A e O/A/O. Por essa versatilidade na formulação, as emulsões são de grande relevância na aplicação em diversas áreas como: na área de alimentos, cosmética, farmacêutica, engenharia entre outras (DICKINSON, 2010; USHIKUBO; CUNHA, 2014).

As misturas de água e óleo são termodinamicamente instáveis devido à diminuição de energia livre no processo de coalescência que tende a separar as fases, levando o sistema para uma configuração termodinâmica mais estável (PICHOT et al., 2015). A instabilidade termodinâmica faz com que as gotas se agrupem, reduzindo a energia total do sistema, por minimizar a área de contato entre as fases, gerando a separação final dos líquidos até atingir o equilíbrio termodinâmico (MAREFATI et al., 2015). Na Figura 6 estão apresentados os diferentes mecanismos físicos que podem desestabilizar as emulsões.

Figura 6 - Representação dos mecanismos físicos de separação de fases nas emulsões alimentícias.

Fonte: Adaptado de McClements (2004)

Para manter as gotas dispersas nos sistemas emulsionados por mais tempo são comumente usados surfactantes, polímeros, proteínas e partículas, os quais são materiais capazes de se concentrar nas interfaces e diminuir a tensão interfacial, reduzindo assim a energia livre envolvida no processo de dispersão e gerando uma

força repulsiva ou uma barreira física que retarde o processo de coalescência (USHIKUBO; CUNHA, 2014). Os principais mecanismos de estabilização de dispersões bifásicas são a estabilização eletrostática (forças repulsivas), estabilização estérica (uso de surfactantes ou cadeias poliméricas) ou formação de uma barreira por partículas sólidas na interface das gotas da emulsão (LAM; VELIKOV; VELEV, 2014).

Em geral, os principais mecanismos de estabilização são baseados em interações eletrostáticas, efeitos estéricos ou a combinação de ambos, uma vez que as moléculas estabilizantes são adsorvidas preferencialmente nas interfaces líquido-líquido (GUTIERREZ BELEÑO, 2017; USHIKUBO; CUNHA, 2014). A funcionalidade de surfactantes e/ou de biopolímeros na estabilização de uma emulsão pode ser substituída por partículas sólidas adsorvidas na interface, em que surge a categoria das emulsões conhecidas como *Pickering* (MARKU et al., 2012; TIMGREN et al., 2011).

As emulsões *Pickering* são sistemas estabilizados por partículas sólidas adsorvidas na interface de dois líquidos imiscíveis. (RAYNER et al., 2012b; YANG et al., 2017). As primeiras experiências de estabilização de emulsões com partículas sólidas foram feitas no início do século XX por Ramsden (1903) e Pickering (1907), e nas aplicações feitas durante as décadas 1930 - 1950 foram usadas partículas sólidas como estabilizadoras dos processos de polimerização por solução (BON, 2014). Atualmente, há um interesse crescente na estabilização de emulsões e espumas utilizando partículas sólidas (tipo *Pickering*), como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 - Publicações por ano encontradas com o *Sci-finder* usando as palavras “emulsões *Pickering*” e “emulsões estabilizadas por partículas”.

Fonte: Adaptado de Xiao, Li e Huang (2016)

O interesse nas emulsões *Pickering* se deve à alta estabilidade de emulsões por longos períodos de tempo e à biocompatibilidade quando usada uma partícula sólida orgânica (LAM; VELIKOV; VELEV, 2014; WU; MA, 2016; XIAO; LI; HUANG, 2016). A alta estabilidade das emulsões *Pickering* está associada ao tamanho das partículas, o que promove uma barreira/impedimento estérico contra o contato mais próximo das gotas e previne a coalescência. Outra característica importante da estabilidade da emulsão, é a grande quantidade de energia necessária para remover a partícula adsorvida na interface óleo/água (DICKINSON, 2010; FRENCH et al., 2016; TIMGREN et al., 2011).

O uso de partículas parcialmente hidrofóbicas para a estabilização de emulsões deve-se a sua capacidade de se adsorver fortemente na interface líquido-líquido, impedindo estericamente a coalescência das emulsões (SWEEDMAN et al., 2013). A explicação convencional para esse tipo de estabilização é baseada na adsorção das

partículas sólidas na interface líquido-líquido, na forma de uma camada compacta, o que pode impedir a coalescência das gotas de emulsões pela sua molhabilidade. Nesse caso, a força da barreira estérica depende de quão difícil é remover as partículas da interface, sendo esta força maior quanto maior a fração da superfície das partículas que está em contato com a fase contínua (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013; DICKINSON, 2010; GUTIERREZ BELEÑO, 2017).

A molhabilidade, capacidade de manter contato entre o líquido e a partícula sólida, afeta a formação das emulsões *Pickering* e pode ser determinada mediante o ângulo de contato entre a partícula e as fases da emulsão. A afinidade parcial da partícula por cada uma das fases permite a previsão da estabilidade da emulsão, conforme ilustrado na Figura 8 (ZHANG; ZHOU; YANG, 2015). As partículas adsorvidas causam uma inclinação da interface em direção à fase que tem menor afinidade, portanto, partículas hidrofílicas são mais adequadas para emulsão O/A e hidrofóbicas, para emulsões A/O (ZHANG; ZHOU; YANG, 2015).

Os grânulos de amido, como partículas sólidas, são bons candidatos à estabilizantes de emulsões *Pickering* pelo seu odor, cor e gosto neutros, e também por não serem alergênicos (RAYNER et al., 2012b). Dependendo da fonte botânica, os grânulos de amido podem variar o tamanho, a forma e a composição (FUENTES et al., 2019). Quando comparada a outras fontes de amido, a *cañihua* é promissora por ter uma distribuição de tamanho de grânulos de 0,8 a 1,5 μm , comparáveis à quinoa e ao amaranto, pseudocereais andinos, que apresentam capacidade de estabilizar gotas de óleos em emulsões (LI et al., 2013; MARKU et al., 2012; RAYNER et al., 2012a).

Figura 8 - Representação esquemática da seção transversal de uma gota de óleo estabilizada por partículas sólidas com diferentes ângulos de contato

Fonte: Adaptado de Duffus et al. (2016)

A estrutura complexa dos grânulos de amido torna-os interessantes por suas propriedades funcionais únicas, principalmente a habilidade de gelatinizar para formar uma camada de massa fundida e coesa, a qual é capaz de proteger as gotas durante o processamento (DICKINSON, 2010). O revestimento das gotas por partículas sólidas funciona como uma barreira rígida contra a coalescência, o que significa que, mesmo as emulsões altamente concentradas podem ser estabilizadas de forma eficiente como emulsões *Pickering* (MAREFATI et al., 2015; MIAO et al., 2014).

No caso de emulsões estabilizadas pelo amido modificado com OSA, as pesquisas indicam que o amido com grânulos de tamanhos menores favorece as propriedades de emulsificação quando comparados aos grânulos de amido de maior tamanho (LI et al., 2014). Na Tabela 4 estão apresentadas diversas pesquisas de amido de várias fontes e modificados com OSA para a estabilização de emulsões.

Tabela 4 - Amido modificado com OSA para a estabilização das emulsões
Pickering

Fonte de amido	Variável de estudo	Principais resultados	Referência
Arroz	12 variedades de arroz com diferente teor de amilose (1,65 – 27,15%).	As emulsões com amido OSA de maior DS* apresentaram menores tamanhos de gotas que os amidos nativos. A estabilidade da emulsão foi relacionada negativamente com o teor de amilose.	(SONG et al., 2013).
Quinoa	Métodos de preparação de emulsões: estado granular, molecular (autoclave) e combinação dos métodos.	Amido estado granular forneceu maior estabilidade às emulsões frente à coalescência. A superfície coberta é menor nos amidos de estado granular.	(MATOS et al., 2016).
Quinoa Arroz Milho Cevada	Tratamentos: amido nativo, amido OSA, amido com tratamento térmico, e efeito de sal na fase continua.	Amido de quinoa ofereceu maior estabilidade de emulsão que os outros amidos. Todos os amidos modificados estabilizaram as emulsões até por dois anos.	(TIMGREN et al., 2013).
Milho	Tempo de tratamento com α -amilase (10 – 60 min) no amido OSA.	As amostras pré-tratadas por modificação enzimática por 25 min mostraram a melhor distribuição do tamanho das gotículas, melhor estabilidade da emulsão e agregação mínima.	(LI et al., 2014).
Continúa...			

Fonte de amido	Variável de estudo	Principais resultados	Referência
Milho ceroso	Conc. de óleo como fase dispersa: 5 - 60%; Conc. de amido OSA = 8 - 16%.	Maior concentração de amido OSA na emulsão promoveu menor tamanho de gota, e consequentemente reduziu a cremeação. Aumento da fase dispersa incrementou a viscosidades aparente e estabilidade física nas emulsões.	(DOKIĆ; KRSTONOŠIĆ; NIKOLIĆ, 2012).
Banana	Conc. Amido OSA = 100 - 250 mg/mL; DS amido = 0 - 0,034.	A concentração de amido influenciou significativamente o índice de emulsificação (EI). Por outro lado, o maior DS levou ao maior diâmetro médio das gotas.	(BELLO-PÉREZ et al., 2015).
Milho	Tipo partícula = Nano partícula de amido solúvel (SSNP), Nano partícula de amido insolúvel (ISNP); Conc. Partícula = 0,05 - 5%; Fase dispersa = 5 - 50%; pH = 3 - 11.	Parâmetros selecionados para ambas partículas: Conc. Partícula 3%, Conc. Fase dispersa 50%; pH 7,0. Emulsão com OSA-SSNP apresentou maiores valores de viscosidade do que as com OSA-ISNP. A distribuição do tamanho das gotas foi monomodal para SSNP e bimodal para ISNP. Estabilidade de todas as emulsões até 30 dias.	(YE et al., 2017).
Kudzu	Conc. Amido OSA = 1 - 5%; Processo em microfluidizador: Pressão (20 -150 MPa); número de ciclos (1 - 5).	Tensão interfacial da dispersão diminui com o aumento da Conc. amido OSA. Tamanho de gotas (186 nm) foi obtido em emulsões preparadas: 100 MPa e 3 ciclos, usando microfluidizador. Estabilidade da emulsão até por 30 dias.	(ZHAO et al., 2017).

*DS = Grau de substituição

Na emulsão *Pickering* pode ser formada uma monocamada de partículas sólidas adsorvidas por duas gotas ao mesmo tempo, promovendo a floculação (DICKINSON, 2010). Ambas gotas estão separadas por uma fina camada da fase contínua como exemplificado na Figura 9. Alguns requerimentos para ocorrer a ponte de gotas são: (i) o ângulo de contato, entre a partícula e a fase dispersa, deve ser satisffeito para ambas as gotas e (ii) ambas as gotas devem colidir sem exceder a capacidade de adsorção da partícula para evitar a coalescência. A ponte de gotas pode atuar como um mecanismo contra a coalescência pela ação de barreira fornecida pelas partículas (BIZMARK; IOANNIDIS, 2018).

Figura 9 - Ponte de gotas: (a) representação esquemática, (b) posição da partícula ao conectar duas gotas.

Fonte: Adaptado de Bizmark e Ioannidis (2018)

3.4 Métodos de emulsificação

Entre os principais equipamentos utilizados na preparação de emulsões *Pickering* encontram-se os dispersores mecânicos, homogeneizadores de alta pressão e transdutores ultrassônicos. Dependendo das condições, métodos de emulsificação e energia fornecida, podem ser obtidos pequenos tamanhos de gotas, baixo índice de polidispersidade no tamanho de gota e alta estabilidade física da emulsão. Apesar de haver muita pesquisa sobre as condições de produção de emulsões, ainda existem aspectos a serem compreendidos com maior profundidade, uma vez que a formação da emulsão é um processo complexo no qual há diversas variáveis (NORTON; SPYROPOULOS; COX, 2009).

Os elementos necessários para a formação da emulsão são: óleo, água, emulsificante e/ou estabilizante e energia (as emulsões *Pickering* são estabilizadas por partículas sólidas na interface óleo-água). A variável mais importante, ao usar métodos diferentes no preparo da emulsão, é o mecanismo pelo qual a energia é fornecida para a formação das gotas. Um dos métodos mais usados é a dispersão mecânica por cisalhamento de dois líquidos. Essa dispersão pode ser feita de forma manual (baixa energia) ou mediante o uso de homogeneizadores de cisalhamento intenso (Ultraturrax). Adicionalmente, podem ser usadas técnicas de emulsificação por ultrassom, métodos de condensação, eletrólitos e de inversão das fases, entre outros (GUTIERREZ BELEÑO, 2017).

3.4.1 Agitação mecânica

No misturador estático, ou rotor-estator, as forças externas por agitação mecânica rompem a fase dispersa em gotas, gerando um fluxo contínuo entre a fase contínua e as paredes das gotas, que estão relativamente distantes entre elas (COSTA et al., 2017). O atrito (viscosidade) gera forças de cisalhamento as quais atuam entre a fase contínua e as gotas dispersas. Dependendo da potência do equipamento e da viscosidade da amostra, o escoamento pode ser laminar ou turbulento (SILVA et al., 2018).

O tempo de permanência das gotas na zona de cisalhamento é relativamente longo, pois todo o volume da emulsão é agitado mecanicamente. De modo que, as forças de cisalhamento atuam sobre todas as gotas ao longo do tempo de emulsificação, favorecendo a adsorção das partículas na interface. Em equipamentos de agitação mecânica, a entrada máxima de potência ao sistema (emulsão) é relativamente baixa (COSTA et al., 2017). Portanto, o limite no tamanho das gotas é bastante grande, comparado ao limite quando se utilizam outros métodos de emulsificação.

3.4.2 Ultrassom

Equipamentos que utilizam ultrassom para promover a emulsificação são mais eficientes na redução do tamanho de gotas, porém tais processos ainda são em menor escala, como os utilizados em laboratório. O mecanismo de emulsificação por ultrassom é devido primariamente à cavitação. Um transdutor converte energia elétrica em vibração longitudinal em um transformador imerso no líquido (KENTISH et al., 2008), causando assim uma onda de choque que resulta na formação de gotas. O tamanho das gotas depende do tempo de sonificação, da quantidade de emulsificante-estabilizante utilizado e da energia aplicada (CHANDRAPALA et al., 2012). Equipamentos de ultrassom emitem ondas de som de frequências entre 16 - 100 kHz. Os mecanismos de formação das gotas ainda não são completamente entendidos, porém a cavitação é considerada mecanismo essencial na formação das gotas pelas ondas de ultrassom (CANSELIER et al., 2002).

A cavitação ocorre numa pequena região perto da sonda de ultrassom, onde as ondas de som e as diferenças de pressão são produzidas. O processo envolve duas etapas, a primeira está relacionada à explosão de bolhas da fase dispersa sob a fase contínua devido à instabilidade de Rayleigh - Taylor e às ondas interfaciais. Na etapa seguinte, os efeitos da cavitação rompem as gotas, nas proximidades das bolhas que implodem em tamanhos menores. Contudo, a formação de gotas, pelas ondas de ultrassom, está diretamente relacionada aos parâmetros que afetam o fenômeno da cavitação (CANSELIER et al., 2002; CHANDRAPALA et al., 2012).

Ao comparar ambos os métodos de emulsificação encontra-se que o ultrassom produz gotas de menor tamanho e maior estabilidade quando comparado à agitação mecânica (KENTISH et al., 2008). Geralmente, o ultrassom tem entradas de energia maiores que a agitação mecânica. O tempo de permanência em que pequenas gotas são formadas é menor no caso do ultrassom, pois o fenômeno da cavitação está localizado próximo à sonda (SILVA et al., 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Foram utilizados grãos de *cañihua* (*Chenopodium pallidicaule*) da variedade Cupi (umidade 5,98%, teor proteico 19,7%, fibra bruta 9,77%) adquiridos no “Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA)”, localizado em Puno - Peru (3.815 metros de altitude), de temperatura ambiente entre 1,6 - 16,3 °C. O amido nativo de *cañihua* foi modificado, em meio alcalino, usando o reagente OSA (TRIGON Chemie GmbH). Na preparação das emulsões, foi utilizado óleo de soja (densidade 920 kg/m³, Sigma-Aldrich, USA) como fase dispersa. A fase contínua foi preparada com o tampão fosfato 5 mM com 0,2 M de NaCl (densidade de 1009,6 kg/m³). Os demais reagentes e solventes usados nesse trabalho, tais como: tolueno, nitrato de prata, ácido clorídrico e fenolftaleína, etc., foram de grau analítico, adquiridos no mercado local.

4.2 Extração e purificação do amido de *cañihua*

A extração do amido de *cañihua* foi feita de acordo com Rayner et al. (2012), com algumas modificações. As principais operações de extração estão apresentadas no fluxograma da Figura 10.

Na extração do amido foram avaliados os seguintes aspectos: efeitos dos solventes: água, solução de hidróxido de sódio e solução de tolueno, em relação aos teores de proteínas e de cinzas presente no amido extraído. Um desses amidos foi escolhido para ser purificado, avaliando-se o número de lavagens (ressuspensão do amido seguida de centrifugação) com solução de hidróxido de sódio. O amido assim purificado que apresentou menor teor de proteínas foi submetido a outra etapa de purificação, para se verificar a eventual redução do teor de proteínas, por lavagens com soluções de NaOH misturadas com NaCl.

Figura 10 - Etapas da extração e purificação do amido de *cañihua*

Fonte: Própria autoria.

4.2.1 Efeito do tipo de solvente na extração do amido

Para avaliar o efeito dos solventes, os grãos de *cañihua* foram macerados em água, solução de NaOH (0,3%), ou solução de tolueno (10%), na proporção em massa 1:3 (grão:solvente), por 24 h a 4 °C. Depois desse período, os grãos foram separados dos solventes e deixados esgotando por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram trituradas com água em um liquidificador (Philips, RI2103) (proporção em massa

água:grãos 1:1) e a dispersão resultante foi filtrada com um tecido de poliéster, similar ao usado na fabricação de queijos.

A dispersão obtida foi passada por uma peneira de 270 *mesh* para separação das fibras e foi deixada em repouso por 4 h sob refrigeração (4 °C), o que favoreceu a sedimentação do amido. O sobrenadante foi removido por sifonagem e o amido sedimentado foi centrifugado a 3000 x g por 10 min a 10 °C (centrífuga Eppendorf AG, modelo 5430 R, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e a camada marrom, associada às proteínas, na superfície do precipitado, foi removida manualmente e descartada. O material precipitado foi ressuspensão novamente em água destilada e permaneceu em repouso por 4 h sob refrigeração (4 °C) para a sedimentação, após centrifugar novamente, o material foi separado e secado em estufa (Marconi MA035/1, Brasil) a 30 °C por 24 h.

O amido assim obtido foi caracterizado quanto à umidade, teores de cinzas e de proteínas. Um dos amidos produzidos foi escolhido para a continuação dos estudos, baseando-se nos resultados das caracterizações, principalmente do teor de proteínas. Assim, esse amido escolhido foi purificado posteriormente.

4.2.2 Avaliação do número de lavagens na purificação do amido selecionado na etapa descrita na seção 4.2.1

O amido extraído usando água como solvente, foi submetido ao primeiro processo de purificação, que consistiu na ressuspensão do amido (processo repetido em até 5 vezes), em solução de NaOH (0,3%) seguida de centrifugação. Esses amidos purificados foram analisados para determinação dos teores de proteínas e de cinzas. O teor de lipídios não foi avaliado, pois o amido sem passar pela etapa de purificação apresentava um teor menor que 0,75%.

Entre cada lavagem, o sobrenadante foi removido por centrifugação a 3000 x g por 10 min a 10 °C (Eppendorf AG, modelo 5430 R, Alemanha) e descartado. Após a lavagem com solução de NaOH, o amido foi lavado no mínimo duas vezes com água destilada e desidratado em estufa (Marconi MA035/1, Brasil) a 30 °C por 24 h. O amido

seco (com a umidade em torno de 10%) foi moído com pistilo e almofariz e a padronização de sua granulometria foi feita por passagem através de peneira 100 *mesh*.

Com o objetivo de se reduzir ainda mais o teor de proteína, o amido pré-purificado foi submetido a outra etapa de purificação. Nessa etapa foi utilizada a solução de NaOH (0,3%) com 1% (m/v) de cloreto de sódio e a mesma metodologia utilizada na purificação com apenas solução de NaOH.

O amido assim purificado foi submetido a análises para caracterizações de teores de umidade, cinzas e proteínas.

4.3 Modificação química do amido purificado com solução de NaOH

Esta parte dos experimentos foi realizada no Departamento de Ciências de Alimentos da Universidade de *Purdue*, USA.

O amido, preparado conforme descrito em 4.2.2, foi disperso em água destilada (20 g/100 mL suspensão) sob agitação. O pH da suspensão foi ajustado para 7,5 pela adição de solução de NaOH (3 M). O reagente OSA foi adicionado nessa suspensão, em 4 partes iguais, a cada 30 minutos, perfazendo, ao final, 3 g de OSA/100 g de amido. O pH do meio foi controlado nas primeiras 3 h de reação, foi mantido entre 7,5 e 8,0, na temperatura pré-determinada (20, 30 ou 40 °C). Essa dispersão foi mantida por até 24 h, para que a reação ocorresse.

Após 24 h, o pH foi ajustado para 6,5 com solução de HCl diluído (1 M). A mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 20 min a 4 °C e lavada duas vezes com água destilada e duas vezes com etanol absoluto (proporção 1:5). Em seguida, o amido foi desidratado a temperatura ambiente por 24 h, e sua granulometria foi padronizada através de peneiras de 100 *mesh*.

O amido também foi modificado com o mesmo procedimento já descrito, mas no intervalo de pH de 8,5 a 9,0, nas mesmas temperaturas.

4.4 Metodologias de análises do amido

4.4.1 Composição química do amido extraído e purificado

O amido extraído na seção 4.2.1 e o amido purificado na seção 4.2.2 foram caracterizados quanto à sua composição química.

4.4.1.1 Umidade

Foram pesados aproximadamente 2 g de amido e colocados em estufa (Marconi MA 035/1, Brasil) a 105 °C por 24 horas. Em seguida as amostras foram colocadas em dessecadores para seu resfriamento. Os cadinhos foram pesados e a fração evaporada foi calculada como umidade e a fração restante do material como matéria seca.

4.4.1.2 Teor de Cinzas

As mesmas amostras utilizadas na determinação de umidade foram colocadas em mufla (500 °C por 4 h). Depois do resfriamento em dessecadores, as amostras foram pesadas e o teor de cinzas foi calculado em função da massa inicial da amostra.

4.4.1.3 Teor de proteínas

Na determinação do teor de proteínas bruta foi usado o método *Kjeldahl* e o fator 6,25 para o cálculo da porcentagem desse componente. O teor de proteínas foi expresso como g de proteína/100 g sólidos.

4.4.2 Características e propriedades do amido modificado

4.4.2.1 Umidade e teor de proteína

A umidade do amido foi determinada por uma balança com infravermelho (MA 30, Sartorius, Germany), que aqueceu a amostra até 135 °C. E o teor de proteína foi determinado usando-se o analisador nitrogênio/proteínas (Flash EA 112 Series, Thermo Scientific, USA) (MAREFATI et al., 2017a).

4.4.2.2 Grau de substituição e eficiência de reação

Amido modificado foi pesado (1,5 g) e adicionado 9 mL de HCl (2,5 M) em condições de agitação suave por 30 min. Seguidamente foi centrifugado a 3000 x g por 10 min a 15 °C. O sedimento foi lavado com solução de isopropanol (90%) mediante agitação por 10 min (para favorecer a remoção dos resíduos de Cl da dispersão). Para avaliar a presença de íons de Cl, foi adicionado uma gota de AgNO₃ (0,1 M) no sobrenadante do centrifugado. A formação de um anel cor branca evidencia da presença de íons de Cl. O amido foi novamente centrifugado nas condições mencionadas anteriormente e o processo de lavagem foi repetido até remover os resíduos de Cl. O sedimento sem presença de Cl foi lavado com solução de etanol (80%) e secado em temperatura ambiente por 24 h. Desse amido acidificado e seco, foi pesado 100 mg e dispersado em 30 mL de água para ser submetido a ebulição por 30 min. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente (25 °C) e tituladas com solução de NaOH (0,01 M) até atingir pH 7. O grau de substituição (DS) foi calculado utilizando-se a seguinte equação:

$$DS = \frac{0,162 \times (A \times M) / W}{1 - [0,210 \times (A \times M)] / W} \quad (1)$$

Em que A é o volume de titulação da solução de NaOH (mL), M é a molaridade da solução da NaOH, 0,162 e 0,210 são as massas molares (mg/mol) da glicose e do

anidro octenil succínico (respectivamente) e *W* a massa seca (g) do amido modificado. A eficiência da reação (*RE*) foi calculada conforme a seguinte equação:

$$RE = \frac{DS_{real}}{DS_{teórico}} \quad (2)$$

Em que *DS* real representa o valor experimental calculado na Equação 1, e *DS* teórico significa o valor de substituição assumindo que todos os grupos OSA reagiram com o amido e formaram ésteres.

No cálculo do valor de *DS* teórico foi considerado a quantidade de OSA utilizada na modificação (3% da massa de amido) e o número de grupos hidroxilas disponíveis para reagir em cada molécula de glicose. Neste caso, o grau de substituição máximo teórico foi de 22×10^{-3} (SONG et al., 2006).

4.4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Micrografias dos grânulos de amidos nativo e modificados com OSA foram obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (Hitachi, modelo TM3000, Tokyo, Japan) a 15 kV com ampliações de 1000x. As amostras foram armazenadas sob vácuo por 12 h em dessecadores com sílica gel. Posteriormente, o amido foi espalhado sobre fita de carbono de dupla face fixada em um suporte de alumínio e analisado (LUCIANO et al., 2017).

4.4.2.4 Difração de Raios X e Índice de cristalinidade

As análises de difração de raios-X (DRX) foram realizadas em um difratômetro de Raios-X RU200B (Rigaku Rotaflex), com anodo de Cu, operando a 40 kV e corrente de 15 mA (radiação $\text{CuK}\beta$, $\lambda = 0,15405 \text{ nm}$). A análise foi realizada de 4 a 40° em uma

velocidade de varredura de 2°/min, em temperatura ambiente. O perfil dos padrões de difração foi obtido utilizando-se o programa *Scion Image Software*.

O índice de cristalinidade foi estimado de acordo com Nara e Komiya (1983) com algumas modificações, usando o *Software Origin* (versão 9.5, OriginLab Corp.). Resumidamente, o espectro DRX foi suavizado e sua linha de base foi determinada. Em seguida, a área total sob o espectro foi calculada por integração. Uma linha suave conectando a linha de base dos picos foi plotada no espectro. Os domínios cristalinos foram assumidos como a área abaixo dos picos cristalinos. O índice de cristalinidade relativa foi calculado como a razão entre a área cristalina e a área total:

$$IC (\%) = \frac{Ac}{Ac+Aa} \times 100 \quad (3)$$

Em que *IC* é o índice de cristalinidade relativa, *Ac* é a área abaixo dos picos cristalinos e *Aa* é a região das regiões amorfas.

4.4.2.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por Transformada de *Fourier* foi obtida utilizando um espectrofotômetro (Spectrum-One, Perkin-Elmer, Califórnia/EUA), com o acessório de refletância total universal atenuada (UATR), que permitiu analisar as amostras em pó sem preparação previa (BERGO; MORAES; SOBRAL, 2013). Foram realizadas 32 varreduras na faixa espectral de 650 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 2 cm⁻¹. Os espectros de varredura coletados foram analisados usando o programa FTIR *Spectrum Software* (Perkin-Elmer).

4.4.2.6 Solubilidade e poder inchamento

As amostras de amido modificado foram pesadas (500 mg de amostra seca) e homogeneizadas com 20 mL de água no tubo de centrifugação. Posteriormente, foram aquecidos a temperaturas de 50, 70 e 90 °C por 30 min em banho termostático (Marconi MA127, Brasil). Após o resfriamento a 25 °C, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge Eppendorf AG, modelo 5430 R) em uma velocidade de 2600 x g durante 15 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi colocado em placas de Petri para secar a 105 °C em estufa com circulação de ar (Marconi MA035 / 1, Brasil) até peso constante (YU et al., 2012). Amido nativo foi usado como branco para os efeitos da modificação. A solubilidade do amido foi calculada com a Equação 4. O precipitado foi pesado em balança analítica (Shimadzu AUY222, Japão) para calcular o poder de inchamento com a Equação 5.

$$S(\%) = \frac{W_r}{W} \times 100 \quad (4)$$

$$SP (g/g) = \frac{W_t}{W - W_r} \quad (5)$$

Em que S a é solubilidade, SP , o poder de inchamento, W , a massa de amostra, W_r , a massa de resíduo de evaporação e W_t , a massa de resíduo de centrifugação.

4.4.2.7 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos nativos e modificados foram analisadas usando um calorímetro diferencial de varredura (DSC, Seiko 6200, Seiko Instruments Inc., Japão). As dispersões de amido foram preparadas e pesadas em recipientes de alumínio revestidos (TA Instruments, EUA) na razão de amido-água de 1:5. A amostra

foi aquecida a uma taxa de 10 °C/min de 10 a 120 °C, usando um porta-amostra vazio como referência (MAREFATI et al., 2017a).

As temperaturas de início de (T_o), de pico (T_p) e de conclusão (T_c) da gelatinização do amido foram determinadas pelas análises da curva. A entalpia da transição de gelatinização do amido foi avaliada como a área total do pico da endoterma (ΔH , J/g de matéria seca).

4.4.2.8 Propriedades de pasta

O *Rapid Visco Analyzer* (RVA-4, Newport Scientific, Austrália) foi utilizado para avaliar as propriedades de pasta dos amidos. O amido (~ 3 g, teor de umidade ~ 10%) foi disperso em água (~ 25 mL). Inicialmente, a dispersão foi agitada no recipiente de alumínio (porta-amostra do RVA) a 960 RPM por 10 s, para evitar a formação de bolhas e a 160 RPM nas demais etapas dessa análise. A dispersão foi mantida a 50 °C por 1 min, em seguida, foi aquecida até 95 °C a uma taxa de 6 °C/min, mantida a 95 °C por 5 min e resfriada a 50 °C na mesma taxa (6 °C/min).

O programa *Standard Analysis 1* do software *Thermocline for Windows*, versão 3.0, foi selecionado para análise das propriedades de pasta (temperatura de pasta, viscosidade de pico, viscosidade de quebra (*Breakdown*), viscosidade mínima, viscosidade final e *retrogradação* (*Setback*)).

4.4.2.9 Estabilidade da capacidade emulsificante do amido modificado pelo tamanho de gota da emulsão

Emulsões óleo em água foram preparadas em tubos de ensaio (7 mL) de vidro usando óleo de soja (Sigma-Aldrich, EUA) como fase dispersa (10%); tampão fosfato (5 mM, pH 7, 0,2 M NaCl) como fase contínua (90%) e amido de *cañihua* como estabilizante: amido sem modificação e seis amostras de amidos modificados (em 2 intervalos de pH e em 3 temperaturas).

As emulsões foram homogeneizadas usando um agitador do tipo rotor-estator de alto cisalhamento (Ystral D-79828, Ballrechten-Dottingen, Alemanha) com dispersor de 6 mm, a 22.000 RPM por 30 s (RAYNER et al., 2012b). As distribuições dos tamanhos das gotas de emulsão foram medidas imediatamente após a preparação e após 10 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

A distribuição do tamanho das gotas da emulsão foi determinada usando um analisador de tamanho de partículas por difração a laser (Mastersizer2000 Ver.5.60, Malvern, Reino Unido) (RAYNER et al., 2012a). A amostra foi adicionada ao sistema de fluxo contendo água Milli-Q e foi bombeada através da câmara óptica a uma velocidade da bomba de 2000 RPM. Para cada emulsão adicionada ao sistema, foram realizadas três medições e todas as amostras foram analisadas em duplicata.

4.5 Amido modificado e desenvolvimento de emulsões *Pickering*

Para uma melhor aplicação como estabilizante de emulsões *Pickering*, um amido extraído e sem purificação, e outro amido purificado apenas com solução de NaOH, foram submetidos a modificação com OSA com os seguintes parâmetros de processo: pH = 7,9, temperatura de 35 °C, e tempo de reação de 6 h. A concentração de OSA foi de 3 g/g de amido adicionado em 4 partes. Os amidos modificados nestas novas condições foram utilizados para serem aplicados em emulsões *Pickering*.

Emulsões óleo em água foram preparadas com proporção O:A (10:90) e concentração de amido variando de 100 a 800 mg de amido OSA/mL de óleo ou diferentes proporções do óleo:água (10:90, 20:80; 60:40 e 40:60) para uma concentração do amido-OSA de 200 mg/mL de óleo (Tabela 5).

As amostras foram emulsionadas, utilizando-se um homogeneizador ultraturrax (Ystral D-79828, Ballrechten-Dottingen, Germany) com dispersor de 6 mm, a 22.000 RPM por 30 s (MAREFATI et al., 2017b; RAYNER et al., 2012a), ou utilizando-se uma sonda ultrassônica (modelo UP200st, Hielscher, Alemanha), com a ponteira S26d7D que possui 7 mm de diâmetro e 95 mm de comprimento. Na emulsificação por sonificação, a potência nominal foi de 37 W, a sonda foi imersa a 50% de

profundidade, com saída de energia ajustada para 75% de amplitude com atividade pulsada (on/off) de 50% (do período de operação) e tempo total de operação 7 min. O controle da temperatura da emulsão foi feito por meio de um banho de gelo para evitar o superaquecimento na amostra. As emulsões assim produzidas foram imediatamente submetidas a análises para as caracterizações de microscopia óptica, de distribuição de tamanho de gotas e estabilidade física.

Tabela 5 - Formulação das emulsões *Pickering*

Tratamentos	Fase aquosa (%)	Fase oleosa (%)	C _{Amido} (mg/mL óleo)
T1	90	10	100
T2	90	10	200
T3	90	10	400
T4	90	10	800
T2	90	10	200
T5	80	20	200
T6	60	40	200
T7	40	60	200

4.6 Caracterização do amido para emulsões e das emulsões *Pickering*

4.6.1 Amido para emulsões

Os amidos modificados com OSA para o desenvolvimento de emulsões *Pickering* foram caracterizados quanto à umidade e ao teor de proteínas conforme descrito na seção 4.4.2.1. O grau de substituição (DS) e a eficiência de reação (RE) foram determinados como descrito na seção 4.4.2.2.

A forma e morfologia dos grânulos desses amidos modificados foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (JSM-6700F, JEOL, Japão) operando com

10 kV e uma distância 8,2 mm. As amostras foram desidratadas e cobertas com uma camada fina de ouro.

4.6.2 Caracterização de emulsões *Pickering*

4.6.2.1 Microscopia óptica

As emulsões foram caracterizadas por microscopia óptica usando uma câmera (DFK 41AF02, The *imaging Source*, Alemanha) que foi acoplada no microscópio óptico (Olympus BX50, Japão). As imagens digitais foram transferidas para um computador e posteriormente analisadas. As emulsões foram diluídas cinco vezes com água Milli-Q e uma gota foi colocada numa lâmina de vidro. Para evitar a deformação das gotas, não foi utilizado vidro de cobertura. A ampliação das imagens foi de 20x.

4.6.2.2 Distribuição do tamanho de gotas

A distribuição do tamanho das gotas da emulsão foi determinada usando o analisador de tamanho de partículas por difração a laser (Mastersizer2000 Ver.5.60, Malvern, Reino Unido). Este equipamento é controlado por um computador, com *software* apropriado para aquisição dos sinais e tratamentos estatísticos. A amostra foi colocada no sistema de fluxo de água Milli-Q e bombeada a uma velocidade da bomba de 2.000 RPM. Os principais parâmetros estatísticos apresentados pela análise são: $d_{(0,1)}$, $d_{(0,5)}$ e $d_{(0,9)}$, que correspondem à faixa de diâmetros que representa o volume acumulado por gotas, partindo do menor diâmetro para o maior, com os percentis de 10, 50 e 90% do volume disperso da amostra. O diâmetro médio de *Brouckere* ($D_{[4,3]}$), que corresponde ao diâmetro médio ponderado pelo volume das gotas, também foi calculado de acordo com a Equação 6. As emulsões preparadas foram imediatamente analisadas.

$$D_{[4,3]} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3 \quad (6)$$

Para determinar as variações nas distribuições de tamanho das gotas, o índice de polidispersidade (PDI), parâmetro associado à polidispersão das curvas de distribuição multimodal das partículas, foi calculado usando a seguinte equação:

$$PDI = \frac{d_{(0,9)} - d_{(0,1)}}{d_{(0,5)}} \quad (7)$$

Em que $d_{(0,1)}$, $d_{(0,5)}$ e $d_{(0,9)}$ representam diâmetros de partículas tal que 10, 50 ou 90%, respectivamente, da amostra analisada são constituídas de partículas de tamanho menor que esse valor.

4.6.2.3 Estabilidade física

A estabilidade física das emulsões, também conhecida como *Turbiscan index*, foi determinada no equipamento *Turbiscan LabExpert* (Formulation Inc., France), que emprega a dispersão estática de luz múltipla. Um volume de 4 mL da amostra foi colocado em uma célula cilíndrica de análise (altura de 50 mm), com cuidado para manter as paredes limpas e a integridade do menisco.

A fonte de luz é um diodo eletroluminescente na região próxima ao infravermelho com um comprimento de onda de 880 nm. Parte da luz incidente é retroespalhada pela amostra ou transmitida através dela e é recebida por dois sensores em locais diferentes: o sensor que recebe a luz transmitida (TS), que está localizado a 180° da radiação incidente, enquanto que o sensor que recebe a luz retroespalhada (BS) está localizado a 45° da luz incidente. Os perfis BS constroem uma impressão digital macroscópica das emulsões em um dado tempo, fornecendo

informações úteis relacionadas às alterações no tamanho das gotas e o aparecimento de uma camada de creme (superior) ou sedimento (inferior).

A TS e a BS foram monitoradas como uma função do tempo e da altura da célula na temperatura ambiente (20°C aproximadamente). As leituras foram configuradas a cada 6 minutos em um período de uma hora. Após a leitura, e com o perfil de BS, foi calculado o índice de emulsificação, conforme descrito em Saari et al., 2019, utilizando-se a Equação 8.

$$EI(\%) = \frac{\text{Altura do pico BS na célula}}{\text{Altura total da amostra na célula (40 mm)}} \times 100 \quad (8)$$

O índice de estabilidade do Turbiscan (TSI) foi estimado usando-se o *software* Turbisoft (2.0.0.33), com base no cálculo matemático da somatória das diferenças de intensidade de cada leitura ($\sum h|scan_i - scan_{i-1}|$) em toda a célula. A soma das variações ($\sum i$) detectadas nas amostras foi calculada de acordo com a Equação 9.

$$TSI = \sum i \frac{\sum h|scan_i - scan_{i-1}|}{H} \quad (9)$$

Em que H é a altura total da célula. TSI é a soma de todas as variações em termos de tamanho ou concentração. Quanto mais alto o TSI, maior a instabilidade do sistema (SAARI et al., 2019)

4.7 Análise estatística

As diferentes propriedades obtidas para as amostras de amidos nativo e modificados, bem como para as emulsões foram analisadas pela análise de variância

(ANOVA), em que as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores médios foram determinadas pelo teste de Tukey utilizando-se o *software* STATISTICA (V.7). Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características dos amidos extraído e purificado

A utilização de diferentes solventes foi avaliada na extração do amido a partir dos grãos de *cañihua*, em termos de umidade, teores de cinzas e de proteínas, que são mostrados na Tabela 6. Nessa tabela pode-se observar que o solvente usado na extração do amido alterou significativamente ($p < 0,05$) os valores de umidade, bem como dos teores de cinzas e de proteínas, e como esperado o amido extraído com água apresentou os maiores teores de proteínas (~1,75%). A umidade dos amidos variou de 11 a 13% e está dentro do intervalo recomendado para amidos comerciais (<14%) (BRASIL, 1987). O teor de cinzas foi menor que 0,3% para os três solventes estudados na extração do amido e foi menor que os determinados por Steffolani; León e Pérez (2013) que obtiveram valores maiores que 1% para quatro variedades diferentes de *cañihua*.

Tabela 6 - Valores de umidade e dos teores de cinzas e de proteínas no amido, após etapa de purificação com diferentes solventes*.

Solventes	Umidade (%)	Cinzas (%)**	Proteínas (%)**
Água	10,57± 0,06 ^a	0,19± 0,02 ^a	1,75± 0,01 ^a
NaOH (0,3%)	12,72± 0,09 ^b	0,26± 0,01 ^b	1,33± 0,01 ^b
Tolueno (10%)	12,82± 0,52 ^b	0,10± 0,03 ^c	1,25± 0,01 ^c

* Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa ($p < 0,05$).

**Em base seca (g/100 g sólidos)

Fonte: Própria autoria.

A solução de NaOH melhorou a solubilização das proteínas, devido à ionização dos grupos carboxilas e à desprotonação dos grupos aminas, favorecendo a lixiviação desse biopolímero, e consequentemente a redução do seu teor no amido. Valenzuela et al. (2013) observaram que a utilização de solução alcalina na extração do amido de quinoa afetou a estrutura das proteínas quanto à carga elétrica e o grau de desnaturação, favorecendo a sua separação do restante dos componentes. Luciano et al. (2017) reportaram que o uso de soluções alcalinas reduziu os teores de proteína e de lipídios do amido isolado de semente de jaca, porém aumentou teor de amilose, devido à despolimerização das cadeias de amilopectina, afetando a proporção de cristalinidade.

O amido extraído com solução de tolueno apresentou aroma característico desse solvente e menor valor de teor de proteínas. Porém, considerando a sua toxicidade e custo maior que os outros solventes usados, o uso desse reagente foi descartado.

Diante do exposto, a maceração dos grãos de *cañihua* foi feita em água e a etapa de purificação, que consiste na ressuspensão do amido seguido da operação de centrifugação (lavagem), foi realizada com solução de NaOH (0,3%). Nessa etapa foi avaliado o número de lavagens do amido com a solução de NaOH para incrementar a pureza dos amidos, em termos da redução do teor de proteínas.

Na Tabela 7 pode se observar que os amidos purificados apresentaram menores valores de umidade conforme aumentava se o número de lavagens realizado. Após cinco lavagens, a umidade do amido foi de 9,64% e foi diferente estatisticamente ($p < 0,05$) para o amido purificado com apenas uma lavagem (10,74%). Da mesma forma, o teor de proteínas diminuiu com o aumento do número de lavagens com a solução de NaOH. Porém, o limite de redução no teor de proteínas foi de 0,88%, sem diferença significativa com o valor obtido a partir da segunda lavagem do amido (1,02%). O teor de cinzas do amido foi reduzido para aproximadamente 0,30% a partir da purificação do amido considerando duas lavagens com NaOH e não foram observadas diferenças significativas nesse parâmetro com o aumento do número de lavagens.

Tabela 7 - Efeito do número de lavagens com solução de hidróxido de sódio (0,3% m/v) sobre a umidade, teores de cinzas e de proteínas no amido, após a etapa de purificação.

Número de lavagens	Umidade (%)	Cinzas (%)**	Proteínas (%)**
1	10,74 ± 0,11 ^a	1,01 ± 0,16 ^a	1,24 ± 0,06 ^a
2	9,92 ± 0,33 ^{ab}	0,30 ± 0,06 ^b	1,02 ± 0,01 ^b
3	9,99 ± 0,04 ^{ab}	0,25 ± 0,01 ^b	1,01 ± 0,01 ^b
4	9,65 ± 0,30 ^b	0,14 ± 0,04 ^b	0,88 ± 0,00 ^b
5	9,64 ± 0,39 ^b	0,30 ± 0,04 ^b	0,93 ± 0,01 ^b

Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa ($p < 0,05$).

***Em base seca (g/100 g sólidos)*

Fonte: Própria autoria.

Resultados similares foram reportados por Cardoso, Samios e Silveira (2006), quando avaliaram a extração/purificação do amido de arroz utilizando soluções de NaOH (0,25%) e observaram que a partir da terceira lavagem do amido não houve diferença significativa no teor de proteínas da amostra. Os teor de proteína remanescente pode estar estruturalmente associada ao amido, portanto, remover essa fração pode danificar aos grânulos de amido (BALDWIN, 2001; LINDEBOOM et al., 2005).

Segundo Scarpati de Briceño (1979) as globulinas e albuminas compõem 41% das proteínas do grão de *cañihua*. Considerando que essas proteínas são solúveis em solução salina, foi usada uma solução de NaOH (0,3%) com 1% de NaCl para a purificação do amido. No entanto após três lavagens com essa solução, não foram observadas redução no teor de proteínas quando comparado à purificação do amido com solução de NaOH sem adição do sal como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 - Efeito da adição de cloreto de sódio (NaCl) em soluções de NaOH com diferentes números de lavagens sobre a umidade, teores de cinzas e de proteína* do amido purificado

Solução	Nº Lavagem	Umidade (%)	Cinza (%)**	Proteína (%)**
Água		10,91 ± 0,08 ^a	0,41 ± 0,01 ^b	1,58 ± 0,13 ^a
NaOH	1	8,65 ± 0,20 ^b	0,48 ± 0,01 ^c	1,16 ± 0,05 ^{ab}
NaOH	3	10,31 ± 0,23 ^a	0,27 ± 0,02 ^a	0,99 ± 0,03 ^b
NaOH-NaCl	1	9,02 ± 0,13 ^b	0,37 ± 0,02 ^b	1,23 ± 0,11 ^{ab}
NaOH-NaCl	3	7,28 ± 0,13 ^c	0,29 ± 0,00 ^a	1,28 ± 0,22 ^{ab}

*Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa ($p < 0,05$).

**Em base seca (g/100 g sólidos)

Fonte: Própria autoria.

Diante dos resultados apresentados nas Tabelas 6 - 8, a extração e purificação do amido foram feitas por maceração dos grãos de *cañihua* com água e duas lavagens do amido com solução de NaOH e finalmente duas lavagens com água para assegurar a remoção de possíveis resíduos do solvente. Esse amido foi estudado nas etapas posteriores.

5.2 Caracterização do amido de *cañihua* modificado com OSA

5.2.1 Umidade e teor de proteínas

Os amidos de *cañihua* modificados com OSA apresentaram valores menores de umidade e de teor de proteínas quando comparados ao amido nativo, como pode ser observado na Tabela 9. A umidade desses amidos variou entre 7,7 a 8,5% e foi significativamente diferente ($p < 0,05$) do amido nativo (11%). Essa diferença pode estar relacionada à incorporação das moléculas de OSA no amido, as quais favorecem o caráter hidrofóbico no grânulo.

Tabela 9 - Umidade, proteína, grau de substituição (DS) e eficiência da reação (RE) dos amidos OSA*

Tratamentos	Umidade (%)	Proteínas (%)**	DS ($\times 10^{-3}$)	RE (%)
Amido nativo (Controle)	11,0 $\pm$ 0,3 ^a	0,63 $\pm$ 0,03 ^a		
pH 7,5-8,0/20 °C (A)	8,0 $\pm$ 0,4 ^b	0,61 $\pm$ 0,01 ^a	11,2 $\pm$ 0,4 ^a	50,9 $\pm$ 1,7 ^a
pH 7,5-8,0/30 °C (B)	8,1 $\pm$ 0,1 ^b	0,52 $\pm$ 0,01 ^b	11,7 $\pm$ 0,2 ^a	53,3 $\pm$ 0,8 ^a
pH 7,5-8,0/40 °C (C)	7,8 $\pm$ 0,1 ^b	0,49 $\pm$ 0,01 ^{bc}	13,9 $\pm$ 0,3 ^b	63,3 $\pm$ 1,3 ^b
pH 8,5-9,0/20 °C (D)	8,4 $\pm$ 0,1 ^b	0,63 $\pm$ 0,01 ^a	12,9 $\pm$ 0,1 ^b	58,9 $\pm$ 0,7 ^b
pH 8,5-9,0/30 °C (E)	8,5 $\pm$ 0,1 ^b	0,53 $\pm$ 0,01 ^b	13,7 $\pm$ 0,2 ^b	62,1 $\pm$ 0,9 ^b
pH 8,5-9,0/40 °C (F)	7,7 $\pm$ 0,5 ^b	0,46 $\pm$ 0,01 ^c	18,7 $\pm$ 0,5 ^c	85,1 $\pm$ 2,2 ^c

*Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa ($p < 0,05$).

**Em base seca (g/100 g sólidos)

Fonte: Própria autoria.

De maneira geral, o teor de proteínas dos amidos modificados foi menor conforme aumentou a temperatura de reação, independente do intervalo do pH usado na reação de modificação (Tabela 9). Amidos modificados com OSA a 20 °C apresentaram valores de teor de proteínas similares ao amido nativo (0,63 $\pm$ 0,03%). No entanto, como a reação de esterificação com OSA ocorreu em meio alcalino, a solubilização das proteínas se potencializou nos ensaios de maior temperatura. Por isso, o teor de proteínas para os amidos modificados a 30 ou 40°C foi significativamente menor que para o amido nativo (Tabela 9).

5.2.2 Grau de substituição (DS) e eficiência de reação (RE)

O grau de substituição variou de $11,2 \times 10^{-3}$ a $18,7 \times 10^{-3}$ e a eficiência da reação, de 51 a 85%, para os tratamentos usados na modificação do amido de *cañihua* com OSA, conforme pode ser observado na Tabela 9. O aumento do intervalo de pH e da temperatura na reação de esterificação do amido promoveu o aumento do grau de substituição e também da eficiência da reação, sendo que sob condições mais altas de pH e de temperatura (pH 8,5-9,0/40 °C) o grau de substituição foi de $18,7 \times 10^{-3}$ e a eficiência de reação de 85%. Enquanto que menores valores de DS, tais como $11,2 \times 10^{-3}$ e $11,7 \times 10^{-3}$, foram determinados para as condições de pH 7,5 - 8,0 e temperatura de 20 ou 30 °C, respectivamente.

O pH da dispersão de amido é importante para a esterificação. Em soluções alcalinas, os íons OH^- atuam como catalisador na reação de esterificação, iniciando a formação de íons alcoolato ao longo das cadeias poliméricas do amido (SONG et al., 2006). Maiores concentrações de íons OH^- , considerando os intervalos de pH estudados, favoreceram ainda mais a formação de íons alcoolato, disponibilizando mais locais de reação para as moléculas de OSA com o amido e conseqüentemente houve um aumento do grau de substituição com o aumento do intervalo de pH da reação (Tabela 9).

No entanto, dispersões de amido em meio aquoso com pH acima de 9,5 poderiam resultar em uma reação de hidrólise, com predominância dos produtos de reação secundária (SONG et al., 2006) e conseqüentemente valores menores de grau de substituição seriam obtidos. Por outro lado, para dispersões de amido com pH menores do que 7,5, os grupos hidroxila do amido não seriam suficientemente ativados para o ataque nucléico das porções anidridas (SONG et al., 2006) e neste caso, também seriam obtidos menores valores para o grau de substituição e eficiência de reação.

O aumento do grau de substituição com o aumento da temperatura da reação, para o mesmo intervalo de pH, pode ser justificado pelo aumento da solubilidade do reagente OSA na fase aquosa, bem como o aumento da difusão do OSA nos grânulos

de amido o que contribuem para o aumento da taxa de esterificação (JEON; LOWELL; GROSS, 1999).

5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias eletrônicas de varredura dos amidos de *cañihua*: nativo e modificado como OSA (pH 8,5 - 9,0 / 40 °C) estão apresentadas na Figura 11. Por meio da análise das micrografias, foi observado que os grânulos apresentaram forma poliédrica, de tamanho pequeno, variando entre 0,8 e 1,0 μm , aproximadamente. A forma, o tamanho e a formação de aglomerados dos grânulos do amido nativo foram semelhantes aos do amido modificado com OSA (Tratamento F). A formação de aglomerados nesses amidos pode estar associada às interações das ligações de hidrogênio intergranular.

Figura 11 - Micrografias de varredura eletrônica do amido de *cañihua*: (a) nativo e (b) modificado (pH 8,5-9,0 / 40 °C). Ampliação 5000x

Fonte: Própria autoria.

Wang, Su e Wang (2010) observaram que as superfícies dos amidos nativos de batata foram lisas e sem de fraturas, enquanto que, amidos modificados com OSA apresentaram maiores sinais de corrosão na superfície do grânulo conforme aumentava o grau de substituição. Resultados similares foram reportados por Sharma et al. (2016) para o amido de milheto modificado com OSA, os quais exibiram pequenos orifícios, cavidades e fraturas na superfície do grânulo. Tratamentos prévios podem intensificar a ação do OSA sobre os grânulos de amido com pré-tratamento, como foi realizado por Huang et al. (2010) quem determinaram alteração na localização e distribuição dos grupos OSA quando usaram pré-tratamento enzimático. Porém pelas análises das micrografias dos amidos modificados de *cañihua* (exemplificada na Figura 11) não foram observadas alterações físicas na superfície do amido estiveram em concordância com as características da literatura (STEFFOLANI; LEÓN; PÉREZ, 2013)

5.2.4 Difração de raios X

Os difratogramas de raios-X dos amidos nativo e modificados mostraram que os comportamentos do padrão de cristalinidade foram semelhantes para todas as amostras (Figura 12). Essas amostras apresentaram padrão de cristalinidade do tipo A, de acordo com a classificação de Zobel (1964), apresentando picos em aproximadamente 15,6; 17,5; 18,6; 20,5 e 23,4°. Nos amidos modificados não foram observados novos picos, muito provavelmente porque os grupos OSA podem ter sido incorporados nas regiões amorfas do amido e, neste caso, essas novas ligações não alteraram a proporção das regiões cristalina (ZHENG et al., 2017). Segundo Whitney et al. (2016), os grupos OSA se ligam preferencialmente às cadeias de amilose ou possivelmente nas cadeias hidrolisadas de amilopectina resultantes das condições de esterificação.

Os valores de índice de cristalinidade dos amidos nativo e modificados variaram de 20 - 26%, sem diferença significativa entre eles. Steffolani, León e Pérez (2013) reportaram valores de índice de cristalinidade para amidos de *cañihua* extraídos com solução de NaOH (0,25%) na faixa de 34 - 36%, que diferem dos resultados obtidos

nesta tese. Essa diferença provavelmente se deve às diferentes condições do processo de purificação do amido.

Figura 12 - Difrátogramas de raios X do amido nativo (controle) e os amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = pH 7,5-8,0 e D,E,F = pH 8,5-9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C)

Fonte: Própria autoria.

5.2.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Durante a esterificação, grupos hidroxilas das moléculas de amido foram substituídos por grupos carbonilas de OSA. Os amidos nativo e modificado apresentaram perfis de espectro FTIR semelhantes (Figura 13). Nessa figura pode se observar picos amplos em aproximadamente 3440 cm^{-1} , indicando a presença de grupos hidroxilas associadas às moléculas de água. Os picos em 2931 e 1650 cm^{-1} ,

representam a vibração de alongamento C-H e a água ligada presente no amido, respectivamente (MIAO et al., 2014).

Figura 13 - Espectrogramas FTIR do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = pH 7,5-8,0 e D,E,F = pH 8,5-9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C)

Fonte: Própria autoria.

A faixa de 2000 a 700 cm^{-1} , região denominada de “impressão digital” do espectro de amido possui cinco picos característicos entre 800 e 1200 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento da ligação C-O presente (i) na interação C-O-C ($\sim 1015 \text{ cm}^{-1}$) (ii) no grupo anidroglicose ($\sim 1081 - 1160 \text{ cm}^{-1}$) e (iii) na vibração esquelética da ligação

glicosídica α -(1-4) ($\sim 930\text{ cm}^{-1}$) (WANG; SU; WANG, 2010), enquanto que o pico próximo a 860 cm^{-1} corresponde à deformação do CH e do CH_2 .

A faixa de $1750 - 1500\text{ cm}^{-1}$ foi identificada como a região que aconteceu o desenvolvimento de duas novas ligações, evidenciando-se na formação de dois picos (NO; MUN; SHIN, 2019; WANG; SU; WANG, 2010). A partir dos dados do espectro FTIR foram processados por ajuste da linha de base, normalização espectral, obtenção da segunda derivada e deconvolução do ajuste do sinal na banda 1150 cm^{-1} . A Figura 14-a ilustra um gráfico comparativo da presença do grupo octenil succinato de amidos modificados, resultando em duas bandas características ~ 1750 e $\sim 1570\text{ cm}^{-1}$ (SIMSEK et al., 2015).

Figura 14 - a) Valores da área abaixo da curva dos picos 1567 , 1645 e 1718 cm^{-1} calculados da deconvolução do espectro FTIR da região $1800 - 1500\text{ cm}^{-1}$ e b) relação entre as áreas de absorção de $R1047/1022$ e $R1000/1022\text{ cm}^{-1}$ do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = pH 7,5-8,0 e D,E,F = pH) e T (A, D = $20\text{ }^{\circ}\text{C}$; B, E = $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; C, F = $40\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Fonte: Própria autoria.

A primeira banda foi atribuída às vibrações C=O a $\sim 1718\text{ cm}^{-1}$ e às vibrações assimétricas RCOO^- a $\sim 1567\text{ cm}^{-1}$ (BASILIO-CORTÉS et al., 2019; ČÍŽOVÁ et al., 2008; JIANG et al., 2016; NO; MUN; SHIN, 2019). A faixa de $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$ é o alongamento do grupo C-O-C do amido com e sem modificação e também a vibração angular O-H da água adsorvida na região amorfa da estrutura do amido (alongamento C-O-C do amido e vibração de flexão O-H da água adsorvida nas regiões amorfas do amido) (BRIDELLI, 2017; KARWASRA; GILL; KAUR, 2017; KIZIL; IRUDAYARAJ; SEETHARAMAN, 2002). De acordo com os resultados, foi encontrado maior desenvolvimento nos grupos RCOO^- ($\sim 1567\text{ cm}^{-1}$), principalmente no tratamento F (parâmetros de reação pH 8,5 - 9,0 e $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$), o que sugere um maior grau de substituição, o que também foi observado na Tabela 9.

Por outro lado, estudos de cristalinidade do amido identificaram a região espectral entre 1100 e 900 cm^{-1} como a mais sensível a mudanças estruturais (Figura 14-b) (CASTILLO et al., 2019; FLORES-SILVA et al., 2017). Bandas em $\sim 1047\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1022\text{ cm}^{-1}$ são estiramento C-O, C-C e C-H e em $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ são estiramento C-O-H e C-O-C do anel anidroglicose. Estudos sobre a cristalinidade do amido mostraram que a banda de 1022 cm^{-1} aumentou em amostras amorfas, enquanto as bandas de 1000 e 1047 cm^{-1} se tornaram mais definidas em amostras mais cristalinas (CASTILLO et al., 2019; FLORES-SILVA et al., 2017; WARREN; GIDLEY; FLANAGAN, 2016).

A relação entre a intensidade do pico ou a área de ~ 1047 a $\sim 1022\text{ cm}^{-1}$ ($R_{1047/1022}$) foi usada para expressar o grau de mudança estrutural do amido (grau de cristalinidade) (CASTILLO et al., 2019; FLORES-SILVA et al., 2017; VAN SOEST et al., 1995). Valores maiores para a razão $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ indicam a existência de uma fase cristalina maior no amido. A partir dos resultados da razão $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ mostrados na Figura 14-b, pode-se notar que os amidos tratados com OSA, quando comparados com o amido nativo (controle), tiveram uma diminuição no grau de cristalinidade.

A razão da área da banda de 1000 a 1022 cm^{-1} também foi usada para avaliar a organização helicoidal dentro da lamela cristalina. Nesse caso, maior valor para a razão $1000/1022\text{ cm}^{-1}$ sugere uma maior organização helicoidal dentro das lamelas

cristalinas (CASTILLO et al., 2019). Todas as amostras de amido modificado apresentaram valores mais baixos de R1000/1022 quando comparadas com o amido nativo (controle) (Figura 14-b), indicando também um menor grau de cristalinidade, com menor organização helicoidal. As mudanças reportadas no ordenamento estrutural foram avaliadas no nível de vibrações moleculares.

Portanto, a modificação do amido com OSA em diferentes condições diminui o grau de cristalinidade quando comparado com o amido nativo, isso não foi observado no amido nativo ao mesmo que a organização helicoidal foi menor para os amidos OSA. Esses resultados sugerem que, além da incorporação do grupo OSA, as condições alcalinas de modificação alteraram as características estruturais,

5.2.6 Solubilidade e poder de inchamento

Os resultados de solubilidade e do poder de inchamento em função da temperatura para os amidos nativo e modificados são apresentados na Figura 15. Como esperado o aumento da temperatura promoveu um aumento da solubilidade e do poder de inchamento para todas as amostras de amido. A 50 °C, a solubilidade da amostra dos amidos nativo (controle) e modificados por OSA foi muito semelhante (~1%) (Figura 15-a). Entretanto, em temperaturas acima da temperatura de gelatinização, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores de solubilidade dos amidos nativo (controle) e modificados por OSA.

No caso do amido nativo a solubilidade aumentou de 1,1 para 12,6%, quando a temperatura aumentou de 50 para 90 °C. No mesmo intervalo de temperatura (50-90 °C), os amidos modificados apresentaram incrementos de 1,3 para 35% - 70%. Na máxima temperatura de aquecimento (90°C) a solubilidade dos amidos modificados esteve na faixa de 30% - 70%. Esse comportamento sugere que os amidos modificados com OSA apresentaram forças associativas interna frágeis para manter a estrutura do grânulo e que o aumento da temperatura ativou termodinamicamente as cadeias de amido, melhorando sua mobilidade e favoreceu a entrada das moléculas de água aumentando sua solubilidade. A desintegração estrutural ocorrida

com o aumento da temperatura provavelmente enfraqueceu a estrutura granular após a modificação facilitando a lixiviação do amido com aumento da solubilidade.

Figura 15 - (a) Solubilidade (%) e (b) poder de inchamento (g/g) dos amidos nativo e modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = $7,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$ e D,E,F = $8,5 \leq \text{pH} \leq 9,0$) e T (A, D = 20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C)

Fonte: Própria autoria

O incremento do poder de inchamento do amido nativo foi de 4,6 para 14,1 (g/g) nas temperaturas de 50 e 90 °C, respectivamente. Por outro lado, os valores máximos de poder de inchamento para os amidos modificados foram de 28 a 34 (g/g) na temperatura de 90 °C, independente das condições da reação de esterificação. O aumento da temperatura enfraquece as forças das ligações no interior do grânulo, permitindo, assim, a entrada de água nos espaços intermoleculares, o que poderia explicar o aumento do poder de inchamento dos amidos. O espaçamento entre cadeias de amido, devido ao grupo OSA, favoreceu a ingresso e retenção das moléculas de água no grânulo de amido.

De modo geral, as condições de pH e temperatura na reação de esterificação do amido de *cañihua* alteraram significativamente a solubilidade e poder de inchamento dos amidos modificados quando comparados aos amidos nativos (Figura 15). Em sistemas alcalinos, o amido foi sintetizado como octenil succinato de amido

sódio, gerando novos grupos carbonilas e grupos ésteres carboxílicos (SONG et al., 2006; WANG; SU; WANG, 2010). A incorporação de grupos octenil gerou impedimento estérico e a reorganização estrutural, resultou em repulsão intermolecular e aumento da percolação da água (SHOGREN et al., 2000). Essas novas condições favoreceram os aumentos dos valores de solubilidade e poder de inchamento (HU et al., 2016; LAWAL, 2004; SWEEDMAN et al., 2013). O poder de inchamento pode estar mais associado com as mudanças da estrutura granular e tamanho de cadeias de amilopectina, do que com o tamanho dos grânulos (BHANDARI; SINGHAL, 2002; BHOSALE; SINGHAL, 2007; LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004).

5.2.7 Propriedades térmicas

As propriedades de gelatinização dos amidos nativo e modificados são apresentadas na Tabela 10. As temperaturas associadas ao processo de gelatinização (T_o , T_{peak} , T_{out}) dos amidos modificados não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao amido nativo ($T_o = 50,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{peak} = 57,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{out} = 64,2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Steffolani, León e Pérez (2013) reportaram maiores valores de temperatura de gelatinização para o amido nativo de *cañihua* ($T_{onset} = 58-59^{\circ}\text{C}$; $T_{peak} = 66^{\circ}\text{C}$) que os encontrados nesta tese (Tabela 10). Essas diferenças poderiam ser explicadas pela intensidade dos processos prévios, extração e purificação, que foram submetidos os amidos.

Os amidos modificados apresentaram temperatura de início (T_{onset}) de gelatinização na faixa de $48,1 - 53,3^{\circ}\text{C}$, enquanto que a temperatura pico (T_{peak}) de gelatinização esteve no intervalo de $57,4 - 60^{\circ}\text{C}$, e por último a temperatura final (T_{out}) de gelatinização foram os valores compreendidos entre $62,5 - 66,0^{\circ}\text{C}$. Won et al. (2017) quando estudaram a modificação de amido de batata com OSA não observaram diferença significativa entre os valores de temperatura de gelatinização (T_o , T_p e T_{out}) dos amidos modificados quando comparado ao amido nativo de batata, comportamento similar foram observados para o amido de *cañihua* (Tabela 10). Por outro lado, Sharma et al., (2016) e Zheng et al., (2017) reportaram diminuição nos

valores da temperatura de gelatinização conforme aumentaram os valores do DS dos amidos modificados com OSA de milho e ginkgo respectivamente.

Tabela 10 - Propriedades térmicas do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = 7,5≤pH≤8,0 e D,E,F = 8,5≤pH≤9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C)

Tratamentos	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C) ^{N.S.}	T _{out} (°C) ^{N.S.}	ΔH (J/g)
Controle	50,7 ± 0,8 ^{abc}	57,4 ± 0,7	64,2 ± 1,0	3,08 ± 0,08 ^a
A	49,1 ± 0,4 ^{ab}	57,7 ± 1,4	64,4 ± 1,0	2,90 ± 0,25 ^a
B	51,0 ± 0,5 ^{bcd}	57,8 ± 1,8	64,2 ± 1,0	1,94 ± 0,02 ^b
C	53,3 ± 1,1 ^c	60,0 ± 1,6	66,0 ± 1,1	2,55 ± 0,12 ^{ab}
D	48,1 ± 1,0 ^a	57,7 ± 0,6	63,2 ± 2,2	2,08 ± 0,49 ^{bc}
E	52,1 ± 0,7 ^{bc}	58,3 ± 1,1	63,0 ± 0,9	1,77 ± 0,41 ^c
F	52,8 ± 2,6 ^c	58,5 ± 0,5	62,5 ± 1,5	0,85 ± 0,24 ^d

N.S.: Não há diferenças significativas (p<0,05).

Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa (p<0,05)

Fonte: Própria autoria.

Uma possível explicação na diminuição dos valores das temperaturas de gelatinização associada ao grau de substituição pelo grupo OSA é integridade dos grânulos de amido. Segundo Eliasson e Gudmundsson (2006), o grau de perfeição cristalina é refletido nas temperaturas de gelatinização. A temperatura de pico de gelatinização fornece uma medida da qualidade dos cristais, o que está relacionado ao comprimento das duplas hélices (SINGH; KAUR; MCCARTHY, 2007).

De maneira geral, os valores de entalpia de gelatinização para os amidos modificados variaram entre 0,85 e 2,90 J/g e foram menores quando comparados à de entalpia de gelatinização do amido nativo (3,08 J/g). O amido modificado a 40 °C/ pH 8,5-9,0 (tratamento F) apresentou o menor valor de entalpia de gelatinização (Tabela 10) e também o maior grau de substituição (Tabela 9). Os menores valores de entalpia para os amidos modificados podem estar associados ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio devido à incorporação dos grupos OSA nesses amidos (SHARMA et al., 2016), favorecendo o inchamento dos grânulos de amido a baixas temperaturas, como apresentado na Figura 15-b (BAO et al., 2003)

Resultados similares foram apresentados por Bhosale e Singhal (2007), que determinaram uma redução de entalpia de gelatinização foi de 2,17 para 1,31 (J/g) para o amido de amarantho modificado com OSA (3 g OSA/100 g de amido) e justificaram esse resultado pelo maior espaçamento e flexibilização das cadeias de amilopectina.

5.2.8 Propriedades de pasta

Exemplos de perfis de viscosidade das pastas de amidos nativo e modificados são apresentados na Figura 16. Observa-se que os amidos modificados atingiram a sua temperatura máxima em um tempo menor que o amido nativo, sugerindo pouca resistência ao empastamento. No entanto, essa pasta formada apresentou menor viscosidade do que o amido nativo. Na Figura 16 pode se observar que os valores de viscosidades (viscosidade de pico, viscosidade mínima e viscosidade final) foram menores para os amidos modificados quando comparados ao amido nativo, com exceção da viscosidade de pico para a amostra F (amido modificado no intervalo de pH 8,5-9,0 e temperatura de 40 °C).

As propriedades de pasta dos amidos são influenciadas pelo tamanho, rigidez, razão amilose e amilopectina e poder de inchamento dos grânulos (SINGH; KAUR; MCCARTHY, 2007). A viscosidade de pico mede a capacidade de absorção de água do amido em termos de resistência dos grânulos intumescido sob cisalhamento e a performance desses grânulos.

Figura 16 - Perfil de viscosidade do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = $7,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$ e D,E,F = $8,5 \leq \text{pH} \leq 9,0$) e T (A, D = 20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C)

Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 11 pode se observar que as propriedades de pasta de todos os amidos de *cañihua*-OSA foram significativamente menores do que para o amido nativo ($p < 0,05$), com exceção da amostra F (tratamento pH: 8,5-9,0 e T= 40 °C). Esse resultado pode ser explicado pela repulsão estérica dos grupos OSA, também pelo espaçamento intermolecular e pela despolimerização das cadeias de amilopectina. Para a amostra F, os parâmetros de modificação poderiam ter favorecido a formação de compostos secundários da reação de esterificação, aumentando a viscosidade de pico e provocando um efeito contrário ao observado nos outros tratamentos (HUI et al., 2009; SONG et al., 2006). Não foi possível definir um comportamento da viscosidade de pico para os amidos modificados em função do aumento do intervalo de pH da reação e/ou da temperatura de reação.

Tabela 11 - Propriedades de pasta do amido nativo (controle) e amidos modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = 7,5≤pH≤8,0; D,E,F = 8,5≤pH≤9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C)

Tratamentos	Viscosidade de pico (cP)	Viscosidade mínima (<i>Trough</i>), (cP)	<i>Breakdown</i> (cP)	Viscosidade Final (cP)	Setback (cP)
Nativo	5034 ±80 ^d	3268 ±4 ^c	1766 ±84 ^b	5609 ±9 ^e	2341 ±13 ^c
A	2756 ±175 ^a	1525 ±103 ^a	1231 ±72 ^a	2464 ±60 ^a	939 ±42 ^a
B	4251 ±301 ^{bc}	1919 ±107 ^b	2332 ±194 ^{cd}	2861 ±13 ^b	942 ±93 ^a
C	4579 ±122 ^{cd}	1950 ±148 ^b	2620 ±40 ^d	3118 ±60 ^c	1168 ±88 ^{ab}
D	3932 ±81 ^b	2058 ±28 ^b	1875 ±53 ^b	3101 ±1 ^c	1044 ±28 ^{ab}
E	3891 ±69 ^b	1859 ±29 ^b	2033 ±40 ^{bc}	2932 ±23 ^{bc}	1074 ±6 ^{ab}
F	6869 ±178 ^e	2112 ±10 ^b	4757 ±168 ^e	3323 ±94 ^d	1211 ±84 ^b

Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Própria autoria.

Os valores da viscosidade mínima (*Trough*) e da viscosidade final do amido nativo de *cañihua* também diminuiram significativamente após a modificação do amido com OSA (Tabela 11). Durante a agitação sob aquecimento, a viscosidade do amido diminuiu após alcançar um valor máximo (viscosidade de pico), pois as moléculas de amido são organizadas na direção da força aplicada, reduzindo assim a resistência ao movimento e consequentemente, a viscosidade da amostra (WANG; SU; WANG, 2010). Na modificação do amido nativo de *cañihua* com OSA pode ocorrer a despolimerização das cadeias de amilose e/ou amilopectina, o que pode favorecer a organização das cadeias poliméricas na direção do escoamento, devido ao menor

tamanho dessas macromoléculas, com pouca resistência ao movimento em tempos mais curtos e a temperaturas mais baixas (SONG et al., 2006).

A diferença entre os valores de viscosidade de pico e viscosidade mínima define a viscosidade de quebra (ou *Breakdown*), índice de estabilidade térmica do amido sob cisalhamento. A modificação do amido de *cañihua* com OSA reduziu significativamente a sua estabilidade térmica sob cisalhamento (maiores valores de *Breakdown*). Na Tabela 11 observa-se que para um determinado intervalo de pH na reação da esterificação, os valores de *Breakdown* do amido de *cañihua*-OSA aumentaram com o incremento da temperatura de modificação do amido.

No período de resfriamento das amostras, a viscosidade final do amido nativo foi maior que a viscosidade de pico. Esse comportamento foi o oposto ao observado para os amidos modificados (Figura 16, Tabela 11). Os valores de *Setback* do amido de *cañihua* nativo decresceu significativamente ($p < 0,05$) após o tratamento com OSA. O valor *Setback* é mais comumente relacionado à tendência de retrogradação da amilose lixiviada dos grânulos de amido ((HUANG et al., 2010)). A capacidade de recristalização/retrogradação das pastas de amido durante o resfriamento foi significativamente reduzida quando comparada ao amido nativo ($p < 0,05$). A incorporação dos grupos OSA na cadeia do amido dificultou o empacotamento das unidades de glicose, com menor capacidade de rearranjo molecular (BHOSALE; SINGHAL, 2007; SHARMA et al., 2016).

5.2.9 Capacidade emulsificante avaliada por tamanho e distribuição de gotas

Os amidos nativo e modificados de *cañihua* foram usados na preparação de emulsões óleo em água. Essas emulsões foram analisadas quanto à distribuição do tamanho de gotas (Figura 17) e os parâmetros determinados a partir dessas curvas foram: o índice de polidispersidade (PDI) e o diâmetro de *Brouckere* ($D_{[4,3]}$) no mesmo dia de sua preparação (inicial) e após dez dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Figura 17 - Distribuição do tamanho de gotas para as emulsões O/A preparadas com amidos nativo e modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = $7,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$; D,E,F = $8,5 \leq \text{pH} \leq 9,0$) e T (A, D = 20°C ; B, E = 30°C ; C, F = 40°C): (a)(c) emulsão inicial e (b)(d) após 10 dias de estocagem.

Fonte: Própria autoria.

Na Figura 17 observa-se que a distribuição do tamanho de gotas para as emulsões apresentou comportamento multimodal, independente do grau de substituição do amido-OSA usado como estabilizante. As curvas de distribuição de tamanho de gotas para as emulsões recém preparadas com o amido apresentaram duas populações, uma com pico em torno de $1,3 \mu\text{m}$ e o outro em $116 \mu\text{m}$ (Figura 17-a), o primeiro pico, muito provavelmente está associado aos grânulos de amido de *cañihua* não adsorvidos na interface e também às gotas muito pequenas de densidade maior que a fase contínua, e o segundo, às gotas de óleo. As gotas com tamanhos maiores que $100 \mu\text{m}$ não foram consideradas como sistema emulsificado devido a sua alta instabilidade.

Todas as emulsões preparadas com amidos modificados, independente do tratamento (ou grau de substituição), apresentaram populações de partículas/gotas com pico próximo a 1,1 μm e os valores dos picos das demais populações (Figura 17) variaram com o grau de substituição do amido OSA sem um comportamento definido. A distribuição inicial do tamanho de gotas das emulsões preparadas com amidos modificados pelos tratamentos A e D (Figura 17-a; -c) (temperatura de reação = 20 °C e diferentes intervalos de pH) apresentou comportamento trimodal, enquanto que as emulsões formuladas com os demais amidos OSA a distribuição de tamanho de gotas foi bimodal.

Após 10 dias de armazenamento, os valores de pico da população de gotas com maior frequência aumentaram de tamanho para todas as emulsões (Figura 17-b, d), sendo que esse aumento foi maior para as emulsões preparadas com amido modificado no intervalo de pH de reação de 8,5-9,0, i.e, para os amidos com maior grau de substituição (Tabela 9). Esse comportamento se deve provavelmente à maior floculação que pode ocorrer em emulsões estabilizadas com amido-OSA com maior grau de substituição, devido à presença de mais grupos carboxílicos (WANG; SU; WANG, 2010).

Nas emulsões recém preparadas, o menor valor de PDI (Tabela 12) foi obtido para a emulsão com o amido submetido ao tratamento C ($2,40 \pm 0,25$) ($\text{pH}_{\text{reação}} = 7,5-8,5$; $T_{\text{reação}} = 40\text{ °C}$), o que indicou uma menor dispersão no tamanho das gotas dessa emulsão. Já o menor valor do tamanho médio das gotas ($D_{[4,3]} \sim 33\text{ }\mu\text{m}$) foi obtida para as emulsões com o amido OSA com o maior grau de substituição (Tratamento F, $\text{pH}_{\text{reação}} = 8,5-9,0$ $T_{\text{reação}} = 40\text{ °C}$).

No entanto, após 10 dias de armazenamento a menor variação nos valores de PDI e no diâmetro de *Brouckere* ($D_{[4,3]}$) foi obtida para a emulsão preparada com amido do tratamento C. Os amidos com maiores graus de substituição resultaram em emulsões com os maiores aumentos de $D_{[4,3]}$ após 10 dias de armazenamento, sugerindo maior instabilidade desses sistemas.

Tabela 12 - Índice de polidispersidade (PDI) e tamanho de gotas das emulsões no primeiro dia (inicial) e após 10 dias de armazenamento preparadas com amidos nativo e modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = 7,5≤pH≤8,0; D,E,F = 8,5≤pH≤9,0) e T (A, D =20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C).

Tratamento Amido	PDI		D _[4,3] (μm)	
	1º dia	10º dia	1º dia	10º dia
Controle	36,50 ± 10,33 ^{aA}	3,46 ± 1,42 ^{aB}	37,07 ± 12,67 ^{abcA}	65,23 ± 8,09 ^{acB}
A	6,75 ± 0,85 ^{bA}	6,40 ± 0,95 ^{cA}	27,46 ± 2,89 ^{aA}	47,00 ± 5,19 ^{bB}
B	3,29 ± 0,24 ^{bA}	2,43 ± 0,26 ^{abB}	36,79 ± 7,45 ^{abcA}	53,75 ± 5,39 ^{abB}
C	2,40 ± 0,25 ^{bA}	2,18 ± 0,06 ^{bB}	48,72 ± 2,13 ^{cA}	59,19 ± 5,80 ^{abB}
D	3,09 ± 0,37 ^{bA}	2,38 ± 0,09 ^{abB}	44,88 ± 2,75 ^{bcA}	57,28 ± 3,94 ^{abB}
E	3,61 ± 0,82 ^{bA}	2,27 ± 0,07 ^{abB}	39,10 ± 10,54 ^{abcA}	96,49 ± 15,88 ^{cB}
F	3,04 ± 0,92 ^{bA}	2,14 ± 0,08 ^{bB}	33,40 ± 5,58 ^{abA}	86,97 ± 11,43 ^{cB}

Letras maiúsculas diferentes mostram diferença significativa no tempo (p<0,05)

Letras minúsculas diferentes mostram diferença significativa entre tratamento (p<0,05)

Fonte: Própria autoria.

Na Figura 18 observa-se as separações de fases das emulsões preparadas com os amidos modificados com OSA após 10 dias de armazenamento. Nessa figura pode ser visto que as amostras contêm uma camada superior composta por camada de óleo (controle, emulsão preparada com amido nativo de *cañihua*) ou gotas da emulsão, formando um creme (aplicando amido modificado), e uma camada inferior composta aparentemente de amido livre sedimentado. O amido nativo de *cañihua* (controle) apresentou óleo livre na superfície, o que pode estar à baixa capacidade de emulsionar gotas de óleo de soja. A sedimentação na base do tudo é muito comum em emulsão *Pickering* estabilizadas com amido OSA na forma granular, devido à

diferença das densidades entre as fases contínua e dispersa, e também à presença de amido livre (MAREFATI et al., 2017a).

Figura 18 - Aspecto das emulsões preparadas com amidos nativo (controle) e modificados com OSA em diferentes condições de pH (A,B,C = $7,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$; D,E,F = $8,5 \leq \text{pH} \leq 9,0$) e T (A, D = 20 °C; B, E = 30 °C; C, F = 40 °C) após 10 dias de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

A espessura da região emulsionada na parte superior dos tubos foi maior para a emulsão preparada com o amido submetido ao tratamento C (Figura 18), sugerindo uma maior capacidade de formar gotas emulsificadas desse amido quando comparado aos demais tratamentos de modificação. Os parâmetros usados na reação de esterificação desse tratamento foram a base para modificar os amidos de *cañihua* com diferentes teores de proteína (OSA-S1 e OSA-S2) para serem utilizados na última etapa desse trabalho.

5.3 Características do amido modificado para o desenvolvimento das emulsões óleo em água

O amido nativo de *cañihua* com duas concentrações de proteínas diferentes (amido sem ser submetido ao processo de purificação (S1) e amido com duas lavagens (S2)) (Tabela 13) foram modificados com OSA para serem utilizados na preparação das emulsões.

Tabela 13 - Umidade, teor de proteína, grau de substituição (DS) e eficiência de reação (RE%) para os amidos nativos e modificados de *cañihua*

Amido	Umidade (%)	Proteína* (%)	DS ($\times 10^{-3}$)	RE (%)
Nativo (S1)	10,1 $\pm$ 0,1	0,98 $\pm$ 0,01 ^a	- - -	- - -
Nativo (S2)	10,8 $\pm$ 0,1	0,62 $\pm$ 0,01 ^c	- - -	- - -
Modificado (OSA-S1)	9,1 $\pm$ 1,1	0,85 $\pm$ 0,01 ^b	18,19 $\pm$ 0,31	78,3 $\pm$ 1,3
Modificado (OSA-S2)	9,2 $\pm$ 0,1	0,58 $\pm$ 0,01 ^d	19,37 $\pm$ 2,04	83,5 $\pm$ 8,8

Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa ($p < 0,05$).

S1: amido obtido sem ser submetido ao processo de purificação; S2: amido purificado;

OSA-S1: amido S1 modificado com OSA; OSA-S2: amido S2 modificado com OSA.

*Em base seca (g/100 g sólidos)

Fonte: Própria autoria.

A purificação do amido, realizada por duas lavagens com solução de NaOH (0,3%) e duas lavagens com água, foi eficiente na remoção das frações proteicas do amido de *cañihua* de 0,98% para 0,62%. Após a modificação com OSA, as amostras de amido S1 e S2 foram denominadas de OSA-S1 e OSA-S2 e o teor de proteínas dessas amostras foram 0,85% e 0,58%, respectivamente (Tabela 13). O menor teor de proteínas para os amidos modificados provavelmente deve-se à solubilização das proteínas no meio alcalino da reação.

Na Tabela 13 observou-se que não foi constatada diferença significativa no grau de substituição ($\sim(18-19) \times 10^{-3}$) e na eficiência de reação ($\sim 80\%$) entre as amostras de amido com diferentes teores de proteínas. Esses resultados podem ser explicados pelo processo de esterificação ocorrer principalmente na superfície do grânulo (WANG; SU; WANG, 2010) e também nas cadeias de amilose ou nas cadeias longas de amilopectina (LOPEZ-SILVA et al., 2019; WHITNEY et al., 2016).

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias eletrônicas dos grânulos dos amidos nativos e modificados de *cañihua* com diferentes teores de proteínas são apresentadas na Figura 19. Nessa figura observa-se que as características dos dois amidos nativos (S1 e S2) foram similares quanto ao tamanho, à forma (poliédrica) e à formação de aglomerados. O tamanho pequeno dos grânulos de amido da *cañihua* potencializa sua aplicação, após a modificação com OSA, em emulsões *Pickering* (AGAMA-ACEVEDO; BELLOPEREZ, 2017; LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004).

Por outro lado, as micrografias dos amidos OSA apresentaram diferenças morfológicas (Figura 19-c; -d). Os grânulos do amido OSA-S2 perderam a forma poliédrica e aparentemente formam aglomerados mais compactos. Essas mudanças na morfologia dos amidos poderiam estar relacionadas ao maior tempo de exposição dos grânulos em solução alcalina.

Lopez-Silva et al. (2019) observaram que a modificação com OSA alterou ligeiramente a superfície dos grânulos de amido de milho com diferentes teores de amilose, provocando pequenos orifícios, cavidades ou fraturas. Whitney et al. (2016), usando microscopia eletrônica retroespalhada, observaram aumento dos grupos OSA na superfície dos grânulos de amido de arroz e tapioca conforme aumentaram os valores de DS. A incorporação dos grupos OSA na superfície é aleatória e muitas vezes acontece de maneira desigual na região amorfa (SWEEDMAN et al., 2013), e segundo o modelo do grânulo de amido proposto por Jenkins, Cameron e Donald (1993), as cadeias de amilose conformam essa região, indicando que as diferenças

na proporção amilose/amilopectina é um fator importante na incorporação do grupo OSA no grânulo de amido (MIAO et al., 2014).

Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura de amidos nativos (a, b) e modificados (c, d) de *cañihua* com diferentes teores de proteína: (a) S1 (0,98%); (b) S2 (0,62%); (c) OSA-S1 (0,85%) e (d) OSA-S2 (0,58%). Amplificação 15000x

Fonte: Própria autoria.

5.4 Características das emulsões óleo em água

Os amidos OSA-S1 e OSA-S2 foram utilizados como estabilizantes na preparação de emulsões *Pickering* (O/A) por dois processos diferentes: agitação mecânica (rotor-estator) ou sonificação (ultrassom). Nesta etapa também foram

avaliadas as concentrações de amido OSA e a proporções óleo:água (O:A) no desenvolvimento dessas emulsões.

5.4.1 Microscopia óptica das gotas de emulsão

As Figuras 20 a 23 mostram a microestrutura das emulsões preparadas com os amidos modificados (OSA-S1 ou OSA-S2) pelo processo de emulsificação com agitação mecânica (ultraturrax) ou sonificação (ultrassom). As microestruturas das emulsões obtidas com diferentes: (i) concentrações de amido (100-800 mg/mL de óleo) são visualizadas nas Figuras 20 e 21 e (ii) proporções O:A (10:90 - 60:40), nas Figuras 22 e 23. Não foi possível preparar a emulsão com 60% de óleo e 200 mg de amido-OSA/ mL de óleo pelo processo de sonificação, com os parâmetros pré-definidos na seção 4.5, o que pode ser associada à viscosidade e, conseqüentemente à dificuldade de resfriamento da amostra durante esse processo.

Aparentemente as imagens das Figuras 20 a 23 apresentam diferentes tamanhos de gotas. Para as emulsões com a mesma formulação, o processo de emulsificação por ultrassom produziu gotas de menores tamanhos quando comparado ao ultraturrax. Esse comportamento era esperado, pois a quantidade de energia por unidade de volume aplicada aos sistemas foi maior para a emulsificação com ultrassom.

Nas Figuras 20 e 22 observa-se que o tamanho das gotas das emulsões, considerando a mesma formulação e o processo de emulsificação por ultraturrax, foi diferente para as emulsões preparadas com os amidos OSA-S1 ou OSA-S2, sugerindo que o teor de proteínas no amido influencia no tamanho e no número das gotas das emulsões *Pickering*.

Figura 20 - Micrografias ópticas (x20) das emulsões preparadas com a proporção O:A (10:90) emulsificadas por ultraturrax com diferentes concentrações de amido OSA-S1 ou OSA-S2

Fonte: Própria autoria.

Figura 21 - Micrografias ópticas (x20) das emulsões preparadas com a proporção O:A (10:90) emulsificadas por ultrassom com diferentes concentrações de amido OSA-S1 2 ou OSA-S2

Fonte: Própria autoria.

Figura 22 - Micrografias ópticas (x20) das emulsões preparadas com diferentes proporções O:A (10:90; 20:80; 40:60 e 60:40) emulsificadas por ultraturrax com 200 mg de OSA-S1 ou OSA-S2 / mL óleo

Fonte: Própria autoria.

Figura 23 - Micrografias óticas (x20) das emulsões preparadas com diferentes proporções O:A (10:90; 20:80 e 40:60) emulsificadas por ultrassom com 200 mg de OSA-S1 ou OSA-S2 / mL óleo

Fonte: Própria autoria.

O tamanho das gotas das emulsões preparadas com OSA-S2 por ultraturrax foram maiores que as preparadas com OSA-S1 (Figura 20). Porém, esse comportamento foi inverso ao emulsificar com ultrassom, pois que as gotas das emulsões com OSA-S1 aparentemente tiveram maior tamanho (nas concentrações de 100 e 200 mg/mL) que as gotas das emulsões preparadas com OSA-S2 (Figura 21).

Nas emulsões preparadas com OSA-S1 (Figura 20) foram observadas grande número de gotas e aglomerados de gotas (floculação), independente do processo de emulsificação utilizado. A redução no tamanho das gotas da emulsão com o aumento da concentração de amido foi constatado por diferentes autores na literatura (MAREFATI et al., 2017a; RAYNER et al., 2012a; DOKIC et al., 2012) e possíveis justificativas para esse fenômeno estão relacionadas ao menor tempo de difusão do amido OSA para a superfície da gota, bem como à formação de uma camada mais espessa de partículas adsorvidas na superfície da gota.

Nas Figuras 22 e 23 observa se um aumento na quantidade das gotas emulsionadas com o amido OSA-S1 com o aumento da proporção O:A, independente do processo de emulsificação. No caso das emulsões preparadas pelo processo de ultraturrax (Figura 22), as gotas apresentaram tamanhos mais homogêneos para as emulsões preparadas com 40 e 60% de óleo. No entanto, esse comportamento não foi observado para o amido OSA-S2, nas mesmas condições de processo e composição, devido ao tamanho de gotas, que era maior e o número de gotas era menor quando comparado aos sistemas OSA-S1. Na Figura 23 foi observado um incremento do número de gotas para ambos estabilizantes (OSA-S1 e OSA-S2) conforme aumentava a proporção O:A (de 10:90 até 40:60).

5.4.2 Distribuição do tamanho de gota e diâmetro médio

Os resultados de distribuição do tamanho das gotas das emulsões O/A preparadas com os amidos OSA-S1 ou OSA-S2, por diferentes processos de emulsificação (ultraturrax ou ultrassom) estão apresentados nas Figuras 24 e 25. Os efeitos das: (i) concentrações do amido para emulsões com 10% de fase oleosa é observado na Figura 24 e (ii) proporções O:A (10:90; 20:80; 40:60 e 60:40) com 200 mg de amido/mL de óleo, na Figura 25.

Figura 24 - Distribuição do tamanho das gotas das emulsões preparadas com diferentes concentrações de amido OSA-S1 ou OSA-S2 usando ultraturrax ou ultrassom e uma proporção O:A (10:90)

Fonte: Própria autoria.

A distribuição do tamanho de gotas para todas as emulsões preparadas, independente da composição e das condições de processo, foi multimodal (Figuras 24 e 25), sendo que o pico observado em 1 μm poderia ser associado à presença de grânulos de amidos não adsorvidos na interface óleo-água e também à presença de gotas emulsificadas. O amido livre é uma característica importante nessas emulsões, que pode indicar a eficiência da emulsificação.

Na Figura 24 observa-se um deslocamento para a esquerda da população de gotas de maior frequência, indicando uma redução do tamanho das gotas na emulsão com o aumento da concentração de amido OSA, o que corrobora com os resultados da microscopia óptica (Figuras 20 e 21). Por outro lado, o aumento da proporção da fase dispersa (Figura 25) interferiu muito pouco no valor do pico para a população de gotas com maior frequência.

Figura 25 - Distribuição do tamanho das gotas das emulsões preparadas com diferentes proporções O:A (10:90; 20:80; 40:60 e 60:40) e 200 mg de OSA-S1 ou OSA-S2 / mL de óleo usando ultraturrax ou ultrassom

Fonte: Própria autoria.

Nas emulsões preparadas com OSA-S1 (proporção O:A - 20:80 e 40:60) ou OSA-S2 (proporção O:A - 40:60) por ultrassom, foi observada uma população de gotas com pico localizado na faixa dos 100 μm (Figura 25). Essa região corresponde à formação de gotas muito grandes e de alta instabilidade nas emulsões, pois superam o limite do tamanho de gotas (100 μm) que define uma macro emulsão (WINDHAB et al., 2005).

Os resultados das propriedades dos tamanhos das gotas para as emulsões preparadas com diferentes concentrações dos amidos OSA-S1 ou OSA-S2 e diferentes proporções O:A utilizando ultraturrax ou ultrassom são apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14 - Propriedades do tamanho de gotas das emulsões com preparadas com diferentes concentrações de amido OSA-S1 ou OSA-S2 e proporções O:A usando ultraturrax

Concentração de amido (mg/mL óleo)	PDI		D _[4,3] (µm)		d _(0,5) (µm)	
	OSA-S1	OSA-S2	OSA-S1	OSA-S2	OSA-S1	OSA-S2
100	2,21 ±0,13 ^{aA}	2,01 ±0,13 ^{aB}	47,1 ±1,7 ^{aA}	83,4 ±6,6 ^{aB}	41,2 ±2,3 ^{aA}	84,4 ±7,1 ^{aB}
200	2,23 ±0,09 ^{aA}	2,03 ±0,10 ^{aB}	38,3 ±1,6 ^{bA}	56,7 ±3,3 ^{bB}	33,2 ±0,8 ^{bA}	56,7 ±3,6 ^{bB}
400	2,86 ±0,11 ^{bA}	3,02 ±0,05 ^{bB}	23,5 ±0,9 ^{cA}	35,6 ±1,9 ^{cB}	17,7 ±0,2 ^{cA}	27,5 ±1,0 ^{cB}
800	3,53 ±0,25 ^{cA}	5,02 ±0,20 ^{cB}	16,8 ±0,4 ^{dA}	20,6 ±0,3 ^{dB}	10,8 ±0,8 ^{dA}	10,5 ±0,5 ^{dA}
Proporção O:A						
10:90	2,23 ±0,09 ^{aA}	2,03 ±0,10 ^{aB}	38,3 ±1,6 ^{abA}	56,7 ±3,3 ^{aB}	33,2 ±0,8 ^{aA}	56,7 ±3,6 ^{aB}
20:80	2,01 ±0,04 ^{aA}	1,72 ±0,06 ^{aB}	39,1 ±0,8 ^{abA}	57,1 ±3,4 ^{aB}	35,6 ±0,6 ^{abA}	60,9 ±1,9 ^{aB}
40:60	1,67 ±0,03 ^{bA}	1,78 ±0,06 ^{aB}	34,3 ±0,3 ^{aA}	56,2 ±0,6 ^{aB}	33,2 ±0,3 ^{aA}	58,7 ±0,4 ^{aB}
60:40	1,66 ±0,27 ^{bA}	1,81 ±0,28 ^{aA}	42,8 ±5,4 ^{abA}	73,2 ±22,0 ^{aB}	36,2 ±2,5 ^{bA}	71,0 ±16,2 ^{aB}

Letras maiúsculas diferentes mostram diferença significativa no tipo de estabilizante (p<0,05)

Letras minúsculas diferentes mostram diferença significativa entre tratamento (p<0,05)

Fonte: Própria autoria

Tabela 15 - Propriedades do tamanho de gotas das emulsões com preparadas com diferentes concentrações de amido OSA-S1 ou OSA-S2 e proporções O:A usando ultrassom

Concentração amido (mg/mL óleo)	PDI		D _[4,3] (µm)		d _(0,5) (µm)	
	OSA-S1	OSA-S2	OSA-S1	OSA-S2	OSA-S1	OSA-S2
100	1,40 ±0,03 ^{aA}	2,35 ±0,38 ^{aB}	24,9 ±0,5 ^{aA}	10,2 ±4,5 ^{aB}	25,7 ±0,6 ^{aA}	9,0 ±5,0 ^{aA}
200	1,73 ±0,02 ^{abA}	1,86 ±0,04 ^{bB}	16,4 ±0,7 ^{bA}	7,2 ±2,4 ^{abB}	15,7 ±0,6 ^{bA}	6,6 ±2,4 ^{abB}
400	1,90 ±0,06 ^{bA}	1,89 ±0,01 ^{bA}	8,7 ±1,4 ^{cA}	6,8 ±0,4 ^{abB}	8,2 ±1,5 ^{cA}	6,2 ±0,4 ^{abB}
800	2,53 ±0,39 ^{cA}	1,82 ±0,10 ^{bB}	10,4 ±3,3 ^{cA}	3,3 ±0,2 ^{bB}	5,7 ±0,7 ^{dA}	2,8 ±0,2 ^{bB}
Proporção O:A						
10:90	1,73 ±0,02 ^{aA}	1,86 ±0,04 ^{aB}	16,4 ±0,7 ^{aA}	7,2 ±2,4 ^{aB}	15,7 ±0,6 ^{aA}	6,6 ±2,4 ^{aB}
20:80	7,01 ±4,96 ^{bA}	1,86 ±0,09 ^{aB}	24,9 ±5,5 ^{bA}	12,8 ±1,8 ^{bB}	11,1 ±2,2 ^{bA}	10,5 ±0,4 ^{bA}
40:60	5,86 ±0,59 ^{abA}	6,04 ±2,40 ^{bA}	32,3 ±3,3 ^{cA}	27,2 ±1,6 ^{cB}	17,0 ±1,0 ^{aA}	14,2 ±2,9 ^{cA}

Letras maiúsculas diferentes mostram diferença significativa no tipo de estabilizante (p<0,05)

Letras minúsculas diferentes mostram diferença significativa entre tratamento (p<0,05)

Fonte: Própria autoria

Em relação à largura das distribuições, representada pelos valores de PDI, observou-se que nas emulsões preparadas com ultraturrax, esses valores variaram de 2,2 - 3,5 e 2 - 5 para as emulsões com amidos OSA-S1 ou OSA-S2, no intervalo de concentração de 100 - 800 mg de amido /mL de óleo (Tabela 14). Nas emulsões preparadas com ultrassom, os valores de PDI variaram entre 1,4 - 2,5 para OSA-S1 e 2,4 - 1,8 para OSA-S2 quando aumentou a concentração de amido de 100 – 800 mg/mL de óleo (Tabela 15).

De maneira geral, o índice de polidispersidade foi maior para as emulsões homogeneizadas por ultraturrax do que para as preparadas com ultrassom. O tipo e a quantidade de energia transferida na emulsificação de um sistema influenciaram na distribuição de tamanho de gotas e consequentemente nos valores de PDI e tamanho médio das gotas, sendo que quanto maior a quantidade de energia transferida ao sistema, neste caso, as emulsões preparadas com ultrassom, apresentam menores valores de PDI (SILVA et al., 2018).

Emulsões preparadas com ultraturrax e OSA-S1 ou OSA-S2 apresentaram tamanhos médios, calculados como $D_{[4,3]}$, entre 48 a 16 μm ou 83 a 21 μm , respectivamente, quando a concentração de amido aumentou de 100 para 800 mg/mL de óleo, enquanto que para o processo de emulsificação por ultrassom, os valores de tamanhos médios ($D_{[4,3]}$) foram de 25 a 6 μm para a amostra OSA-S1 e de 10 a 3 μm , para o OSA-S2. Esses resultados sugerem que o teor de proteína no amido e/ou a morfologia do amido modificado influenciaram o tamanho médio das gotas da emulsão preparadas por ultrassom.

Marefati et al. (2017a) estudaram emulsões preparadas com amido de quinoa modificado com OSA e teor de proteínas ao redor de 0,6%. Para as condições experimentais desse estudo, as emulsões apresentaram redução no tamanho de gotas de 70 para 20 μm com o aumento da concentração de amido-OSA de 100 para 800 mg/mL, respectivamente. Esse intervalo de tamanho corrobora com os resultados apresentados na Tabela 14, considerando a preparação da emulsão com o amido OSA-S2 (conteúdo de proteína de ~0,6) e por ultraturrax. Os teores de proteínas remanescente nos grânulos de amido poderiam afetar a adsorção do amido na

interface O:A, considerando que as proteínas estão localizadas na superfície do grânulos de amido (BALDWIN, 2001).

O amido com maior teor de proteína (OSA-S1) resultou no intervalo de menor tamanho médio quando foi usado o ultraturrax e um comportamento inverso foi observado para o amido OSA-S2, quando a emulsificação foi feita com ultrassom. Ressalta-se que não há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de tamanho médio ($D_{[4,3]}$ e $d_{0,5}$) para as emulsões preparadas com OSA-S2 por ultrassom. O tamanho das gotas das emulsões, principalmente para as emulsões preparadas com baixas concentrações de amido (100-200 mg/mL de óleo) com ultrassom (Tabela 15), sugere diferença na capacidade emulsificante dos amidos OSA com diferentes concentrações de proteína.

Nas Tabelas 14 e 15 também estão apresentadas as propriedades dos tamanhos das gotas para as emulsões preparadas com diferentes proporções O:A e 200 mg de amido OSA-S1 ou OSA-S2 / mL de óleo e diferentes processos de emulsificação: ultraturrax ou ultrassom. Os valores de PDI das emulsões preparadas no intervalo da proporção O:A entre 10:90 e 60:40 variaram de 2,2 a 1,7 (Tabela 14) e de 1,7 a 7,0 (Tabela 15) para emulsificação por ultraturrax ou por ultrassom, respectivamente.

De maneira geral, o diâmetro médio de *Brouckere* ($D_{[4,3]}$) não apresentou diferenças significativas entre as emulsões preparadas por ultraturrax, independente do amido usado, em função da proporção O:A (Tabela 14). Na emulsificação por ultraturrax, o $D_{[4,3]}$ variaram de 34 - 42 μm e de 56 a 73 μm para as emulsões preparadas com os amidos OSA-S1 ou OSA-S2, respectivamente.

Por outro lado, nas emulsões preparadas por ultrassom observou-se incremento dos valores de $D_{[4,3]}$ com o aumento da proporção O:A, de 16,2 a 32,3 μm e 7,2 a 27,2 μm , usando os amidos OSA-S1 ou OSA-S2 respectivamente (Tabela 15). Esse aumento do $D_{[4,3]}$ poderia ser explicado pelo aumento da viscosidade do sistema, o que dificultaria a emulsificação, dessas formulações. Finalmente, o tipo de amido influenciou significativamente para a mesma formulação e independente do processo de emulsificação.

5.4.3 Estabilidade física

A estabilidade física das emulsões se relaciona com a ausência de migração de fases, que pode ocorrer pelos dos mecanismos de cremação ou sedimentação, floculação ou coalescência (MATOS et al., 2016; SAARI et al., 2019). Os efeitos das concentrações do amido e da proporção O:A são avaliados nas Figuras 26 e 27, respectivamente. A emulsão com alta proporção O:A (60%) não foi analisada devido à sua alta viscosidade, o que limitou a sua utilização nas células do equipamento Turbiscan.

Figura 26 - Perfil Turbiscan (BS) das emulsões preparadas com 10% de óleo e diferentes concentrações de amido (C_A) OSA-S1 ou OSA-S2 usando ultraturrax ou ultrassom

Fonte: Própria autoria

Figura 27 - Perfil Turbiscan (BS) das emulsões preparadas com diferentes proporções óleo:água e 200 mg de OSA-S1 ou OSA-S2/ mL de óleo usando ultraturrax ou ultrassom

Fonte: Própria autoria

As emulsões preparadas com o amido OSA-S1 por ultraturrax (Figura 26) apresentaram altos valores de BS na região superior da célula (38 - 48 mm e de 30 - 40 mm) para as concentrações de 100 e 200 mg de amido/mL de óleo, respectivamente. A cremação observada nesses sistemas foi fortemente influenciada pela menor densidade da fase dispersa em comparação à fase contínua, provocando seu deslocamento para o topo da célula.

Matos et al. (2016) descreveram que altos valores de BS na região superior da célula poderiam ser considerados como a fração emulsionada do sistema. Ainda nessas emulsões, os valores de BS (valores altos a partir da base da célula ~10 mm) indicaram a formação de sedimentos para as maiores concentrações de OSA-S1 (400 e 800 mg/mL de óleo). Neste caso, o aumento na concentração de amido reduziu o tamanho da gota ($D_{[4,3]}$) (Tabelas 14 e 15) e incrementou a área específica, utilizando maior quantidade de amido na interface óleo-água, o que provavelmente aumentou a

densidade das gotas em comparação à fase contínua, promovendo a desestabilização da emulsão por sedimentação.

Por outro lado, as amostras preparadas com ultraturrax e amido OSA-S2 apresentaram processo de cremação, independente da concentração de amido, e também foi observado formação de sedimento o que poderia estar associado com a deposição do amido livre na base da célula (~10 mm) (Figura 26). Esses resultados sugerem que as emulsões preparadas com ultraturrax foram instáveis, independentemente do tipo e da concentração de amido.

Porém, ao utilizar o ultrassom, as amostras com amido OSA-S1 apresentaram altos valores de BS (na altura da célula de 10 a 40 mm) a partir da concentração de 200 mg/mL de óleo e sem variação desses valores durante o tempo da análise (Figura 26) e para as emulsões com amido OSA-S2, esse comportamento foi obtido para as concentrações de 400 e 800 mg de amido/mL de óleo. Aparentemente a emulsão estabilizada com 100 mg de amido OSA-S2/mL de óleo teve uma performance similar às das amostras preparadas com maior concentração de amido, porém esse resultado foi influenciado pelos grânulos de amido livre que flutuavam na zona clarificada (fase contínua) da amostra. Esse resultado pode ser justificado considerando que o amido OSA-S2 tem estrutura mais frágil (Figura 19) e acredita-se que pode ser mais facilmente quebrado em partículas menores (ou mais finas), por forças fortes durante a emulsificação, que são mantidas dispersas na fase contínua.

De maneira geral, os valores de BS foram maiores para as emulsões preparadas por ultrassom do que por ultraturrax, considerando a mesma composição. Segundo Saari et al. (2019) o aumento dos valores de BS, depende do tamanho da partícula e da sua fração em volume. O processo de emulsificação com ultrassom forneceu emulsões com gotas de menor tamanho (Tabela 15), quando comparadas ao processo com ultraturrax (Tabela 14), o que corrobora com os resultados da Figura 26.

Na Figura 27 pode se observar que nas emulsões preparadas com menor proporção O:A (10:90) e por ultraturrax ocorreu separação de fases (sedimentação, ~10 mm e cremação, 30-40 mm) durante o tempo da análise, independente do amido

modificado usado. Já as emulsões preparadas com maiores proporções O:A (20:80 e 40:60) mostraram se mais estáveis no período da análise (altos valores de BS, na região da célula de 10 a 40 mm), indicando que o aumento da viscosidade das emulsões, pelo aumento da proporção O:A, reduziu a mobilidade das gotas. Os valores mais altos de BS e com perfis de BS similares, sem variações, foram obtidos para a emulsão preparada com 40% de óleo usando ultrassom e amido OSA-S2.

Dos resultados obtidos no *Turbiscan* foi possível obter os valores de Índice de Estabilidade Turbiscan (TSI) e calcular os valores de índice de emulsificação (EI%), que estão apresentados na Tabela 16. O valor de TSI é a medida que incorpora todos os tipos de mudanças numa dispersão, associados à desestabilização das emulsões, que afetam o perfil BS (SAARI et al., 2019).

Na Tabela 16 observa-se uma tendência de redução nos valores de TSI com o aumento da concentração do amido. Nas emulsões com 800 mg de amido/mL de óleo, os valores de TSI foram de aproximadamente 3 e 1, independente do amido usado como estabilizante, para os processos de emulsificação por ultraturrax e ultrassom, respectivamente. Saari et al. (2019) reportaram que altos valores de TSI representam emulsões com maior instabilidade. Nesse sentido, pode se inferir que os valores menores de TSI relacionam-se à redução do tamanho das gotas, que foram observadas nas emulsões preparadas com concentrações mais altas de amido, principalmente quando o processo de ultrassom foi utilizado, e consequentemente resultaram em uma maior estabilidade física.

Por outro lado, os valores de índice de emulsificação (EI) mostraram diferenças significativas conforme aumentou a concentração de amido (Tabela 16). Os valores mais altos de EI(%), que representaram alta capacidade emulsificante, foram obtidos com as maiores concentrações de amido. O EI foi de aproximadamente 80% para as emulsões preparadas com 10% de óleo usando ultrassom. Já para o processo de emulsificação com ultraturrax os valores de EI permaneceram na faixa de 39% e 12% para as emulsões estabilizadas com o amido OSA-S1 ou OSA-S2, respectivamente. As emulsões com menores valores de EI(%) foram as preparadas com OSA-S2 usando o processo de ultraturrax, sugerindo que as proteínas adsorvidas no amido também contribuíram para a estabilização das emulsões.

Na avaliação do efeito da proporção O:A, os valores de TSI não mostraram diferenças significativas para as emulsões preparadas, com exceção das amostras com amido OSA-S1 usando o ultraturrax (Tabela 16). Não foi possível estabelecer uma tendência para os valores de TSI com a proporção O:A. A alta variação reportada nos resultados de TSI apresentados na avaliação desse efeito pode ser explicada pelo aumento da viscosidade das emulsões.

Tabela 16 - Valores de TSI e EI% das emulsões preparadas com diferentes concentrações de amido (OSA-S1 ou OSA-S2) e de óleo usando ultraturrax ou ultrassom

Concentração Amido (mg/mL óleo)	ULTRATURRAX				ULTRASSOM			
	TSI		EI(%)		TSI		EI(%)	
	OSA-S1	OSA-S2	OSA-S1	OSA-S2	OSA-S1	OSA-S2	OSA-S1	OSA-S2
100	4,70 ± 0,35 ^{bA}	4,09 ± 1,12 ^{aA}	21,9 ± 1,2 ^{aA}	12,90 ± 2,3 ^{abB}	11,35 ± 2,19 ^{aA}	1,93 ± 0,64 ^{aB}	42,6 ± 5,4 ^{aA}	11,2 ± 1,9 ^{aB}
200	5,98 ± 0,47 ^{bA}	3,10 ± 0,59 ^{aB}	39,5 ± 2,3 ^{bA}	12,70 ± 2,1 ^{aB}	2,56 ± 1,20 ^{bA}	8,24 ± 3,13 ^{bB}	82,0 ± 3,0 ^{bA}	82,0 ± 1,7 ^{bA}
400	5,89 ± 0,42 ^{bA}	3,44 ± 0,89 ^{aB}	65,8 ± 3,3 ^{cA}	15,00 ± 1,3 ^{abB}	1,85 ± 0,96 ^{bA}	1,92 ± 0,74 ^{aA}	90,4 ± 1,6 ^{cA}	98,0 ± 0,6 ^{cB}
800	2,93 ± 0,52 ^{aA}	2,98 ± 0,56 ^{aA}	93,8 ± 1,6 ^{dA}	19,95 ± 0,9 ^{cB}	0,96 ± 0,06 ^{bA}	1,13 ± 0,74 ^{aA}	99,0 ± 0,1 ^{dA}	99,0 ± 0,6 ^{cA}
Proporção óleo:água								
10:90	5,98 ± 0,47 ^{aA}	3,10 ± 0,59 ^{aB}	39,5 ± 2,3 ^{aA}	12,7 ± 2,1 ^{aB}	2,56 ± 1,20 ^{aA}	8,24 ± 3,13 ^{bB}	82,0 ± 2,9 ^{aA}	82,0 ± 1,7 ^{aA}
20:80	5,15 ± 0,68 ^{aA}	4,43 ± 0,96 ^{aA}	74,9 ± 3,2 ^{bA}	32,3 ± 2,1 ^{bB}	2,20 ± 0,53 ^{aA}	2,77 ± 0,04 ^{aA}	96,7 ± 1,6 ^{bA}	86,7 ± 2,6 ^{abB}
40:60	0,48 ± 0,13 ^{bA}	3,47 ± 0,85 ^{aB}	99,3 ± 0,4 ^{cA}	81,3 ± 1,1 ^{cB}	1,11 ± 0,33 ^{aA}	3,77 ± 0,18 ^{aB}	93,7 ± 1,9 ^{bA}	93,5 ± 2,4 ^{bA}

Letras maiúsculas diferentes mostram diferença significativa no tipo de estabilizante ($p < 0,05$)

Letras minúsculas diferentes mostram diferença significativa entre tratamento ($p < 0,05$)

Fonte: Própria autoria

As células analisadas no *Turbiscan*, contendo as emulsões, foram armazenadas a temperatura ambiente por 7 dias. Os fenômenos de instabilidade física foram avaliados visualmente (Figura 28), encontrando similaridade entre as características das emulsões do primeiro dia e após 7 dias de armazenamento. Apesar da creameação ou sedimentação formada no primeiro dia, as emulsões mantiveram suas características durante o período de armazenamento, sendo as emulsões mais estáveis as preparadas com maiores proporções óleo:água. É importante ressaltar que não foi observado óleo livre na superfície da célula, evidenciando estabilidade da fração emulsificada.

O aumento na proporção O:A para as emulsões estabilizadas com amido modificado apresentou um maior tempo para a cremeação. Esses resultados estão de acordo com o postulado teórico que o aumento na proporção O:A aumenta a estabilidade à cremeação pelo aumento da densidade de empacotamento das gotas de óleo (DOKIĆ; KRSTONOŠIĆ; NIKOLIĆ, 2012). O aumento da estabilidade da emulsão com o aumento da proporção O:A foi observado por Dokic; Krstonosic, Nikolic (2012), na estabilização de emulsões com amido OSA preparada com 60% de fase dispersa. Resultados previamente publicados por Sun e Gunasekaran (2009) também corroboram com os resultados obtidos nessa tese.

Figura 28 - Emulsões preparadas com amido OSA-S1 ou OSA-S2 usando UT ou US, como processo de emulsificação, após 7 dias de armazenamento. (1,2,3 e 4 = emulsão preparada com proporção O:A (10:90) e 100 (1), 200 (2), 400 (3) ou 800 (4) mg de amido/ mL de óleo), (5 e 6 = emulsão preparada com 200 mg de amido/ mL de óleo e proporção O:A (20:80)-(5) e (40:60)-(6))

Fonte: Própria autoria

6. CONCLUSÕES

Os resultados de extração com diferentes solventes mostraram que a solução de NaOH promoveu a obtenção de amidos com baixos teores de proteínas. O número de lavagens do amido (ressuspensão/centrifugação) na etapa de purificação foi avaliado para obter o menor teor de proteínas no amido nativo de *cañihua*, que foi obtido a partir de duas lavagens do amido em solução de NaOH.

Na modificação do amido de *cañihua* com OSA, os efeitos da temperatura e do intervalo de pH usados na reação durante o processo de esterificação foram avaliados. Os maiores valores para o grau de substituição nos amidos modificados foram obtidos com o incremento da temperatura no intervalo do pH de 8,5 – 9,0. As mudanças na estrutura do amido alteraram as suas propriedades físico-químicas, entre as quais destacam-se a redução das propriedades de pasta, incremento da solubilidade e do poder de inchamento e desenvolvimento da capacidade emulsificante. A esterificação do amido de *cañihua* com OSA promoveu a diminuição das viscosidades de *Trough* e final do amido de *cañihua*, diminuiu a estabilidade térmica sob cisalhamento (valores maiores de *Breakdown*) e diminuiu a tendência à retrogradação (menores valores de *Setback*). A maior capacidade emulsificante foi obtida para o amido modificado no intervalo de pH de 7,5-8,0 a 40°C.

A estabilização de emulsões O/A por amido OSA de *cañihua* com diferentes teores de proteínas foi avaliado, utilizando dois processos diferentes de emulsificação: rotor-estator (ultraturrax) e sonificação (ultrassom). Foi observado que o aumento da concentração de amido reduziu o tamanho de gotas da emulsão, independente do teor de proteína presente no amido, enquanto que o aumento do teor de óleo reduziu o índice de polidispersidade das gotas da emulsão. Formulações emulsificadas com ultraturrax foram mais estáveis quando o amido usado foi o de maior teor proteico (OSA-S1). Por outro lado, as formulações emulsionadas por ultrassom e com amido com menor teor proteico (OSA-S2) apresentou menores tamanhos de gotas, favorecendo a estabilidade física do sistema.

A integridade da estrutura dos grânulos de amido interfere na capacidade emulsificante do amido. Os amidos OSA com diferentes teores de proteínas podem formar emulsões, porém, as características das gotas formadas dependem da composição da emulsão e também do processo de emulsificação. Em sistemas de alta viscosidade o uso do ultrassom como método de emulsificação é limitado.

Diferentes teores de proteínas do amido modificado de *cañihua* OSA e de processos de emulsificação são capazes de influenciar os resultados de tamanho de gota e estabilidade de emulsões. Os valores de TSI, do índice de emulsificação e tamanho de gotas tiveram forte relação quando avaliada a estabilidade física. A utilização de amidos com menor quantidade de proteína e do processo de emulsificação por ultrassom, sem excesso de partículas, permitiram obter emulsões mais estáveis e homogêneas.

7. SUGESTÕES DE PESQUISA

Para uma maior compreensão da produção de emulsões estabilizadas com amido é necessário conhecer os efeitos do processo de modificação do amido com soluções alcalinas nos aspectos relacionados à redução de tamanho de cadeias, alterações nas ramificações de amilopectina e da capacidade de giro (raio de giro). Essas informações podem contribuir no entendimento das características estruturais associadas à estabilização das emulsões.

Outro tema importante é o estudo das interações amido - proteínas durante o processo de emulsificação. A literatura considera muito pouco o efeito das proteínas remanescentes ou estruturais nas amostras de amido. Estudar as interações entre essas macromoléculas e se existe algum sinergismo entre ambas na estabilização dos sistemas emulsionados.

Determinar as alterações físicas na superfície dos grânulos de amido devido ao efeito das ondas de ultrassom durante o processo de emulsificação. Diversas intensidades de emulsificação e diferentes formulações poderiam explicar melhor o efeito do ultrassom sobre a estrutura do grânulo de amido e sobre a estabilidade física da emulsão.

REFERÊNCIAS

- AGAMA-ACEVEDO, E.; BELLO-PEREZ, L. A. Starch as an emulsions stability : the case of octenyl succinic anhydride (OSA) starch. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 78–83, 2017.
- APAZA-MAMANI, V. **Manejo y mejoramiento de Kañiwa**. Primera ed. Puno - Perú: Editorial Altiplano E.I.R.L., 2010.
- ASHOGBON, A. O.; AKINTAYO, E. T. Recent trend in the physical and chemical modification of starches from different botanical sources: A review. **Starch/Stärke**, v. 66, n. 1–2, p. 41–57, 2014.
- BAI, Y.; SHI, Y. C. Structure and preparation of octenyl succinic esters of granular starch, microporous starch and soluble maltodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 520–527, 2011.
- BALDWIN, P. M. Starch Granule-Associated Proteins and Polypeptides: A Review. **Starch - Stärke**, v. 53, n. 10, p. 475, out. 2001.
- BAO, J. et al. Physical properties of octenyl succinic anhydride modified rice, wheat, and potato starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2283–2287, 2003.
- BASILIO-CORTÉS, U. A. et al. Effect of dual modification on the spectroscopic, calorimetric, viscosimetric and morphological characteristics of corn starch. **Polymers**, v. 11, n. 2, 2019.
- BELLO-PÉREZ, L. A. et al. Effect of the degree of substitution of octenyl succinic anhydride-banana starch on emulsion stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 17–24, 2015.
- BEMILLER, J. N. Starch Modification : Challenges and Prospects. **Starch/Stärke**, v. 49, n. 4, p. 127–131, 1997.
- BEMILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. **Starch: Chemistry and Technology**. Third ed.

New York: Academic Press, 2009.

BERGO, P.; MORAES, I. C. F.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer concentration and type on moisture content in gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 412–415, ago. 2013.

BERSKI, W. et al. Pasting and rheological properties of oat starch and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 665–671, 2011.

BHANDARI, P. N.; SINGHAL, R. S. Effect of succinylation on the corn and amaranth starch pastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 3, p. 233–240, 2002.

BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Effect of octenylsuccinylation on physicochemical and functional properties of waxy maize and amaranth starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 447–456, 2007.

BIDUSKI, B. et al. Impact of acid and oxidative modifications, single or dual, of sorghum starch on biodegradable films. **Food Chemistry**, v. 214, p. 53–60, 2017.

BINDAR, Y.; EFAN, A.; RAHMI. Sodium hydroxide (NaOH) concentration and steeping time duration effects on starch production from dry-milled low quality rice IR 64 grade 3 flour using alkaline-protease enzyme digestion method. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 3, p. 1353–1358, 2013.

BIZMARK, N.; IOANNIDIS, M. A. Nanoparticle-stabilised emulsions: Droplet armouring: Vs. droplet bridging. **Soft Matter**, v. 14, n. 31, p. 6404–6408, 2018.

BON, S. A. F. The Phenomenon of Pickering Stabilization: A Basic Introduction. In: **Particle-Stabilized Emulsions and Colloids: Formation and Applications**. [s.l.] RSC Publishing, 2014. v. 13p. 298–302.

BRASIL, Leis, decretos, etc. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1987. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 21 de out. 1987, p. 20. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.

BRIDELLI, M. G. Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Study of Hydrated

- Biological Macromolecules. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2017.
- CANSELIER, J. P. et al. Ultrasound emulsification - An overview. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 23, n. 1–3, p. 333–349, 2002.
- CARDOSO, M. B.; SAMIOS, D.; SILVEIRA, N. P. Study of Protein Detection and Ultrastructure of Brazilian Rice Starch during Alkaline Extraction. **Starch - Stärke**, v. 58, n. 7, p. 345–352, jul. 2006.
- CASTANHA, N.; MATTA JUNIOR, M. D. DA; AUGUSTO, P. E. D. Potato starch modification using the ozone technology. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 343–356, 2017.
- CASTILLO, L. A. et al. Crystalline morphology of thermoplastic starch/talc nanocomposites induced by thermal processing. **Heliyon**, v. 5, n. 6, 2019.
- CHANDRAPALA, J. et al. Ultrasonics Sonochemistry Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 975–983, 2012.
- CHEN, M. et al. Preparation and characterization of octenyl succinic anhydride modified waxy rice starch by dry media milling. **Starch/Staerke**, v. 66, n. 11–12, p. 985–991, 2014.
- CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M. A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 23–34, 2013.
- ČÍŽOVÁ, A. et al. Carboxymethyl starch octenylsuccinate: Microwave- and ultrasound-assisted synthesis and properties. **Starch/Staerke**, v. 60, n. 8, p. 389–397, 2008.
- COSTA, A. L. R. et al. Emulsifier functionality and process engineering: Progress and challenges. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 69–80, 2017.
- DICKINSON, E. Food emulsions and foams: Stabilization by particles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 40–49, abr. 2010.
- DICKINSON, E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and

- stabilization of food emulsions. **Trends in Food Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 4–12, 2012.
- DOKIĆ, L.; KRSTONOŠIĆ, V.; NIKOLIĆ, I. Physicochemical characteristics and stability of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 185–192, 2012.
- DUFFUS, L. J. et al. A comparative study on the capacity of a range of food-grade particles to form stable O/W and W/O Pickering emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 473, p. 9–21, 2016.
- ELIASSON, A.-C.; GUDMUNDSSON, M. Starch: Physicochemical and Functional Aspects. In: ELIASSON, A.-C. (Ed.). **Carbohydrates in Food**. 2nd. ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2006. p. 521.
- FLORES-SILVA, P. C. et al. In vitro digestibility of ultrasound-treated corn starch. **Starch/Staerke**, v. 69, n. 9–10, p. 1–9, 2017.
- FRENCH, D. J. et al. The secret life of Pickering emulsions: particle exchange revealed using two colours of particle. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–9, 2016.
- FUENTES, C. et al. Physicochemical and structural properties of starch from five Andean crops grown in Bolivia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 829–838, 2019.
- GUTIERREZ BELEÑO, L. M. **Nanopartículas de Sílica Híbridas para Estabilização de Dispersões Bifásicas**. [s.l.] Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2017.
- HAN, J. A.; BEMILLER, J. N. Preparation and physical characteristics of slowly digesting modified food starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 3, p. 366–374, 2007.
- HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n. 3, p. 253–267, 2001.

- HU, H. et al. Structure and functional properties of octenyl succinic anhydride modified starch prepared by a non-conventional technology. **Starch/Stärke**, v. 68, n. 1–2, p. 151–159, 2016.
- HUANG, Q. et al. The effect of enzymatic pretreatments on subsequent octenyl succinic anhydride modifications of cornstarch. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 1, p. 60–65, 2010.
- HUI, R. et al. Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 81–86, 2009.
- JENKINS, P. J.; CAMERON, R. E.; DONALD, A. M. A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. **Starch - Stärke**, v. 45, n. 12, p. 417–420, 1993.
- JEON, Y.-S.; LOWELL, A. V.; GROSS, R. A. Studies of Starch Esterification: Reactions with Alkenylsuccinates in Aqueous Slurry Systems. **Starch - Stärke**, v. 51, n. 2–3, p. 90–93, 1999.
- JIANG, S. et al. Preparation and characterization of octenyl succinic anhydride modified taro starch nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–11, 2016.
- KARWASRA, B. L.; GILL, B. S.; KAUR, M. Rheological and structural properties of starches from different Indian wheat cultivars and their relationships. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 1, p. S1093–S1106, 2017.
- KAUR, B. et al. Progress in starch modification in the last decade. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 2, p. 398–404, 2012.
- KENTISH, S. et al. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 170–175, 2008.
- KIM, H. et al. **Preparation and characterization of amorphous granular potato starches (AGPS) and cross-linked amorphous granular potato starches (CLAGPS)**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017.
- KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J.; SEETHARAMAN, K. Characterization of irradiated

- starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3912–3918, 2002.
- KRÓLIKOWSKA, K. et al. Effect of modification of octenyl succinate starch with mineral elements on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 118–127, 2017.
- LAM, S.; VELIKOV, K. P.; VELEV, O. D. Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 490–500, 2014.
- LAWAL, O. S. Succinyl and acetyl starch derivatives of a hybrid maize: Physicochemical characteristics and retrogradation properties monitored by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 16, p. 2673–2682, 2004.
- LI, C. et al. Pickering emulsions stabilized by native starch granules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 431, p. 142–149, 2013.
- LI, G.; WANG, S.; ZHU, F. Physicochemical properties of quinoa starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 328–338, 2016.
- LI, Z. et al. Emulsification properties of enzymatically treated octenyl-succinic anhydride starch. **Starch/Stärke**, v. 66, n. 11–12, p. 1089–1095, 2014.
- LINDEBOOM, N. et al. Granule-bound starch synthase I (GBSSI) in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its relationship to amylose content. **Cereal Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 246–250, 2005.
- LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R. T. Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. **Starch - Stärke**, v. 56, n. 34, p. 89–99, 2004.
- LOPEZ-SILVA, M. et al. Effect of amylose content in morphological, functional and emulsification properties of OSA modified corn starch. **Food Hydrocolloids**, v. 97, n. February, 2019.

- LUCIANO, C. G. et al. Evaluation of extraction method on the structure and physicochemical properties of starch from seeds of two jackfruit varieties. **Starch - Stärke**, v. 69, n. 11–12, 2017.
- MAREFATI, A. et al. Fabrication of encapsulated oil powders from starch granule stabilized W/O/W Pickering emulsions by freeze-drying. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 261–271, 2015.
- MAREFATI, A. et al. Pickering emulsifiers based on hydrophobically modified small granular starches – Part I: Manufacturing and physico-chemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 473–483, 2017a.
- MAREFATI, A. et al. Storage and digestion stability of encapsulated curcumin in emulsions based on starch granule Pickering stabilization. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 309–320, 2017b.
- MARKU, D. et al. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 428, n. 1–2, p. 1–7, 2012.
- MASINA, N. et al. A review of the chemical modification techniques of starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1226–1236, 2017.
- MATOS, M. et al. Comparative Emulsifying Properties of Octenyl Succinic Anhydride (OSA) -Modified Starch : Granular Form vs Dissolved State. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–16, 2016.
- MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques**. Second ed. [s.l.] CRC Press, 2004.
- MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.
- MIAO, M. et al. Structure and physicochemical properties of octenyl succinic esters of sugary maize soluble starch and waxy maize starch. **Food Chemistry**, v. 151, p. 154–160, 2014.

- NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the Relationship Between Water-saturated State and Crystallinity by the Diffraction Method for Moistened Potato Starch. **Starch - Stärke**, v. 35, n. 12, p. 407–410, 1983.
- NO, J.; MUN, S.; SHIN, M. Properties and digestibility of octenyl succinic anhydride-modified Japonica-type waxy and non-waxy rice starches. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 6–9, 2019.
- NORTON, I. T.; SPYROPOULOS, F.; COX, P. W. Effect of emulsifiers and fat crystals on shear induced droplet break-up, coalescence and phase inversion. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1521–1526, 2009.
- PERSIN, Z. et al. Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: The EPNOE views for the next decade in the areas of materials, food and health care. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 22–32, 2011.
- PICHOT, R. et al. Particle-Stabilized Food Emulsions. In: **Particle-Stabilized Emulsions and Colloids: Formation and Applications**. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2015. p. 247–282.
- PICKERING, S. U. CXCVI.-Emulsions. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 91, n. 0, p. 2001–2021, 1907.
- PIETRZYK, S. et al. Influence of amylose content and oxidation level of potato starch on acetylation, granule structure and radicals' formation. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.
- PREGO, I.; MALDONADO, S.; OTEGUI, M. Seed Structure and Localization of Reserves in *Chenopodium quinoa*. **Annals of Botany**, v. 82, p. 481–488, 1998.
- PUMACAHUA RAMOS, A. **Extração e caracterização de amido de quinoa, cañihua e *Mirabilis jalapa***. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2014.
- RAMÍREZ-LÓPEZ, S. **Amido e farinha de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*): extração, caracterização e desenvolvimento de filmes biodegradáveis**. [s.l.] Universidade São Paulo, 2016.

- RAMSDEN, W. Separation of Solids in the Surface-Layers of Solutions and "Suspensions" (Observations on Surface-Membranes, Bubbles, Emulsions, and Mechanical Coagulation). -- Preliminary Account. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 72, n. 1, p. 156–164, 1903.
- RAYNER, M. et al. Quinoa starch granules as stabilizing particles for production of Pickering emulsions. **Faraday Discussions**, v. 158, p. 139, 2012a.
- RAYNER, M. et al. Quinoa starch granules: A candidate for stabilising food-grade Pickering emulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 9, p. 1841–1847, 2012b.
- RAYNER, M. et al. Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 458, n. 1, p. 48–62, 2014.
- REPO-CARRASCO, R. et al. Chemical and functional characterization of Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) grain, extrudate and bran. **Plant foods for human nutrition**, v. 64, n. 2, p. 94–101, jun. 2009.
- REPO-CARRASCO, R. et al. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*).pdf. **Food Chemistry**, v. 120, p. 128–133, 2010.
- REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S.-E. Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*).pdf. **Food Reviews International**, v. 19, n. 1–2, p. 179–189, 2003.
- SAARI, H. et al. A comparison of emulsion stability for different OSA-modified waxy maize emulsifiers: Granules, dissolved starch, and non-solvent precipitates. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, 2019.
- SCARPATI DE BRICEÑO, Z. **Isolation and characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) and canihua (*Chenopodium pallidicaule*) starch.**

Lima - Perú: [s.n.].

- SCHOENLECHNER, R.; SIEBENHANDL, S.; BERGHO, E. Pseudocereals. In: ARENT, E. K.; FABIO., D. V. (Eds.). . **Gluten-free cereal products and beverages**. [s.l: s.n.]. p. 149–191.
- SHAH, A. et al. Physicochemical, rheological and structural characterization of acetylated oat starches. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 19–26, 2017.
- SHARMA, M. et al. Impact of octenyl succinylation on rheological , pasting , thermal and physicochemical properties of pearl millet (*Pennisetum typhoides*) starch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 52–59, 2016.
- SHOGREN, R. L. et al. Distribution of Octenyl Succinate Groups in Octenyl Succinic Anhydride Modified. p. 196–204, 2000.
- SILVA, E. K. et al. Coupling of high-intensity ultrasound and mechanical stirring for producing food emulsions at low-energy densities. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 47, n. April, p. 114–121, 2018.
- SIMSEK, S. et al. Chemical composition, digestibility and emulsification properties of octenyl succinic esters of various starches. v. 75, p. 41–49, 2015.
- SINGH, J.; KAUR, L.; MCCARTHY, O. J. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A review. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 1, p. 1–22, 2007.
- SINGH, M.; ADEDEJI, A. A. Characterization of hydrothermal and acid modified proso millet starch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 21–26, 2017.
- SONG, X. et al. Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified early indica rice starch. **Starch/Stärke**, v. 58, n. 2, p. 109–117, 2006.
- SONG, X. et al. Effects of amylose content on the paste properties and emulsification of octenyl succinic starch esters. **Starch/Stärke**, v. 65, n. 1–2, p. 112–122,

2013.

SONG, X. et al. Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 256–263, 2015.

STEENEKEN, P. A. M.; WOORTMAN, A. J. J. Superheated starch: A novel approach towards spreadable particle gels. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 394–405, 2009.

STEFFOLANI, M. E.; LEÓN, A. E.; PÉREZ, G. T. Study of the physicochemical and functional characterization of quinoa and kañiwa starches. **Starch/Stärke**, v. 65, n. 11–12, p. 976–983, 2013.

SUJKA, M. Ultrasonic modification of starch – Impact on granules porosity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 424–429, 2017.

SUN, C.; GUNASEKARAN, S. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized whey protein isolate with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 165–174, 31 jan. 2009.

SWEEDMAN, M. C. et al. Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 905–920, 2013.

TANAKA, K. et al. Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1633–1639, 1980.

TIMGREN, A. et al. Starch particles for food based Pickering emulsions. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 95–103, 2011.

TIMGREN, A. et al. Emulsion stabilizing capacity of intact starch granules modified by heat treatment or octenyl succinic anhydride. **Food science & nutrition**, v. 1, n. 2, p. 157–71, 2013.

USDA. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**.

- USHIKUBO, F. Y.; CUNHA, R. L. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 145–153, 2014.
- VALENZUELA, C. et al. Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 4, p. 843–849, 3 abr. 2013.
- VAN SOEST, J. J. G. et al. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 279, p. 201–214, 1995.
- VILLA, D. Y. G. et al. Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium pallidicaule* (cañihua) and *Chenopodium quinoa* (quinoa) seeds. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 26, n. 7, p. 609–615, 21 abr. 2014.
- WANG, J.; SU, L.; WANG, S. Physicochemical properties of octenyl succinic anhydride-modified potato starch with different degrees of substitution. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 3, p. 424–429, 2010.
- WANG, X. et al. Preparation and characterisation of octenyl succinate starch as a delivery carrier for bioactive food components. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1218–1225, 2011.
- WARREN, F. J.; GIDLEY, M. J.; FLANAGAN, B. M. Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure - A joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study. **Carbohydrate Polymers**, v. 139, p. 35–42, 2016.
- WHITNEY, K. et al. Analysis of octenylsuccinate rice and tapioca starches : Distribution of octenylsuccinic anhydride groups in starch granules. **Food Chemistry**, v. 211, p. 608–615, 2016.
- WINDHAB, E. J. et al. Emulsion processing - From single-drop deformation to design of complex processes and products. **Chemical Engineering Science**, v. 60, n. 8- 9 SPEC. ISS., p. 2101–2113, 2005.
- WON, C. et al. Rheological, pasting, thermal and retrogradation properties of octenyl

- succinic anhydride modified potato starch. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 321–327, 2017.
- WU, J.; MA, G. H. Recent Studies of Pickering Emulsions: Particles Make the Difference. **Small**, n. 34, p. 4633–4648, 2016.
- XIAO, J.; LI, Y.; HUANG, Q. Recent advances on food-grade particles stabilized Pickering emulsions: fabrication, characterization and research trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 55, p. 48–60, 2016.
- YANG, Y. et al. An overview of Pickering emulsions: Solid-particle materials, classification, morphology, and applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. MAY, p. 1–20, 2017.
- YE, F. et al. Elucidation of stabilizing oil-in-water Pickering emulsion with different modified maize starch-based nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 229, p. 152–158, 2017.
- YU, S. et al. Physicochemical Properties of Starch and Flour from Different Rice Cultivars. **Food & Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 626–637, fev. 2012.
- ZHANG, B. et al. Preparation and characterization of non-crystalline granular starch and corresponding carboxymethyl starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 656–662, 2017.
- ZHANG, S.; ZHOU, Y.; YANG, C. Pickering emulsions stabilized by the complex of polystyrene particles and chitosan. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 338–344, 2015.
- ZHAO, Y. et al. Formulation and characterization of O/W emulsions stabilized using octenyl succinic anhydride modified kudzu starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, n. August, p. 91–98, 2017.
- ZHENG, Y. et al. Physicochemical and structural characteristics of the octenyl succinic ester of ginkgo starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 566–570, 2017.

ZHU, F. Plasma modification of starch. **Food Chemistry**, v. 232, p. 1–7, 2017.