UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LÍA ETHEL VELÁSQUEZ CASTILLO

**Nanocristais de amido de quinoa: produção, caracterização e
aplicação em filmes de amido**

Pirassununga

2018

LÍA ETHEL VELÁSQUEZ CASTILLO

**Nanocristais de amido de quinoa: produção, caracterização e
aplicação em filmes de amido**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Desenvolvimento, caracterização e aplicação de materiais voltados à agroindústria.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes

Pirassununga

2018

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

V434n Velásquez-Castillo, Lía Ethel
Nanocristais de amido de quinoa: produção,
caracterização e aplicação em filmes de amido / Lía
Ethel Velásquez-Castillo ; orientadora Izabel
Cristina Freitas Moraes. -- Pirassununga, 2018.
105 f.

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

1. Chenopodium quinoa Willd. 2. Cristalinidade.
3. Casting. 4. Hidrólise ácida. 5. Nanocompósitos. I.
Freitas Moraes, Izabel Cristina, orient. II. Título.

Dedico à minha família, em especial aos meus pais María e Marcos, por todo o apoio e compreensão.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por guiar meus passos.

Aos meus pais Maria e Marco, e minha irmã Lourdes, por terem me apoiado incondicionalmente durante o mestrado longe de casa.

A Profa. Dra. Izabel Cristina Freitas Moraes por ter me dado a oportunidade de estudar na Universidade de São Paulo e pela orientação, paciência e confiança para a realização desta dissertação.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões que contribuíram com a melhora desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral pela disponibilização do Laboratório de Tecnologia de Alimentos.

Aos professores Dra. Cynthia Ditchfield e Dr. Gelson Andrade da Conceição pelas sugestões que contribuíram com o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores Dra. Alessandra Lopes de Oliveira, Dra. Carmen Fávaro Trindade, Dra. Eliria Agnolon Pallone, Dra. Giovanna Tommaso, Dr. Francisco Palma Rennó e Dra. Samantha Cristina de Pinho pela disponibilidade dos equipamentos para realização das análises.

Aos técnicos Carla Mônaco, Fabio Gallo, Keila Kazue, Nilson Ferreira, Marcelo Thomazini e Tatiana Cardoso pelo auxílio no laboratório, e principalmente agradeço a Camila Velludo, Nathalia Trevisan, Ana Mônica e Rodrigo Lourenço pela colaboração em diferentes análises e no uso de equipamentos.

Ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/DEMa/UFSCar) pelas análises de microscopia de eletrônica de varredura.

A Victor Aredo pela ajuda incondicional durante o mestrado.

Aos meus amigos que fiz em Pirassununga durante o mestrado Alexander, Angel, Ashley, Carlos, Diana, Dulce Maria, Gilda, Gerardo, Heber, Hubert, Maria, Marco, José, Jeannine, Laura, Luis, Lizbet, Mariana, Rafael, Roger, Santiago, Samira e Sandra pelo apoio e sua companhia.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Polímeros Naturais e Biomateriais: Carla, Débora, Gisele, Jaiber, Karina, Monique, Nathalia e Santiago pelo companheirismo e colaboração com esta pesquisa.

A Mariani Leite pelo trabalho árduo nesta pesquisa durante seu período de estágio.

Ao Programa Nacional de Becas y Credito Educativo (PRONABEC) do Ministério de Educação do Peru pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao projeto CAPES-PVE Processo N° 88881.062173/2014-01/Capes pelo suporte financeiro para a realização dessa pesquisa.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. ”

Marie Curie

RESUMO

VELASQUEZ-CASTILLO, L. E. **Nanocristais de amido de quinoa: produção, caracterização e aplicação em filmes de amido**. 2018. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Nos últimos anos, pesquisas sobre a produção de nanocristais de amido (NCA) receberam interesse crescente devido a suas diversas aplicações, principalmente como material de reforço de matrizes poliméricas. Nesse contexto, o amido de quinoa (AQ) apresenta características desejáveis na produção de NCA tais como tamanho de grânulo pequeno e conteúdo de amilose relativamente baixo. Assim, o objetivo desta pesquisa foi produzir NCA de quinoa (NCAQ) por hidrólise ácida em diferentes temperaturas (30, 35 e 40) °C. Além disso, foi estudado o efeito da adição dos NCAQ nas propriedades estruturais e físicas de filmes de amido de mandioca. O AQ apresentou diferentes percentagens de hidrólise, no quinto dia, 63%, 73% e 91% para (30, 35 e 40) °C, respectivamente. O AQ ($k = 0,59 \text{ dias}^{-1}$) foi hidrolisado mais rápido que o amido de milho ceroso ($k = 0,39 \text{ dias}^{-1}$) a 40 °C. O rendimento dos NCAQ diminuiu com o incremento da temperatura de 30 a 40 °C; enquanto que a cristalinidade relativa dos NCAQ não foi alterada (~35%). A morfologia dos NCAQ produzidos a 30 °C foi irregular com tamanho micrométrico, enquanto que os produzidos a 35 e 40 °C apresentaram forma de paralelepípedo com tamanhos entre (50 e 100) nm e (400 e 900) nm (agregados). O diâmetro hidrodinâmico e as propriedades térmicas dos NCAQ diminuíram com o aumento da temperatura da hidrólise; enquanto que a intensidade das bandas FTIR e o potencial zeta aumentaram. As propriedades indicaram que NCAQ foram produzidos somente a (35 e 40) °C com rendimentos de 22,7% e 6,8%, respectivamente. Dessa forma, considerando o rendimento e a temperatura de transição, os NCAQ produzidos a 35 °C foram selecionados para aplicação em filmes de amido de mandioca. Os filmes foram preparados pela técnica do *casting*, com 4 g de amido de mandioca/100 g de dispersão filmogênica; 25 g glicerol/ 100 g de amido; e 0; 2,5; 5,0 e 7,5 g de NCAQ/ 100 g de amido. Os difratogramas de raios X confirmaram a presença dos NCAQ nos filmes. A adição de NCAQ nos filmes aumentou a rugosidade e o ângulo de contato em concentrações de 5% e 7,5%, a resistência à tração e o módulo elástico, os

parâmetros de cor L^* e a^* em concentrações 7,5%, e a opacidade; enquanto que diminuiu a deformação na ruptura, a permeabilidade ao vapor de água na concentração de 5%, e o brilho. Outras propriedades dos filmes como espessura, umidade, solubilidade, propriedades térmicas não foram alteradas pela adição de NCAQ. Os resultados indicaram que os NCAQ produzidos a 35 °C podem ser usados como reforço em filmes nanocompósitos para melhorar suas propriedades mecânicas.

Palavras-chave: *Chenopodium quinoa* Willd. Cristalinidade. *Casting*. Hidrólise ácida. Nanocompósitos.

ABSTRACT

VELASQUEZ-CASTILLO, L. E. Quinoa starch nanocrystals: production, characterization and application in starch films. 2018. 105 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Recently researches on starch nanocrystals (SNC) production have become of interest due to their many applications, especially as reinforcement in polymeric matrices. Quinoa starch (QS) has desirable characteristics for SNC production such as small granule size and relatively low amylose content. Thus, the objective of this research was to produce quinoa SNC (QSNC) by acid hydrolysis at different temperatures (30, 35 and 40) °C. Furthermore, the effect of QSNC addition on the structural and physical properties of cassava starch films was studied. QS presented different percentages of hydrolysis on the fifth day, 63%, 73% and 91% for (30, 35 and 40) °C, respectively. QS (0.59 days^{-1}) was hydrolyzed more rapidly than waxy maize starch (0.39 days^{-1}) at 40 °C. QSNC yields decreased with temperature increase from (30 to 40) °C, while the relative crystallinity was not altered (~35%). The morphology of QSNC produced at 30 °C was irregular with micrometric size while those produced at 35 °C and 40 °C presented parallelepiped shapes with sizes between 50 nm and 100 nm and 400 nm to 900 nm (aggregates). The hydrodynamic diameter and the thermal properties of QSNC decreased with temperature increase, while the FTIR band intensities and the zeta potential increased. The properties indicated that quinoa QSNC were only obtained at (35 and 40) °C with yields of 22.8% and 6.8%, respectively. QSNC produced at 40 °C presented lower yield and crystallinity than waxy maize SNC, but a lower hydrodynamic diameter. Thus, based on the yield and transition temperature, QSNC produced at 35 °C was selected for application in cassava starch films. The films were prepared by casting technique, with 4 g of cassava starch / 100 g of film forming dispersion; 25 g glycerol / 100 g starch; and 0; 2.5; 5.0 and 7.5 g of QSNC / 100 g of starch. X-ray diffractograms confirmed the presence of QSNC in the films. Addition of QSNC to films increased the roughness and the contact angle at 5.0% and 7.5% concentrations, the tensile strength and elastic modulus, the color parameters L^* and a^* at 7.5% concentration, and the opacity; while decreasing deformation at break, water vapor permeability at 5.0% concentration, and gloss. Other film properties such

as thickness, moisture content, solubility, thermal properties were not affected by QSNC addition. The results indicated that the QSNC produced at 35 ° C can be used as reinforcement in nanocomposite films to improve their mechanical properties.

Key words: *Chenopodium quinoa* Willd. Crystallinity. Casting. Acid hydrolysis. Nanocomposites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da a) amilose e da b) amilopectina	19
Figura 2 - Grânulo de amido: estrutura e níveis de organização molecular interna amilose e amilopectina	20
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura lamelar do grânulo de amido	21
Figura 4 - Representação esquemática das cadeias da amilopectina	21
Figura 5 - Representação esquemática de uma seção de amilopectina indicando os padrões ramificados das cadeias A,B1-B3	22
Figura 6 - Estrutura cristalina do amido tipo A e tipo B	23
Figura 7 - Grãos de quinoa	25
Figura 8 - Seção longitudinal do grão de quinoa: (PE) pericarpo, (EP) Episperma, (C) cotilédones, (EN) endosperma, (R) radícula e (P) perisperma	26
Figura 9 - Mecanismo de la hidrólise ácida do amido	29
Figura 10 - Primeira observação dos nanocristais de amido ceroso por microscopia eletrônica de transmissão: a) vista longitudinal, b) vista planar e c) representação dos fragmentos lamelares da vista longitudinal e planar	30
Figura 11 - Representação esquemática do preparo de filmes pela técnica do Casting	34
Figura 12 - Fluxograma de extração do amido de quinoa, a) primeira etapa e b) segunda etapa	38
Figura 13 - Aspecto visual das dispersões dos NCA de quinoa produzidos a a) 30 °C, b) 35 °C e c) 40 °C e dos NCA de milho ceroso produzidos a d) 40 °C	43
Figura 14 - Micrografias do amidos a) de quinoa e b) de milho ceroso com aumentos de 3000x, e c) de mandioca com aumento de 2000x	52
Figura 15 - Distribuição de tamanho de partícula dos amidos de quinoa (AQ) e de milho ceroso (AMC)	53
Figura 16 –Percentagens de hidrólise ácida do amido de quinoa (AQ) a (30, 35 e 40) °C e do amido de milho ceroso (AMC) a 40 °C em função do tempo. Pontos: valores experimentais; linha contínua modelo de cinética de primeira ordem.	54
Figura 17 - Padrões de difração de raios X: a) do amido de quinoa (AQ) e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos (30, 35 e 40) °C, e b) do amido de milho ceroso (AMC) e dos nanocristais de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C	57
Figura 18 - Micrografias eletrônicas de varredura dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a a) 30 °C, b) 35 °C e c) 40 °C, e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC) produzidos a d) 40 °C	60

Figura 19 - Micrografias de força atômica e perfis de linha de altura dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a a) 30 °C, b) 35 °C e c) 40 °C, e dos nanocristais de milho ceroso (NCAMC) produzidos a d) 40 °C	62
Figura 20 - Distribuição de tamanho de partícula por intensidade dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC) produzidos a 40 °C.	63
Figura 21 - Curvas de fluxo de calor: a) do amido de quinoa (AQ) e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C e b) do amido de milho ceroso (AMC) e dos nanocristais de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C	65
Figura 22 - Curvas termogravimétricas: a) do amido de quinoa (AQ) e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C, e b) do amido de milho ceroso (AMC) e dos nanocristais de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C	68
Figura 23 - Espectros FTIR: a) do amido de quinoa (AQ) e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos a 30, 35 e 40 °C, e b) do amido de milho ceroso (AMC) e dos nanocristais de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C	70
Figura 24 – Imagens representativas dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações: a) 0%, b) 2,5%, c) 5,0% e d) 7,5%.	73
Figura 25 - Padrões de difração de raios X dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações.....	76
Figura 26 - Micrografias de força atômica dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em concentrações: a,b) 0%; c,d) 2,5%; e,f) 5,0% e g,h) 7,5%	78
Figura 27 - Curvas tensão-deformação dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações.....	80
Figura 28 –Curvas de fluxo de calor dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações.....	83
Figura 29 - Curvas termogravimétricas: a) TGA e b) DTG dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações. ...	86
Figura 30 - Curva padrão de amilose.....	104
Figura 31 - Curva padrão de glicose	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química e teor de amilose dos amidos de quinoa, de milho ceroso e de mandioca	51
Tabela 2 – Constante da cinética (k) e o coeficiente de determinação (R^2) da hidrólise ácida do amido de quinoa (AQ) a 30, 35 e 40 °C e do amido de milho ceroso (AMC) a 40 °C	55
Tabela 3 - Rendimento dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC) produzidos a 40 °C	56
Tabela 4 - Cristalinidade relativa dos amidos de quinoa (AQ) e de milho ceroso (AMC), e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos (30, 35 e 40) °C e de milho ceroso (NCAMC) produzidos a 40 °C	59
Tabela 5 - Diâmetro médio e índice de polidispersividade (IPD) dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos (30, 35 e 40) °C e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC) produzidos a 40 °C	64
Tabela 6 - Propriedades térmicas do amido de quinoa (AQ), amido de milho ceroso (AMC), e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C e de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C	66
Tabela 7 - Potencial zeta dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a 30, 35 e 40 °C e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC), a 40 °C.....	72
Tabela 8 - Espessura, umidade e solubilidade em água dos filmes de amido de mandioca reforçados com diferentes concentrações de nanocristais de amido de quinoa (C_{NCAQ}).....	74
Tabela 9 - Rugosidade média (R_a) e raiz quadrática da rugosidade média (R_q) dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})	77
Tabela 10 – Ângulo de contato dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ}).....	79
Tabela 11 - Propriedades mecânicas dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})	81
Tabela 12 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ}).....	82
Tabela 13 – Propriedades térmicas dos filmes de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ}).....	84
Tabela 14 - Parâmetros de cor e opacidade dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})	88
Tabela 15 – Brilho dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. Amido.....	18
3.1.1. Composição.....	18
3.1.2. Estrutura.....	19
3.1.3. Cristalinidade.....	22
3.1.4. Gelatinização e Retrogradação do amido	23
3.1.5. Fontes de amido	24
3.1.5.1 Amido de quinoa	25
3.1.5.2 Amido de milho ceroso.....	26
3.1.5.3 Amido de mandioca	27
3.2. Nanocristais de amido.....	27
3.2.1. Produção de nanocristais de amido por hidrólise ácida	28
3.2.2. Produção de nanocristais de amido por métodos combinados.....	31
3.3. Filmes de amido.....	33
3.3.1. Propriedades dos filmes de amido.....	35
3.3.2. Aplicações dos nanocristais de amido em filmes	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. Materiais.....	37
4.2. Metodologia	37
4.2.1. Extração do amido de Quinoa	37
4.2.2. Caracterização dos amidos.....	39
4.2.2.1 Composição química e teor de amilose	39
4.2.2.2 Morfologia.....	40
4.2.2.3 Distribuição de tamanho de partícula	40
4.2.3. Hidrólise ácida dos amidos	40
4.2.4. Caracterização dos nanocristais de amido.....	41
4.2.4.1 Cristalinidade relativa	42
4.2.4.2 Morfologia.....	42
4.2.4.3 Distribuição de tamanho	42
4.2.4.4 Propriedades térmicas	43
4.2.4.5 Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .	44

4.2.4.6	Potencial Zeta.....	44
4.2.5.	Seleção dos nanocristais de amido de quinoa adicionados nos filmes	44
4.2.6.	Produção dos filmes de amido reforçados com nanocristais de amido de quinoa	45
4.2.7.	Caracterização dos filmes	46
4.2.7.1	Espessura, umidade e solubilidade em água	46
4.2.7.2	Análise de difração de raios X	46
4.2.7.3	Microestrutura.....	47
4.2.7.4	Ângulo de contato	47
4.2.7.5	Propriedades mecânicas	47
4.2.7.6	Permeabilidade ao vapor de água	48
4.2.7.7	Propriedades térmicas	48
4.2.7.8	Cor e opacidade	49
4.2.7.9	Brilho	49
4.2.8.	Análise estatística.....	49
5.	RESULTADOS.....	50
5.1.	Caracterização dos amidos.....	50
5.1.1.	Composição centesimal e teor de amilose.....	50
5.1.2.	Morfologia	52
5.1.3.	Distribuição de tamanho de partículas	53
5.2.	Hidrólise ácida dos amidos	54
5.3.	Caracterização dos nanocristais de amido.....	57
5.3.1.	Cristalinidade relativa.....	57
5.3.2.	Morfologia	59
5.3.3.	Distribuição de tamanho.....	63
5.3.4.	Propriedades Térmicas.....	65
5.3.5.	Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	69
5.3.6.	Potencial zeta.....	71
5.4.	Seleção dos nanocristais de amido de quinoa para aplicação em filmes	72
5.5.	Caracterização dos filmes de amido reforçados com nanocristais de amido	73
5.5.1.	Aspecto visual, espessura, umidade e solubilidade em água	73
5.5.2.	Padrões de difração de raios X	75
5.5.3.	Morfologia	76
5.5.4.	Ângulo de contato.....	79
5.5.5.	Propriedades mecânicas	80
5.5.6.	Permeabilidade ao vapor de água	82
5.5.7.	Propriedades Térmicas.....	83

5.5.8. Cor e Opacidade.....	87
5.5.9. Brilho.....	89
6. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE	102

1. INTRODUÇÃO

O amido é um polímero de glicose, biossintetizado por muitas plantas na forma de grânulos semicristalinos (BERTONILI et al., 2009). Os grânulos de amido consistem em anéis de crescimento (100 a 400 nm em espessura) dispostos em blocos esféricos (20 a 500 nm de diâmetro) que, por sua vez, contêm lamelas cristalinas e amorfas alternadas (9 a 10 nm de espessura) conformadas por cadeias de amilopectina e amilose (LE CORRE; BRAS; DUFRESNE, 2010; KIM et al. 2015). Atualmente, esta estrutura semicristalina pode ser isolada para produzir nanomateriais, como nanocristais de amido.

Os nanocristais de amido (NCA) são um tipo de nanomaterial com propriedades cristalinas que resultam da ruptura da estrutura semicristalina de grânulos de amido pela hidrólise das partes amorfas com ácido em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização (LE CORRE; ANGELLIER-COUSSY, 2014; LIN et al., 2011a). Atualmente, os NCA apresentam uma ampla gama de aplicações na área de materiais e alimentos (HAO et al, 2018), tais como material de reforço de filmes nanocompósitos a base de amido (GARCÍA, N. et al., 2009; GONZÁLEZ et al., 2015; LI et al., 2015; MUKURUMBIRA; MELLEM; AMONSOU, 2017), proteínas (CONDÉS et al., 2015), carboximetil quitosana (DUAN et al., 2011), e borracha natural (ANGELLIER et al., 2005); *filler* em matrizes carreadoras de fármacos (BAKRUDEEN et al., 2016; LIN et al., 2011b); agente estabilizador de emulsões (HAAJ et al., 2014; LI; SUN; YANG, 2012; YANG et al., 2018); e como agente absorvente (ALILA et al., 2011; DESAI et al., 2017).

Na produção de NCA, diferentes metodologias foram avaliadas com o objetivo de melhorar o método de produção com ácido sulfúrico (3,16 M por 5 dias a 40 °C), proposto por Angellier et al. (2004), tais como a combinação da hidrólise enzimática com a hidrólise ácida (LE CORRE et al., 2012), a sonicação com a hidrólise ácida (KIM et al., 2013a; KIM et al., 2013b; AMINI et al., 2016); obtendo em alguns casos melhorias na redução do tempo e rendimento, mas sem mudanças notáveis na cristalinidade relativa. Recentemente, novas melhorias foram reportadas na produção de NCA visando seu escalonamento; Dai et al. (2018) utilizaram moinho de bola seguido de hidrólise ácida e reduziram o tempo de produção de NCA de milho ceroso de 5 para 3 dias com um rendimento de 19,3% e uma cristalinidade relativa de 47%. HAO et al. (2018) estudaram o pré-tratamento do amido de batata com glucoamilases

seguido da hidrólise ácida e conseguiram produzir NCA com elevada cristalinidade relativa (50,8%). Entretanto, a hidrólise ácida ainda é o método mais utilizado na produção de NCA.

O rendimento e as propriedades dos NCA são influenciados pelas características da fonte de amido e pelas condições da hidrólise ácida (tipo de ácido, concentração do ácido, agitação, temperatura e tempo) (LIN et al., 2011a). Assim, o tipo de padrão cristalino do amido foi associado à morfologia dos NCA; sendo que os produzidos com amido tipo A resultaram em formas quadradas, e os produzidos com amidos Tipo B resultam em formas arredondadas (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011). Os amidos com elevado conteúdo de amilose resultaram em NCA de maior tamanho, o que foi relacionado a um menor grau de hidrólise desses amidos sugerindo que a amilose bloqueia as vias de hidrólise (KIM et al., 2012; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011).

Atualmente, a principal fonte de amido empregada na produção de NCA é o amido de milho ceroso (HAO et al., 2018; DAI et al., 2018), devido ao seu elevado conteúdo de amilopectina (KIM, PARK; LIM, 2015). No entanto, outras fontes de amido como o milho normal, o *amilomaize*, a batata, e o trigo (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011; KIM et al., 2012), a tapioca, o grão de bico, o feijão-mungo, e a cevada (XU et al., 2014), o taro (MUKURUMBIRA et al., 2017) e, o amaranto (DE LA CONCHA et al., 2018) foram estudadas com o objetivo de obter melhores rendimentos e propriedades. Nesse contexto, o amido de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) apresenta características desejáveis na produção de NCA, tais como tamanho de grânulo pequeno de 0,5 a 3 μm , conteúdo de amilose relativamente baixo que varia de 7 a 26% (LI; WANG, ZHU, 2016; LINDEBOOM et al., 2005) e ainda foi muito pouco estudado para a obtenção de NCA. Por sua vez, quando comparado ao amido de milho ceroso, o amido de quinoa possui amilopectina com elevada quantidade de cadeias curtas de 8 a 12 unidades (INOUCHI et al. 1999), baixa densidade de empacotamento de moléculas (0,9) (PRAKNIZ et al. 1999) e baixa temperatura de início de gelatinização ($\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) (LI; WANG, ZHU, 2016), características que devem ser consideradas nas condições de produção de NCA de quinoa por hidrólise ácida. Dessa forma, esta pesquisa visou contribuir no estudo de uma nova fonte de amido na produção de NCA e no estudo da sua aplicação como agente de reforço em filmes de amido de mandioca.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação foi produzir nanocristais de amido de quinoa por hidrólise ácida em diferentes temperaturas e estudar o efeito da sua adição nas propriedades estruturais e físicas de filmes de amido de mandioca.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Extrair o amido de quinoa a partir do grão de quinoa.
- Realizar a hidrólise ácida do amido de quinoa a (30, 35 e 40) °C.
- Estudar as propriedades estruturais e físicas dos nanocristais de amido de quinoa quando comparadas às dos nanocristais de amido de milho ceroso produzidos a 40 °C.
- Produzir filmes de amido de mandioca com diferentes concentrações de nanocristais de amido de quinoa.
- Avaliar as propriedades estruturais e físicas dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Amido

O amido, polímero de glicose, é um dos polissacarídeos mais abundantes sintetizados pelas plantas (IMAM et al., 2012). Este biopolímero pode ser encontrado em vários de seus tecidos e órgãos como brotos, caules, folhas, frutos, sementes e raízes (PREISS, 2004).

O amido é depositado em partículas, chamadas grânulos, cujos tamanhos (~1 a 100 μm em diâmetro), formas (esférica, ovoide, lenticular, poligonal), distribuições de tamanho (unimodal ou bimodal), associação como grânulos individuais (simples) ou aglomerados (composta), composição (α -glucano, lipídios, proteínas, minerais e umidade), e estrutura supramolecular dependem da sua fonte botânica (BERTOLINI, 2009; TESTER; KARKALAS; XIN, 2004).

3.1.1. Composição

Os grânulos de amido são compostos principalmente por dois tipos de polissacarídeos, a amilose e a amilopectina (Figura 1), os quais representam aproximadamente de 98 a 99% da massa seca (TESTER; KARKALAS; XIN, 2004). A amilose (Figura 1a) é o componente linear, relativamente longo, unido por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) e ligeiramente ramificado por ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) (<0,5%). A amilose possui uma massa molar aproximada de 10^5 a 10^6 g/mol, com grau de polimerização de 324 a 4920 com 9 a 20 pontos de ramificação equivalentes a 3 a 11 cadeias por molécula (COPELAND et al., 2009; TESTER; KARKALAS; XIN, 2004). A amilopectina (Figura 1b) é o componente altamente ramificado do amido, unida principalmente por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) (em torno de 95%) e ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) (em torno de 5%) nos pontos de ramificação (BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS; XIN, 2004). A amilopectina possui uma massa molar entre 10^7 a 10^9 g/mol, um grau de polimerização tipicamente compreendido no intervalo de 9.600 a 15.900 (TESTER; KARKALAS; XIN, 2004). Dependendo da fonte botânica, o conteúdo de amilose varia entre 18 a 28%, enquanto a amilopectina varia de 72 a 82%. No entanto, alguns tipos de amidos modificados possuem um elevado conteúdo de amilopectina (99% para o amido de milho ceroso) ou um elevado teor de amilose (70% para o *amilomaize*) (BULÉON et al., 1998).

Figura 1 - Estrutura da a) amilose e da b) amilopectina

Fonte: VAZQUEZ, A. et al. Starch/clay Nano-biocomposites. In: AVÉROUS, L.; POLLET, E. **Environmental Silicate Nano-Biocomposites**. London: Springer, 2012 cap.11, p. 287-321.

Os componentes restantes do grânulo de amido são agrupados em três tipos: material particulado, composto principalmente por fragmentos da parede celular; componentes de superfície, os quais podem ser removidos no processo de extração; e componentes internos (BULÉON et al., 1998). Entre os principais componentes de superfície estão as proteínas, enzimas, aminoácidos, lipídios e minerais (cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio). Já, os componentes internos do grânulo são principalmente lipídios; os quais desempenham um papel determinante nas propriedades do amido, pois podem formar complexos com a amilose (COPELAND et al., 2009; TESTER; KARKALAS; XIN, 2004).

3.1.2. Estrutura

A estrutura do grânulo de amido é complexa e depende fortemente da origem botânica (BULÉON et al., 1998). Basicamente, os grânulos de amido consistem em anéis de crescimento semicristalinos e amorfo, que crescem a partir de um núcleo chamado *hilum* (Figura 2) (COPELAND et al., 2009). Esquemáticamente, os anéis de crescimento semicristalinos possuem uma espessura que varia no intervalo de 120 a 400 nm, e estão formados por lamelas cristalinas e amorfas, que em conjunto possuem uma espessura de 9 a 10 nm (BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS; XIN, 2004). As lamelas cristalinas possuem uma espessura de 5 a 7 nm e consistem em *clusters* ordenados de cadeias laterais de amilopectina de dupla hélice, que estão alternadas por lamelas amorfas de (3 a 4) nm de espessura que consistem em regiões de ramificação da amilopectina (Figura 3) (PÉREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009). Por

sua vez, estas lamelas estão organizadas em blocos esféricos, cujos diâmetros podem variar de (20 a 500) nm dependendo da fonte botânica e de sua localização no grânulo (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997).

Figura 2 - Grânulo de amido: estrutura e níveis de organização molecular interna amilose e amilopectina

Fonte: Adaptado de GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 32, n. 3, p. 177-191, 1997.

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura lamelar do grânulo de amido

Fonte: TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; XIN, Q. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, London, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.

Estruturalmente, a amilopectina é formada por cadeias A, B e C (Figura 4). As cadeias A são cadeias externas unidas por ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) às cadeias B. As cadeias B por sua vez estão unidas a outras cadeias tipo B ou à cadeia principal da molécula da amilopectina (cadeia C) (BULÉON et al., 1998; TESTER; KARKALAS; XIN, 2004). As cadeias B podem ser classificadas como B1- B4 (Figura 5) de acordo com a quantidade de *clusters* de cadeias laterais nas quais elas participam; a cadeia B1 participa de um *cluster*, as cadeias B2 e B3 de dois e três *clusters* respectivamente, e as cadeias B4 que unem quatro ou mais *clusters* (PÉREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009). As cadeias A e B são as mais externas e formam as duplas hélices dentro dos grânulos nativos, enquanto que a cadeia C é única por molécula de amilopectina, faz ligações com as outras cadeias na forma de ramificações, e contém o único resíduo terminal redutor (BULÉON et al., 1998).

Figura 4 - Representação esquemática das cadeias da amilopectina

Fonte: SAJILATA, M. G; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant starch—a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2006.

Figura 5 - Representação esquemática de uma seção de amilopectina indicando os padrões ramificados das cadeias A,B1-B3

Fonte: TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; XIN, Q. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, London, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.

Segundo Tester, Karkalas e Xin (2004) e LeCorre e Angellier-Coussy (2014), a localização exata da amilose no interior do grânulo ainda não é completamente definida, sendo encontrada nas regiões amorfas, em feixes entre *clusters* de amilopectina ou intercaladas entre *clusters* de amilopectina, tanto nas regiões amorfas como cristalinas. O modelo mais aceito para a sua localização no interior do grânulo consiste em que a amilose forma cadeias individuais, radialmente orientadas e distribuídas aleatoriamente nas cadeias de amilopectina (PÉREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009).

3.1.3. Cristalinidade

A estrutura semicristalina do grânulo de amido proporciona padrões específicos, que podem ser observados por difração de raios X. Estes padrões permitem determinar a cristalinidade relativa do grânulo baseada na área das regiões amorfa e cristalina, que pode variar de (15 a 45)% para os grânulos de amido nativo (ZOBEL,1988). Dependendo de seus padrões de difração de raios X, os amidos são classificados em três tipos: A, B e C. Os amidos tipo A cristalizam em uma célula unitária monocíclica e apresentam empacotamento das duplas hélices relativamente compacto com baixo conteúdo de água (quatro moléculas de água por unidade de célula), o tipo B está formado por uma célula unitária hexagonal e apresenta empacotamento das duplas hélices mais aberto contendo um núcleo helicoidal

hidratado contendo 36 moléculas de água por unidade de célula (Figura 6), e o tipo C é uma mistura de células unitárias do tipo A e B (PÉREZ; BALDWIN; GALLANT, 2009; TESTER; KARKALAS; XIN, 2004). O padrão tipo A é característico de amidos de cereais; o tipo B, de amidos de tubérculos, raízes e cereais ricos em amilose; e o tipo C é característico de amido de leguminosas, raízes e frutas (BULÉON et al, 1998).

Figura 6 - Estrutura cristalina do amido tipo A e tipo B

Fonte: PÉREZ, S.; BALDWIN, P.M.; GALLANT, D. J. Structural Features of Starch Granules I. In: BEMILLER, J. N; WHISTLER, R. **Starch: Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, 2009. cap. 5, p. 149-192.

Outra estrutura cristalográfica distinta que também tem sido identificada é a do tipo V. Esta forma cristalina resulta da formação de complexos entre amilose e compostos como o iodo, dimetilsulfóxido, álcoois ou ácidos graxos e aparece após a gelatinização do amido, sendo raramente detectada em amidos nativos (BULÉON et al., 1998).

3.1.4. Gelatinização e Retrogradação do amido

Quando os grânulos de amido nativo são aquecidos em excesso de água, sua natureza semicristalina e sua arquitetura 3D são gradualmente eliminadas, resultando em uma transição de fase de uma estrutura granular organizada a um estado desorganizado em água, o qual é conhecido como gelatinização (XIE; HALLEY; AVÉROUS, 2012). Este colapso das ordens moleculares no interior do grânulo de amido manifestada em alterações irreversíveis de propriedades tais como a absorção de água, inchamento granular, fusão de cristalitos, desenrolamento de duplas hélices,

perda de birrefringência, solubilização do amido, desenvolvimento da viscosidade e finalmente formação de pasta (WANG; COPELAND, 2013; LUND; LORENZ, 1984). A temperatura na qual acontecem as mudanças irreversíveis é chamada temperatura de gelatinização (LUND; LORENZ, 1984). A gelatinização ocorre em uma faixa de temperatura que compreende a temperatura de início de gelatinização (temperatura na qual o grânulo de amido começa a perder sua birrefringência) e a temperatura de conclusão da gelatinização (temperatura na qual 98% dos grânulos de amido perdem sua birrefringência e o material do grânulo difunde na água) (WANG; COPELAND, 2013). A temperatura de gelatinização na maioria dos amidos está compreendida no intervalo de (60 a 80) °C (COPELAND et al., 2009).

No resfriamento e armazenamento, as moléculas de amilose e amilopectina no amido gelatinizado podem se realinhar em uma estrutura ordenada, em um processo conhecido como retrogradação, o qual acontece pelas interações moleculares (formação de ligações de hidrogênio) entre as moléculas adjacentes (SINGH et al., 2003; WANG; COPELAND, 2013). A retrogradação do amido resulta em mudanças consideráveis como aumento na viscosidade, firmeza e opacidade do gel, separação de fases entre polímero e água (sinéreses), e o aparecimento de um padrão de difração de raios X tipo B em algumas fontes de amido (por exemplo, os amidos de ervilha e de lentilhas) (WANG; COPELAND, 2013). Em períodos de armazenamento curtos a dureza inicial do gel de amido é determinada pela retrogradação da amilose, enquanto que em períodos longos a estrutura do gel e a cristalinidade do amido processado são determinados pela retrogradação da amilopectina, já que geralmente a amilose retrograda de minutos a horas e a amilopectina de horas a dias (COPELAND et al., 2009; WANG; COPELAND, 2013). No entanto, a retrogradação é um processo complexo que pode ser afetado por outros fatores como o tipo e a concentração de amido, a taxa de aquecimento e de resfriamento, o pH, e a presença de solutos como lipídios, sais e açúcares (HOOVER, 1995).

3.1.5. Fontes de amido

Atualmente, a extração de amido a nível comercial se restringe a cereais, raízes e tubérculos sendo que as principais fontes botânicas de amido são milho, batata, trigo, arroz e mandioca. No entanto, o interesse pelas fontes de amido não convencionais como taro, banana, manga, amaranto, quinoa, etc., é cada vez maior

devido a seus usos como materiais de encapsulação, filme ou cobertura, agente estabilizador de emulsões, produção de nanocristais, etc. (BELLO; AGAMA-ACEVEDO, 2017).

3.1.5.1 Amido de quinoa

A quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) é um pseudocereal originário dos Andes, e tem sido cultivada há 5.000 anos (REPO-CARRASCO; ESPINOZA; JACOBSEN, 2003). Atualmente, os principais países produtores de quinoa são a Bolívia e o Peru, no entanto, seu cultivo foi introduzido nos Estados Unidos, China, Europa, Canadá e Índia (ABUGOCH, 2009).

O grão de quinoa (Figura 7) apresenta um diâmetro compreendido entre 1,5 a 3 mm, forma ovulada plana, e diferentes cores que incluem branco, amarelo, roxo e preto em função da variedade (ABUGOCH, 2009; RUIZ et al., 2014). Segundo Abugoch (2009), este grão apresenta conteúdos de carboidratos de 73,6 a 74%, fibras de 7 a 9,7%, proteínas de 12 a 23% e lipídios de 1,8 a 9,5% (em base seca). Além disso, o grão de quinoa também é rico em minerais como potássio, fósforo e magnésio, vitaminas como a B₆; e componentes bioativos como os polifenóis (ABUGOCH, 2009; RUALES; NAIR, 1993).

Figura 7 - Grãos de quinoa

Fonte: Própria autoria

O componente presente em maior quantidade no grão de quinoa é o amido, o qual representa aproximadamente de 53,5 a 69,2% da massa seca (LI; WANG; ZHU, 2016) e está localizado no perisperma do grão (Figura 8) (PREGO; MALDONADO; OTEGUI, 1998). O grânulo de amido de quinoa apresenta forma poligonal, e tamanho de 0,5 a 3,0 μm (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004) e padrões de difração de Raios X tipo A com uma cristalinidade relativa alta compreendida no intervalo de 35 a 43% (ABUGOCH, 2009). Apresenta baixo conteúdo de amilose (3,5 a 22,5%) e um elevado teor de amilopectina (77,5% a 97%) (ABUGOCH, 2009).

Figura 8 - Seção longitudinal do grão de quinoa: (PE) pericarpo, (EP) Episperma, (C) cotilédones, (EN) endosperma, (R) radícula e (P) perisperma

Fonte: PREGO, I.; MALDONADO, S.; OTEGUI, M. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 481-488, 1998.

3.1.5.2 Amido de milho ceroso

O milho ceroso é a matéria-prima mais importante na produção de amidos modificados (WHITE; TZIOTIS, 2004). Sendo cultivado principalmente sob contrato para empresas de moagem a úmido (MASON, 2009); e chamado de "ceroso" porque parece ceroso ou brilhante quando os grãos são cortados (ACHAYUTHAKAN; SUPHANTHARIKA; RAO, 2006).

Os grânulos de amido de milho ceroso apresentam forma poligonal redonda, tamanho de 5 a 30 μm , padrões de difração de raios X do tipo A com uma cristalinidade

relativa de aproximadamente 39% (TAGGART, 2004). Este amido se caracteriza por apresentar baixo conteúdo de amilose (~2%), o qual resulta em propriedades de pasta mais semelhantes às dos amidos de raízes e tubérculos do que as de outros amidos de cereais (MASON, 2009).

3.1.5.3 Amido de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um arbusto lenhoso perene das *Euphorbiaceae* extensivamente cultivado como uma colheita anual em regiões tropicais e subtropicais por sua raiz tuberosa amilácea comestível (LIU et al., 2014). É nativa da América do Sul, onde foi domesticada há muitos milhares de anos (PAREJA; AMBROGI, 2016; PINTO-ZEVALLOS; PAREJA; AMBROGI, 2016). Posteriormente, seu cultivo tem se expandido a África, Índia e ao Sudeste da Ásia (BRIMER et al., 2015).

As raízes de mandioca apresentam aproximadamente 70% de umidade e 24% de amido, sendo que os outros componentes estão presentes em pequenas quantidades (fibras 2%, proteína ~1%, lipídios, vitaminas e minerais 3%; em base úmida) (HOOVER, 2000; TONUKARI, 2004).

O amido presente na raiz de mandioca pode atingir até 80% da massa seca (ZHU, 2015) e seus grânulos geralmente apresentam forma arredondada com um tamanho no intervalo de 4 a 43 μm ; padrões de difração de raios X do tipo A e C; e cor branca (MOORTHY, 2002). Seu conteúdo de amilose pode variar de 13,6 a 23,8% (MOORTHY, 2002) e sua temperatura de gelatinização entre 57,0 °C e 76,1 °C para as temperaturas de início e de conclusão da gelatinização, respectivamente (HOOVER, 2001).

3.2. Nanocristais de amido

Nas últimas décadas, o uso do amido como um material precursor na síntese de nanomateriais cresceu notavelmente devido sua abundância, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Segundo Razavi e Amini (2016), os nanomateriais de amido poderiam ser categorizados em diferentes tipos com base em sua morfologia e propriedades físicas, porém ainda não há uma classificação definida. Assim, esses

autores distinguem os nanomateriais de amido em nanopartículas, nanocristais e nanofibras com base na sua forma e natureza cristalina.

Dessa forma, considerando a literatura revisada nesta dissertação, será feita a distinção entre nanocristais e nanopartículas de amido, as quais geralmente possuem natureza amorfa, pois são produzidas a partir do amido gelatinizado (LE CORRE; BRAS; DUFRESNE, 2010; GHASEMLOU; CRAN, 2016) e a nomenclatura “nano” será utilizada para aqueles materiais que possuem pelo menos uma dimensão na escala nanométrica (1 a 100 nm) (SHARMA et al., 2018).

Os nanocristais de amido (NCA) são plaquetas cristalinas que resultam da ruptura da estrutura semicristalina dos grânulos de amido por hidrólise das partes amorfas a temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização (LE CORRE; ANGELLIER-COUSSY, 2014; LIN et al., 2011a). No entanto, deve se ressaltar que os NCA não são 100% cristalinos e que sua cristalinidade relativa média é aproximadamente 45% devido à presença de uma importante quantidade de material desorganizado após a hidrólise (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011; LE CORRE; ANGELLIER-COUSSY, 2014). Em função da origem botânica, a cristalinidade relativa dos NCA varia no intervalo de 32 a 52% (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011; SANCHEZ et al., 2018; XU et al., 2014).

Na produção de NCA diferentes metodologias têm sido desenvolvidas e avaliadas, entre elas podem ser citadas a hidrólise ácida e a combinação de algumas tecnologias.

3.2.1. Produção de nanocristais de amido por hidrólise ácida

A hidrólise ácida do amido nativo é um importante método de modificação utilizado na indústria do amido (CHEN et al., 2017), que consiste no tratamento de uma dispersão de amido (40%) com soluções diluídas de HCl ou H₂SO₄, a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização do amido (25 a 55 °C) por períodos de tempo determinados (HOOVER et al., 2000).

No mecanismo da hidrólise ácida, o íon hidrônio (H₃O⁺) realiza um ataque eletrofílico sobre o átomo de oxigênio da ligação glicosídica α -(1→4) (Figura 9A). Posteriormente, os elétrons de uma das ligações carbono-oxigênio se movem para o átomo de oxigênio (Figura 9B), gerando um carbocátion intermediário instável de alta energia (Figura 9C). O carbocátion intermediário é um ácido de Lewis, de modo que

reage subsequentemente com a água (Figura 9D), uma base de Lewis, levando à regeneração de um grupo hidroxila (Figura 9E) (HOOVER, 2000).

Figura 9 - Mecanismo de la hidrólise ácida do amido

Fonte: HOOVER, R. Acid-treated starches. **Food Reviews International**, New York, v. 16, n. 3, p. 369–392, 2000.

Segundo Wang e Copeland (2015), a hidrólise ácida da maioria dos amidos apresenta dois estágios: (i) um estágio de hidrólise inicial rápida, presumivelmente devido à hidrólise das regiões amorfas dos grânulos de amido, e (ii) um segundo estágio mais lento, devido à hidrólise simultânea das regiões amorfas e cristalinas densamente empacotadas que não permitem prontamente a penetração de H_3O^+

A maioria das pesquisas que descrevem a produção dos NCA de diferentes fontes botânicas por hidrólise ácida baseiam-se principalmente nos procedimentos desenvolvidos por Dufresne, Cavaille e Helbert (1996) e Angellier et al. (2004).

Dufresne, Cavaille e Helbert (1996) desenvolveram um método para produzir "amido microcristalino", como partículas aglomeradas. O procedimento consistiu na hidrólise de amido de batata (5%, m/m) numa suspensão de ácido clorídrico (HCl) de 2,2 N durante 15 dias a 35 °C. Após esse período, a suspensão foi diluída com água destilada e lavada por sucessivas centrifugações até obter uma dispersão livre de ácido, a qual foi submetida a ultrassom por 3 min e armazenada sob refrigeração. Baseando-se neste método, Putaux et al. (2003) conseguiram obter NCA de milho ceroso por hidrólise ácida com solução de HCl, depois de 6 semanas, nas mesmas condições usadas por Dufresne, Cavaille e Helbert (1996). As micrografias eletrônicas de transmissão mostraram os nanocristais obtidos como blocos paralelepípedicos (de ângulos de 60 - 65 °C) com comprimento de 20 a 40 nm, largura de 15 a 30 nm e espessura de 5 a 7 nm (Figura 10).

Figura 10 - Primeira observação dos nanocristais de amido ceroso por microscopia eletrônica de transmissão: a) vista longitudinal, b) vista planar e c) representação dos fragmentos lamelares da vista longitudinal e planar

Fonte: PUTAUX, J-L. et al. Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 5, p. 1198-1202, 2003. Scale bar (50 nm).

Posteriormente, Angellier et al. (2004) otimizaram o procedimento de preparação de NCA de milho ceroso; reduzindo o tempo de processo para 5 dias de hidrólise com o uso de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 3,16 M) a 40 °C, obtendo um maior rendimento (15%, m/m) quando comparado ao processo de hidrólise com HCl (0,5%, m/m). Por conseguinte, essa metodologia foi adotada como o método tradicional de preparo de nanocristais de amido por hidrólise ácida.

Na produção de NCA, fatores como a origem botânica do amido, o tipo de padrão cristalino e a proporção de amilose e amilopectina determinam a estrutura e a morfologia dos NCA (LE CORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011; XU et al., 2014). No entanto, as condições de hidrólise como o tipo de ácido, a temperatura e o tempo de reação também podem afetar o tamanho e o rendimento dos nanocristais de amido (LIN et al., 2011a).

3.2.2. Produção de nanocristais de amido por métodos combinados

LeCorre et al. (2012) combinaram a hidrólise enzimática com a hidrólise ácida na obtenção de NCA de milho ceroso visando a redução de seu tempo de produção. O estudo mostrou que o pré-tratamento com glucoamilases durante 2 horas seguido da hidrólise ácida permitiu obter nanocristais em 45 horas com um rendimento de 15%, mas sem mudanças na cristalinidade relativa quando comparados a aqueles produzidos somente por hidrólise ácida (3,16 M H_2SO_4) a 40 °C por 5 dias.

Kim et al. (2013a) estudaram o efeito do tratamento de ultrassom na produção de NCA de amido de milho ceroso por hidrólise ácida (3,16 M H_2SO_4) a 40 °C por 7 dias; e relataram que a aplicação do tratamento ultrassônico suave (20% amplitude, 30 min/dia, 20 kHz) sobre a dispersão de amido (14,7% m/m) permitiu aumentar a concentração de NCA com tamanhos menores a 100 nm de 20 a 70% quando comparado ao controle, embora com baixo rendimento (3,5%). Posteriormente, Kim et al. (2013b) reportaram que a hidrólise ácida (3,16 M H_2SO_4) do amido de milho ceroso (14,7% m/m) a 4 °C por 6 dias seguida do tratamento de ultrassom (60% de amplitude, 3 min, 20 kHz), permitiu obter NCA de diâmetros de (50 a 90) nm com um rendimento de 78%, porém sem mudanças na cristalinidade relativa quando comparados ao amido nativo.

Amini e Razavi (2016) combinaram hidrólise ácida (3,16 M H_2SO_4 a 40 °C) e o tratamento de ultrassom (100% amplitude, 40 kHz, 350 W) simultaneamente; e

conseguiram preparar NCA de milho ceroso em 45 min com tamanho de partículas menor do que 100 nm, cristalinidade relativa de aproximadamente 37%, e rendimento de até 21,6%. Segundo esses autores a sonicação durante a preparação dos nanocristais preservou a estrutura cristalina e aumentou razoavelmente a eficiência da hidrólise do amido.

Dai et al. (2018) combinaram a trituração dos grânulos de amido em moinho de bolas com a hidrólise ácida (3,16 M H_2SO_4) a 40 °C na produção de NCA de milho ceroso. Estes autores concluíram que a trituração dos grânulos durante 30 min seguida da hidrólise ácida por 3 dias (40 °C) permitiu obter NCA com diâmetro médio de aproximadamente 31 nm e cristalinidade relativa de 45%,

Hao et al. (2018) estudaram a combinação da hidrólise enzimática e da hidrólise ácida (3,16 H_2SO_4 , 40 °C) na produção de NCA de batata cerosa; e concluíram que o uso de glucoamilases por 6 h antes da hidrólise ácida (5 dias a 40 °C) permitiu a obtenção de NCA de 50 a 100 nm e cristalinidade relativa de até 50%, com um rendimento de 19%.

Atualmente, a hidrólise ácida das partes amorfas do grânulo do amido ainda é o método mais utilizado na produção de NCA. Embora, a obtenção de NCA uniformes com um rendimento elevado ainda é um desafio no processo de hidrólise ácida (KIM; PARK; LIM, 2015). Com o objetivo de superar tais limitações, novas metodologias de produção e diversas fontes de amido com diferentes conteúdos de amilose e cristalinidade relativa tais como o milho normal, o *amilomaize*, a batata e o trigo (LECORRE; BRAS; DUFRESNE), a cevada, a tapioca, e o grão-de-bico (XU et al., 2014), o taro (MUKURUMBIRA et al., 2017) e, o amaranto (DE LA CONCHA et al., 2018) estão sendo estudadas.

3.3. Filmes de amido

Os filmes são geralmente definidos como materiais finos e flexíveis; os quais ao serem usados em produtos alimentares desempenham um papel importante na sua conservação, distribuição e comercialização (FALGUERA et al., 2011).

A aplicação do amido na produção de filmes se baseia principalmente nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007). Durante a secagem da dispersão gelatinizada de amido, as moléculas de amilose, devido à sua linearidade, tendem a se orientar paralelamente e fazem ligações de hidrogênio entre as hidroxilas de polímeros adjacentes (JIMÉNEZ et al., 2012; SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

Atualmente, os filmes comestíveis e biodegradáveis são compostos dos biopolímeros formadores de filmes, de solventes como água ou etanol, e de outros aditivos. Entre estes aditivos podem se mencionar os que melhoram ou modificam a funcionalidade básica do material como os plastificantes, agentes de reticulação, emulsionantes e reforços; e os que melhoram a qualidade, estabilidade e segurança dos alimentos embalados como antioxidantes, agentes antimicrobianos, agentes de cor, sabores e agentes nutracêuticos (SALGADO et al., 2015).

Segundo Jiménez et al. (2012) e Versino et al. (2016), os filmes comestíveis e biodegradáveis a base de amido são obtidos principalmente por duas técnicas: solução *casting* e subsequente secagem (processo úmido), e processamento termoplástico (processo seco). No entanto, em escala de laboratório a técnica mais amplamente usada para a produção de filmes a base de amido é o *casting* (GARCÍA, M. et al., 2009; TAPIA-BLÁCIDO et al., 2013).

A produção de filmes de amido pela técnica *casting* consiste na gelatinização dos grânulos em excesso de água, e na desidratação da dispersão formadora de filme colocada sobre um suporte (Figura 11) (GARCÍA, M. et al., 2009; MORAES et al., 2013). Durante o processo de produção a temperatura de secagem influencia fortemente as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes resultantes (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). Em temperaturas em que o processo de secagem é mais rápido do que a retrogradação e recristalização obtém-se filmes mais estáveis.

Figura 11 - Representação esquemática do preparo de filmes pela técnica do *Casting*

Fonte: Própria Autoria

Os plastificantes são definidos como substâncias de baixa volatilidade e baixa massa molecular, que quando adicionados em outro material, provocam mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas (HAN, 2014; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005). São usados na formulação de filmes de amido para evitar a formação de uma estrutura quebradiça e rígida (HAN; ARISTIPPOS, 2005; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005).

Especificamente, os plastificantes reduzem as ligações de hidrogênio entre as moléculas do polímero e aumentam o volume livre da estrutura polimérica permitindo maior mobilidade molecular (HAN, 2014; HAN; ARISTIPPOS, 2005). Estas modificações conduzem a uma diminuição na temperatura de transição vítrea e na cristalinidade, o que proporciona a obtenção de materiais mais flexíveis com melhores propriedades mecânicas (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008). A permeabilidade ao vapor de água dos filmes de amido aumenta com o aumento da concentração deste aditivo, devido à formação de matrizes menos densas (MALI et al., 2006).

Os plastificantes usados comumente na formulação de filmes de amido são os polióis, como o glicerol e o sorbitol, devido à sua compatibilidade e natureza hidrofílica (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; VIEIRA et al., 2011). Geralmente, estes plastificantes são empregados na proporção de 15 a 35 g/ 100 g de biopolímero. O glicerol é o plastificante mais empregado na formulação de filmes de amido e tem sido

usado na produção de filmes de amidos de arroz (LAOHAKUNJIT; NOOMHORM, 2004), inhame (MALI et al., 2004), banana (PELISSARI et al., 2013), quinoa (ARAUJO-FARRO et al., 2010); ervilha (LI et al., 2015), batata (SESSINI et al., 2016), milho ceroso (ANGELLIER et al., 2006), milho (LOPEZ et al., 2015; MALI et al., 2006) e mandioca (MALI et al., 2006; SOUZA et al., 2012; PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2017).

3.3.1. Propriedades dos filmes de amido

As propriedades dos filmes de amido dependem de fatores, como a origem botânica do amido, do teor e tipo do plastificante e das condições de processamento e armazenamento (JIMÉNEZ et al., 2012, PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2017). Contudo, os filmes a base de amido são geralmente transparentes, inodoros, insípidos e incolores (JIMÉNEZ et al., 2012; MALI et al., 2006); e em sua maioria, apresentam boas propriedades de barreira ao oxigênio e ao dióxido de carbono (MALI et al., 2004; MALI et al., 2006; TALJA et al., 2007), além de ser bastante compatíveis e de baixo custo em relação a outros filmes a base de biopolímeros naturais. No entanto, quando comparado com outros polímeros plásticos, estes filmes apresentam várias desvantagens, tais como pobres propriedades mecânicas, caráter hidrófilo e alta permeabilidade ao vapor de água (JIMÉNEZ et al., 2012).

Na última década, com o objetivo de superar as limitações dos filmes de amido, diversas pesquisas têm focado seu interesse na adição de *nanofillers* orgânicos ou inorgânicos à matriz de amido (XIE et al., 2013). Neste sentido, recentemente os NCA têm recebido interesse crescente devido à abundante disponibilidade da sua matéria-prima, fácil processabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade quando comparados às partículas inorgânicas (LIN; HUANG; DUFRESNE, 2012).

3.3.2. Aplicações dos nanocristais de amido em filmes

Segundo Le Corre e Angellier-Coussy (2014), o principal objetivo da preparação de NCA foi sua utilização como reforço de matrizes poliméricas. Sendo que já foram avaliados com sucesso em filmes nanocompósitos a base de diferentes polímeros, como o amido (ANGELLIER et al., 2006; GARCÍA, N. et al., 2009; VIGUIÉ; MOLINA-BOISSEAU; DUFRESNE, 2007), pululana (KRISTO; BILIADERIS, 2007),

proteínas de soja (ZHENG et al., 2009) e carboximetil quitosano (DUAN et al., 2011). Alguns estudos têm mostrado que a adição de NCA também melhora as propriedades de barreira dos filmes (CONDÉS et al., 2015; DUAN et al., 2011; LI et al., 2015; MUKURUMBIRA; MELLEM; AMONSOU, 2017) provavelmente devido a sua forma de plaquetas.

A aplicação dos NCA nas matrizes de amido é influenciada por diversos fatores tais como compatibilidade dos NCA com o amido formador da matriz polimérica, conteúdo de amilose do amido, concentrações de nanocristais e de plastificante. Com a finalidade de definir esses fatores, a incorporação de NCA de diversas fontes botânicas na matriz de amido ainda está sendo investigada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Na produção de NCA foram utilizados amido de quinoa extraído de grãos de quinoa da variedade “Real”, safra de 2016, provenientes da Bolívia, adquiridos no mercado local (Pirassununga, SP) e amido de milho ceroso (Amisol R4000) doado pela Ingredion Brasil (Ingredion Brasil Ingr. Inds. Ltda., São Paulo, Brasil). Na produção dos filmes foi usado amido de mandioca (NCA do Brasil Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda, São Paulo, Brasil). Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico.

A legislação Brasileira (BRASIL, 1978) define ao produto amiláceo extraído das raízes de mandioca, como fécula de mandioca, no entanto, a nomenclatura utilizada nesta dissertação foi amido de mandioca.

4.2. Metodologia

4.2.1. Extração do amido de Quinoa

A extração do amido do grão de quinoa foi realizada em duas etapas com base nos procedimentos descritos por Rayner et al. (2012) e Steffolani, León e Perez (2013) (Figura 12).

Na primeira etapa, os grãos de quinoa foram lavados por 4 vezes, com o objetivo de retirar a saponina e os componentes externos aderidos ao grão. Posteriormente, os grãos foram macerados em água destilada, na proporção 1:3 (m/v), por 12 horas a 4 °C. Em seguida, os grãos foram triturados em um liquidificador industrial (Skymesen, Siemens Ltda, Brazil) com água destilada na proporção de 1:1 (m/v) por 4 min. A suspensão obtida foi passada através de um tecido e da peneira de 270 mesh (abertura de 0,053 mm), para separação das fibras e dos grãos não triturados, que foram novamente submetidos à trituração no liquidificador. Este procedimento foi repetido por 4 vezes. A nova suspensão foi decantada a 4 °C por 12 h para separar o sobrenadante (fase rica em residual proteico) do precipitado (fase rica em amido). O precipitado foi centrifugado (Thermo IEC, Centra GP8R, EUA) a

3000 x g a 4 °C por 10 min e, então, o sobrenadante foi descartado, a camada proteica de cor ocre foi retirada por raspagem e o amido foi suspenso em água destilada e centrifugado novamente, repetindo este procedimento por 3 vezes. Finalmente, a suspensão de amido resultante foi desidratada em estufa com circulação de ar (Marconi, MA 037, Brasil) a 30 °C por 24 h.

Figura 12 - Fluxograma de extração do amido de quinoa, a) primeira etapa e b) segunda etapa

Fonte: Própria autoria

Na segunda etapa, o amido desidratado foi suspenso em uma solução aquosa de NaOH 0,30% (m/m) na proporção 1:3 (m/v) e submetido a agitação constante por 5 min para remover proteínas e resíduos de fibras. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3000 x *g* a 4 °C por 10 min para remover o sobrenadante e a camada de proteica de cor ocre e, então, o amido foi suspenso novamente em solução de NaOH; repetindo-se este procedimento duas vezes. Subsequentemente, o amido precipitado foi lavado com água destilada, neutralizado com uma solução de ácido cítrico (1 M) e lavado mais duas vezes; entre cada passo de lavagem, o amido foi ressuspenso em água destilada durante 5 min e o sobrenadante foi removido por centrifugação a 3000 x *g* durante 10 min. O amido precipitado foi desidratado em estufa com circulação de ar (Marconi, MA 037, Brasil) a 30 °C por 24 h. Após a secagem, o amido de quinoa foi triturado em almofariz e pilão, a granulometria foi padronizada através da peneira de 100 mesh (abertura 0,150 mm) e o armazenamento foi feito em embalagem de vidro à temperatura ambiente.

O rendimento da extração do amido de quinoa foi calculado como o porcentual entre a massa seca dos grânulos de amido e a massa seca dos grãos de quinoa.

4.2.2. Caracterização dos amidos

Os amidos de quinoa, de milho ceroso e de mandioca foram caracterizados quanto a suas principais propriedades de interesse na produção de NCA e de filmes, respectivamente.

4.2.2.1 Composição química e teor de amilose

A composição química dos amidos de quinoa, de mandioca e de milho ceroso (umidade, teores de cinzas, de proteína, e de lipídios) foi determinada com base nos métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005) (Apêndice A).

O teor de amilose dos amidos de quinoa, de mandioca e de milho ceroso foi determinado de acordo com a metodologia da *International Organization for Standardization* 6647 (ISO, 1987). As amostras foram previamente desengorduradas segundo a metodologia de Kasemsuwan et al. (1995) (Apêndice B).

4.2.2.2 Morfologia

A morfologia dos grânulos dos amidos de quinoa, de mandioca e de milho ceroso foi observada em um microscópio eletrônico de varredura (TM3000, Hitachi, Japão). As amostras foram armazenadas em sílica gel por 24 horas e posteriormente fixadas em um suporte de alumínio com fita de carbono e analisadas a 15 kV com ampliações de 3000x.

4.2.2.3 Distribuição de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho dos grânulos de amidos de quinoa e de milho ceroso foi determinada em um analisador de tamanho de partículas por difração laser (SALD-201V, Shimadzu, Japão) com um laser semiconductor de 670 nm. As amostras foram dispersas em etanol e homogeneizadas em banho de ultrassom (Q-5.9/ 25 kHz, Ecosonics, Brasil) por 3 min antes da análise (LI; YEH, 2001; PELISSARI et al., 2013).

Os dados das curvas de distribuição de tamanho foram obtidos com o programa *Wing-1 [Standar data processing]* (Shimadzu Corporation). O tamanho dos grânulos foi calculado como o diâmetro médio $D_{[1,0]}$ usando os dados da distribuição de tamanho por número.

4.2.3. Hidrólise ácida dos amidos

A hidrólise ácida dos amidos de quinoa e de milho ceroso foi realizada seguindo o procedimento descrito por Angellier et al. (2004). Os amidos foram suspensos em 250 mL de solução de ácido sulfúrico 3,16 M (14,69% m/v) e incubados a temperatura constante por 5 dias, com agitação de 200 rpm. As temperaturas de incubação foram 30, 35 e 40 °C, para o amido de quinoa e 40 °C, para o amido de milho ceroso. Alíquotas da suspensão (10 µL) foram retiradas a cada 24 horas, diluídas em 20 mL de água destilada, e centrifugadas (Himac CR 21GII, Hitachi, Japão) a 13.000 rpm por 10 min para determinar a percentagem de hidrólise.

A percentagem de hidrólise foi determinada pela razão entre a quantidade de açúcares no sobrenadante e a massa inicial do amido em base seca. Os açúcares foram determinados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) (Apêndice C).

A cinética da hidrólise ácida de ambos amidos foi ajustada ao modelo de reação de primeira ordem de acordo com a Equação 1. Para isso, os dados das percentagens de hidrólise foram expressos como a diferença entre 100 e a percentagem de hidrólise, com o objetivo de representá-los como conteúdo de amido residual (%). O modelo foi ajustado aos pontos experimentais utilizando o programa Origin (versão 9.5, OriginLab, USA), com o algoritmo de iteração “Levenberg Marquardt”.

$$C_f = C_0 * e^{-kt} \quad (1)$$

em que t é o tempo de reação (dias), C_f é a percentagem de amido residual no tempo t (100 - % hidrólise), C_0 é a percentagem de amido residual no tempo 0 (100%), k é a constante da cinética de hidrólise (dias⁻¹).

Após o período de hidrólise, a suspensão foi submetida a processos de lavagem com água destilada e centrifugação até atingir pH próximo a neutralidade (oito ciclos sucessivos). Em seguida, o precipitado, denominado de resíduos da hidrólise ácida foi homogeneizado em ultra-turrax (T25 digital, IKA, Suíça) a 10.000 rpm por 5 min, congelado com nitrogênio líquido, liofilizado (FD 1,0-60, Heto) e armazenado em embalagens de polietileno de baixa densidade no interior de dessecadores contendo gel sílica a temperatura ambiente.

O rendimento dos NCA, após cinco dias de hidrólise ácida, foi calculado como o percentual entre a massa do resíduo e a massa dos amidos, em base seca (DUAN et al., 2011).

4.2.4. Caracterização dos nanocristais de amido

Os NCA de quinoa e de milho ceroso foram caracterizados quanto a suas propriedades estruturais (Difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica); propriedades térmicas (Calorimetria Diferencial de Varredura e Análise Termogravimétrica); propriedades químicas (Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier); e estabilidade coloidal (Potencial zeta). Para efeito de comparação seus amidos nativos também foram caracterizados.

4.2.4.1 Cristalinidade relativa

Os padrões cristalográficos dos NCA e seus amidos foram obtidos utilizando um difratômetro de Raios-X (Miniflex600, Rigaku, Japão) com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$), operando a 40 kV e corrente de 15 mA. Para isso, as amostras foram previamente condicionadas em dessecador contendo solução de BaCl_2 saturada (UR 90%, 25°C) por dez dias, e analisadas no intervalo de 4° a 40° em 2θ com velocidade de varredura de 2°/minuto (LECORRE et al., 2011; XU et al., 2014).

A cristalinidade relativa foi estimada como o percentual entre a área dos picos e a área total do difratograma, conforme a metodologia descrita por Nara e Komiya (1983), usando o programa Origin (versão 9.5, OriginLab, USA).

4.2.4.2 Morfologia

A morfologia dos NCA foi observada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Philips XL-30 FEG, Eindhoven, Netherlands) a 10 kV com ampliações de 100.000x.

A morfologia dos NCA também foi observada por microscopia de força atômica (MFA) (Solver Next, NT-MDT, Rússia) em modo semi-contato, com frequência de ressonância de 150 kHz, força de contato de 5 N/m, e velocidade de varredura de 0,4 Hz; com o objetivo de estimar seu tamanho e espessura. As imagens foram adquiridas e tratadas no programa *Image Analysis* 3.2.5. Enquanto que, os perfis de altura usados para estimar o tamanho e a espessura dos NCA foram obtidos no programa *Gwyddion* 2.50.

As amostras foram suspensas em água deionizada (0,01% m/v), homogeneizadas em ultra-turrax a 10.000 rpm por 5 min, gotejadas sobre fita de carbono (MEV) e sobre mica (MFA), e secas a temperatura ambiente antes das análises. As amostras analisadas por MEV foram recobertas com ouro.

4.2.4.3 Distribuição de tamanho

A distribuição de tamanho dos NCA foi determinada por espalhamento de luz quase-elástico (*QELS*, *Quasi-elastic Light Scattering*), utilizando-se o equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA), com ângulo de incidência de

90°. As amostras foram dispersas em água deionizada (0,01% m/v), homogeneizadas em ultra-turrax a 10.000 rpm por 5 min e analisadas a 25 °C (CONDÉS et al., 2015; MUKURUMBIRA et al., 2017). O aspecto visual das dispersões dos RHAQ ao 0,01% após a homogeneização pode ser observado na Figura 13. Os dados da distribuição de tamanho de partícula por intensidade foram obtidos com o programa *ZetaPlus Particle Sizing* (Brookhaven Instruments), e seus valores de diâmetro hidrodinâmico e de índice de polidispersividade foram reportados.

O pH das dispersões dos NCA foi determinado usando um pH-metro (TEC-3MP, Tecnal, Brasil).

Figura 13 - Aspecto visual das dispersões dos NCA de quinoa produzidos a a) 30 °C, b) 35 °C e c) 40 °C e dos NCA de milho ceroso produzidos a d) 40 °C

Fonte: Própria autoria

4.2.4.4 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos NCA e seus amidos foram avaliadas em excesso de água usando-se um calorímetro diferencial de varredura (DSC TA2010, TA Instrument) de acordo com Franco et al. (2002). Amostras de 2 mg (base seca), aproximadamente, foram pesadas em uma cápsula de alumínio e misturadas com 6 µL de água destilada. As cápsulas foram fechadas hermeticamente e mantidas a temperatura ambiente por duas horas, e aquecidas de 20 a 120 °C a 10 °C/min. Uma cápsula vazia foi utilizada como referência. As temperaturas de transição foram determinadas diretamente das curvas térmicas usando o programa *Universal Analysis V1.7F* (TA Instruments). Os parâmetros analisados foram temperatura de pico (T_p), a variação de temperatura (ΔT = temperatura de conclusão – Temperatura de início) e a variação de entalpia (ΔH).

A estabilidade térmica dos NCA e seus amidos foi analisada em um analisador termogravimétrico (STA 449F3, NETZSCH, Alemanha). Amostras de ~10 mg foram colocadas no porta-amostra e aquecidas de 30 a 600 °C a 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio (20 mL/min).

4.2.4.5 Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR dos NCA e seus amidos foram obtidos usando um espectrofotômetro (Spectrum-One, Perkin-Elmer, EUA) com acessório UATR ("Universal Attenuator Total Reflectance"). As amostras em pó foram colocadas no suporte de cristal sob pressão de 80 N. As análises foram realizadas na faixa espectral de 600 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , perfazendo um total de 32 varreduras para cada amostra. Os espectros das curvas foram coletados e analisados com o programa *Spectrum v 5.3.1* (Perkin-Elmer, EUA).

4.2.4.6 Potencial Zeta

O potencial zeta dos NCA foi determinado por medidas de mobilidade eletroforética, técnica de espalhamento de luz eletroforético (ELS, *Electrophoretic light scattering*), utilizando-se o equipamento ZetaPlus (Nanobrook 90Plus Zeta, Brookhaven Instruments Company, NY, EUA). As amostras foram dispersas em água deionizada (0,1% m/v) e homogeneizadas no ultraturrax (T25 digital, IKA, Suíça) por 5 min, e deixadas a temperatura ambiente por uma hora antes das análises. Em seguida, as amostras foram diluídas em KCl de 1 mM (0,03% v/v) e analisadas a 25 °C (WEI et al., 2014a). Os valores de potencial zeta foram obtidos diretamente no programa *Zeta Potencial Analyzer* (Brookhaven Instruments).

O pH das dispersões dos NCA foi determinado usando um pH-metro (TEC-3MP, Tecnal, Brasil).

4.2.5. Seleção dos nanocristais de amido de quinoa adicionados nos filmes

O critério de seleção dos NCA de quinoa, usados como reforço de filmes de amido de mandioca, foi baseado no rendimento de produção e nas propriedades dos materiais obtidos nas diferentes temperaturas de hidrólise ácida.

4.2.6. Produção dos filmes de amido reforçados com nanocristais de amido de quinoa

Os filmes de amido de mandioca reforçados com NCA de quinoa foram preparados pela técnica *casting*, seguindo o procedimento de Li et al. (2015) com algumas modificações. Dispersões de amido de mandioca (4 g de amido de mandioca /100 g de dispersão filmogênica) foram preparadas em água destilada e aquecidas em banho maria (MA-184, Marconi, Brasil) com temperatura controlada (90 °C) por 30 min sob agitação mecânica a 300 rpm. Em seguida, o glicerol (25 g /100 g de amido), previamente disperso em água destilada, foi adicionado. A dispersão foi agitada por mais 15 min e deixada resfriar até 50°C. Os NCA de quinoa, previamente dispersos em água destilada usando ultraturrax (T25 digital, IKA, Suíça) a 10.000 rpm durante 10 min, foram adicionados nas concentrações de 2,5; 5,0 e 7,5 g de NCA/100 g de amido à dispersão filmogênica a 50 °C e a mesma foi agitada por 15 min. Após essa etapa, a dispersão filmogênica foi colocada em placas de poliestireno de 14 cm de diâmetro (48 g de dispersão filmogênica/ placa), e submetida a desidratação em estufa com circulação de ar forçado a 30 °C por 21 horas. Foram produzidos filmes sem reforço de NCA como controle.

É importante ressaltar que inicialmente foi previsto a adição de NCA até a concentração de 10,0 g de NCA/100 g de amido nos filmes de amido de mandioca. No entanto, esses filmes se quebraram durante o processo de secagem de 21h, e não foi possível caracterizá-los.

Posteriormente, os filmes foram condicionados em dessecadores contendo uma solução saturada de brometo de sódio (UR 58 %, 25 °C) por um período de 5 dias, antes de serem caracterizados quanto a espessura, umidade, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água e padrões de difração de raios X; e no mínimo de 10 dias, antes de serem caracterizados quanto a suas propriedades térmicas. Na caracterização da microestrutura, os filmes foram condicionados em dessecadores com gel sílica a 25 °C por no mínimo 7 dias.

4.2.7. Caracterização dos filmes

4.2.7.1 Espessura, umidade e solubilidade em água

A espessura dos filmes foi considerada como o valor médio de dez medidas realizadas em pontos aleatórios do filme usando um micrômetro digital (Absolute ID-C112B, Mitutoyo, Japão) com precisão de 0,001 mm.

A umidade dos filmes foi determinada por gravimetria por secagem em estufa a 105 °C durante 24 horas. Amostras de filmes (discos de 2 cm de diâmetro) foram colocadas em pesa filtros que foram pesados antes e depois da secagem. A umidade foi calculada como a percentagem da perda de massa em relação à massa inicial do filme.

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo a metodologia de Gontard et al. (1992). Amostras de filmes (discos de 2 cm de diâmetro) previamente pesadas foram imersas em água destilada (50 mL), e mantidas sob agitação mecânica a 60 rpm durante 24 h a 25 °C. Após esse período, as amostras foram retiradas da água, secas em estufa a 105 °C por 24 h, e pesadas para determinar a massa final não solubilizada dos filmes. A solubilidade foi determinada de acordo com a Equação (2).

$$\text{Solubilidade (\%)} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (2)$$

em que m_i é a massa seca inicial da amostra (g); m_f é a massa seca final da amostra (g), após da solubilização.

4.2.7.2 Análise de difração de raios X

Os padrões de difração de raios X dos filmes foram obtidos utilizando o mesmo difratômetro descrito na seção 4.2.4.1. Amostras retangulares de filmes (30 mm x 40 mm) foram analisadas no intervalo de 4 a 40° em 2 θ com velocidade de varredura de 2°/minuto (MUKURUMBIRA; MELLEM, AMONSOU, 2017).

4.2.7.3 Microestrutura

Os filmes (superfície de secagem) foram analisados no modo semi-contato, usando o mesmo microscópio de força atômica descrito na seção 4.2.4.2, com uma frequência de ressonância de 150 kHz, força de contato de 5 N/m e velocidade de varredura de 0,4 Hz. Os filmes foram analisados em pontos aleatórios com áreas de $2.500 \mu\text{m}^2$ e resolução de $0,1 \mu\text{m}/\text{pixel}$. A rugosidade média dos filmes foi determinada no programa *Image Analysis* 3.2.5.

4.2.7.4 Ângulo de contato

O ângulo de contato dos filmes foi determinado pelo método da gota sésil utilizando um tensiômetro ótico (Attension Theta Lite, KSV Instrument, Finlândia). Amostras retangulares dos filmes de (20 mm x 30 mm) foram fixadas no suporte do equipamento e, então, uma gota de água Mili-Q ($\sim 5 \mu\text{L}$) foi gotejada sobre a superfície de secagem dos filmes com ajuda de uma seringa de precisão. Em seguida, foram adquiridas imagens da amostra a cada segundo por um período de 40 segundos. O ângulo formado entre a superfície do filme e a tangente traçada na superfície da gota foi determinado pelo programa *Attension Theta* (Versão 4.1.9.8).

4.2.7.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por testes de tração uniaxial utilizando um texturômetro (TAXT2, TA Instruments, EUA) de acordo com ASTM D882-10 (ASTM, 2010a). Amostras retangulares de filme (90 mm x 15 mm) foram fixadas nas garras que apresentavam separação inicial de 50 mm e em seguida analisadas com velocidade de separação de 1,0 mm/s. A resistência à tração (MPa) (relação entre a carga máxima aplicada e a área da seção transversal do filme), tensão na ruptura (MPa) (relação entre a carga e a área da seção transversal do filme na ruptura) e a deformação na ruptura (%) (percentagem de mudança no comprimento original do filme na ruptura) foram obtidas diretamente da curva de tensão versus deformação. O módulo elástico (MPa) foi calculado como a inclinação da parte linear da curva de tensão em função da deformação. As propriedades mencionadas foram obtidas usando o programa *Exponent Lite Express* 6.1.13.0.

4.2.7.6 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada de acordo com ASTM E96/96M (ASTM, 2010b). Amostras circulares de filme foram fixadas na abertura interna de células de permeação de alumínio contendo 60 g de sílica gel (UR ~ 0%). Em seguida, as células foram colocadas dentro de dessecadores contendo água destilada (UR ~ 100 %) e mantidas a temperatura constante (25 °C) em BOD (MA 415, Marconi, Brasil). O ganho de massa da célula de permeação foi registrado a cada 24 horas por 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada de acordo com a Equação (3).

$$PVA = \frac{w \cdot x}{t \cdot A \cdot (P_1 - P_2)} \quad (3)$$

em que PVA é a permeabilidade ao vapor de água (g.mm/h.m².kPa); w/t é o coeficiente angular da regressão linear da reta de ganho de água na célula de permeação em função do tempo (g/h); x é a espessura do filme (mm); A é a área exposta do filme (0,003117 m²), P₁ é a pressão de vapor de água pura a 25 °C (3,166 kPa), P₂ é a pressão de vapor da atmosfera com sílica gel (0 kPa).

4.2.7.7 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos filmes foram determinadas em um calorímetro (DSC T2010, TA Instruments). Uma massa de filme de ~10 mg foi colocada em uma cápsula de alumínio que foi selada hermeticamente, e analisada de -150 a 250 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. A temperatura de transição vítrea (T_g), e a temperatura de fusão (T_m) e a entalpia de fusão (ΔH) foram determinadas diretamente das curvas térmicas usando o programa *Universal Analysis V1.7F* (TA Instruments).

A estabilidade térmica dos filmes foi analisada em um analisador termogravimétrico (STA 449F3, NETZSCH, Alemanha). Amostras de ~10 mg foram colocadas no porta-amostra e aquecidas de (30 a 600) °C a razão de 5 °C/ min sob atmosfera de ar inerte (20 mL/min).

4.2.7.8 Cor e opacidade

A cor dos filmes foi determinada usando um colorímetro (Miniscan EZ 45/0, HunterLab, EUA), com iluminante D65 e ângulo de 10°. O espaço de cor CIE $L^*a^*b^*$ foi usado para medir a luminosidade (L^*), variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* , variando de verde ($-a$) ao vermelho ($+a$); e b^* , variando de azul ($-b$) ao amarelo ($+b$) dos filmes. Os filmes foram medidos sobre a superfície de um padrão branco, com coordenadas de cor de $L^* = 94,51 \pm 0,03$, $a^* = -0,76 \pm 0,01$, $b^* = 2,07 \pm 0,01$. A diferença total da cor (ΔE) foi calculada de acordo com a Equação (4).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

em que $\Delta L^* = L^*_{amostra} - L^*_{padrão}$; $\Delta a^* = a^*_{amostra} - a^*_{padrão}$; $\Delta b^* = b^*_{amostra} - b^*_{padrão}$

A opacidade dos filmes foi determinada no mesmo equipamento seguindo o procedimento descrito por Sobral (2000). A opacidade foi calculada como a razão entre a opacidade da amostra ao ser colocada sobre uma superfície padrão negra e sobre o padrão branco.

4.2.7.9 Brilho

O brilho dos filmes foi determinado na superfície de secagem usando um Glossímetro (Rhodopoint NGL 20/60), nos ângulos de 20° e 60° (Valencia et al., 2018).

4.2.8. Análise estatística

A hidrólise ácida foi feita em duplicata, e todas as outras análises, no mínimo, em triplicata. Os resultados da caracterização dos NCA e dos filmes a base de amido foram submetidos às análises estatísticas de ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$) para verificar as diferenças significativas entre as médias, usando o programa Statistica (versão 7.0, Statsoft, USA). Foi avaliado o efeito da temperatura de hidrólise na produção de NCA e o efeito da concentração dos NCA nas propriedades físicas dos filmes.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização dos amidos

5.1.1. Composição centesimal e teor de amilose

A composição química e o teor de amilose dos amidos de quinoa, de milho ceroso e de mandioca são apresentados na Tabela 1. A umidade dos amidos está dentro do limite estabelecido pela legislação Brasileira para a comercialização de amidos ou féculas ($\leq 14\%$) (BRASIL, 1978). O teor de proteínas do amido de quinoa (1,62%) foi maior que o apresentado pelo amido de milho ceroso (0,71%) e de mandioca (0,26%). Elevados teores de proteínas no intervalo de 0,9 a 1,3% também foram reportados por Araujo-Farro et al. (2010), Pagno et al. (2015) e Steffolani, León e Perez (2013) para o amido de quinoa extraído e purificado em condições similares (NaOH (0,20 a 0,30)% por 5 min) à relatada na metodologia de extração (seção 4.2.1); o que provavelmente está relacionado à localização dos grânulos de amido de quinoa nas células do perisperma, as quais estão protegidas por uma cobertura proteica, fato que dificultaria a remoção da proteína durante o processo de extração. Contudo, o conteúdo de proteínas do amido de quinoa foi maior que o reportado por esses autores, diferenças que podem ser atribuídas à variedade de quinoa e ao maior número de lavagens empregados por Araujo-Farro et al. (2010) e Pagno et al. (2015) antes e após a purificação para a remoção de proteínas residuais e à maior proporção de amido: solução de NaOH (1:5) usada na purificação por Steffolani, León e Perez (2013). O teor de proteína do amido de milho ceroso também foi elevado quando comparado aos reportados para outros amidos comerciais de 0,01 a 0,13% por Tester e Sommerville (2003) e Weber et al. (2009); enquanto que o amido de mandioca apresentou um teor similar ao valor de 0,20% reportado por Peroni, Rocha e Franco (2006).

Os teores de lipídios e de cinzas dos amidos de quinoa e de milho ceroso foram baixos ($<0,2\%$) e similares aos reportados por Araujo-Farro et al. (2010) para amido de quinoa e por Tester e Sommerville (2003) para amido de milho ceroso comercial. No caso do amido de mandioca, esses conteúdos foram maiores e são similares aos valores reportados por Moorthy et al. (2002) e Peroni, Rocha e Franco (2006).

Tabela 1 - Composição química e teor de amilose dos amidos de quinoa, de milho ceroso e de mandioca

Amido	Composição do amido (%)				Teor de Amilose (%)
	Umidade	Proteínas	Lipídios	Cinzas	
Quinoa	11,41 ± 0,08 ^b	1,62 ± 0,03 ^a	0,17 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	22,79 ± 0,07 ^a
Milho ceroso	11,75 ± 0,06 ^b	0,71 ± 0,07 ^b	0,13 ± 0,02 ^b	0,03 ± 0,00 ^b	N.D ¹
Mandioca	12,31 ± 0,04 ^a	0,26 ± 0,02 ^c	0,39 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,00 ^a	16,90 ± 0,18 ^b

Valores médios ± desvio padrão, em base seca. N.D¹ não detectado. Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Fonte: Própria autoria

O teor de amilose aparente obtido para o amido de quinoa foi de 22,8%, valor similar aos determinados por Li, Wang e Zhu (2016) (21 a 23%) e por Díaz (2016) (20 a 21,3%) para quinoa branca de origem boliviana e peruana, respectivamente. No entanto, conteúdos de amilose no intervalo de 7,1 a 24,45% foram reportados para amidos de quinoa extraídos de grãos de diferentes variedades e países por Jan et al. (2017), Li e Zhu (2017a), Qian e Kuhn (1999) e Tang et al. (2002), todos determinados por métodos baseados na ligação com iodo. Segundo Li e Zhu (2017a) essas diferenças podem ser atribuídas à variedade, método de determinação do conteúdo de amilose, desengorduramento prévio das amostras ou à interação de cadeias longas de amilopectina do amido de quinoa com o iodo. Nos amidos de milho ceroso e de mandioca, os teores de amilose foram próximo a zero e de 16,9%, respectivamente. Tester e Sommerville (2003) e De la Concha et al. (2018) também determinaram baixos conteúdos de amilose aparente (1,8 e 3,3%) em amidos de milho ceroso, o que é justificado pelo seu alto conteúdo de amilopectina. O teor de amilose para o amido de mandioca foi similar ao obtido por Piñeros-Hernandez et al. (2017) (18%).

O rendimento da extração do amido a partir do grão da quinoa foi de $44,2 \pm 4,7\%$, em base seca; valor muito próximo ao encontrado por Jan et al. (2017) (41,3% a 48,4%), quando extraíram amido de duas variedades de quinoa colhidas na Índia. Quando comparado aos rendimentos de outras fontes comumente usadas na extração de amido, como batata (14 a 18%) e mandioca (21 a 28%) (NGOBESE et al., 2017; ZHU, 2015), o grão da quinoa apresenta-se como uma fonte de amido com um grande potencial industrial.

5.1.2. Morfologia

Os grânulos dos amidos de quinoa e de milho ceroso apresentaram forma irregular e poligonal com notáveis diferenças no tamanho (Figura 14). Assim também, foi observado que os grânulos de amido de quinoa se encontraram formando aglomerados (Figura 14a), o qual é um fenômeno físico-químico característico de grânulos de pequeno tamanho associado à presença de proteínas (QIAN; KUHN, 1999; LINDEBOOM et al., 2005); e que alguns grânulos de amido de milho ceroso apresentavam poros na sua superfície (setas vermelhas na Figura 14b), característica dessa fonte de amido (JANE, 2009). Enquanto que os grânulos de amido de mandioca apresentaram forma redonda com presença de alguns grânulos quebrados, o que pode estar associado à formação desses grânulos e a seu processo de extração. A forma dos amidos foi similar à reportada por Lindeboom et al. (2005) e Qian e Kuhn (1999), para o amido de quinoa; Cheng et al. (2006) e Wei et al. (2013), para o amido de milho ceroso; e por Peroni, Rocha e Franco (2006), para o amido de mandioca.

Figura 14 - Micrografias do amidos a) de quinoa e b) de milho ceroso com aumentos de 3000x, e c) de mandioca com aumento de 2000x

Fonte: Própria autoria

5.1.3. Distribuição de tamanho de partículas

A distribuição do tamanho dos grânulos de amido de quinoa e de milho ceroso foi unimodal (Figura 15), com tamanhos compreendidos no intervalo de 0,6 a 3,0 μm com pico em 1 μm e de 10 a 40 μm com pico em 15 μm para os amidos de quinoa e de milho ceroso, respectivamente. Esse tipo de distribuição também foi obtido por Atwell et al. (1983) e Tang et al. (2002) para o amido de quinoa com pico em aproximadamente 1,5 μm ; e por Lindeboom et al. (2005) para o amido de milho ceroso.

Figura 15 - Distribuição de tamanho de partícula dos amidos de quinoa (AQ) e de milho ceroso (AMC)

Fonte: Própria autoria

Os tamanhos dos grânulos dos amidos de quinoa e de milho ceroso foram determinados como o diâmetro médio D [1,0], cujos valores foram de $1,23 \pm 0,01 \mu\text{m}$ e de $19,31 \pm 1,57 \mu\text{m}$, respectivamente.

Após a caracterização, os amidos de quinoa e de milho ceroso foram submetidos à hidrólise ácida para a produção de nanocristais.

5.2. Hidrólise ácida dos amidos

As percentagens de hidrólise ácida dos amidos de quinoa em diferentes temperaturas e do amido de milho ceroso a 40 °C, e o ajuste do modelo da cinética de primeira ordem a essas percentagens são apresentados na Figura 16.

Em geral, as percentagens de hidrólise ácida de ambos amidos evidenciaram dois estágios: o primeiro, do dia 1 ao dia 3, que corresponde a um estágio relativamente rápido devido à degradação das regiões amorfas dos grânulos, enquanto o segundo, do dia 4 ao dia 5, que se refere a um estágio mais lento atribuído à degradação da região cristalina. Segundo, Wang e Copeland (2015) esses dois estágios são característicos da maioria dos amidos.

Figura 16 –Percentagens de hidrólise ácida do amido de quinoa (AQ) a (30, 35 e 40) °C e do amido de milho ceroso (AMC) a 40 °C em função do tempo. Pontos: valores experimentais; linha contínua modelo de cinética de primeira ordem.

Fonte: Própria autoria

O incremento da temperatura de (30 a 40) °C aumentou as percentagens de hidrólise ácida do amido de quinoa, provavelmente devido à maior atividade do íon hidrônio; o que resultou em diferentes percentagens de hidrólise no quinto dia, 63%, 73% e 91% para as temperaturas de 30, 35 e 40 °C, respectivamente.

As constantes da cinética e os coeficientes de determinação dos modelos são apresentados na Tabela 2. Nessa tabela observa-se um aumento na constante do modelo da cinética de primeira ordem com o aumento da temperatura de (30 a 40) °C da hidrólise ácida para o amido de quinoa. A 40 °C, a constante da hidrólise ácida do amido de quinoa foi muito mais elevada (0,59 dias⁻¹) que a observada para o amido de milho ceroso (0,39 dias⁻¹), o que implicou que esse amido foi hidrolisado 1,5 vezes mais rápido que o amido de milho ceroso nessa temperatura. Esse comportamento provavelmente está relacionado ao menor tamanho de grânulo e maior conteúdo de amilose do amido de quinoa; assim como as outras características dessa fonte de amido como maior proporção de cadeias de amilopectina curtas a longas (média: 14,6) (LI, ZHU, 2017a) e menor densidade de empacotamento de suas moléculas (0,9) (PRAKNIZ et al. 1999). A dependência de k com a temperatura foi descrita pela equação tipo Arrhenius e a energia de ativação calculada foi de 82,6 kJ/mol ($R^2 = 0,92$).

Tabela 2 – Constante da cinética (k) e o coeficiente de determinação (R^2) da hidrólise ácida do amido de quinoa (AQ) a 30, 35 e 40 °C e do amido de milho ceroso (AMC) a 40 °C

Amostra	k (dias ⁻¹)	R^2
AQ 30 °C	0,21 ± 0,03	0,96
AQ 35 °C	0,27 ± 0,01	0,95
AQ 40 °C	0,59 ± 0,06	0,96
AMC 40 °C	0,39 ± 0,03	0,95

Valores médios ± desvio padrão.

Fonte: Própria autoria

Os rendimentos dos NCA de quinoa (NCAQ) e de milho ceroso (NCAMC), após cinco dias, são mostrados na Tabela 3. Os valores mostraram que o incremento da temperatura da hidrólise ácida diminuiu o rendimento dos NCAQ, o que está diretamente relacionado às diferenças observadas nas constantes da cinética da hidrólise ácida. A 40 °C, os NCAQ apresentaram um rendimento muito baixo (6,79%) quando comparado aos NCAMC (14,13%) (Tabela 3), e aos rendimentos de NCA de milho normal (14%), de cevada (18%), de tapioca (15%), de batata (8,8%), de *mungbean* (35%) e de grão-de-bico (16%) (XU et al, 2014). O rendimento dos NCAMC foi similar ao reportado por Angellier et al. (2004) (15%). De la Concha et al. (2018) também observaram um baixo rendimento para NCA de amaranto (9,3%), o qual foi relacionado ao tamanho de grânulo desse amido (diâmetro de 1,5 µm). No entanto, Mukurumbira et al. (2017) relataram um elevado rendimento para NCA de taro (25%), cujos grânulos de amido extraídos de duas variedades apresentaram diâmetros médios de 2,0 e 3,7 µm. A diferença no rendimento de NCA de fontes de amido de tamanho pequeno, produzidos nas mesmas condições, mas com diferente distribuição no comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina (Jane et al., 1999) pode sugerir que esse parâmetro influenciou em maior grau o rendimento dos NCA do que o tamanho do grânulo.

Tabela 3 - Rendimento dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC) produzidos a 40 °C

Amostra	Rendimento (%)
NCAQ 30 °C	35,78 ± 0,24 ^a
NCAQ 35 °C	22,76 ± 0,21 ^b
NCAQ 40 °C	6,79 ± 0,36 ^d
NCAMC 40 °C	14,13 ± 0,46 ^c

Valores médios ± desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

5.3. Caracterização dos nanocristais de amido

5.3.1. Cristalinidade relativa

Os padrões de difração de raios X dos NCA de quinoa e de milho ceroso, e de seus amidos nativos são apresentados na Figura 17. Nessa figura pode se observar que ambos os amidos mostraram padrão de difração tipo A com picos de maior intensidade aproximadamente em 15°, 17°, 18°, e 23° em (2 θ), característicos dos amidos de cereais (QIAN; KUHN, 1999; LOPEZ-RUBIO et al., 2008); e que esse padrão foi preservado nos seus NCA. No entanto, os picos nesses difratogramas apresentaram um incremento na intensidade para os NCA quando comparados aos amidos nativos (Figura 17). Esse aumento na intensidade dos picos também foi observado em NCA de amaranto (DE LA CONCHA et al, 2018), de milho ceroso (CONDÉS et al., 2015; HAAJ et al., 2016) e de taro (MUKURUMBIRA et al., 2017).

Figura 17 - Padrões de difração de raios X: a) do amido de quinoa (AQ) e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos (30, 35 e 40) °C, e b) do amido de milho ceroso (AMC) e dos nanocristais de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C

Fonte: Própria autoria

O incremento da temperatura de 30 para 40 °C aumentou a cristalinidade relativa dos NCAQ de 34,3% para 36,2% (Tabela 4), sugerindo que a temperatura de hidrólise não influenciou esta propriedade. A cristalinidade relativa dos NCA de quinoa e de milho ceroso aumentou quando comparada à cristalinidade de seus amidos nativos, como consequência da hidrólise preferencial das regiões amorfas do grânulo de amido. Os NCAQ apresentaram menores incrementos na cristalinidade (7,55%; 8,22%; 9,59%) que os NCAMC (14,2%), sendo que este último mostrou um incremento similar ao valor mostrado na literatura, para essa fonte de NCA (~14%), por LeCorre, Bras e Dufresne (2011) e Dai et al. (2018). De la Concha et al. (2018) também determinaram um aumento baixo na cristalinidade relativa (~8%) para os NCA de amaranto, cujo amido apresentou um baixo conteúdo de amilose (1,5%) e características similares ao amido de quinoa, tais como elevado conteúdo de cadeias de amilopectina curtas, pequeno tamanho de grânulo (1,5 µm) e baixa cristalinidade (25%). Dessa forma, o baixo incremento da cristalinidade dos NCAQ pode ser relacionado às características da amilopectina do amido de quinoa, a qual apresenta

uma elevada quantidade de cadeias curtas de 8 a 12 unidades (INOUCHI et al. 1999) e uma alta percentagem de cadeias tipo A (10,4%, DP 6-8) (LI, ZHU, 2017a).

Tabela 4 - Cristalinidade relativa dos amidos de quinoa (AQ) e de milho ceroso (AMC), e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos (30, 35 e 40) °C e de milho ceroso (NCAMC) produzidos a 40 °C

Amostra	Cristalinidade relativa (%)
AQ	26,57
NCAQ 30 °C	34,32
NCAQ 35 °C	34,79
NCAQ 40 °C	36,16
AMC	33,75
NCAMC 40°C	48,00

Fonte: Própria autoria

5.3.2. Morfologia

As Micrografias eletrônicas de varredura evidenciaram que a temperatura da hidrólise ácida do amido de quinoa afetou a forma e o tamanho dos NCAQ (Figura 18). Os NCAQ produzidos a 30 °C (Figura 18a) apresentaram forma irregular e maior tamanho, enquanto que os NCAQ produzidos a 35 °C (Figura 18b) mostraram forma de paralelepípedo com tamanho nanométrico e exibiram a presença de algumas estruturas cônicas, que provavelmente correspondem a regiões cristalinas parcialmente hidrolisadas. A forma dos NCAQ e NCAMC produzidos a 40 °C foi difícil de observar devido à formação de agregados (Figura 18c,d), embora a forma individual de paralelepípedo e tamanho nanométrico pode ser distinguida nos NCAMC (Figura 18d).

Figura 18 - Micrografias eletrônicas de varredura dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a a) 30 °C, b) 35 °C e c) 40 °C, e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC) produzidos a d) 40 °C

Fonte: Própria autoria

Diversos estudos relacionaram a forma dos NCA à configuração de empacotamento das duplas hélices de amilopectina nos amidos, uma vez que formas quadradas e de paralelepípedos foram observadas para amidos do tipo A e formas arredondadas para amidos do tipo B (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011; MUKURUMBIRA et al., 2017; DE LA CONCHA et al., 2018). Dessa forma, os NCAQ produzidos a 35 °C e os NCAMC a 40 °C apresentaram uma morfologia esperada devido ao seu padrão cristalino tipo A.

A morfologia dos NCAQ e NCAMC também foi observada por microscopia de força atômica (Figura 19). Nessas micrografias é possível observar a presença de NCAQ e NCAMC com tamanhos nanométricos nas diferentes temperaturas estudadas. Os perfis de linha de altura (Figura 19, coluna da direita) extraídos das posições das setas azuis mostraram que os tamanhos individuais desses nanocristais estavam compreendidos no intervalo de (50 a 100) nm no eixo maior (diâmetro) e de (5 a 8) nm no eixo menor (espessura). Essas dimensões foram similares aos diâmetros de (47 a 118) nm e à espessura de (3 a 8) nm observados por LeCorre, Bras e Dufresne (2012) em NCA de diferentes fontes botânicas. Dessa mesma forma, usando perfis de linha de altura foi estimado que o tamanho das estruturas cônicas observadas nos NCAQ produzidos a 35 °C está compreendido entre (100 e 300) nm no eixo maior (diâmetro) e de 30 a 90 nm no eixo menor (espessura). Na Figura 19 também pode se observar que os NCAQ e NCAMC se apresentam principalmente como agregados.

A formação de agregados nos NCA foi amplamente relatada na produção de NCA de diferentes fontes botânicas como amido de milho ceroso (1 a 5 μm) (ANGELLIER et al., 2004) e amido de milho normal (823 nm) (CONDÉS et al., 2015). Esse comportamento foi atribuído à presença de um elevado número de grupos hidroxilas presentes na superfície dos NCA, os quais favorecem sua associação por ligação de hidrogênio (GARCÍA, N. et al., 2009).

Figura 19 - Micrografias de força atômica e perfis de linha de altura dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a a) 30 °C, b) 35 °C e c) 40 °C, e dos nanocristais de milho ceroso (NCAMC) produzidos a d) 40 °C

Fonte: Própria autoria

5.3.3. Distribuição de tamanho

A distribuição de tamanho dos NCAQ e NCAMC, medidos em pH ~5,8, é apresentada na Figura 20. Nessa figura pode se observar que o incremento da temperatura na hidrólise ácida afetou a distribuição do tamanho de partícula dos NCAQ. Os NCAQ produzidos a 30 °C mostraram distribuição unimodal com tamanho em torno de 1000 nm. Nas temperaturas de 35 e 40 °C, os NCA apresentaram distribuição de tamanho de partículas bimodal, com duas populações, uma no intervalo de 60 a 200 nm e a outra, no intervalo de 400 a 900 nm. A população de maior tamanho está associada a formação de agregados, conforme foi observado por MEV e MFA.

Hao et al. (2018) e Wei et al (2014b) também mostraram um comportamento similar na distribuição de tamanho de NCA de batata ceroso e de milho ceroso quando as dispersões foram analisadas em pH 7,0.

Figura 20 - Distribuição de tamanho de partícula por intensidade dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC) produzidos a 40 °C.

Fonte: Própria autoria

O diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade e pH das dispersões dos NCAQ e NCAMC estão apresentados na Tabela 5. Os valores de diâmetro dos NCAQ diminuíram com o aumento da temperatura de hidrólise de 30 para 40 °C. Os NCAQ produzidos a 30 °C apresentaram o maior diâmetro médio e menor índice de polidispersividade, o que indicou que esses resíduos se apresentaram principalmente como partículas e aglomerados de aproximadamente 1000 nm de diâmetro. Os NCAQ obtidos a (35 e 40) °C apresentaram diâmetros hidrodinâmicos similares aos reportados para NCA de amaranço (374 nm) (DE LA CONCHA et al., 2018) e de taro (220 a 263 nm) (MUKURUMBIRA et al., 2017) medidos em concentrações de 0,01 a 0,02% e homogeneizados em banho de ultrassom. Na temperatura de 40 °C, os NCAQ apresentaram menor diâmetro hidrodinâmico que os NCAMC, o que pode ser associado a uma maior percentagem de hidrólise ácida e também à formação de agregados de menor tamanho. O diâmetro médio hidrodinâmico dos NCAMC foi menor que o determinado por De la Concha et al. (2018) (462 nm) para NCA de milho ceroso, medido a partir de dispersões com 0,01% (m/v) previamente homogeneizadas por 50 segundos em banho de ultrassom (50 Hz), e menor que o obtido por Condés et al. (2015) (1287 nm) determinado a partir da concentração de 0,05% (v/v) sem prévia homogeneização.

Tabela 5 - Diâmetro médio e índice de polidispersividade (IPD) dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos (30, 35 e 40) °C e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC) produzidos a 40 °C

Amostra	Diâmetro médio (nm)	IPD	pH
NCAQ 30°C	1056,70 ± 19,84 ^a	0,08 ± 0,01 ^b	5,65 ± 0,06
NCAQ 35°C	369,80 ± 4,01 ^b	0,32 ± 0,02 ^a	5,80 ± 0,01
NCAQ 40°C	243,43 ± 1,54 ^c	0,34 ± 0,01 ^a	5,93 ± 0,02
NCAMC 40°C	394,80 ± 9,85 ^b	0,31 ± 0,01 ^a	5,74 ± 0,08

Valores médios ± desvio padrão. Índice de polidispersividade (IPD). Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

5.3.4. Propriedades Térmicas

As curvas de fluxo de calor em excesso de água dos NCAQ e NCAMC, e seus amidos são apresentadas na Figura 21. As transições térmicas correspondem aos picos endotérmicos dessas figuras e são associadas a fenômenos de fusão de cristalitos para os NCA e de gelatinização para o amido. O intervalo de temperatura (início e final do pico) e a variação de entalpias também foram determinados e esses valores são apresentados na Tabela 6.

Figura 21 - Curvas de fluxo de calor: a) do amido de quinoa (AQ) e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C e b) do amido de milho ceroso (AMC) e dos nanocristais de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C

Fonte: Própria autoria

O incremento da temperatura de (30 a 40) °C diminuiu a temperatura de pico (T_p) dos NCAQ (Tabela 6). Os NCAQ produzidos a (30 e 35) °C apresentaram temperatura de pico em (87-88) °C e para os produzidos a 40 °C, essa temperatura foi de 74 °C, valor menor que o obtido para os NCAMC na mesma temperatura. A diminuição observada nos NCAQ obtidos a 40 °C poderia ser atribuída à obtenção de cristalitos imperfeitos devido a uma maior hidrólise das regiões cristalinas nessa temperatura.

Tabela 6 - Propriedades térmicas do amido de quinoa (AQ), amido de milho ceroso (AMC), e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C e de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C

Amostra	T_p (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g) ¹	T_d
AQ	66,7 ± 0,5 ^d	29,02	10,9 ± 2,0 ^a	299,0
NCAQ 30°C	86,4 ± 2,1 ^{a,b}	45,52	14,4 ± 1,4 ^a	290,3
NCAQ 35°C	88,0 ± 2,2 ^a	33,98	19,1 ± 6,3 ^a	276,4
NCAQ 40°C	74,4 ± 3,1 ^c	36,29	14,1 ± 3,9 ^a	269,4
AMC	73,8 ± 0,2 ^c	22,24	16,8 ± 0,6 ^a	296,7
NCAMC 40°C	80,2 ± 2,1 ^{b,c}	28,15	13,3 ± 3,4 ^a	279,1

Valores médios ± desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras minúsculas diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ¹Resultados expressos em J/g de amido (base seca). T_p , temperatura de pico; $\Delta T = T_c - T_o$; ΔH , variação de entalpia. T_d , temperatura de início de decomposição.

Fonte: Própria autoria

Independentemente da sua temperatura de produção, os NCAQ e NCAMC mostraram um aumento significativo na T_p quando comparados a seus amidos nativos, o que pode estar relacionado a diversos fatores como a maior cristalinidade e maior compactação das partes cristalinas dos resíduos devido às ligações de hidrogênio após a liofilização (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012). Esse incremento também foi observado em NCA de diversas fontes botânicas, tais como amidos de mandioca, de milho normal e de batata (COSTA et al. 2017) e amidos de milho ceroso, *amilomaize*, de trigo e de batata (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012).

Os NCAQ também apresentaram variações no intervalo de temperatura (ΔT) em função da sua temperatura de produção. Os NCAQ produzidos a 30 °C mostraram a maior ΔT (45,52 °C), sugerindo maior heterogeneidade nos cristalitos, o que pode

estar relacionado com a obtenção de estruturas cristalinas com diferentes graus de hidrólise e tamanhos. Enquanto, os produzidos a (35 e 40) °C apresentaram menores ΔT de 33,98 °C e 36,29 °C, respectivamente; sugerindo a obtenção de cristais mais homogêneos.

Os NCAQ e NCAMC não apresentaram diferenças significativas na entalpia em relação à sua temperatura de produção e nem comparado a seus amidos nativos. Costa et al. (2017) também verificaram que após 5 dias de hidrólise ácida, os NCA de mandioca e de milho não apresentaram diferenças na entalpia quando comparados a seus amidos nativos. No entanto, Kim et al. (2012) observaram que a entalpia dos NCA de milho ceroso e de milho normal aumentou após 7 dias de hidrólise ácida e justificaram esse comportamento pela clivagem das cadeias de amido, o que poderia levar à rearranjos de cadeia e aumentar a cristalinidade relativa.

As curvas termogravimétricas dos NCA e seus amidos nativos permitiram estudar e comparar a estabilidade térmica desses materiais. Todas as curvas mostraram perfis similares com dois estágios bem diferenciados (Figura 22). O primeiro estágio da curva compreendido entre (60 e 150) °C correspondeu à evaporação da água livre das amostras (CHEN et al., 2017) e o segundo estágio compreendido de (250 a 370) °C pode ser atribuído à decomposição das unidades glicosídicas dos resíduos e seus amidos (COSTA et al., 2017).

O incremento na temperatura de produção de 30 para 40 °C diminuiu a temperatura de início de decomposição (T_d) (Tabela 6) e, portanto, sua estabilidade térmica. Os NCAQ produzidos 30 °C apresentaram T_d de 290°C, a qual foi mais próxima à T_d do amido nativo (299 °C), provavelmente devido a seu maior tamanho e à obtenção de materiais com diferentes graus de hidrólise. Neste sentido, LeCorre, Bras e Dufresne (2012) constataram que quanto maior o tamanho dos NCA tem se menor área de superfície específica e, conseqüentemente uma menor quantidade de grupos sulfatos podem catalisar a reação, o que resulta em uma T_d maior, semelhante à do amido nativo. A T_d dos NCAQ produzidos a (35 e 40) °C foram de (276 e 269) °C, respectivamente, o que sugere uma diferença muito pequena na estabilidade térmica desses nanocristais. Os NCAQ produzidos a 40 °C apresentaram menor T_d do que os NCAMC (279 °C).

Independentemente da temperatura de produção, a decomposição térmica iniciou primeiro nos NCA que nos amidos nativos. Esse comportamento foi similar ao observado por Xu et al. (2014), por LeCorre, Bras e Dufresne (2012) e por

Mukurumbira et al. (2017) em NCA de diferentes fontes botânicas, o que foi atribuído à presença de grupos sulfatos na superfície dos NCA que catalisam a reação de despolimerização das amostras (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2012).

Figura 22 - Curvas termogravimétricas: a) do amido de quinoa (AQ) e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos a (30, 35 e 40) °C, e b) do amido de milho ceroso (AMC) e dos nanocristais de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C

Fonte: Própria autoria

5.3.5. Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros FTIR dos NCAQ mostraram que o incremento da temperatura de hidrólise ácida de 30 para 40 °C aumentou progressivamente a intensidade da transmitância das bandas dos grupos funcionais do amido (Figura 23); esse comportamento foi mais evidente nas bandas localizadas em torno a 3300 cm^{-1} (O-H), 2931 cm^{-1} (C-H), 1645 cm^{-1} (O-H), 1015 cm^{-1} (C-O-C) e 860 cm^{-1} (C-O-C) (KIZIL; IRUDAYARAJ; SEETHARAMAN, 2002). Os NCAQ produzidos a 40 °C mostraram um maior incremento na intensidade dessas bandas que os NCAMC, o que pode estar relacionado à maior extensão da hidrólise do amido de quinoa. Especificamente, o incremento observado na intensidade das bandas em 3312 cm^{-1} e 3293 cm^{-1} pode ser atribuído a mudanças nas ligações de hidrogênio das moléculas de amido resultantes da hidrólise (MUKURUMBIRA et al., 2017), enquanto que o observado em 2930 cm^{-1} pode ser atribuído à variação da proporção de amilose e amilopectina (KIZIL; IRUDAYARAJ; SEETHARAMAN, 2002). O incremento na intensidade da banda em 1045 cm^{-1} pode ser relacionado à presença de estruturas mais ordenadas (SEVENOU et al., 2002); por sua vez o incremento em 1015 cm^{-1} e 997 cm^{-1} pode ser associado à hidrólise da região amorfa (SEVENOU et al., 2002). Wei et al. (2014a) mencionaram que o incremento observado na intensidade da banda em 861 cm^{-1} pode ser atribuído à vibração da ligação C-O-S devido à formação de grupos éster sulfato durante a hidrólise com H_2SO_4 . Em geral, os espectros FTIR dos NCA foram similares aos obtidos para os amidos nativos, o que sugere que a maioria de grupos funcionais permaneceram após a hidrólise ácida. Esse comportamento também foi observado em NCA de batata (HAO et al., 2018), de milho ceroso (GONG et al., 2016; YANG et al., 2018; WEI et al., 2014a) e de taro (MUKURUMBIRA et al., 2017).

Figura 23 - Espectros FTIR: a) do amido de quinoa (AQ) e dos nanocristais de AQ (NCAQ) produzidos a 30, 35 e 40 °C, e b) do amido de milho ceroso (AMC) e dos nanocristais de AMC (NCAMC) produzidos a 40 °C

Fonte: Própria autoria

5.3.6. Potencial zeta

O potencial zeta desempenha um papel importante na determinação da estabilidade coloidal de nanopartículas em soluções aquosas (PRATHAPAN et al., 2016). O incremento da temperatura da hidrólise ácida do amido de quinoa afetou o potencial zeta de seus NCA, sendo que NCAQ produzidos a (35 e 40) °C apresentaram os maiores valores (Tabela 7). O valor do potencial zeta para os NCAQ produzidos a 40 °C foi similar ao dos NCAMC. O potencial zeta negativo dos nanocristais de amidos pode ser atribuído à presença de grupos carboxila e grupos ésteres sulfato na sua superfície, os quais são característicos nos NCA produzidos com ácido sulfúrico (WEI et al., 2014a).

HAO et al. (2018) determinaram um valor de potencial zeta de -14 mV a pH 7,0 para os NCA de batata cerosa, valor ligeiramente menor que os observados na Tabela 7. Essa diferença que pode estar relacionada com a fonte botânica e também com o processo de produção, que nesse caso, o amido de batata foi pré-tratado com glucoamilases seguido da hidrólise ácida. Por outro lado, Jiang et al. (2016) obtiveram potencial zeta de -27 mV em pH 7,0 para os NCA de milho ceroso produzidos por hidrólise ácida, esse valor foi maior que os apresentados na Tabela 7; provavelmente devido à diferença no pH das dispersões.

Ressalta-se que os NCA podem atingir valores de potencial zeta de até -32,3 mV quando o pH no meio é de 10,6, devido à desprotonação dos grupos carboxila e ésteres sulfato contribuindo à formação de suspensões estáveis (≥ 30 mV) (WEI et al., 2014a). Os resultados mostraram que os NCAQ e NCAMC produzem dispersões relativamente estáveis (± 10 a 20 mV) (BHATTACHARJEE, 2016) quando medidos em pH ~5,9.

Tabela 7 - Potencial zeta dos nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) produzidos a 30, 35 e 40 °C e dos nanocristais de amido de milho ceroso (NCAMC), a 40 °C

Amostra	Potencial Zeta (mV)	pH
NCAQ 30 °C	-18,46 ± 0,67 ^b	5,85 ± 0,04
NCAQ 35 °C	-19,97 ± 0,88 ^{a,b}	6,00 ± 0,04
NCAQ 40 °C	-21,01 ± 1,78 ^a	6,11 ± 0,05
NCAMC 40 °C	-20,39 ± 0,96 ^{a,b}	5,99 ± 0,11

Valores médios ± desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Fonte: Própria autoria

5.4. Seleção dos nanocristais de amido de quinoa para aplicação em filmes

Após a caracterização dos NCAQ quanto a morfologia, a cristalinidade, ao tamanho das partículas e as propriedades térmicas, e a comparação com os NCAMC; pode se concluir que NCAQ somente foram produzidos por hidrólise ácida nas temperaturas 35 e 40 °C. O tamanho nanométrico e a morfologia de paralelepípedo desses NCAQ indicaram que podem ser usados como nano-reforços em filmes biocompósitos.

Considerando o maior rendimento da hidrólise e a maior temperatura de fusão, os NCAQ produzidos a 35 °C foram selecionados para a adição em filmes de amido de mandioca. O efeito da concentração dos NCAQ sobre a morfologia e as propriedades físicas de filmes de amido de mandioca são apresentados na sequência (seção 5.5).

5.5. Caracterização dos filmes de amido reforçados com nanocristais de amido

5.5.1. Aspecto visual, espessura, umidade e solubilidade em água

Os filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ apresentaram aspecto homogêneo (Figura 24), sendo facilmente retirados das placas de poliestireno. No entanto, a adição de NCAQ implicou em leves alterações visuais nos filmes quando comparados ao filme controle (NCAQ 0%) (Figura 24a).

Figura 24 – Imagens representativas dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações: a) 0%, b) 2,5%, c) 5,0% e d) 7,5%.

Fonte: Própria autoria

A espessura dos filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ é apresentada na Tabela 8. Esses valores mostraram que todos os filmes apresentaram uma espessura média de aproximadamente 0,100 mm e que a adição de NCAQ nas concentrações de 0 a 7,5% não influenciou significativamente a espessura média dos filmes de amido. Esse resultado corrobora com os obtidos por Condés et al. (2015) e Costa (2017), que não observaram alterações significativas na espessura de filmes de proteína reforçados com NCA de milho ceroso e de milho normal em concentrações de 0% a 12% (~70 μ m), e de filmes de amido de mandioca reforçados com NCA de batata, de milho e de mandioca em concentrações de 1% a 5% (~0,100 mm), respectivamente. No entanto, Li et al. (2015) concluíram que a adição de NCA de milho ceroso nas concentrações de 1% a 9% em filmes de amido de ervilha aumentou significativamente a espessura desses filmes de 104 a 131 μ m.

Tabela 8 - Espessura, umidade e solubilidade em água dos filmes de amido de mandioca reforçados com diferentes concentrações de nanocristais de amido de quinoa (C_{NCAQ})

C_{NCAQ} (%)	Espessura (mm)	Umidade (%)	Solubilidade (%)
0,0	$0,103 \pm 0,002$	$11,84 \pm 0,42$	$25,11 \pm 1,39^a$
2,5	$0,102 \pm 0,003$	$10,95 \pm 0,57$	$24,33 \pm 0,65^a$
5,0	$0,100 \pm 0,003$	$10,49 \pm 0,31$	$22,88 \pm 0,95^a$
7,5	$0,106 \pm 0,002$	$10,72 \pm 0,38$	$23,86 \pm 0,70^a$

Valores médios $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Própria autoria

A umidade dos filmes foi aproximadamente 11% (Tabela 8), sem alterações significativas desse valor com adição de NCAQ. Esse resultado difere do obtido por Li et al. (2015), que verificaram um decréscimo na umidade de 38 para 26% nos filmes de amido de ervilha com o aumento da concentração NCA de milho ceroso. Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) investigaram o efeito da adição de NCA de taro nas propriedades de filmes de amido de taro e de batata e verificaram que a umidade dos filmes de amido de taro diminuiu com a adição desses nanocristais em concentrações de 5 a 10%, porém este efeito não foi observado para os filmes de

amido de batata, que apresentaram uma umidade média de 16%, independentemente da quantidade de reforço adicionada.

A solubilidade dos filmes de amido de mandioca foi aproximadamente 24% (Tabela 8) e não foi afetada pela adição de NCA. Esse comportamento também foi observado em filmes de amido de taro e de batata reforçados com NCA de taro (5 a 10%) (MUKURUMBIRA; MELLEM; AMONSOU, 2017) e em filmes de proteína de amaranto reforçados com NCA de milho ceroso (3 a 9%) (CONDÉS et al., 2015). No entanto, Costa (2017) verificou que a solubilidade dos filmes de amido de mandioca incrementou em aproximadamente 10% com adição de NCA de batata, de mandioca e de milho nas concentrações de 1, 3 e 5%. A diferença observada nesses comportamentos poderia ser atribuída às propriedades dos NCA de diferentes origens botânicas e sua interação com a matriz de amido.

Os valores de solubilidade em água dos filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ (Tabela 8) foram menores que os obtidos por Mukurumbira, Mellem e Amounsou (2017) para filmes de amido de batata (30%) e taro (35%) reforçados com NCA de taro e, por sua vez, menores que os obtidos por Costa (2017) para filmes de amido de mandioca reforçados com NCA de batata (~38%), de mandioca (~39%) e de milho (37%). As diferenças entre esses valores podem ser atribuídas ao maior conteúdo de glicerol usado na produção dos filmes (30%) por esses autores e a variações no método de determinação da solubilidade, já que os filmes produzidos por Costa (2017) foram imersos por 48 h em água destilada.

5.5.2. Padrões de difração de raios X

A difração de raios X foi usada para observar as mudanças estruturais na matriz dos filmes de amido após a adição dos NCAQ. Os difratogramas de raios X dos filmes de amido de mandioca se caracterizaram por apresentar um amplo pico em torno de 20° (Figura 25), que está associado à presença de material amorfo nos filmes (ANGELLIER et al., 2006). O aumento da concentração de NCAQ de (2,5 a 7,5)% nos filmes implicou no aparecimento de picos do padrão cristalino tipo A (15°, 17° e ~23°) e um leve incremento da intensidade do pico central, o que confirmou a presença dos NCAQ e a preservação da sua cristalinidade após o processamento dos filmes. Angellier et al. (2006) e Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) produziram filmes de amido de milho ceroso reforçados com NCA de milho ceroso (5 a 15%) e filmes de

amidos de batata e de taro reforçados com NCA de taro (2,5 a 10%), respectivamente. Esses autores também observaram que a adição de NCA resultou em picos do padrão cristalino da fonte de amido usada na produção de NCA e no aumento da magnitude desses picos em função da sua concentração.

Figura 25 - Padrões de difração de raios X dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações.

Fonte: Própria autoria

5.5.3. Morfologia

As micrografias de força atômica da superfície de secagem dos filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ em 2D e 3D estão apresentadas na Figura 26. As micrografias permitiram observar que os filmes apresentaram uma superfície irregular e rugosa, e que a adição de NCAQ incrementou essas características quando comparados visualmente ao filme controle (Figura 26a,b). O aumento da rugosidade na superfície de secagem também foi observado em filmes de amido de mandioca reforçados com NCA de mandioca (GARCIA, N. et al., 2009), em filmes de amido de ervilha reforçados com NCA de milho ceroso (LI et al., 2015), e em filmes de amido

de batata e de taro reforçados com NCA de taro e (MUKURUMBIRA; MELLEM; AMONSOU, 2017).

Os valores de rugosidade média (R_a) e da raiz quadrática da rugosidade média (R_q) dos filmes de amido de mandioca são apresentados na Tabela 9. A adição de NCAQ em contrações de 5% e 7,5% aumentaram significativamente a rugosidade dos filmes, possivelmente devido à formação de agregados entre os NCAQ e às interações entre a amilose e os NCAQ durante a secagem do filme. Os valores de R_a e R_q dos filmes de amido de mandioca controle e com reforço de 2,5% de NCAQ foram similares aos observados em filmes de amido de mandioca reforçados com laponita em concentrações de 0 a 6% (VALENCIA et al., 2018) e aos valores de rugosidade de filmes de amido de milho ceroso (JIMENÉZ et al., 2012b).

Tabela 9 - Rugosidade média (R_a) e raiz quadrática da rugosidade média (R_q) dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})

C_{NCAQ} (%)	R_a (nm)	R_q (nm)
0	85,44 ± 1,05 ^b	108,14 ± 1,95 ^b
2,5	102,27 ± 6,42 ^b	128,65 ± 6,89 ^b
5,0	205,33 ± 8,18 ^a	261,33 ± 17,33 ^a
7,5	247,33 ± 33,09 ^a	309,33 ± 39,38 ^a

Valores médios ± desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

Figura 26 - Micrografias de força atômica dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em concentrações: a,b) 0%; c,d) 2,5%; e,f) 5,0% e g,h) 7,5%

Fonte: Própria autoria

5.5.4. Ângulo de contato

Os valores de ângulo de contato dos filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ, para um tempo de 30 segundos, estão apresentados na Tabela 10. Os filmes reforçados com 5,0% e 7,5% de NCAQ apresentaram os maiores valores de ângulo de contato. O filme controle e o reforçado com NCAQ na concentração de 2,5% apresentaram valores de ângulo de contato $< 65^\circ$, sendo classificados como superfícies hidrofílicas, enquanto que os reforçados com NCAQ nas concentrações de 5,0 e 7,5% apresentaram valores $> 65^\circ$ correspondendo a superfícies hidrofóbicas (VOGLER, 1998); o que sugere que o aumento da concentração de NCAQ aumentou a hidrofobicidade da superfície do filme. Esse comportamento não foi esperado pois a matriz e o reforço apresentavam natureza hidrofílica, além de que o incremento da rugosidade superficial do filme (seção 5.5.3) foi associado à diminuição do ângulo de contato em filmes de amido de mandioca reforçado com laponita (Valencia et al., 2018). Embora neste estudo os incrementos na rugosidade dos filmes foram muito maiores, 140% e 189% para as concentrações de 5,0 e 7,5% devido à formação de aglomerados na superfície de secagem, que neste caso poderiam ter formado uma estrutura mais compacta e fechada.

Os valores de ângulo de contato do filme controle foram próximos aos reportados por Valencia et al. (2018) para a superfície de secagem de filmes de amido de mandioca plastificados com glicerol (55°).

Tabela 10 – Ângulo de contato dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})

C_{SNC} (%)	Ângulo de contato ($^\circ$) (t = 30 s)
0,0	$47,94 \pm 2,3^b$
2,5	$57,77 \pm 2,8^b$
5,0	$75,27 \pm 2,8^a$
7,5	$73,49 \pm 1,4^a$

Valores médios $\pm$ desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

5.5.5. Propriedades mecânicas

Exemplos de curvas tensão-deformação, dos testes de tração, para os filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ nas diferentes concentrações são apresentados na Figura 27.

Figura 27 - Curvas tensão-deformação dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações.

Fonte: Própria autoria

A resistência à tração, a tensão na ruptura e o módulo elástico dos filmes de amido de mandioca aumentaram com o incremento da concentração de 0 a 5% de NCAQ, enquanto que a deformação na ruptura desses filmes diminuiu (Tabela 11). Esse comportamento também foi reportado em filmes de amido de arroz reforçados com NCA de arroz em concentrações de 5 a 30% (PIYADA; WARANYOU; THAWIEN, 2013); em filmes de amido de batata e de taro reforçados com NCA de taro (2,5 a

10%) (MUKURUMBIRA; MELLEM; AMONSOU, 2017) e em filmes de amido de ervilha reforçados com NCA de milho ceroso (3 a 9%) (LI et al., 2015).

O filme reforçado com 5% de NCAQ apresentou o maior incremento na resistência à tração (149%) e no módulo elástico (134%) sem diferenças significativas na deformação na ruptura quando comparado ao filme controle, possivelmente devido a uma distribuição mais uniforme dos NCAQ nessa concentração dentro da matriz filmogênica. Esse aumento da resistência à tração foi maior que o obtido por Li et al. (2015) para filmes de amido de ervilha reforçados com NCA de milho ceroso na concentração de 5% (73%) com diminuição da deformação na ruptura de até 56%.

Segundo Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) e Piyada et al. (2013) o incremento da resistência à tração com a adição de NCA poderia ser atribuído à fortes ligações interfaciais entre o reforço e a matriz, as quais permitem a transferência efetiva da tensão da matriz para o reforço. No entanto, quando concentração de NCAQ foi de 7,5%, os valores de resistência à tração dos filmes diminuíram significativamente quando comparados à concentração de 5%. Uma possível explicação para esse comportamento é uma maior formação de agregados de NCAQ na concentração de 7,5%, o que diminui a área superficial dos nanocristais para possíveis interações com a matriz filmogênica (DAI et al., 2015).

Tabela 11 - Propriedades mecânicas dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})

C_{NCAQ} (%)	RT (MPa)	TR (MPa)	DR (%)	M (MPa/%)
0%	$6,51 \pm 0,49^c$	$4,97 \pm 0,32^c$	$10,23 \pm 1,00^a$	$2,82 \pm 0,19^c$
2,5%	$8,42 \pm 0,48^{b,c}$	$6,81 \pm 0,32^{b,c}$	$7,43 \pm 0,88^b$	$3,68 \pm 0,19^{b,c}$
5,0%	$16,53 \pm 2,53^a$	$12,39 \pm 1,68^a$	$8,72 \pm 0,59^{a,b}$	$6,61 \pm 0,82^a$
7,5%	$11,85 \pm 0,28^b$	$9,24 \pm 0,43^b$	$7,11 \pm 0,74^b$	$4,79 \pm 0,12^b$

Valores médios $\pm$ desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). RT, resistência à tração; TR, tensão na ruptura; DR, deformação na ruptura; M, módulo elástico.

Fonte: Própria autoria

5.5.6. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes controle e reforçados com NCAQ é apresentada na Tabela 12. A PVA diminuiu significativamente em 17% com a adição de 5% de NCAQ em relação ao filme controle, o que pode ser atribuído a uma melhor dispersibilidade dos nanocristais na matriz filmogênica nessa concentração e à formação de um caminho tortuoso mais longo para a passagem das moléculas de água (DAI et al., 2015). No entanto, para a concentração de 7,5% de NCAQ não foi observada diferença da PVA em relação ao filme controle, possivelmente devido a uma maior agregação dos NCAQ (LI et al., 2015). García et al. (2009), Li et al. (2015) e Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) também observaram uma redução de PVA em filmes de amido de mandioca reforçados com NCA de mandioca de até 40%, em filmes de amido de ervilha reforçados com NCA de milho ceroso, de até 60%, e em filmes de amido de batata e de taro com a adição de taro, de até 17 e 22%; respectivamente. No entanto, Gonzáles et al. (2015) produziram filmes de amido de milho normal e reforçados com NCA de milho ceroso nas concentrações de 1 a 5% e não observaram diferenças significativas na PVA.

Os valores de PVA dos filmes obtidos neste estudo foram similares aos informados por Monteiro et al. (2018) (0,49 a 0,51 g·mm/kPa·m²·h) para filmes de amido mandioca reforçado com 2,5% de bentonita e menor ao reportado para filmes de amido de banana (PELLISSARI et al., 2014) (0,72 g·mm/kPa·m²·h); ambos plastificados com glicerol em concentrações de ~20%.

Tabela 12 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})

C _{NCAQ} (%)	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)
0,0	0,54 ± 0,01 ^a
2,5	0,50 ± 0,01 ^{a,b}
5,0	0,45 ± 0,03 ^b
7,5	0,52 ± 0,03 ^{ab}

Valores médios ± desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

5.5.7. Propriedades Térmicas

Exemplos de curvas de fluxo de calor dos filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ em diferentes concentrações são apresentados na Figura 28.

Figura 28 –Curvas de fluxo de calor dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações

Fonte: Própria autoria

As temperaturas das transições endotérmicas observadas nos filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ estão apresentadas na Tabela 13. Como esperado, as curvas de fluxo de calor dos filmes apresentaram duas temperaturas de transição vítrea (T_g) que podem ser atribuídas as duas fases que se originam da miscibilidade parcial do glicerol e do amido (FORSELL et al., 1997). A primeira

temperatura de transição vítrea ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) foi atribuída à fase rica em glicerol, já que o glicerol puro apresenta uma T_g de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (STADING; RINDLAV-WESTLING; GATENHOLM, 2001) e esta temperatura permanece constante, independentemente da concentração de NCAQ, sugerindo que o reforço não perturbou a mobilidade da fase rica em glicerol. Angellier et al. (2006) e Viguié et al. (2007) produziram filmes de amido de milho ceroso reforçados com NCA de milho ceroso plastificados com glicerol e sorbitol, e também verificaram que independente da concentração de reforço não houve alteração da T_g do plastificante.

A segunda temperatura de transição vítrea dos filmes foi observada no intervalo de $(11,6\text{ a }23,1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabela 13), e pode ser associada à fase rica em biopolímero, já que o amido sem plastificante apresenta uma transição vítrea em torno de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (LIU et al., 2010). A T_g associada ao amido não foi afetada significativamente pela adição de NCAQ (Tabela 13), resultado que foi diferente dos observados por Viguié et al. (2007) para filmes de amido de milho ceroso reforçados com NCA de milho ceroso (5 a 15%) e por Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) para filmes de amido de batata e taro reforçados com NCA de taro (2,5 a 10%), que constaram um aumento da T_g . Segundo esses autores, o incremento da T_g é uma indicação de que a presença dos NCA dificulta a mobilidade molecular das cadeias de amilopectina devido às interações, como a ligação de hidrogênio, entre matriz de amido e os NCA.

Tabela 13 – Propriedades térmicas dos filmes de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})

C_{NCAQ} (%)	T_{gG} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{gA} ($^{\circ}\text{C}$)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_m (J/g)	T_d ($^{\circ}\text{C}$)
0	$-70,13 \pm 2,97^a$	$15,05 \pm 2,12^{a,b}$	$212,76 \pm 2,30^a$	$56,25 \pm 7,00^a$	292,1
2,5	$-71,71 \pm 2,13^a$	$11,59 \pm 2,87^{a,b}$	$208,15 \pm 5,45^a$	$60,88 \pm 3,74^a$	294,1
5,0	$-71,65 \pm 1,08^a$	$17,68 \pm 0,90^{a,b}$	$214,55 \pm 2,36^a$	$161,23 \pm 14,62^b$	294,1
7,5	$-72,23 \pm 2,13^a$	$23,08 \pm 3,48^a$	$215,83 \pm 2,50^a$	$147,21 \pm 5,91^b$	293,7

Valores médios $\pm$ desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). T_{gG} e T_{gA} , temperaturas de transição vítrea associada ao ponto médio das transições das fases ricas em glicerol e em amido, respectivamente; T_m , temperatura de fusão; ΔH_m , entalpia de fusão; e temperatura de início de decomposição (T_d)

Fonte: Própria autoria

A temperatura de fusão (T_m) não foi afetada pela adição dos NCAQ em filmes de amido de mandioca. Esse resultado é diferente dos obtidos por alguns autores (Li et al., 2015; MUKURUMBIRA; MELLEM; AMONSOU, 2017) que verificaram aumentos da T_m para filmes reforçados com NCA. Li et al. (2015) desenvolveram filmes de amido de ervilha reforçados NCA de milho ceroso em concentrações de 1 a 9% e observaram que a T_m dos filmes incrementou significativamente na concentração de 5%, esse comportamento foi atribuído à fortes interações entre os NCA e os filmes. Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) avaliaram o efeito do reforço de NCA de taro (2,5 a 10%) em filmes de amido de taro e batata e observaram que a T_m dos filmes de amido incrementou progressivamente com a adição de NCA. Esses autores atribuíram o incremento da T_m ao aumento da cristalinidade dos filmes como resultado da incorporação dos NCA. Por outro lado, Jiang et al (2016) produziram filmes de amido de ervilha reforçados com nanopartículas de amido de batata (3 a 12%) e verificam aumento na temperatura de fusão dos filmes em concentrações superiores a 9%. Dessa forma, os diferentes comportamentos observados poderiam ser relacionados às diferenças nas propriedades dos NCA empregados como reforço, o que poderia levar a diferentes resultados em função da sua concentração e interações com matriz de amido. Neste sentido, o comportamento observado na T_m poderia ser atribuído à baixa cristalinidade dos NCAQ (~35%), a qual foi menor que a cristalinidade dos NCA de taro e de milho ceroso e das nanopartículas de amido de batata (preparadas por enzimólise e recristalização), a qual nas concentrações estudadas não influenciou a T_m .

Por outro lado, a entalpia dos filmes aumentou notavelmente com a adição de NCAQ nas concentrações de 5 e 7,5% (Tabela 13), sendo que esse incremento foi maior para os filmes reforçados com 5% de NCAQ. Li et al. (2015) observaram que a entalpia dos filmes de amido de milho ceroso reforçados com NCA de milho ceroso aumentou com o aumento da concentração dos NCA de 1 a 9%, e que a concentração de 5% apresentou o maior incremento; e atribuíram esses comportamentos às interações entre o reforço e os segmentos de cadeia do filme (aumento da cristalinidade do filme) e à maior compatibilidade entre os NCA e o filme nessa concentração. Dessa forma, o maior incremento da entalpia na concentração de 5% para os filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ poderia estar relacionado à uma melhor distribuição e compatibilidade dos NCA com o filme nessa concentração, como o observado nas propriedades mecânicas e na permeabilidade ao vapor de água.

As curvas termogravimétricas dos filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ permitiram comparar a estabilidade térmica desses materiais (Figura 29). Nessa figura pode se observar que a degradação térmica dos filmes aconteceu em dois estágios bem diferenciados (Figura 29b): o primeiro estágio observado de 50 a 150 °C, que corresponde à perda de água; enquanto que o segundo estágio de 250 a 370 °C, pode ser atribuído à decomposição dos componentes dos filmes (GARCÍA, N. et al., 2009).

A adição de NCAQ aos filmes não alterou a temperatura de início de decomposição (T_d) desses materiais quando comparados ao filme controle (Tabela 13). Esse comportamento diferiu do reportado por Li et al. (2015), que observaram que concentrações de NCA de milho ceroso de 1,3 e 5% incrementaram a T_d de filmes de amido de ervilha, e que concentrações de 7 e 9% diminuíram a T_d . Uma provável explicação para o comportamento observado nos filmes com reforço, é que a baixa cristalinidade dos NCAQ não influenciou a estabilidade térmica dos filmes no intervalo de concentração estudado.

Figura 29 - Curvas termogravimétricas: a) TGA e b) DTG dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa (NCAQ) em diferentes concentrações.

Fonte: Própria autoria

5.5.8. Cor e Opacidade

Os valores dos parâmetros de cor L^* , a^* , b^* dos filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ são apresentados na Tabela 14. Esses valores indicaram que a adição de NCAQ nas concentrações de 2,5% e 5,0% não influenciaram significativamente os parâmetros de cor dos filmes. Na concentração de 7,5% de NCAQ um leve aumento nos parâmetros L^* e b^* foi observado, indicando que esses filmes apresentaram uma tonalidade mais branca e mais amarelada que os filmes controle, respectivamente. Assim também, ΔE^* dos filmes diminuiu nessa concentração, indicando que esses filmes foram mais parecidos ao padrão branco usado como referência. Li et al. (2015) também verificaram que a adição de NCA de milho ceroso em concentrações de (0 a 9)% nos filmes de amido de ervilha, produz pequenas variações nos parâmetros L^* e a^* e um aumento significativo no parâmetro b^* . No entanto, Condés et al. (2015) reportaram que a adição de NCA de milho normal e ceroso em concentrações de (3 a 12)% em filmes de proteína com pH previamente ajustado a 10,5, não alteraram os parâmetros de cor desses filmes nem o ΔE^* , comportamento que foi atribuído à boa dispersão do nanoreforço na matriz proteica nessas condições de preparo. Assim, o leve incremento observado nos parâmetros

de cor dos filmes com 7,5% de NCAQ poderia ser atribuído à formação de agregados dos NCAQ.

Tabela 14 - Parâmetros de cor e opacidade dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})

C_{NCAQ} (%)	Parâmetros de Cor				Opacidade
	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	
0,00	$91,28 \pm 0,03^c$	$-0,67 \pm 0,01^{a,b}$	$2,36 \pm 0,02^b$	$3,21 \pm 0,02^a$	$0,51 \pm 0,08^d$
2,50	$91,34 \pm 0,18^{b,c}$	$-0,67 \pm 0,01^b$	$2,45 \pm 0,02^b$	$3,12 \pm 0,18^a$	$1,19 \pm 0,18^c$
5,00	$91,67 \pm 0,12^b$	$-0,66 \pm 0,01^b$	$2,50 \pm 0,06^b$	$2,87 \pm 0,13^a$	$2,05 \pm 0,09^b$
7,50	$92,24 \pm 0,07^a$	$-0,69 \pm 0,01^a$	$2,82 \pm 0,05^a$	$2,40 \pm 0,06^b$	$3,29 \pm 0,08^a$

Valores médios $\pm$ desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

Os valores de opacidade mostraram que a incorporação de NCAQ aumentou progressivamente a opacidade dos filmes (Tabela 14). Alterações na opacidade de filmes de amido reforçados com NCA e nanopartículas de amido também foram observados por Haaj et al. (2016), Li et al. (2015), Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017), Shi et al. (2013) e Dai et al. (2015). Esses autores atribuíram o aumento da opacidade à agregação do reforço, possivelmente por ligação de hidrogênio, em uma rede percolada durante a produção do filme. Especificamente, a agregação de NCA aumentou o tamanho desses nanomateriais, no entanto, partículas com diâmetro abaixo dos 40 nm são requeridas para obter nanocompósitos transparentes (ALTHUES; HENLE; KASKEL, 2007). Nesse sentido, Li et al. (2015) e Mukurumbira, Mellem e Amonsou (2017) mencionaram que o incremento da opacidade dos filmes pode contribuir na preservação da qualidade de alimentos suscetíveis à luz. Contudo, a transparência ótica dos filmes é uma propriedade procurada com adição de nanoreforços (HAAJ et al. 2016), pois é um indicativo de boa dispersão desses materiais na matriz filmogênica.

5.5.9. Brilho

Os valores de brilho dos filmes de amido de mandioca reforçados com NCAQ, determinados nos ângulos de 20° e 60°, estão apresentados na Tabela 15. Segundo Villalobos et al. (2005), ângulos menores (20°) são apropriados para avaliar superfícies com brilho alto, enquanto que ângulos maiores (60°), permitem distinguir melhor as superfícies com brilho baixo. Contudo, os valores de brilho determinados a 20° confirmaram o observado a 60°, a adição de NCAQ nas concentrações estudadas diminuiu o brilho dos filmes quando comparados ao filme controle.

Esse comportamento pode ser atribuído à formação de agregados dos NCAQ na superfície do filme durante o processo de secagem, já que brilho do filme está relacionado com a morfologia da superfície do filme (VILLALOBOS et al. 2005). Dessa forma, esse resultado concordou com o incremento da rugosidade dos filmes na superfície de secagem (Tabela 9 e Figura 26).

O filme controle apresentou um valor de brilho similar ao reportado na literatura para filmes de amido de mandioca plastificado com glicerol (VALENCIA et al., 2018) (54 unidades, 60°). Em geral, considerando os valores de brilho obtidos a 60°, as superfícies de secagem dos filmes de amido de mandioca com e sem reforço podem ser classificados como materiais de brilho baixo (< 60 unidades) (TREZZA; KROCHTA, 2000), sendo que adição de NCAQ diminuiu drasticamente esta propriedade em concentrações maiores ou iguais a 5,0%.

Tabela 15 – Brilho dos filmes de amido de mandioca reforçados com nanocristais de amido de quinoa em diferentes concentrações (C_{NCAQ})

C _{SNC} (%)	Brilho (Unidades de brilho)	
	20°	60 °
0,0	23,5 ± 2,4 ^a	58,3 ± 5,0 ^a
2,5	13,8 ± 1,4 ^b	35,2 ± 2,6 ^b
5,0	6,5 ± 0,9 ^c	19,5 ± 0,8 ^c
7,5	3,6 ± 0,5 ^c	15,6 ± 0,3 ^c

Valores médios ± desvio padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Própria autoria

6. CONCLUSÕES

A hidrólise ácida do amido de quinoa em diferentes temperaturas resultou em diferentes velocidades de reação e rendimentos de NCA. A cinética da hidrólise ácida do amido de quinoa nas diferentes temperaturas foi descrita pelo modelo de primeira ordem e a constante de velocidade aumentou com o aumento da temperatura de hidrólise ácida do amido.

Os NCAQ apresentaram diferentes características estruturais e físicas em função da temperatura de hidrólise ácida. Partículas de amido de quinoa com tamanho micrométrico, forma irregular e cristalinidade relativa de 34%, foram produzidas a 30 °C; enquanto que NCAQ de tamanho nanométrico e micrométrico devido à formação de agregados, forma de paralelepípedo e cristalinidade de 35%, foram produzidos a 35 e 40 °C.

O tamanho nanométrico e a morfologia dos NCAQ indicaram que poderiam ser usados como nanoreforços em filmes nanocompósitos. Os NCAQ produzidos a 35 °C foram selecionados para serem aplicados em filmes de amido de mandioca devido a seu maior rendimento e maior temperatura de transição.

A propriedades físicas e estruturais dos filmes de amido de mandioca evidenciaram que a aplicação de NCAQ como reforço é viável, sendo que a concentração de 5% além de melhorar as propriedades mecânicas em até 130% também melhorou a permeabilidade ao vapor de água em 17%, aproximadamente.

REFERÊNCIAS

ABUGOCH, L. E. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, Maryland Heights, v. 58, p. 1-31, 2009.

ALILA, S. et al. Sorption potential of modified nanocrystals for the removal of aromatic organic pollutant from aqueous solution. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 33, p. 350-357, 2011.

ALTHUES, H.; HENLE, J.; KASKEL, S. Functional inorganic nanofillers for transparent polymers. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 36, 1454–1465, 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS - ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In: _____. **Annual book of ASTM standards. Designation E882-10**. Philadelphia: American Society for Testing Materials, 2010a.

_____. Standard test method for water vapor transmission of materials. In: _____. **Annual book of ASTM standards. Designation E96/E96M - 10**. Philadelphia: American Society for Testing Materials, 2010b.

AMINI, A. M.; RAZAVI, S. M. A. A fast and efficient approach to prepare starch nanocrystals from normal corn starch. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 57, p. 132-138, 2016.

ANGELLIER, H. et al. Optimization of the preparation of aqueous suspensions of waxy maize starch nanocrystals using a response surface methodology. **Biomacromolecules**, Washington, v. 5, n. 4, p. 1545-1551, 2004.

ANGELLIER, H. et al. Processing and structural properties of waxy maize starch nanocrystals reinforced natural rubber. **Macromolecules**, Washington, v. 38, n. 9, p. 3783–3792, 2005.

ANGELLIER, H. et al. Thermoplastic starch– waxy maize starch nanocrystals nanocomposites. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 2, p. 531-539, 2006.

ARAUJO-FARRO, P. C. et al. Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 81, n. 4, p. 839–848, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International** (18th ed). Gaithersburg, MD: AOAC International, 2005.

ATWELL, W. A. et al. Characterization of quinoa starch. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 60, n. 1, p. 9-11, 1983.

BAKRUDEEN, H. B.; SUDARVIZHI, C.; REDDY B. S.R. Starch nanocrystals based hydrogel: Construction, characterizations and transdermal application. **Materials science & engineering**. C, Amsterdam, v. 68, p. 880-889, 2016.

BELLO, L. A.; AGAMA-ACEVEDO, E. Starch. In VILLAR, M. A. et al. **Starch-Based Materials in Food Packaging**. London: Academic Press, 2017, cap. 1, p. 1-18.

BERTOLINI, A. **Starches: Characterization, Properties, and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2009.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 235, p. 337-351, 2016

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

BRASIL. Decreto n° 12.486 de 20 de outubro de 1978. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 21 out. 1978, p. 168. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.

BRIMER, L. Cassava production and processing and impact on biological compounds. In: **Processing and Impact on Active Components in Food**. London: Academic Press, 2015. cap. 10. p. 81-87.

BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

CHEN, P. et al. Effect of acid hydrolysis on the multi-scale structure change of starch with different amylose content. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 69, p. 359-368, 2017.

CHEN, P. et al. Morphology and microstructure of maize starches with different amylose/amylopectin content. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 58, n. 12, p. 611-615, 2006.

CONDÉS, M. C. et al. Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 47, p. 146-157, 2015.

COPELAND, L. et al. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 23, n. 6, p. 1527-1534, 2009.

COSTA, M. S. et al. Structural, thermal, and morphological characteristics of cassava amyloextrins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 98, p. 2751–2760, 2017.

COSTA, M. S. **Produção e caracterização estrutural, molecular e morfológica de nanocristais a partir de diferentes amidos e sua aplicação em biofilmes**. 2017.166 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2017.

DAI, L. et al. Characterisation of corn starch-based films reinforced with taro starch nanoparticles. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 174, p. 82-88, 2015.

DAI, L. et al. Preparation and characterization of starch nanocrystals combining ball milling with acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 180, p. 122-127, 2018.

DE LA CONCHA, B.B.S. et al. Acid hydrolysis of waxy starches with different granule size for nanocrystal production. **Journal of Cereal Science**, London, v.79, p. 198-200, 2017.

DESAI, S. K.; BERA, S.; SINGH, M.; MONDAL, D. Polyurethane-functionalized starch nanoparticles for the purification of biodiesel. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 134, n. 7, p. 44463. 2016.

DUAN, B. et al. Preparation and properties of starch nanocrystals/ carboxymethyl chitosan nanocomposite films. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 63, n. 9, p. 528-535, 2011.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUFRESNE, A. Crystalline starch based nanoparticles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Kidlington, v. 19, n. 5, p. 397-408, 2014.

DUFRESNE, A.; CAVAILLE, J-Y.; HELBERT, W. New nanocomposite materials: microcrystalline starch reinforced thermoplastic. **Macromolecules**, Washington, v. 29, n. 23, p. 7624-7626, 1996.

FALGUERA, V. et al. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 22, n. 6, p. 292-303, 2011.

FORSSELL, P. M. et al. Phase and glass transition behaviour of concentrated barley starch-glycerol-water mixtures, a model for thermoplastic starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 34, n. 4, p. 275-282, 1997

FRANCO, C. M.L; CABRAL, R.A.F; TAVARES, D. Q. Structural and physicochemical characteristics of lintnerized native and sour cassava starches. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 54, n. 10, p. 469-475, 2002.

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 32, n. 3, p. 177-191, 1997.

GARCÍA, M. A. et al. Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. In: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. (Eds.). **Edible films and coatings for food applications**. Dordrecht: Springer, 2009. cap 6. p. 169–210.

GARCÍA, N. L. et al. Physico-Mechanical Properties of Biodegradable Starch Nanocomposites. **Macromolecular Materials and Engineering**, Weinheim, v. 294, n. 3, p. 169-177, 2009.

GHASEMLOU, M.; GHARIBZAHEDI, S. M. T.; CRAN, M. J. Preparation and Characterization of Starch Nanocrystals. In Visakh P. M.; Long Y. **Starch-based Blends, Composites and Nanocomposites**. London: Royal Society of Chemistry, 2015, cap. 3, p. 60-106.

GONG, B. et al. Understanding shape and morphology of unusual tubular starch nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 151, p. 666-675, 2016.

GONTARD, N; GUILBERT, S; CUQ, J-L. Edible wheat glute films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 57, n.1, p. 190-195, 1992.

GONZÁLEZ, K. et al. Starch and cellulose nanocrystals together into thermoplastic starch bionanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 117, p. 83-90, 2015.

HAAJ, S. B. et al. Starch Nanocrystal Stabilized Pickering Emulsion Polymerization for Nanocomposites with Improved Performance. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 6, n. 11, p. 8263-8273, 2014

HAAJ, S. B. et al. Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: A comparative study. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 143, p. 310-317, 2016.

HAN, J. H. Edible Films and Coatings: A Review. In: HAN, J. H. **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. London: Academic Press, 2014. cap. 9. p. 213-255.

HAN, J. H.; ARISTIPPOS, G. Edible films and coatings: A review. In: HAN, J. H. **Innovations in Food Packaging**. New York: Academic Press, 2005. cap. 15. p. 239-262.

HAO, Y. et al. Preparation of starch nanocrystals through enzymatic pretreatment from waxy potato starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 184, p. 171-177, 2018.

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

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 45, n. 3, p. 253-267, 2001.

HOOVER, R. Starch retrogradation. **Food Reviews International**, New York, v. 11, n. 2, p. 331-346, 1995.

IMAM, S. H. et al. Chemistry, Microstructure, Processing, and Enzymatic Degradation. In: AHMED, J. et al. **Starch-Based Polymeric materials and nanocomposites: chemistry, processing, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2012. cap. 2., p. 5-32.

INOUCHI, N. et al. Characterization of amaranth and quinoa starches. **Journal of Applied Glycoscience**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 233-240, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Norme internationale: riz détermination de la teneur en amylose**; ISSO 6647. Suisse, 1987. 5 p.

JAN et al. Structural, thermal and rheological properties of starches isolated from Indian quinoa varieties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 102, p. 315-322, 2017.

JANE, J., et al. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 76, n. 5, p. 629-637, 1999.

- JANE, J-L. Structural features of starch granules II. In: BEMILLER, J. N; WHISTLER, R. **Starch: Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, 2009. cap. 6, p. 193-236.
- JIANG, S. et al. Physicochemical properties of starch nanocomposite films enhanced by self-assembled potato starch nanoparticles. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 69, p. 251–257, 2016.
- JIMÉNEZ, A. et al. Edible and biodegradable starch films: a review. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 6, p. 2058-2076, 2012a.
- KASEMSUWAN, T. et al. Characterization of the dominant mutant amylose extender (Ae1-5180) maize starch. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 72, n. 5, p. 457–464, 1995.
- KIM, H-Y. et al. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 64, n. 5, p. 367-373, 2012.
- KIM, H-Y. et al. Effect of ultrasonic treatments on nanoparticle preparation of acid-hydrolyzed waxy maize starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 93, n. 2, p. 582-588, 2013a.
- KIM, H-Y.; PARK, S. S.; LIM, S.-T. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 126, p. 607-620, 2015.
- KIM, H-Y. et al. Preparation of crystalline starch nanoparticles using cold acid hydrolysis and ultrasonication. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 295-301, 2013b.
- KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J.; SEETHARAMAN, K. Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n.14, p. 3912-3918, 2002.
- KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 68, n. 1, p. 146-158, 2007.
- LAOHAKUNJIT, N.; NOOMHORM, A. Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 56, n. 8, p. 348-356, 2004.
- LE CORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: a review. **Biomacromolecules**, Washington, v. 11, n. 5, p. 1139-1153, 2010.
- LE CORRE, D; ANGELLIER-COUSSY, H. Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 85, p. 97-120, 2014.
- LECORRE, D. et al. Enzymatic pretreatment for preparing starch nanocrystals. **Biomacromolecules**, Washington, v. 13, n. 1, p. 132-137, 2012.
- LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of botanic origin and amylose content on the morphology of starch nanocrystals. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 13, n. 12, p. 7193-7208, 2011.
- LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of native starch's properties on starch nanocrystals thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 87, n. 1, p. 658-666, 2012.

LI, C.; SUN, P.; YANG, C. Emulsion stabilized by starch nanocrystals. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 64, n. 6, p. 497-502, 2012.

LI, G.; WANG, S.; ZHU, F. Physicochemical properties of quinoa starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 137, p. 328-338, 2016.

LI, G.; ZHU, F. Amylopectin molecular structure in relation to physicochemical properties of quinoa starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 164, p. 396-402, 2017b.

LI, G.; ZHU, F. Molecular structure of quinoa starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v.158, p. 124–132, 2017a.

LI, J-Y; YEH, A-I. Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. **Journal of Food Engineering**, London, v. 50, n. 3, p. 141-148, 2001.

LI, X. et al. Mechanical, barrier and morphological properties of starch nanocrystals-reinforced pea starch films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 121, p. 155-162, 2015.

LIN, N. et al. Effect of polysaccharide nanocrystals on structure, properties, and drug release kinetics of alginate-based microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 85, p. 270–279, 2011b.

LIN, N. et al. Preparation, modification, and application of starch nanocrystals in nanomaterials: a review. **Journal of Nanomaterials**, New York, v. 2011, p. 20, 2011a.

LIN, N.; HUANG, J.; DUFRESNE, A. Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: a review. **Nanoscale**, Cambridge, v. 4, n. 11, p. 3274-3294, 2012.

LINDEBOOM, N. et al. Characteristics of starch from eight quinoa Lines. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 82, n. 2, p. 216-222, 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**, Weinheim, v. 56, n. 3-4, p. 89-99, 2004.

LIU, P. et al. Glass transition temperature of starches with different amylose/amylopectin ratios. **Journal of Cereal Science**, London, v. 51, n. 3, p. 388-391, 2010.

LIU, P. et al. Root and Tuber Crops. In: VAN ALFEN, N. K. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. London: Elsevier, 2014. p. 46-61.

LOPEZ, O. V. et al. Agro-industrial residue from starch extraction of *Pachyrhizus ahipa* as filler of thermoplastic corn starch films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 134, p. 324-332, 2015

LOPEZ-RUBIO, A.; FLANAGAN, B. M.; GILBERT, E. P; GIDLEY, M. J. A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: A combined XRD and NMR study. **Biopolymers**, Hoboken, v. 89, n. 9, p. 761–768, 2008.

LUND, D.; LORENZ, K. J. Influence of time, temperature, moisture, ingredients, and processing conditions on starch gelatinization. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 20, n. 4, p. 249-273, 1984.

MALI, S. et al. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 56, n. 2, p. 129-135, 2004.

MALI, S. et al. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, London, v. 75, n. 4, p. 453-460, 2006.

MALI, S.; GROSSMANN M. V.; YAMASHITA, F. Starch films: production, properties and potential of utilization. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.

MASON, W. R. Starch used in Foods. In: BEMILLER, J. N; WHISTLER, R. **Starch: Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, 2009. cap. 20, p. 746-788.

MONTEIRO, M. K. S., et al. Incorporation of bentonite clay in cassava starch films for the reduction of water vapor permeability. **Food Research International**, Kidlington, v. 105, p. 637-644, 2018.

MOORTHY, S. N. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: a review. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 54, n. 12, p. 559-592, 2002.

MORAES, J. O. et al. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. **Journal of Food Engineering**, London, v. 119, n. 4, p. 800-808, 2013.

MUKURUMBIRA et al. Microstructure, thermal properties and crystallinity of amadumbe starch nanocrystals. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 102, p. 241-247, 2017.

MUKURUMBIRA, A. R.; MELLEM, J. J.; AMONSOU, E. O. Effects of amadumbe starch nanocrystals on the physicochemical properties of starch biocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 165, p. 142-148, 2017.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 72, n. 1, p. 82-87, 2008.

NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 35, n. 12, p. 407-410, 1983.

NGOBESE, N. Z.; WORKNEH, T. S.; ALIM, B. A.; TESFAY, S. Nutrient composition and starch characteristics of eight European potato cultivars cultivated in South Africa. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 55, p. 1-11, 2017.

PAGNO et al. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 173, p. 755-762, 2015.

- PELISSARI, F. M. et al. Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 681-690, 2013.
- PÉREZ, S.; BALDWIN, P.M.; GALLANT, D. J. Structural Features of Starch Granules I. In: BEMILLER, J. N; WHISTLER, R. **Starch: Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, 2009. cap. 5, p. 149-192.
- PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology International**, London, v. 12, n. 6, p. 505-513, 2006.
- PIÑEROS-HERNANDEZ, D. et al. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 63, p. 488-495, 2017.
- PINTO-ZEVALLOS, D. M.; PAREJA, M.; AMBROGI, B. G. Current knowledge and future research perspectives on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) chemical defenses: An agroecological view. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 130, p. 10-21, 2016.
- PIYADA, K.; WARANYOU, S.; THAWIEN, W. Mechanical, thermal and structural properties of rice starch films reinforced with rice starch nanocrystals. **International Food Research Journal**, Serdang, v. 20, n. 1, p. 439- 449, 2013.
- PRATHAPAN, R. et al. Modulating the zeta potential of cellulose nanocrystals using salts and surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 509, p. 11-18, 2016.
- PRAZNIK, W. et al. Molecular background of technological properties of selected starches. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 51, n. 6, p. 197-211, 1999.
- PREGO, I.; MALDONADO, S.; OTEGUI, M. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, n. 4, p. 481-488, 1998.
- PREISS, J. Plant starch synthesis. In: ELIASSON, A-C. **Starch in food: Structure, function and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 1., p. 3-56.
- PUTAUX, J-L. et al. Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 5, p. 1198-1202, 2003.
- QIAN, J.; KUHN, M. Characterization of Amaranthus cruentus and Chenopodium quinoa starch. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 51, n. 4, p. 116-120, 1999.
- RAYNER, M. et al. Quinoa starch granules as stabilizing particles for production of Pickering emulsions. **Faraday Discussions**, Cambridge, v. 158, p. 139-155, 2012.
- RAZAVI, S. M. A.; AMINI, A. M. Starch Nanomaterials: a state-of-the-art review and future trends. In Grumezescu., A. **Novel Approaches of Nanotechnology in Food**. London: Academic Press, 2016, cap. 8, p. 237-269.
- REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S-E. Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium*

pallidicaule). **Food Reviews International**, New York, v. 19, n. 1-2, p. 179-189, 2003.

RUALES, J.; NAIR, B. M. Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 131-136, 1993.

RUIZ, K. B. et al. Quinoa biodiversity and sustainability for food security under climate change. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, n. 2, p. 349-359, 2014.

SAJILATA, M. G; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant starch—a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2006.

SALGADO, P. R. et al. Edible films and coatings containing bioactives. **Current Opinion in Food Science**, Kidlington, v. 5, p. 86-92, 2015.

SESSINI, V. et al. Processing of edible films based on nanoreinforced gelatinized starch. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 132, p. 157-158, 2016.

SEVENOU, O., et al. Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 31, n.1-3, p. 79-85, 2002.

SHARMA, V. P. et al. Advance Applications of Nanomaterials: A Review. **Materials Today: Proceedings**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 6376-6380, 2018.

SHI, A. et al. Characterization of starch films containing starch nanoparticles: Part 1: Physical and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 96, n. 2, p. 593-601, 2013

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.

SOBRAL, P. J. A. Thickness effects of myofibrillar protein based edible films on their functional properties. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. In: HAN, J. H. **Innovations in Food Packaging**. New York: Academic Press, 2005. cap. 23. p. 403-453.

SOUZA, A. C., et al. Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 46, n. 1, p. 110-117, 2012.

STADING, M.; RINDLAV-WESTLING, Å.; GATENHOLM, P. Humidity-induced structural transitions in amylose and amylopectin films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 45, n. 3, p. 209-217, 2001.

- STEFFOLANI, M. E.; LEÓN, A. E.; PÉREZ, G. T. Study of the physicochemical and functional characterization of quinoa and kañiwa starches. **Starch - Stärke**, Weinheim, v. 65, p. 976–983, 2013.
- TAGGART, P. Starch as an ingredient: manufacture and applications. In: ELIASSON, A-C. **Starch in food: Structure, function and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 12., p. 363-392.
- TALJA, R. A. et al. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 67, n. 3, p. 288-295, 2007.
- TANG, H.; WATANABE, K.; MITSUNAGA, T. Characterization of storage starches from quinoa, barley and adzuki seeds. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 49, n. 1, p. 13-22, 2002.
- TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; SOBRAL, P. J.; MENEGALLI, F. C. Effect of drying conditions and plasticizer type on some physical and mechanical properties of amaranth flour films. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 50, n. 2, p. 392-400, 2013.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; XIN, Q. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, London, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.
- TESTER, R. F.; SOMMERVILLE, M. D. The effects of non-starch polysaccharides on the extent of gelatinisation, swelling and α -amylase hydrolysis of maize and wheat starches. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p.41-54, 2003.
- TONUKARI, N. J. Cassava and the future of starch. **Electronic journal of biotechnology**, Valparaiso, v. 7, n. 1, p. 5-8, 2004.
- TREZZA, T. A.; KROCHTA, J. M. The gloss of edible coatings as affected by surfactants, lipids, relative humidity, and time. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 65, n. 4, p. 658-662, 2000.
- VALENCIA, G. A. et al. Microstructure and physical properties of nano-biocomposite films based on cassava starch and laponite. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 107, p. 1576-1583, 2018.
- VAZQUEZ, A. et al. Starch/clay Nano-biocomposites. In: AVÉROUS, L.; POLLET, E. **Environmental Silicate Nano-Biocomposites**. London: Springer, 2012 cap.11, p. 287-321.
- VIEIRA, M. G. A. et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, Kidlington, v. 47, n. 3, p. 254-263, 2011.
- VIGUIÉ, J; MOLINA-BOISSEAU, S; DUFRESNE, A. Processing and Characterization of Waxy Maize Starch Films Plasticized by Sorbitol and Reinforced with Starch Nanocrystals. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 7, n. 11, p. 1206–1216, 2007.
- VILLALOBOS, R. et al. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 19, n.1, p. 53-61, 2005.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 74, n.1-3, p. 69-117, 1998.

WANG, S.; COPELAND, L. Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 55, n. 8, p. 1081–1097, 2015.

WANG, S.; COPELAND, L. Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review. **Food & function**, Cambridge, v. 4, n. 11, p. 1564-1580, 2013.

WEBER, F. H. COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 29, n. 4, 2009.

WEI, B. et al. Effect of defatting on acid hydrolysis rate of maize starch with different amylose contents. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 62, p. 652-656, 2013.

WEI, B. et al. Effect of pHs on dispersity of maize starch nanocrystals in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 36, p. 369-373, 2014b.

WEI, B. et al. Surface chemical compositions and dispersity of starch nanocrystals formed by sulfuric and hydrochloric acid hydrolysis. **Plos One**, San Francisco, v. 9, p. e86024, 2014a.

WHITE, P.J; TZIOTIS, A. New corn starches. In: ELIASSON, A-C. **Starch in food: Structure, Function and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 10., p. 295-320.

XIE, F. et al. Starch-based nano-biocomposites. **Progress in Polymer Science**, London, v. 38, n. 10, p. 1590-1628, 2013.

XIE, F.; HALLEY, P.J.; AVÉROUS, L. Rheology to understand and optimize processibility, structures and properties of starch polymeric materials. **Progress in Polymer Science**, London, v. 37, n. 4, p. 595-623, 2012.

XU, Y. et al. Morphological, Structural, and Thermal Properties of Starch Nanocrystals Affected by Different Botanic Origins 1. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 91, n. 4, p. 383-388, 2014.

YANG, T. et al. High internal phase emulsions stabilized by starch nanocrystals. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 82, p. 230-238, 2018.

ZHENG, H. et al. Structure and properties of starch nanocrystal-reinforced soy protein plastics. **Polymer Composites**, Hoboken, v. 30, n. 4, p. 474-480, 2009.

ZHU, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 122, p. 456-480, 2015.

ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 40, n. 2, p. 44-50, 1988.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Determinação da composição química

Umidade

A umidade dos amidos foi determinada por gravimetria. Amostras de 2,0 g foram pesadas em cadinhos e colocados em estufa a 65 °C por 24 horas. Após esse período, os cadinhos foram colocados em dessecadores contendo sílica gel e, posteriormente, foram pesados. A umidade foi calculada como a fração evaporada de acordo a Equação 5.

$$Umidade (\%) = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (5)$$

Em que m_i é a massa inicial da amostra (g) e m_f é a massa seca final da amostra (g).

Teor de lipídios

O teor de lipídios dos amidos foi determinado pelo método de Soxhlet. Uma massa de 2 g (base seca) foi colocada em papel filtro de massa conhecida e inserida num balão previamente pesado. O solvente empregado na separação da fração lipídica das amostras foi o éter de petróleo (~250 mL). A separação foi por arraste com base no ponto de ebulição do solvente (~ 60 – 75 °C). Após 6 horas de extração, o balão foi retirado do equipamento e colocado em estufa (65 °C por 12 horas) para a evaporação do solvente residual. Posteriormente, o balão foi colocado em dessecador contendo gel sílica e pesado. A fração lipídica foi calculada em função da massa inicial da amostra de acordo com a Equação 6.

$$Cinza (\%) = \left(\frac{Massa\ bal\tilde{o}\ Final - Massa\ bal\tilde{o}\ inicial}{Massa\ amostra\ inicial} \right) \times 100 \quad (6)$$

Teor de proteína

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método Kjeldahl. O método consistiu de três fases: (i) digestão, (ii) destilação e (iii) titulação. Uma massa de 100 mg de amido (base seca) foi colocada em tubo de digestão, juntamente com uma mistura catalítica de potássio e sulfato de cobre (10:1 m/m), e 3 mL de ácido sulfúrico. Posteriormente, o tubo de digestão foi levado para um bloco digestor a 400 °C por 4 horas. Após o resfriamento, o tubo contendo a amostra digerida foi colocada no destilador. A destilação foi realizada com 15 mL de água destilada, 15 mL hidróxido de sódio (NaOH 50 %), 10 mL de uma solução de ácido bórico (5 %) e uma gota de indicador misto de vermelho de metila e azul de metileno. Finalmente, a amostra foi titulada com ácido clorídrico (0.02 N), em presença de um indicador, para obter a percentagem de nitrogênio que foi relacionada com o fator 6,25 para o cálculo da percentagem de proteína bruta de acordo com a Equações 7 e 8.

$$\%N = \left(\frac{V \times N_{HCl} \times f_c \times MM_N}{M_{(mg)}} \right) \times 100 \quad (7)$$

$$Proteína\ Bruta\ (\%) = \%N \times 6,25 \quad (8)$$

Em que % N é a percentagem de nitrogênio; V é volume gasto (mL); N_{HCl} é a normalidade da solução de HCl; f_c é o fator de correção (1, padronização da solução); MM_N é a massa molecular de nitrogênio (14,007).

Teor de cinza

As amostras utilizadas na determinação de umidade foram colocadas em cadinhos previamente pesados e levadas à mufla (500 °C por 4 h). Após o resfriamento das amostras em dessecadores, foram pesadas e o conteúdo de cinzas foi calculado em função da massa inicial da amostra (Equação 9).

$$Cinza\ (\%) = \left(\frac{Massa\ cadinho_{Final} - Massa\ cadinho_{vazio}}{Massa\ amostra_{inicial}} \right) \times 100 \quad (9)$$

APÊNDICE B – Determinação do teor de amilose

O teor de amilose total foi determinado de acordo com a metodologia ISO 6647 (International Organization for Standardization, 1987). As amostras do amido quinoa e milho ceroso foram previamente desengorduradas segundo a metodologia de Kasemsuwan et al., (1995). Para isso, uma amostra de 0,5 g de amido foi dispersa em 25 ml de dimetilsulfóxido 90 % (DMSO), e aquecida em banho de água fervente (100°C) sob agitação durante 1 hora. Em seguida, a amostra foi resfriada a temperatura ambiente e submetida a agitação por 24 h. Posteriormente, o amido foi precipitado com 75 mL de etanol absoluto e separado por centrifugação (5000 g, 15 min). O precipitado suspenso em etanol absoluto, filtrado a vácuo, e seco em estufa a 38°C durante 24 h.

Para a determinação da amilose, 100 mg do amido desengordurado foram colocados num balão de 100 mL, adicionou-se 1 mL de etanol 95% e 9 mL de NaOH 1 M, e a solução foi aquecida em banho de água fervente, por 10 minutos. Após o resfriamento, o volume do balão foi completado com água destilada. Uma alíquota de 5 mL foi retirada e transferida para um balão volumétrico (100 mL) contendo 50 mL de água destilada. Posteriormente, 1 mL de acético (1 M) e 2 mL de solução de iodo foram adicionados. A mistura foi homogeneizada e deixada no abrigo da luz durante 20 minutos. Após esse período, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 620 nm. A curva analítica do teor de amilose foi realizada a partir da mistura de padrões de amilose (SIGMA Tipo III A-0512) e amilopectina (SIGMA A-8515). O teor de amilose foi obtido referindo-se a absorbância à curva padrão (Figura 30).

Figura 30 - Curva padrão de amilose

Fonte: Própria autoria

APÊNDICE C – Determinação dos açúcares solúveis pelo método fenol sulfúrico

Os açúcares solúveis no sobrenadante foram determinados pelo método fenol-ácido sulfúrico de acordo com Dubois et al. (1956). Para isso, 1 mL do sobrenadante obtido após a centrifugação foi colocado num tubo colorimétrico, adicionou-se 1 mL de fenol a 5% (m/m) e 5 mL ácido sulfúrico a 98% rapidamente. Em seguida, a misturada foi deixada em repouso por 10 min, e logo homogeneizada no vórtex por 30 segundos e colocada por 20 minutos em BOD a 25 °C. Após esse período, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 490 nm. O branco foi preparado substituindo o sobrenadante por água destilada. A quantidade de açúcar foi determinada a partir da curva padrão de glicose (0,01% m/v) de intervalo 10 – 90 µg/mL (Figura 31).

Figura 31 - Curva padrão de glicose

Fonte: Própria autoria