

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós – Graduação
Programa de Pós – Graduação Strictu Sensu
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

RAFAEL RAMIRES DE ALMEIDA

**ESTUDO DO BAGAÇO DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* C.), NATIVO E
TRATADO COM α – AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE, POR MEIO DE TÉCNICAS
TERMOANALÍTICAS**

Ponta Grossa
2009

RAFAEL RAMIRES DE ALMEIDA

**ESTUDO DO BAGAÇO DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* C.), NATIVO E TRATADO
COM α – AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE, POR MEIO DE TÉCNICAS
TERMOANALÍTICAS**

Dissertação apresentada para a
obtenção do título de Mestre pela
Universidade Estadual de Ponta
Grossa em Ciência e Tecnologia
de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Egon
Schnitzler.

Co-orientador: Prof. Dr. Gilbert
Bannach

Ponta Grossa
2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

A447e

Almeida, Rafael Ramires de

Estudo do bagaço de mandioca (*Manihot esculenta* C.), nativo e tratado com α - Amilase e Amiloglucosidade, por meio de técnicas termoanalíticas . / Rafael Ramires de Almeida. Ponta Grossa, 2009. 85 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Egon Schnitzler

Coorientador : Prof. Dr. Gilbert Bannach

1. TG. 2. DSC. 3. Bagaço da mandioca. 4. Hidrólise enzimática. 5. Amido. I. Schnitzler , Egon. II. Bannach, Gilbert. III T

CDD: 633.682

TERMO DE APROVAÇÃO

RAFAEL RAMIRES DE ALMEIDA

“ESTUDO DO BAGAÇO DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* C.), NATIVO E TRATADO COM α -AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE, POR MEIO DE TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Ponta Grossa, 22 de dezembro de 2009

Prof. Dr. Egon Schnitzler
UEPG/PR

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate
UEPG/PR

Prof. Dr. Marco Aurélio da Silva Carvalho
UFPR/PR

Ponta Grossa
2009

RAFAEL RAMIRES DE ALMEIDA

**ESTUDO DO BAGAÇO DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* C.), NATIVO E TRATADO
COM α – AMILASE E AMILOGLUCOSIDASE, POR MEIO DE TÉCNICAS
TERMOANALÍTICAS**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos

Ponta Grossa, 22 de Dezembro de 2009.

Prof. Dr. – Marco Aurélio da Silva Carvalho Filho – Universidade Positivo (Curitiba)
(Membro)

Prof^a. Dr^a. Ivó Mottin Demiate – UEPG
(Membro)

Prof. Dr. Egon Schnitzler – UEPG
(Orientador)

Prof. Dr. Gilbert Bannach
(Co-orientador)

Ponta Grossa
2009

*Este trabalho, eu dedico aos meus
pais, minha esposa, filha e
enteada pela compreensão e
confiança em mim depositadas.
Aos Professores Marco Aurélio e
Egon Schnitzler por ajudarem a
mudar minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela aventura maravilhosa que se chama vida.

Aos Professores Egon Schnitzler e Marco Aurélio Carvalho da Silva Filho pela ajuda e apoio nesta caminhada de dois anos.

Ao doutorando Luiz Gustavo Lacerda pela parceria nas pesquisas e pela grande amizade.

Ao Professor Ivo Mottin Demiate pelo apoio e encorajamento.

Ao Professor Gilbert Bannach por suscitar dúvidas em momentos que achava que estava certo.

Ao Professor Massao Ionashiro pelo auxílio e correções à distância.

À UNESP de Araraquara pelas análises complementares de Raios X.

À Professora Marney Pascoli Cereda e sua produção científica sobre amidos que nortearam minhas pesquisas e conclusões.

Às minhas colegas Franciely Kanunfre, Andréa Pacheco Sikorski e Elisângela Serenato Madalozzo pelas risadas e companheirismo nessa jornada.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Novamente à minha família e pais por caminharem comigo nesta jornada e serem meu incentivo quando o cansaço e desânimo sobre mim se abatiam.

A todos os demais, mesmo que por instantes, me ajudaram e contribuíram para a realização deste sonho.

Ao meu apêndice, que se foi para me avisar que estar vivo é a coisa mais importante que existe.

Em especial ao astrônomo Carl Sagan e seu programa Cosmos, que fizeram de mim um amante da Ciência.

RESUMO

A geração de resíduos é um problema diário para grande parte das agroindústrias em virtude da toxicidade ou grande volume gerado. Atualmente, políticas ambientais exigem o tratamento de resíduos antes do descarte na natureza. Além disso, este tratamento de resíduos é repassado aos custos de produção para o produto final. Propostas estão sendo apresentadas pelo setor ambiental com a finalidade de um uso racional para esses resíduos gerados. A indústria do amido, em especial o extraído da mandioca, produz quantidades significativas de rejeitos que podem ser empregados de forma racional, evitando seu descarte na natureza e gerando novos produtos. O bagaço da mandioca é esse tipo de resíduo, pois apresenta em sua composição alto teor de amido e fibras alimentares. Após o processamento, esse amido, por meio de ação de enzimas amilolíticas, pode ser convertido em xarope de maltose ou glicose, produtos de maior valor agregado, utilizados principalmente na indústria cervejeira. As análises via úmida para caracterizar a composição deste bagaço já foram realizadas, mas suas principais desvantagens estão associadas ao tempo requerido para a obtenção de resultados. Em função disso, o presente estudo visa analisar o bagaço de mandioca por várias frentes, sendo a análise térmica a principal entre as demais. As técnicas termoanalíticas empregadas foram a termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA), termogravimetria derivada (DTG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC). Assim como em trabalhos anteriores, a microscopia óptica foi utilizada provando-se de grande utilidade na identificação desse tipo de amostra. A difratometria de raios X pelo método do pó, classicamente utilizada no estudo de amidos em virtude de sua semi-cristalinidade, foi empregada neste tipo de resíduo. Como o processo hidrolítico quando empregado em fontes amiláceas produz quantidades significativas de açúcares redutores, a fase líquida resultante do processo foi analisada pela reação de redução com o ácido dinitrossalicílico (DNS). As temperaturas de degradação térmica obtidas a partir da análise termogravimétrica do bagaço de mandioca nativo e hidrolisado apresentaram redução, bem como alteração nas entalpias dos eventos de decomposição e combustão. A análise da calorimetria exploratória diferencial evidenciou uma temperatura de fusão do amido presente no bagaço de mandioca em 170 °C. Essa temperatura reduziu gradativamente à medida que as amostras foram hidrolisadas durante doze e vinte quatro horas, respectivamente 162.5 °C e 152.3 °C.

Palavras-chave: TG, DSC, bagaço de mandioca, hidrólise enzimática, amido.

ABSTRACT

Waste generation represent a daily problem for most of the agriculture industry due to its toxicity and/or volume produced. Nowadays these residues demands treatment before its discard in the environment. Besides, the amounts spent with treatment are aggregated to manufacturing costs. Rational use of the residues seems to be the best way to handle with this problem. Cassava roots processing industry, produces significant amount of solid and liquid wastes from which valuable products could be extracted. Cassava bagasse is one of these residues containing high amounts of starch and dietary fibers. Before processing, the starch, through amylolytic enzyme digestion yields glucose and maltose syrups, products with wide uses in industry, for example, brewing industry. Classic laboratory analyses were already used in the characterization of cassava bagasse, but too much time were necessary to obtain results. Hence the present study aims for the analysis of cassava bagasse from multiple ways, being the thermal analysis the most important of all. The thermal techniques employed were thermogravimetry (TG), differential thermal analysis (DTA), derivate thermogravimetry (DTG) and differential scanning calorimetry (DSC). As in other past studies, optic microscopy proved its use in the identification of this kind of sample. X ray powder diffractometry is classically employed in the study of semi-cristalinity starch granule structure and was used to analyze the cassava bagasse. When a hydrolytic process is applied to starchy material, significant amount of reducing sugars are produced. Dinitrosalicylic acid (DNS) reducing reaction was performed in the hydrolyzed liquid fraction. The degradation temperatures obtained through thermogravimetric analysis of the native and hydrolyzed solid fractions of the cassava bagasse suffer reduction as well as changes in enthalpy and combustion values were noticed. DSC also showed fusion temperature of the starch in the cassava bagasse around 170 °C. This value gradually reduced to 162.5 °C and 152.3 °C when the samples were hydrolyzed for twelve and twenty-four hours, respectively.

Key-words: TG, DSC, cassava bagasse, enzymatic hydrolysis, starch.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da amilose	22
Figura 2	Esquema da molécula de amilopectina mostrando os pontos de ramificação	23
Figura 3	Estrutura da ramificação da amilopectina	23
Figura 4	Esquema da distância entre planos cristalográficos e os raios X incidentes e refratados	33
Figura 5	Diagrama de um difratômetro de raios X	33
Figura 6	Representação de uma curva termogravimétrica	35
Figura 7	Representação de uma curva TG-DTG	37
Figura 8	Representação de uma curva DSC	38
Figura 9	Fluxograma do processo de hidrólise das amostras e as respectivas análises	42
Figura 10	Micrografias do bagaço de mandioca nativo mostrando a morfologia dos grânulos de amido em aumento de 400x	52
Figura 11	Micrografia de grânulos de amido nativo em destaque em aumento de 1000x	52
Figura 12	Micrografia mostrando a presença de fibras com grânulos de amido aderidos em aumento de 100x no bagaço de mandioca sem tratamento enzimático	53
Figura 13	Micrografia do bagaço de mandioca após tratamento enzimático de 24h (400x)	54
Figura 14	Micrografia mostrando grânulos de amido ligados à parede celular do material fibroso do bagaço de mandioca (400x)	54
Figura 15	Curva TG-DTA do bagaço da mandioca sem tratamento enzimático	56

Figura 16	Curva TG-DTA do bagaço de mandioca após tratamento enzimático por 1 hora sob ação da α -amilase	57
Figura 17	Curva TG-DTA do bagaço de mandioca após tratamento enzimático por 12 horas sob ação da α -amilase e amiloglucosidase	57
Figura 18	Curva TG-DTA do bagaço de mandioca após tratamento enzimático por 24 horas sob ação da α -amilase e amiloglucosidase	58
Figura 19	Curvas DTG do bagaço de mandioca nativo e hidrolisados	61
Figura 20	DSC do bagaço de mandioca sem tratamento enzimático	63
Figura 21	Análise TG-DTA e DSC do bagaço de mandioca	64
Figura 22	DSC do bagaço de mandioca hidrolisado por 1 hora	65
Figura 23	DSC do bagaço de mandioca hidrolisado por 24 horas	65
Figura 24	DSC do bagaço de mandioca hidrolisado por 24 horas	66
Figura 25	Curva de gelatinização do amido presente no bagaço de mandioca	68
Figura 26	Concentração de açúcares redutores (AR) em g L^{-1} , após hidrólise enzimática	69
Figura 27	Gráfico de difração de raios X do bagaço de mandioca nativo	72
Figura 28	Gráfico de difração de raios X do bagaço de mandioca após 1 hora de ação enzimática	72
Figura 29	Gráfico de difração de raios X do bagaço de mandioca após 12 horas de ação enzimática	73
Figura 30	Gráfico de difração de raios X do bagaço de mandioca após 24 horas de ação enzimática	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição média das raízes de mandioca nativa	17
Tabela 2	Composição físico-química do bagaço de mandioca (%) em base seca	19
Tabela 3	Avaliação dos dados das curvas termogravimétricas do bagaço da mandioca	58
Tabela 4	Composição média das amostras de bagaço de mandioca utilizadas no presente estudo	60
Tabela 5	Avaliação dos dados das curvas de termogravimetria derivada das amostras	62
Tabela 6	Valores de entalpia de fusão do bagaço de mandioca	66
Tabela 7	Concentração de açúcares redutores em g/L	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	MANDIOCA	17
3.2	BAGAÇO DA MANDIOCA	18
3.3	AMIDO	20
3.4	AMILOSE	22
3.5	AMILOPECTINA	23
3.6	AMIDO DE MANDIOCA	24
3.7	FIBRAS ALIMENTARES	25
3.8	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	25
3.9	ENZIMAS	27
3.9.1	α -Amilase	28
3.9.2	Amiloglucosidase	28
3.10	PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE	29
3.10.1	Hidrólise do amido presente no bagaço da mandioca	29
3.10.2	Determinação dos açúcares redutores	29
3.10.3	Espectroscopia UV – visível	30
3.10.4	Microscopia	31
3.10.5	Difratometria de raios X	31
3.10.6	Técnicas termoanalíticas	34
3.10.6.1	Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)	36
3.10.6.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise térmica diferencial (DTA)	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	MATERIAIS	40

4.2	MÉTODOS	41
4.2.1	Microscopia óptica	41
4.2.2	Análise do bagaço sem tratamento	41
4.2.3	Hidrólise enzimática	42
4.2.4	Técnicas termooanalíticas	45
4.2.4.1	Calibração do equipamento TG 60	45
4.2.4.2	Calibração do equipamento DSC 60	45
4.2.4.3	Termogravimetria (TG)	46
4.2.4.4	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	46
4.2.5	Determinação de açúcares redutores	48
4.2.6	Espectrofotometria UV - visível	49
4.2.7	Difratometria de raios X	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	MICROSCOPIA ÓPTICA	51
5.2	TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS	55
5.2.1	Termogravimetria	55
5.2.2	Calorimetria exploratória diferencial	62
5.2.2.1	Fusão do amido	62
5.2.2.2	Gelatinização	67
5.3	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	69
5.4	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X	70
6	CONCLUSÃO	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* C.) é uma cultura largamente difundida em nosso país devido, em partes, a capacidade de produção mesmo em solos com baixa fertilidade. É um alimento importante para o homem e para animais podendo substituir o trigo em alguns casos. Segundo dados fornecidos pela SEAB - PR, a produção mundial de mandioca saltou de 98 milhões de toneladas em 1970, para 226 milhões de toneladas em 2006, sendo que o Brasil foi responsável por 12% deste total, no mesmo ano (GROXKO, 2009a). Em 2006, atingiu a marca de 26,6 milhões de toneladas melhorando sua parcela de contribuição (IBGE, 2009). O Estado do Paraná ocupa o terceiro lugar nacional com 3,9 milhões de toneladas de raiz produzidas em 192 mil hectares, mas é o primeiro em extração do amido, cuja participação no mercado nacional é de 60 a 65%, em virtude do nível tecnológico empregado nas indústrias processadoras (GROXKO, 2009a; GROXKO, 2009b; ABAM, 2008). A mandioca apresenta em sua composição de 25 a 35% de amido (SOCCOL, 1996), entretanto não é a fonte amilácea mais utilizada mundialmente, sendo esta posição ocupada pelo milho (LEONEL, 2002). O amido apresenta muitas aplicações na indústria alimentícia, papelreira, têxtil e farmacêutica.

Durante a extração do amido da mandioca, resíduos são gerados (CEREDA, 1994). De acordo com Leonel (1999), para cada tonelada de amido extraída, aproximadamente 928 kg de bagaço de mandioca são produzidos. Propostas têm sido apresentadas pelo setor ambiental e agroindustrial visando o uso desse resíduo de forma lucrativa (PANDEY, 2000a, SAITO, 2006). O bagaço de mandioca pode ser considerado como a fração restante do processamento da mandioca para produção de

amido. É um resíduo fibroso, altamente higroscópico (aproximadamente 85% de umidade) e por este motivo de difícil secagem na indústria, mas que apresenta em sua composição alto teor de amido (CEREDA, 1996a).

Ainda, segundo Cereda (1996a), o bagaço de mandioca é constituído, em média, por 75% de amido, em base seca. Como se trata de amido de qualidade em concentração consideravelmente alta existe a possibilidade de conversão do mesmo em glucose por meio de hidrólise enzimática. Para tal, faz-se necessário o uso das enzimas amilolíticas comerciais α -amilase e amiloglucosidase, sintetizadas respectivamente pelos microorganismos, *Bacillus licheniformes* e *Aspergillus niger*, largamente utilizadas para obtenção de glucose a partir de fontes amiláceas. Os hidrolisados enzimáticos estão entre os amidos modificados mais valorizados comercialmente em virtude da variedade e pureza dos produtos obtidos, desde açúcares derivados do amido até ciclodextrinas, e fornecendo produtos finais com maior qualidade que os hidrolisados quimicamente por ácidos e calor (SURMELY, 2003).

As técnicas termoanalíticas (TG/DTG, TG-DTA) mostraram-se eficientes na demonstração das decomposições ocorridas quando produtos amiláceos são aquecidos em razão do tempo. Ao contrário de técnicas de análise via úmida, a análise termogravimétrica não requer o uso de reagentes e vidrarias, podendo ser empregada nos mais diversos setores industriais e acadêmicos, entre eles a tecnologia de alimentos, engenharia, geologia e criminalística.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- O objetivo deste projeto é monitorar a hidrólise enzimática do bagaço de mandioca, bem como seu estado nativo, utilizando-se de técnicas termoanalíticas (TG-DTA, TG/DTG, DSC).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter dados da temperatura de gelatinização do amido presente no bagaço da mandioca (temperatura *onset*, temperatura de pico e ΔH).
- Analisar dos componentes do bagaço por meio de microscopia óptica
- Por meio da difratometria de Raios X pelo método do pó, verificar a cristalinidade das amostras.
- Mensurar açúcares redutores na fração líquida do material hidrolisado através da reação de reação com ácido 3,5 dinitrossalicílico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MANDIOCA

A mandioca é uma raiz originária do Brasil cultivada em grande parte dos países em desenvolvimento, onde, dependendo da região na qual é cultivada, serve para diferentes fins. Na África é uma cultura de subsistência, econômica na Ásia e cultural no Brasil (CEREDA, 2002a). A mandioca apresenta em sua composição teor médio de amido em comparação com outras tuberosas amiláceas, mas por seus baixos teores de matérias-graxas, proteínas e pectinas é ideal para extração do amido (CEREDA, 2000a). De acordo com a Tabela 1, a mandioca in natura contém de 25 a 35% de amido em sua constituição (SOCCOL, 1996). A mandioca apresenta uma série de vantagens em relação a outros cultivos. Fácil propagação, elevada tolerância a longas estiagens, baixo investimento em maquinário para plantio e fácil adaptação a climas tropicais fizeram da mandioca uma cultura largamente difundida em países em desenvolvimento (CEREDA, 2002a).

Tabela 1

Composição média das raízes de mandioca nativa

Composição Distribuição por peso (%)	
Umidade	65.5
Proteínas	1.00
Lipídios	0.2
Fibras	1,1
Amido	32.4
Cinzas	0.9

Fonte: Soccol (1996), Cereda e Takahashi (1996)

De acordo com a FAO (2008), as estimativas de produção mundial, em 2006, eram da ordem de 226 milhões de toneladas de mandioca em 18 milhões de hectares, tornando-se assim um dos cultivos mais importante. A cadeia produtiva da mandioca pode gerar melhores condições para pequenos produtores, através de empregos e oportunidades em países como o Brasil (onde existem mais de 80 unidades produtivas industriais), assim como em demais países da América Latina, e Ásia (LEONEL, 2001a). O Brasil, com 26,6 milhões de toneladas/ano, é o segundo país em quantidade produzida de mandioca, sendo que a Nigéria lidera a produção, com 45,7 milhões de toneladas (GROXKO, 2008a; FAO, 2008).

Industrialmente, seu processamento gera uma série de produtos e subprodutos para a alimentação humana, animal ou outros usos industriais (SILVA, 2006; DEMIATE, 2000). Ainda assim, grande parte da produção nacional acaba sendo usada na subsistência das famílias envolvidas no cultivo da tuberosa.

3.2 BAGAÇO DA MANDIOCA

O farelo ou bagaço de mandioca é um resíduo agroindustrial sólido resultante do processamento da raiz para extração do amido (PANDEY, 2000a). Este material ainda apresenta teores de amido que podem variar entre 60 – 70% em peso seco, porém, se descartado, é causador de problemas ao meio-ambiente (CEREDA, 1996a; PANDEY, 2000a).

De acordo com Leonel (1999) e Saito (2006), nas fecularias, para cada tonelada de raiz processada são produzidos cerca de 928 kg de farelo com 85% de umidade. Após seco, este resíduo apresenta, em média, 70% de amido e 11.5% de fibras. A

Tabela 2 apresenta resultados obtidos por vários pesquisadores baseados em resíduos gerados a partir de diferentes unidades de processamento no Estado do Paraná.

Tabela 2

Composição físico-química do bagaço de mandioca (%) seco

Composição	Cereda (1994)	Sterz (1997)	Vandenberghe (1998)
Umidade	9,52	10,70	11,20
Proteínas	0,32	1,60	1,61
Lipídios	0,83	0,53	0,54
Fibras	14,88	22,20	21,10
Cinzas	0,66	1,50	1,44
Amido	63,85	63,40	63,00

Fonte: Pandey (2000a)

O resíduo do processamento da mandioca já foi estudado em várias frentes. Podemos citar entre outros a produção enzimas microbianas por fermentação em estado sólido (PANDEY, 2003), recuperação das fibras existentes no bagaço após hidrólise para obtenção de etanol (LEONEL, 1999) e a substituição economicamente vantajosa aos alimentos tradicionalmente empregados em bovinos (MARQUES, 2000), somente para citar alguns trabalhos publicados. Existem fecularias que empregam a prensagem desse resíduo para recuperação do amido residual, mas essa atitude ainda não é comum na maioria nas unidades processadoras (LEONEL, 2001a).

A composição físico-química do bagaço de mandioca mostra-se mais completa que outros resíduos, tais como o bagaço de cana (PANDEY, 2000b). A composição mineral apresenta teores médios de nitrogênio (0,06%), fósforo (0,02%), potássio

(0,13%), cálcio (0,24%), magnésio (0,11%), f erro (98 mg kg⁻¹), zinco (4 mg kg⁻¹) e cobre (1 mg kg⁻¹) (CEREDA, 1996b).

3.3 AMIDO

O amido é a mais abundante reserva de carboidratos disponível para o consumo humano. Depois da celulose, é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É encontrado nas raízes, sementes e frutos de vegetais superiores. O amido é a principal fonte de energia dos grãos de cereais e tubérculos. Embora a quantidade de amido contida nos grãos varie, geralmente se encontra entre 60 e 75% do peso, produzindo 70 – 80% das calorias consumidas pelo homem (FENNEMA, 2000).

É encontrado no interior da célula vegetal das sementes, raízes e folhas na forma de grânulos, os amiloplastos, nos mais variados formatos e dimensões, dependendo da fonte botânica dos mesmos (FENNEMA, 2000).

Quimicamente, o amido, é um hidrato de carbono de fórmula geral (C₆H₁₀O₅)_n. É um polímero formado por monômeros de glucose onde cada unidade está ligada à seguinte pelos carbonos C₁ e C₄, formando uma ligação glicosídica (WHISTLER, 1984).

As denominações amido e fécula são utilizadas no Brasil, para designar a parte da planta da qual os mesmos foram extraídos. A denominação fécula é comumente utilizada para tuberosas, tais como mandioca e batata, enquanto que amido é utilizado para o produto extraído de partes aéreas, como o milho, o sorgo, trigo, etc. Quando se faz referência às suas propriedades gerais, comumente denominam-se amidos (CIACCO, 1982; KARAM, 2003).

As aplicações industriais dos amidos são, entretanto, dependentes de suas propriedades físicas e químicas, as quais variam de uma cultura para outra, ou são influenciadas por fatores ecológicos ou agrônômicos. Por ser uma matéria-prima altamente versátil, podendo ser aplicada de várias formas pela indústria de alimentos, novas fontes do polissacarídeo têm sido pesquisadas (ADEBOWALE *et al.*, 2005).

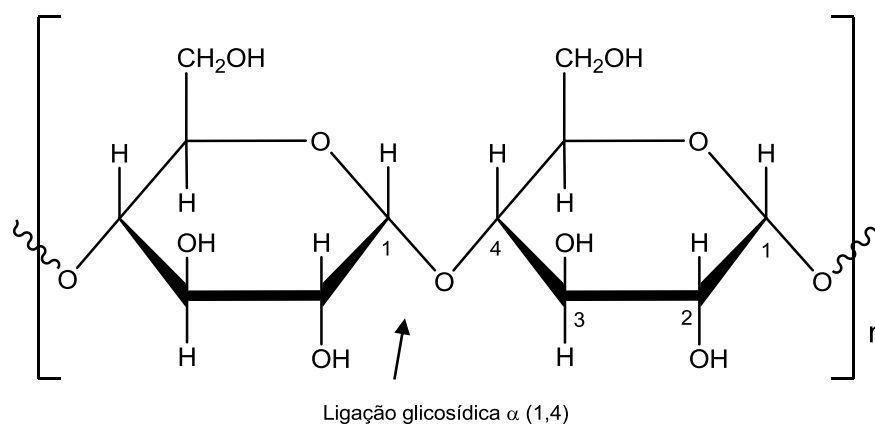
Na natureza, existem muitas fontes botânicas que dispõem do material, no entanto, industrialmente os amidos mais isolados são o de milho e o de mandioca. De acordo com a sazonalidade, clima e especialmente localização geográfica, determinadas fontes podem ser mais utilizadas que outras (KARAM, 2003; LACERDA, 2008b).

Amidos de diferentes fontes botânicas apresentam propriedades funcionais distintas e são aplicados nas indústrias com diversas finalidades, tais como nutricionais, tecnológicas ou sensoriais. Um exemplo de uso na indústria é o emprego do amido como estabilizante em emulsões (FENNEMA, 2000)

Esse polímero é formado por duas macromoléculas: amilopectina e amilose, que são as responsáveis pelas características e funcionalidades de cada amido, e a proporção entre as duas varia de acordo com a fonte botânica (BILIADERIS, 1991).

3.4 AMILOSE

É uma molécula essencialmente linear, formada por unidades de D – glucose, unidas por ligações α (1,4), podendo apresentar um pequeno número de ramificações, dependendo da fonte botânica (Figura 1) (BULÉON, 1998).



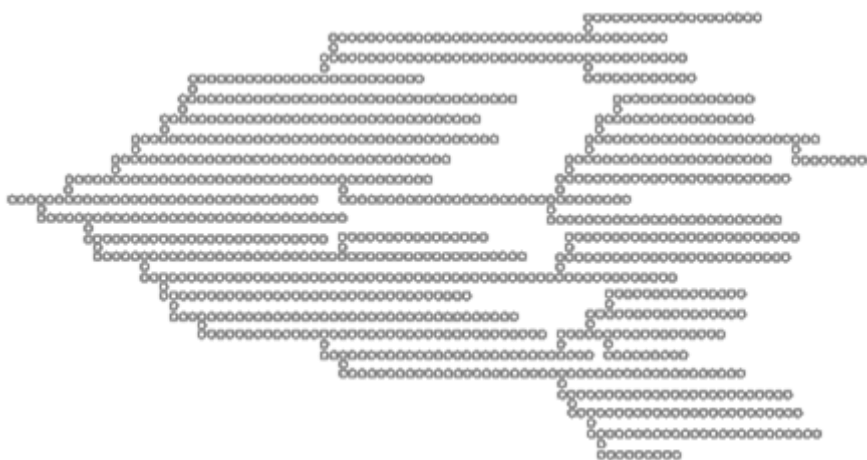
Fonte: Adaptado Wurzburg (1986)

Figura 1 – Estrutura química da amilose

A amilose apresenta peso molecular em torno de $1,5 \times 10^5 - 10^6$ e tamanho médio da cadeia de aproximadamente 10^3 unidades de glucose e apresenta instabilidade em solução aquosa, denominada retrogradação (BILIADERIS, 1991). Segundo Rundle, 1943, a amilose em presença de iodo forma complexos dando coloração azul, através da oclusão das moléculas do halogênio no interior da hélice formada por, no mínimo 40 – 50 unidades de glucose da amilose (MOULD, 1954).

3.5 AMILOPECTINA

A amilopectina é uma molécula altamente ramificada formada por unidades de D – glucose, unidas em α (1,4), e com 5 a 6% de ligações em α (1,6) nos pontos de ramificação (Figura 2 e 3) (BULÉON, 1998). Seu peso molecular é da ordem de $(50 - 500) \times 10^6$ e o comprimento, variável, das cadeias é em média 20 a 30 unidades de glucose. Em presença de iodo apresenta coloração avermelhada e é estável em solução aquosa (BILIADERIS, 1991)



Fonte: Adaptado Manners (1989)

Figura 2 – Esquema da molécula de amilopectina mostrando os pontos de ramificação

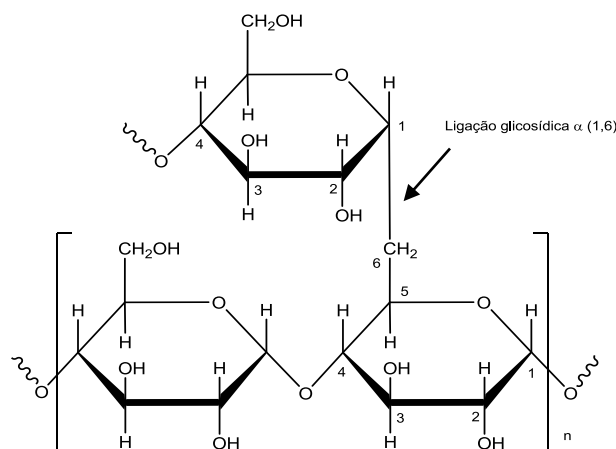


Figura 3 – Estrutura da ramificação da amilopectina

3.6 AMIDO DE MANDIOCA

A produção brasileira de amido de mandioca ganhou destaque a partir de 1990. A produção nacional, de 170 mil toneladas na época saltou para atuais 600 mil (GROXKO, 2009b).

O amido de mandioca é muito utilizado especialmente na indústria de alimentos devido a algumas de suas propriedades. Dentre elas, pode-se citar: alto teor de amilopectina, faixa de gelatinização compreendida entre 65 e 70 °C, rápido aumento de viscosidade durante o evento endotérmico (o que o torna excelente espessante), claridade da pasta, aroma neutro, baixa tendência à retrogradação e boa estabilidade do gel, pela baixa concentração de amilose (ELLIS, 1998).

Em uma mesma raiz de mandioca podemos encontrar diferentes estágios de maturação dos grânulos de amido em virtude da atividade da enzima reguladora da biossíntese do amido, a adenosina difosfato glucose pirofosforilase (ADGPppase). Esta peculiaridade ocasiona teores de amilose diferentes nos grânulos de amido na mesma raiz, sendo que a concentração do polissacarídeo aumenta com a maturidade dos grânulos (DAIUTO, 2000).

O amido de mandioca natural tem apresentado boa aceitação no segmento de embutidos cárneos por suas propriedades, superiores aos demais amidos utilizados, principalmente como espessante na produção de salsichas embaladas à vácuo (SILVA, 2000).

Outra característica competitiva do amido de mandioca é a facilidade de hidrólise por apresentar menores teores de lipídios e proteínas e menor temperatura de gelatinização comparado com amidos de outras fontes (SURMELY, 2003).

3.7 FIBRAS ALIMENTARES

Em seu estudo, Almeida (1997) cita que a fibra alimentar, em sua maior parte, é composta por paredes celulares de plantas, que, por apresentarem resistência à digestão, sofrem modificações muito limitadas em sua estrutura e são eliminadas quase totalmente. Em geral, as fibras solúveis em água (pectinas, gomas, mucilagens e certas hemiceluloses) retardam a passagem intestinal, o esvaziamento gástrico e a absorção da glucose, ajudando a reduzir o colesterol no soro sanguíneo. As fibras insolúveis em água (lignina, celulose e algumas hemiceluloses) aceleram o trânsito intestinal, aumentam o peso das fezes, desaceleram a hidrólise do amido e retardam a absorção da glucose, contribuindo para a redução do risco de alguns males do cólon.

De acordo com Cereda (1996b), o farelo de mandioca é uma fonte de fibra de boa qualidade, apresentando em média 29% de fibra detergente neutro (FDN), 14% de fibra detergente ácido (FDA) e uma proporção de 6:1 de insolúveis para solúveis.

3.8 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática consiste em uma reação química mediada por enzimas, em meio aquoso, para a quebra de uma molécula em frações menores. No caso do amido a hidrólise enzimática é empregada para produção de xarope de glucose, maltose e outros açúcares de pesos moleculares variados (SURMELY, 2003).

A hidrólise de amidos é realizada comumente por duas vias: enzimática e química. A hidrólise por via enzimática permite, com o uso de uma mesma linha de produção, a fabricação de uma ampla gama de hidrolisados, enquanto que por via

ácida somente a produção de glucose e dextrinas é possível (SURMELY, 2003). A susceptibilidade dos grânulos de amido frente às enzimas é determinada pelo tamanho dos grânulos e espécie botânica da qual foram extraídos (FRANCO; CIACCO, 1995).

A quebra do amido por meio de enzimas exige uma série de condições distintas e muito específicas sendo mais onerosa e, em virtude disso, ainda não é amplamente utilizada no Brasil. Apesar dos custos, a atuação das enzimas mostra alta especificidade, possibilitando a obtenção de produtos de propriedades físico-químicas bem definidas além do que o processo ocorre em reações mais brandas que as empregadas em hidrólise ácida (EDUARDO, 2002).

Apesar de a hidrólise enzimática ser notadamente mais onerosa que a via ácida e necessitar de alto investimento inicial e mão-de-obra especializada (WOICIECHOWSKI, 2002), ainda assim apresenta mais vantagens no seu manejo, como as descritas por Surmely (1996):

- A neutralização de uma hidrólise ácida produz quantidades significativas de sal no produto final;
- Na hidrólise enzimática são utilizadas menores quantidades de carvão ativado para remoção de compostos coloridos e odores indesejáveis;
- Uma mesma linha de produção pode gerar uma grande variedade de produtos.

Na hidrólise do amido duas enzimas normalmente são usadas, dependendo do produto final que se espera fabricar. São elas a α -amilase e a amiloglicosidase, também chamada de glicoamilase. São usadas sinergicamente para conversão do amido em xarope de glucose, sendo observados resultados satisfatórios em praticamente qualquer substrato amiláceo (MONNA, 1989)

3.9 ENZIMAS

São compostos de natureza protéica que apresentam ação catalisadora em reações metabólicas, reduzindo as energias de ativação das mesmas e conseqüentemente aumentando as suas velocidades, permanecendo inalteradas e apresentando a mesma atividade ao final dessas reações (CHAPLIN & BUCKE, 1990).

De acordo com sua estrutura, podem ser classificadas em holoproteínas por apresentar somente aminoácidos em sua estrutura, ou heteroproteínas por apresentar regiões não-protéicas as quais podem ser coenzimas ou metais. Uma propriedade inerente das enzimas é a sua especificidade. Enzimas catalisam somente um tipo de reação, como no caso da ligação glicosídica α (1,4) do amido (LEHNINGER, 1995). As enzimas amilolíticas utilizadas no presente estudo podem ser divididas em duas categorias (SURMELY, 2003):

- α -amilase termorresistente, cuja temperatura de ação é superior a 90 °C;
- Enzimas de sacarificação do tipo amiloglucosidase e β -amilase.

3.9.1 α -Amilase

Produzida a partir de cepas selecionadas de bactérias da espécie *Bacillus licheniformis*, a α -amilase produzida pela Novozymes A/S é comercialmente conhecida como TERMAMYL 120L. É classificada como uma endoenzima por catalisar especificamente e ao acaso a ruptura das ligações glicosídicas α (1,4) do amido, no entanto, sem apresentar ação sobre ligações α (1,6). A ação desta α -amilase sobre o

amido reduz drasticamente a viscosidade do meio, sendo denominada uma enzima de liquefação, que se destina a produção de maltodextrinas (SURMELY, 2003).

As α -amilases sintetizadas por *Bacillus licheniformis* estão entre as mais resistentes dentre todas as α -amilases existentes (KRISHNAN, 1983), por conseguinte, são classificadas como termoestáveis, por apresentarem pico de ação em temperaturas de 90 a 105 °C e pH 6.0 e são utilizadas na produção de xaropes, bebidas, álcool, na indústria têxtil, entre outras (LEONEL, 2001b).

De acordo com o padrão da Novozymes A/S, TERMAMYL 120L apresenta atividade enzimática de 120 KNU / g, sendo 1 KNU a quantidade de enzima que hidrolisa 5,26g de amido por hora (SURMELY, 2003)

3.9.2 Amiloglucosidase

Também conhecida como glicoamilase ou amilo-1,6-glucosidase, é comercializada sob o nome AMG 300L, produzida pela Novozymes S/A. É uma enzima sacarificante produzida por cepas do fungo *Aspergillus niger*, que hidrolisa completamente o amido em glucose a partir de uma extremidade não-redutora. Tem a capacidade de hidrolisar tanto ligações α (1,4) quanto α (1,6) do amido liquefeito e por este motivo é classificada como uma exoenzima. O resultado da conversão enzimática do amido pela amiloglucosidase é a sua transformação total em glucose (SURMELY, 2003).

De acordo com o fabricante apresenta atividade de 120 AGU/g, sendo que 1 AGU representa a concentração de enzima necessária para hidrolisar 1 micromol de maltose por minuto, segundo o padrão na Novozymes A/S (SURMELY, 2003).

3.10 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE

3.10.1 Hidrólise do amido presente no bagaço de mandioca

A hidrólise com o uso sinérgico de duas enzimas amilolíticas, α -amilase e amiloglucosidase tem por objetivo converter todo o amido presente no resíduo do processamento industrial da mandioca em glucose. Por meio de diversas técnicas serão monitorados parâmetros tais como a concentração de glucose ao final da hidrólise, microscopia, entre outras.

3.10.2 Determinação dos açúcares redutores

De acordo com a presença de grupos funcionais nas moléculas dos carboidratos, os mesmos podem ser classificados como açúcares redutores ou não-redutores. Os grupos funcionais que determinam essa classificação são os aldeídos ou cetonas. A presença desses terminais redutores nas moléculas pode ser determinada com o auxílio de indicadores, sendo o mais conhecido e utilizado entre todos, o cobre (SURMELY, 2003). Carboidratos como a glucose e a frutose, apresentam esses terminais redutores, sendo o aldeídico na glucose o cetônico na frutose.

A quantificação dos açúcares redutores pode ser feita pelo método DNS, proposto por Miller (1959) que se baseia na reação de redução do ácido 3, 5 dinitrossalicílico em 3 – amino – 5 – nitrossalicílico, com o desenvolvimento de coloração avermelhada (HOSTETTLER, 1951).

O método DNS de determinação de açúcares redutores é composto pelos seguintes reagentes: ácido dinitrossalicílico, sal de Rochelle, fenol, bissulfito de sódio e hidróxido de sódio, sendo que cada um tem uma finalidade específica (MILLER, 1959).

- Sal de Rochelle (solução de tartarato de sódio e potássio – $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$) – previne a reação do oxigênio dissolvido sobre o ácido dinitrossalicílico.
- Fenol – aumenta a quantidade da cor produzida.
- Bissulfito de sódio – estabilizante da cor obtida na presença do fenol.
- Hidróxido de sódio – redutor da ação da glucose sobre o ácido dinitrossalicílico.

3.10.3 Espectrofotometria UV – visível

A absorção da luz pelos materiais é o método pelo qual as cores são emitidas. Na região visível ou ultra-violeta a absorção de energia luminosa ocasiona rearranjo das moléculas que se encontram em seu estado fundamental. Esse rearranjo ocorre assim que um elétron absorve um fóton e é promovido ao seu estado de maior energia. Todos os métodos espectroscópicos estão fundamentados na Lei de Beer – Lambert, a qual enuncia que a quantidade de radiação absorvida é proporcional ao número de moléculas que absorvem a radiação, que é a concentração das espécies absorventes. A lei de Beer-Lambert só é aplicada rigorosamente se as interações entre as moléculas absorvidas são fracas. A quantidade de energia luminosa absorvida é denominada pela

absorbância (A) que é capacidade dos materiais em absorver radiações em frequências específicas (ROBINSON, 1996). A equação que a define:

$$A = \log_{10} \frac{I}{I_0}$$

(1)

3.10.4 Microscopia

Ao microscópio óptico, o grânulo de amido se mostra como uma massa homogênea. Ainda assim, é possível, por meio dessa técnica, distinguir amidos de diferentes fontes botânicas pela análise dos seus formatos, tamanho e simetria (CEREDA, 2002a).

Este método será empregado para avaliação dos efeitos da hidrólise enzimática no bagaço da mandioca.

3.10.5 Difratometria de Raios X

A difratometria de raios X é uma técnica de caracterização microestrutural de materiais cristalinos. Ao atingir um material, a radiação emitida é espalhada elasticamente sem perda de energia pelos elétrons de um átomo (PADILHA, 2000).

A radiação X foi descoberta por W. C. Röntgen em 1895. A técnica de difração de raios X pelo método do pó é a técnica mais utilizada para identificação de compostos cristalinos pela análise do padrão de difração (PADILHA, 2000).

A geração de raios X se dá com o bombardeamento de um ânodo puro de um determinado material, como exemplos, Cu, Cr, Fe, Co e Mo, por um feixe de elétrons do

cátodo acelerados por alta tensão em um tubo selado. Os comprimentos de onda das radiações mais utilizados são compreendidos entre 0,56 e 2,29 Å. Para que os resultados da análise de raios X apresentem qualidade, é indispensável que a radiação seja monocromática. Um tubo de raios X produz radiações tipo $K\alpha_1$, $K\alpha_2$ e $K\beta$. Para a análise de materiais são utilizadas ondas tipo $K\alpha$, sendo que as $K\beta$ são eliminadas por meio de filtros monocromadores. Ondas tipo $K\alpha_2$ são eliminadas eletronicamente durante o processamento dos dados (CONNOLLY, 2009).

A difração de raios X por compostos cristalinos é resultado da interação da radiação da fonte com os elétrons da amostra. Essa interação provoca espalhamento da radiação em todas as direções. A interferência construtiva dos raios X espalhados pelos átomos da amostra caracteriza a difração. O espalhamento coerente dos raios X, isto é, na mesma energia da radiação incidente, ocorre em um ângulo definido, denominado de ângulo de Bragg. A condição para ocorrência da difração é determinada pela Lei de Bragg (PADILHA, 2000):

$$n \lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta_{hkl} \quad (2)$$

Onde n é a ordem de difração (normalmente $n = 1$), λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d_{hkl} representa a distância entre o conjunto de planos e θ_{hkl} o ângulo de difração medido em relação aos raios X incidentes.

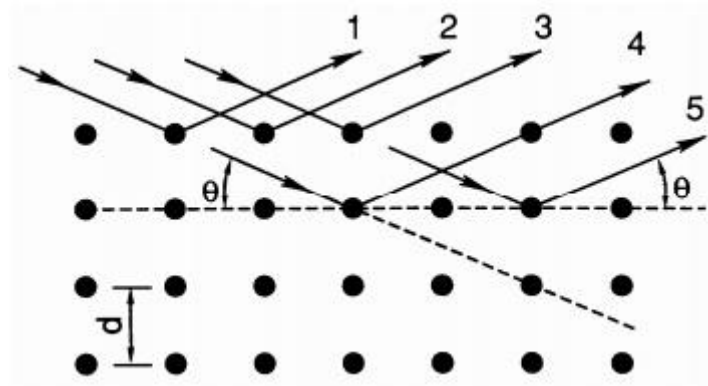


Figura 4 – Esquema da distância entre planos cristalográficos e os raios X incidentes e refratados

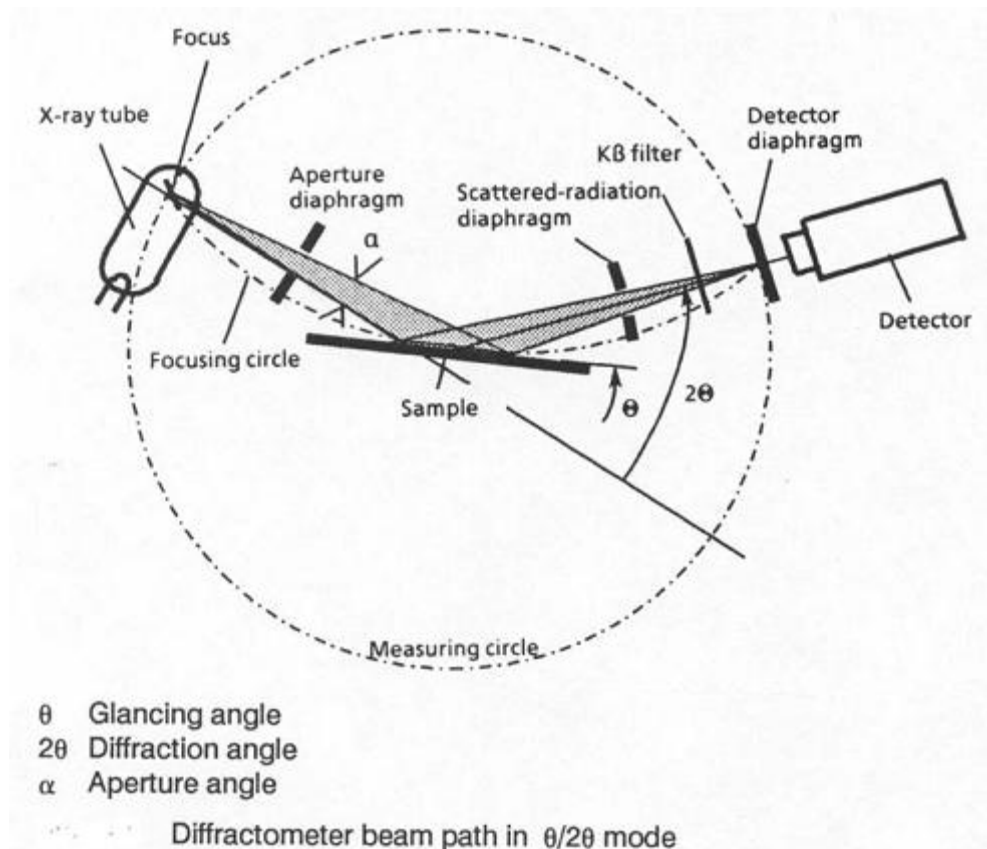


Figura 5 – Diagrama de um difratômetro de raios X.

Grânulos de amido apresentam estrutura semi – cristalina, a qual proporciona padrões específicos quando submetidos à radiação. Essa mesma estrutura cristalina sofre alterações quando o amido passa por um processo de hidrólise enzimática (AGGARWAL, 1998a; LACERDA, 2008b).

3.10.6 Técnicas Termoanalíticas

A Análise Térmica foi introduzida no Brasil nos anos 60 pelo Prof. Ernesto Geisbrecht com o auxílio de vários colaboradores, citando entre eles, especialmente o Profº Ivo Giolito, pelo seu trabalho de divulgação das técnicas termoanalíticas por meio de palestras, conferências e cursos. Nos dias atuais a Análise Térmica alcançou elevado grau de sofisticação e ganhou notoriedade por sua aplicação nos mais diversos setores da pesquisa e desenvolvimento de produtos bem como no controle de qualidade de produção (IONASHIRO, 2005).

Dentre as técnicas termoanalíticas existentes podemos citar as mais difundidas e utilizadas: Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Estas técnicas permitem obter informações referentes à variação de massa, estabilidade térmica, água livre e ligada, pureza, ponto de fusão e ebulição, transições vítreas, etc. Pela miríade de informações que o conjunto de técnicas termoanalíticas pode oferecer sobre os materiais analisados, o seu uso é verdadeiramente interdisciplinar, podendo ser empregada nas áreas de tecnologia de alimentos, química, metalúrgica, geológica, botânica, agrônômica e criminalística. Os amidos de diversas fontes botânicas bem como as alterações sofridas quando expostos à ação de enzimas também são objeto de pesquisa por meio da análise térmica (IONASHIRO, 2005, LACERDA, 2008a).

3.10.6.1 Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)

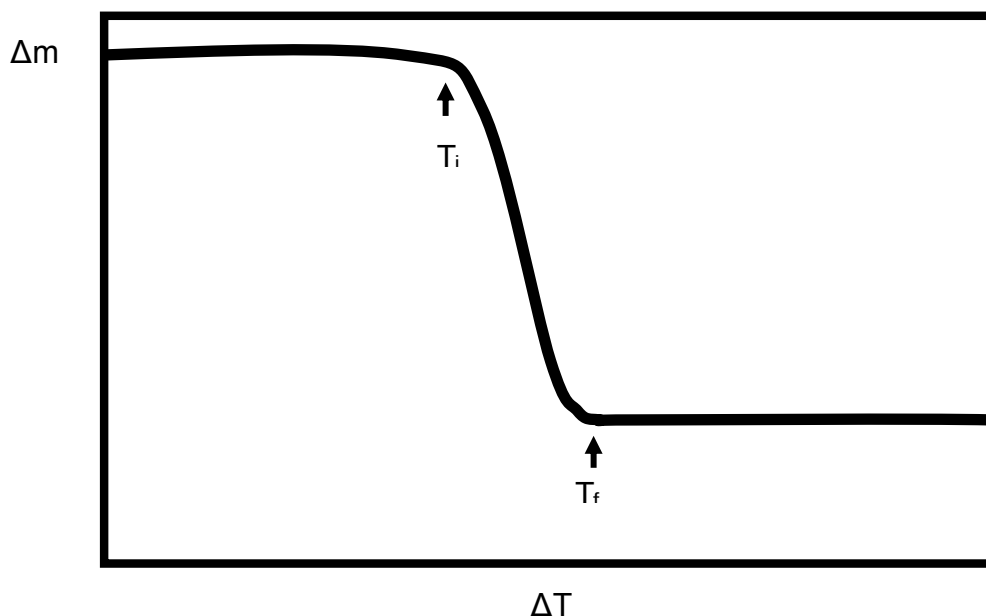


Figura 6 – Representação de uma curva termogravimétrica

A termogravimetria é uma técnica na qual as mudanças na massa de uma amostra (perdas ou ganhos) são determinadas em função da temperatura e/ou tempo (WENDLANT, 1986).

Essa técnica teve sua origem na necessidade de se conhecer detalhadamente o efeito que o aquecimento pode provocar sobre a massa das substâncias, e a faixa em que sua decomposição tem início, bem como para acompanhamento de sua desidratação, oxidação, etc (IONASHIRO, 2005).

Em 1915 foi descrito pelo pesquisador japonês Kotaro Honda, o primeiro instrumento para estudo das curvas de decomposição do sulfato manganoso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), do gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e do anidrido crômico (CrO_3). Foi esse mesmo pesquisador o criador da palavra termobalança (IONASHIRO, 2005).

Atualmente as balanças térmicas são compostas pelos seguintes componentes: balança registradora, forno, suporte da amostra, sistema de análise de dados e controlador da atmosfera do forno. Grande parte dos aparelhos comerciais utiliza a chamada “balança de nulo”, onde os suportes da referência e da amostra operam sempre em equilíbrio, e os deslocamentos provocados pelas perdas são compensados pela ação de um motor de torque magnético (IONASHIRO, 2005).

As análises termogravimétricas podem ser classificadas de três maneiras: isotérmicas, quase – isotérmicas e dinâmicas. Na TG isotérmica as alterações na amostra são avaliadas em função do tempo, sob uma temperatura constante. A TG quase – isotérmica é realizada com o aquecimento por etapas da amostra até a massa constante. Na TG dinâmica a amostra é aquecida, preferencialmente de forma linear, sob uma atmosfera controlada (WENDLANT, 1986).

A análise termogravimétrica pode ser aplicada no estudo das decomposições térmicas de substâncias orgânicas e inorgânicas, tais como, minérios, petróleo, madeiras, polímeros, alimentos, materiais explosivos, etc. Permite também o estudo da corrosão de metais em atmosferas controladas e em faixas amplas de temperatura. Estudo das velocidades de destilação e evaporação nos líquidos, e sublimação em materiais sólidos (IONASHIRO, 2005).

Na termogravimetria derivada (DTG), a derivada da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) é registrada em função da temperatura ou tempo. Neste método são obtidas curvas que correspondem à primeira derivada da curva TG e onde as áreas dos picos são proporcionais às alterações de massa sofridas pela amostra (IONASHIRO, 2005). As curvas DTG apresentam algumas vantagens:

- As curvas DTG indicam com exatidão o início e o instante em que a velocidade da reação é máxima.
- Os picos agudos permitem distinguir claramente uma sucessão de eventos que muitas vezes não podem ser percebidos na curva TG.
- Às áreas dos picos correspondem exatamente às perdas e ganhos de massa e podem ser utilizadas em determinações quantitativas.

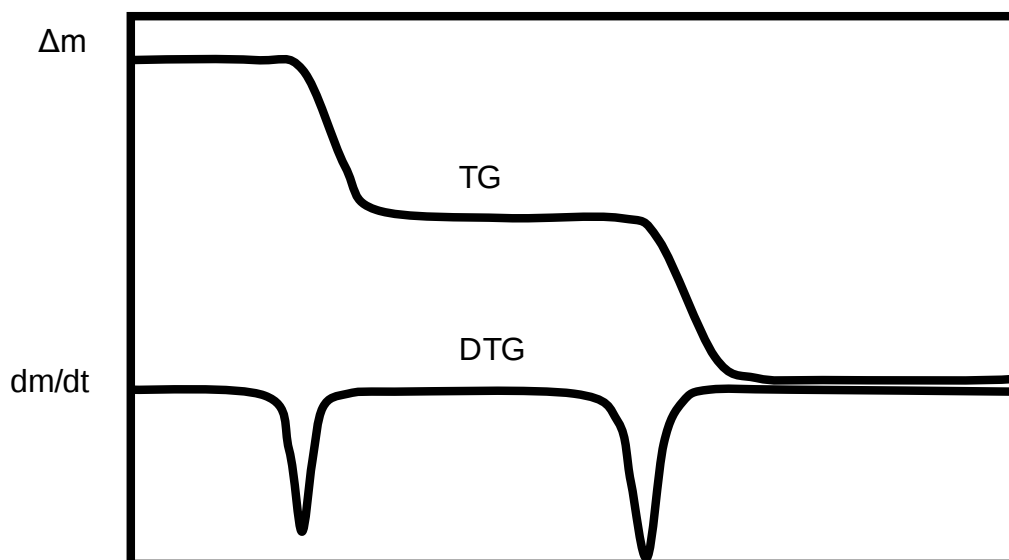


Figura 7 – Representação de uma curva TG-DTG

3.10.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à amostra e a um material de referência termicamente inerte (p. ex.: microcadinho selado vazio) à medida que ambos vão sendo submetidos a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO, 2005).

Através dessa técnica é possível acompanhar efeitos decorrentes da variação de temperatura associados a alterações físicas ou químicas, tais como, transições de fase como a fusão, ebulição, sublimação, congelamento e modificações de estruturas cristalinas, ou reações de desidratação, dissociação, oxidação – redução e decomposição. Transições de segunda ordem (variação de entropia), como a transição vítrea sofrida por polímeros, também são detectadas pela calorimetria exploratória diferencial (IONASHIRO, 2005).

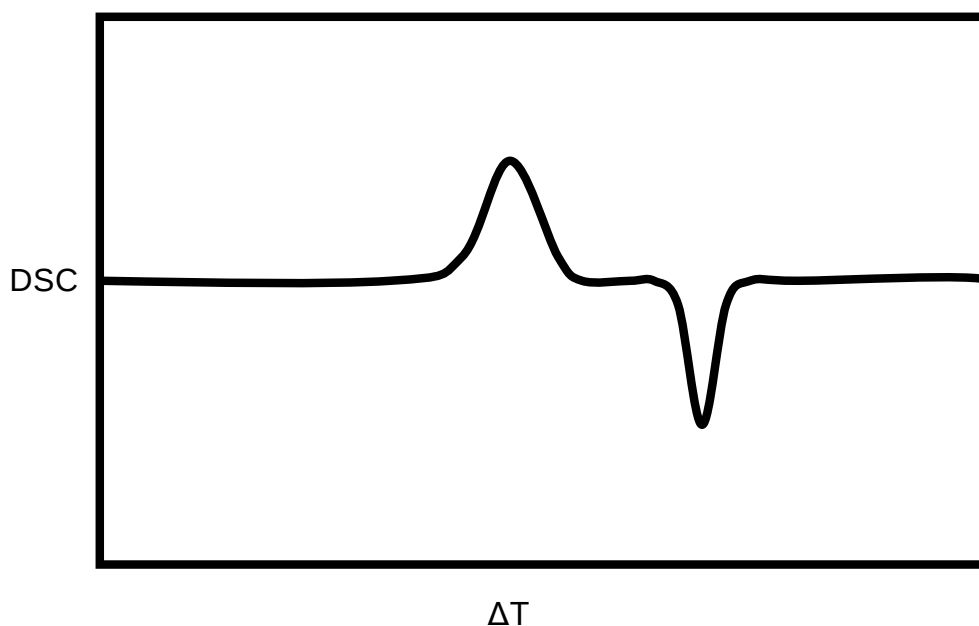


Figura 8 – Representação de uma curva DSC

Na análise térmica diferencial, amostra e referencial inerte são submetidos a medição contínua de temperaturas à medida em que são aquecidos ou resfriados em um forno. Essas medidas de temperatura são diferenciais, pois são registradas as diferenças entre na amostra (T_a) e a referência (T_r), ou seja, $\Delta T = T_a - T_r$, em função do tempo, sendo que a razão de aquecimento é sempre linear ($dT/dt = \text{cte}$)

De acordo com Speyer (1994), as técnicas de calorimetria exploratória diferencial e análise térmica diferencial permitem acompanhar as transformações ocorridas em uma amostra durante o processo de aquecimento/resfriamento de um material face a um referencial inerte. Temperaturas em que ocorrem transformações nos materiais, assim como, a termodinâmica e cinética podem ser determinadas usando a DTA e DSC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O bagaço de mandioca utilizado neste estudo trata-se do resíduo fibroso do processo de extração do amido de mandioca (bagaço da mandioca) proveniente de uma unidade da Amidos Pasquini situada ao Noroeste do Estado do Paraná.

O bagaço de mandioca foi hidrolizado com as enzimas α -amilase comercialmente denominada TERMAMYL 120L e amiloglucosidase comercialmente denominada AMG 300L, ambas produzidas por Novozymes A/S.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Microscopia óptica

Cada amostra foi submetida à análise em um microscópio OLYMPUS SZX9, câmera CYBERNETIC'S COOL SNAP PRO COLOR CAMERA. As imagens foram identificadas e dotadas de escala usando-se IMAGE PRO PLUS nos aumentos 400x e

1000x com óleo de imersão. Para tanto, cada amostra foi hidratada com água destilada e corada com reagente de lugol, a fim de se evidenciar mais claramente os grânulos de amido presentes. A solução de lugol foi preparada triturando-se 10 g de iodeto de potássio (KI) p.a com 5g de iodo (I_2) p.a com pequenas quantidades de água destilada. A mistura triturada foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, tendo, então, seu volume completado.

4.2.2 Análise do bagaço sem tratamento

As amostras de bagaço de mandioca sem tratamento enzimático foram analisadas microscopicamente a fim de se observar seus constituintes (grânulos de amido e fibras). A difratometria de raios x pelo método do pó foi empregada para verificação da cristalinidade do material. As técnicas termoanalíticas (TG-DTA, TG/DTG e DSC) foram utilizadas para analisar o comportamento das amostras de bagaço de mandioca quando submetidas a um programa de aquecimento em razão do tempo. As perdas de massa, mudanças de estado físico, temperatura de gelatinização foram determinadas a partir das análises.

4.2.3 Hidrólise enzimática

O bagaço de mandioca foi hidrolisado pelo método enzimático suspendendo-se o material sólido em água destilada na concentração de 10%, visto que concentrações maiores aumentariam demasiadamente a viscosidade do meio reduzindo a ação da enzima por oclusão do substrato da reação (SURMELY, 2003). As amostras foram hidrolisadas de três formas distintas, sendo elas: 1 hora sob ação da α -amilase, 12 e 24

horas sob ação da α -amilase e amiloglucosidase. Cada amostra foi hidrolisada em triplicata (Figura 9).

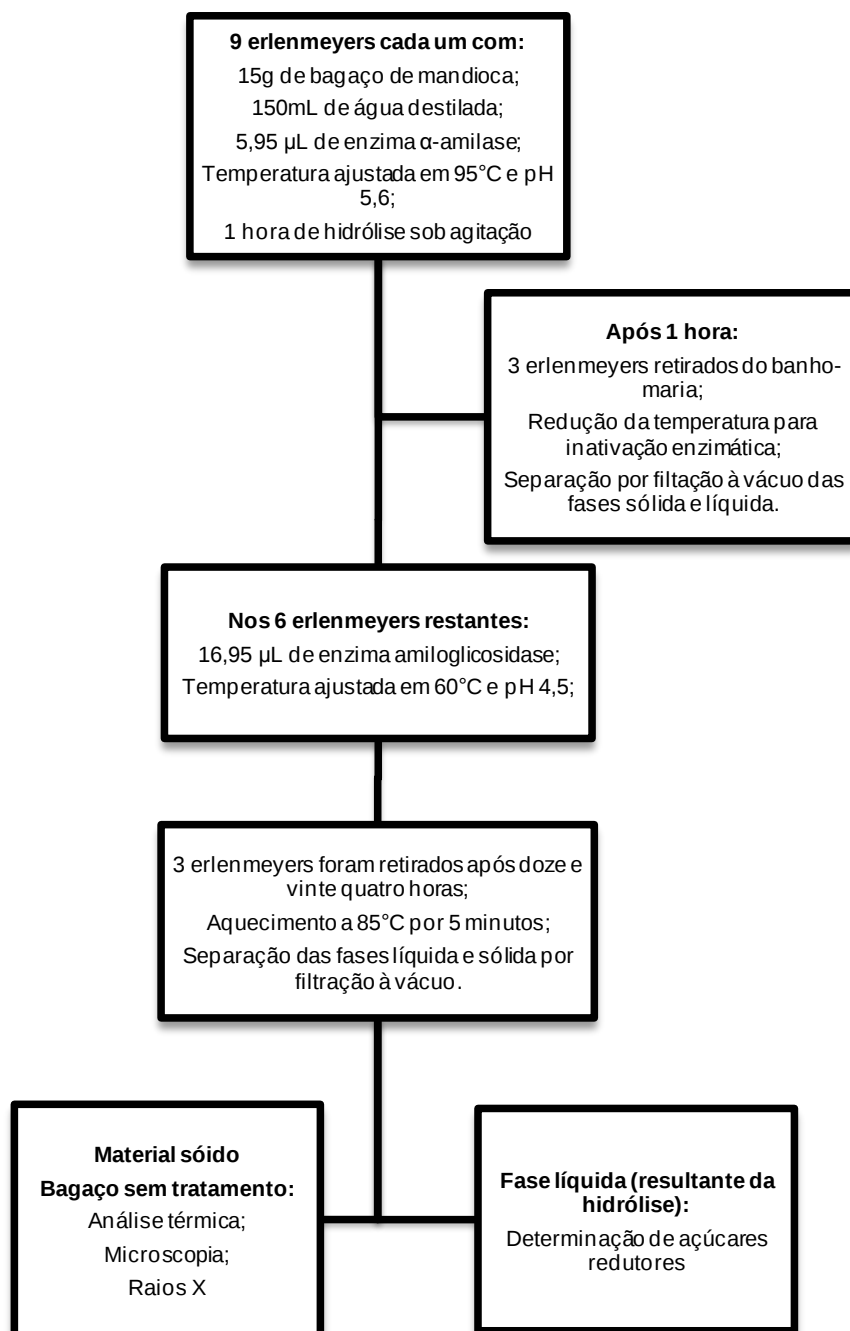


Figura 9 – Fluxograma do processo de hidrólise das amostras e as respectivas análises

Cada frasco teve seu pH corrigido para 5,6 com o auxílio de soluções 0,1 e 0,01 M de ácido clorídrico. Para cada frasco com a suspensão de bagaço de mandioca foi adicionado enzima α -amilase na proporção de 0,5 kg por tonelada de material amiláceo bem como 30 mg kg⁻¹ de CaCl₂, necessário para estabilização da enzima, segundo a recomendação da ficha técnica do fabricante, considerando-se a massa total de amostra. O volume de amostra utilizado no presente estudo foi baseado no peso seco da amostra seguindo as recomendações sugeridas pelo fabricante:

Sendo assim:

$$\begin{array}{rcl} 500g \text{ Termamyl} & - & 1.000.000g \text{ amido} \\ x g & - & 15g \text{ amostra} \end{array}$$

$$x = 0,0075 g$$

A enzima Termamyl apresenta densidade igual a 1,26 g mL⁻¹. Pela equação:

$$d = \frac{m}{V}$$

(3)

Calculamos o volume de enzima a ser usada:

$$1,26 = \frac{0,0075}{V}$$

$$v = 0,00945 \text{ mL ou } 9,45 \mu\text{L}$$

Após a adição do preparado enzimático cada frasco foi acondicionado em um banho-maria tipo DUBNOFF, marca TECNAL (Piracicaba – SP, Brasil) sob agitação até a temperatura de 90 °C.

Ao final da primeira hora, a enzima α -amilase foi inativada pela redução da temperatura de atividade da enzima e ajuste do pH para ação da enzima seguinte. Três erlenmeyers foram retirados do banho-maria e estocados em freezer para posterior separação das fases sólida e líquida. A temperatura do banho-maria foi então reduzida para 60 °C e os erlenmeyers restantes tiveram seu pH ajustado para 4,5 com HCl 0,1 M para a adição da enzima amiloglucosidase na quantidade de 1,13 L para cada tonelada de material amiláceo, segundo a especificação do fabricante. O volume de amiloglucosidase a ser usado com base no peso da amostra foi calculado obedecendo às recomendações do fabricante:

Sendo assim o volume utilizado será:

$$\begin{array}{rcl} 1,130\text{mL AMG} & - & 1.000.000\text{g amido} \\ x\text{ g} & - & 15\text{g amostra} \\ x = 0,00001695\text{mL ou } 16,95\mu\text{L} \end{array}$$

Dos seis erlenmeyers restantes, três foram retirados depois de 12 horas e os três últimos retirados após o término das 24 horas.

A amiloglucosidase remanescente foi inativada pelo aquecimento da suspensão até 85 °C por 5 minutos.

Todas as suspensões foram filtradas sob pressão negativa com auxílio de um funil de Büchner para separação das fases sólida e líquida.

O material sólido obtido após as hidrólises foi analisado por meio de microscopia óptica para verificação da ação das enzimas sobre os grânulos de amido. A difratometria de raios X foi utilizada para análise da cristalinidade do amido restante no

bagaço hidrolisado. Ainda na fase sólida, foram empregadas as técnicas termooanalíticas nas mesmas condições utilizadas no material não hidrolisado.

4.2.4 Técnicas Termooanalíticas

4.2.4.1 Calibração do equipamento TG 60

Para que os resultados das técnicas termooanalíticas sejam precisos e reprodutíveis deve-se realizar a calibração do equipamento. Para tanto, utilizam-se materiais-padrão com decomposição conhecida e com perdas de massa em temperaturas bem definidas. Para calibração do equipamento de termogravimetria foi utilizado um padrão de oxalato de cálcio monoidratado frente a um micro-cadinho de referência vazio.

4.2.4.2 Calibração do equipamento DSC 60

Por ser utilizada tanto em medidas quantitativas quanto qualitativas, a calibração do equipamento de DSC deve ser realizada a cada alteração das condições experimentais, como atmosfera, vazão e tipo do gás de arraste, razão de aquecimento, etc.

De acordo com Carvalho Filho (2000), a calibração da constante de célula do equipamento e da temperatura foi baseada na determinação do ponto de fusão de um material padrão como o Índio por meio de uma curva DSC comparada com o valor obtido na literatura. A linha base foi calibrada empregando-se dois micro-cadinhos,

sendo um vazio como referência e outro com o Índio, grau de pureza 99,9% e aquecimento até 600 °C.

4.2.4.3 Termogravimetria

A análise termogravimétrica foi executada em um TG 60 SHIMADZU. Cada amostra do bagaço de mandioca sem tratamento enzimático e com diferentes tempos de hidrólise permaneceu acondicionada em um dessecador até o momento da análise. Posteriormente cada amostra foi pesada em uma balança analítica SHIMADZU AY 220, com a finalidade de se obter o valor aproximado da massa para cada análise. Todas as amostras, após terem suas massas pesadas, foram acondicionadas em micro-cadinhos de α -alumina pré-tarados na termobalança.

As condições de análise foram as seguintes (AGGARWAL, 1998a):

- Massa da amostra: aproximadamente 5,0 mg;
- Atmosfera da câmara: ar sintético;
- Vazão de gases: 100 mL min⁻¹;
- Razão de aquecimento: 10 °C min⁻¹.;
- Faixa de temperatura de análise: 30 a 600 °C.

4.2.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento DSC 60 SHIMADZU. Cada amostra foi acondicionada em um dessecador para, no momento imediatamente

anterior a cada análise, ser pesada em uma balança analítica SHIMADZU AY 220, para se obter o valor aproximado da massa de cada amostra ser analisada. Foram utilizados cadinhos de alumínio modelo C 201 – 53090, fabricante SHIMADZU, selados pelo mecanismo de prensagem com capacidade de 40 μL . Para as análises, cada cadinho de alumínio e o material nele contido foram selados e analisados no DSC.

As condições para análise do bagaço de mandioca sem tratamento enzimático são as seguintes (AGGARWAL, 1998a):

- Massa da amostra: aproximadamente 5,0 mg;
- Atmosfera da câmara: ar sintético;
- Vazão de gases: 100 mL min^{-1} ;
- Razão de aquecimento: 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$;
- Faixa de temperatura de análise: 30 a 600 $^{\circ}\text{C}$.

Para analisar o evento da gelatinização, foram feitas suspensões de bagaço de mandioca e água destilada na razão de 1:4 (amido:água) em peso, para cada amostra. Cada cadinho de alumínio foi preenchido com aproximadamente 2 mg de bagaço e 8 μL de água destilada. Após a mistura do bagaço com água, cada cadinho foi selado e deixado em repouso pelo período de 1h, para a homogeneização das fases sólida e líquida. Antes de se iniciarem as análises, um cadinho vazio foi selado e colocado no calorímetro para ser utilizado como referência (AGGARWAL, 1998a; YU; CHRISTIE, 2001).

Na análise da gelatinização foram utilizadas as seguintes condições:

- Massa da amostra: aproximadamente 2 mg de bagaço suspensos em 8 μL de água destilada;
- Atmosfera: ar sintético;
- Vazão: 100 mL min^{-1} ;
- Razão de aquecimento: 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$;
- Faixa de temperatura: entre 30 e 90 $^{\circ}\text{C}$.

4.2.5 Determinação de açúcares redutores

O método DNS descrito por Miller, (1959), baseia-se na reação de redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico em 3 – amino – 5 – nitrossalicílico por ação dos açúcares redutores. Esta reação, em soluções contendo açúcares redutores, produz coloração com tonalidades do amarelo ao castanho, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente.

A análise foi realizada inicialmente com a diluição das amostras líquidas, em água destilada, na proporção 1:100, e foi adicionado às mesmas, 1 mL do reagente DNS filtrado, sendo posteriormente homogeneizadas em agitador. As amostras foram colocadas por 5 minutos em banho-maria a 95 $^{\circ}\text{C}$ e em seguida foram resfriadas a temperatura ambiente. Subseqüentemente as absorbâncias foram analisadas, em um espectrofotômetro de UV visível modelo Uvmini – 1240, marca SHIMADZU no comprimento de onda de 540 nm. Os valores foram convertidos em g L^{-1} com base na curva padrão de glucose a 1 g L^{-1} realizada com o mesmo reagente e empregando-se a mesma técnica.

4.2.6 Espectrofotometria UV - visível

A espectrofotometria é um método de análise óptico baseado em medidas de absorção de radiação eletromagnética. Dependendo da região do espectro analisada, a técnica recebe denominações diferentes, como espectrofotometria no infra-vermelho, no ultra-violeta visível (UV-vis). A região que compreende os comprimentos de onda de 400nm a 700nm (1 nanômetro = 10^{-9}) é denominada espectro de luz visível. É nessa faixa de comprimento que as análises de açúcares redutores são realizadas. Os valores obtidos por meio desta técnica são dados pela absorção de energia luminosa incidente pelas moléculas da amostra em questão. A análise é realizada pela comparação da amostra frente à um referencial que não apresenta absorbância na região do espectro visível. Para o cálculo da concentração de açúcares redutores, em g L^{-1} , na fase líquida resultante do processo de hidrólise do bagaço de mandioca, as amostras foram diluídas na proporção de 1:100 de forma a facilitar a leitura, evitando assim valores demasiadamente altos.

4.2.7 Difratometria de raios X

Os grânulos de amido apresentam cristalinidade a qual pode ser confirmada por meio da técnica de difratometria de raios X. Para análise do bagaço da mandioca foi empregada difratometria de raios X pelo método do pó utilizando-se um difratômetro SIEMENS mod. D-5000, operando com radiação de $\text{Cu}_{K\alpha}$ (comprimentos de onda de 1.542 Å) sob tempo de varredura de $0,5^\circ \text{ min}^{-1}$ na geometria de Bragg – Brentano de

$5 < \Theta < 35$. As análises foram executadas usando gerador de tensão de 40kV e corrente emissora de 30 mA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

As imagens obtidas na análise microscópica do bagaço de mandioca sem tratamento enzimático mostraram a presença de amido em grande quantidade (Figura 10 e 11). Os grânulos do amido de mandioca apresentam forma esférica e hemisférica, e 20µm de diâmetro, em média, confirmando resultados obtidos por Hoover (2001), Ciacco (1982) e Karam (2003). Grânulos de amido são mostrados em destaque na Figura 11, sob aumento de 1000x, podendo ser observada a morfologia característica do amido de mandioca.

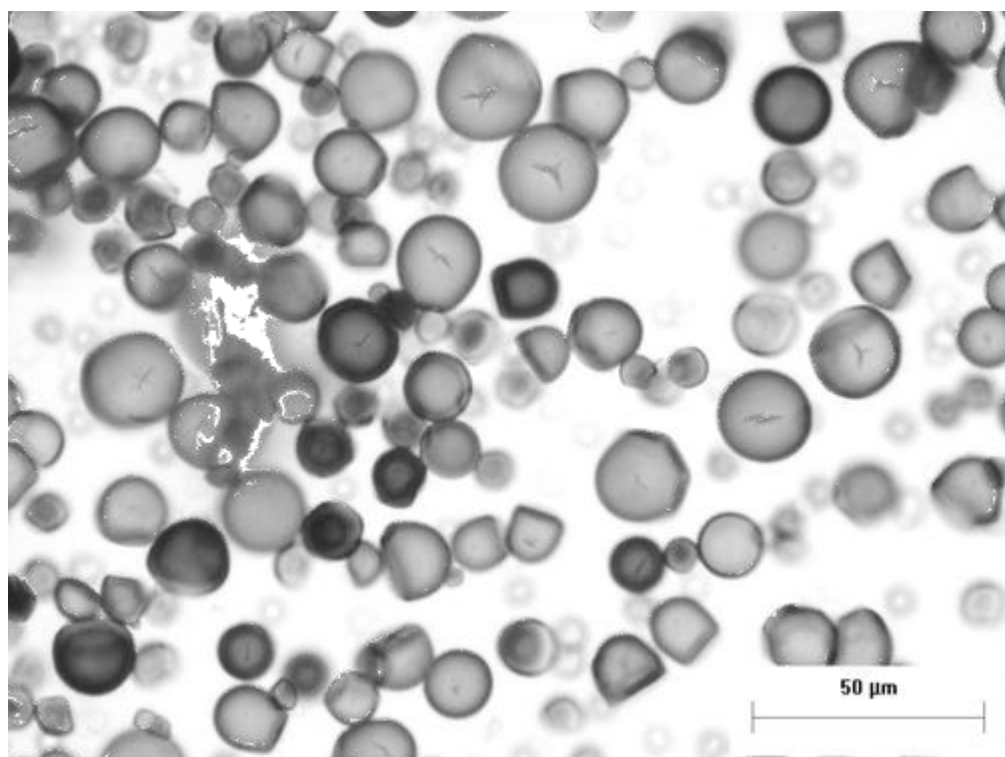


Figura 10 – Micrografias do bagaço de mandioca nativo mostrando a morfologia dos grânulos de amido em aumento de 400x

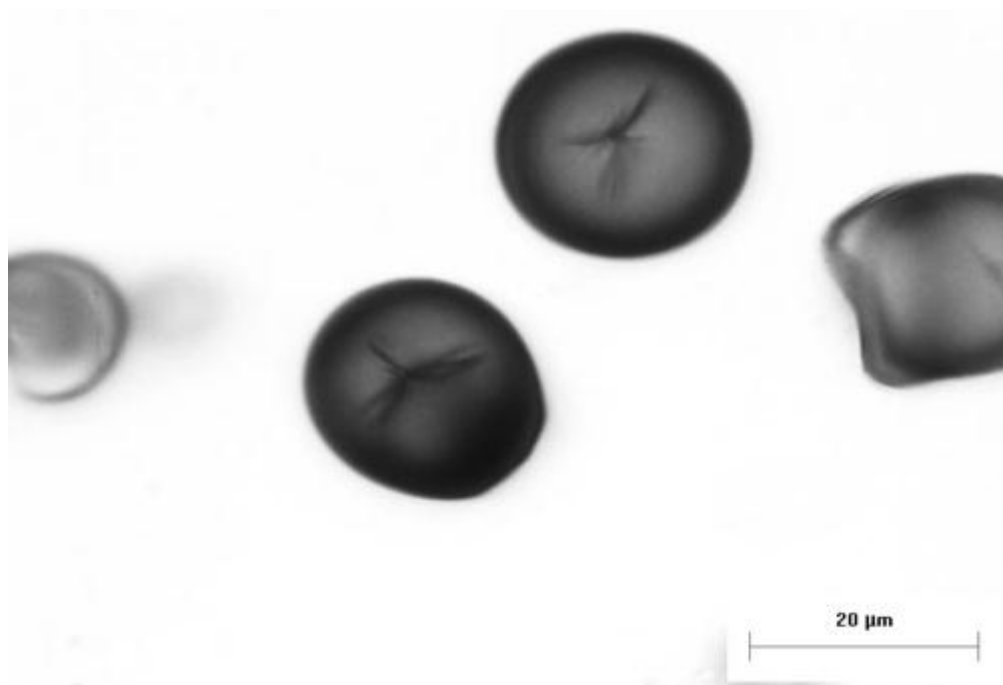


Figura 11 – Micrografia de grânulos de amido nativo em destaque em aumento de 1000x

Na Figura 12 observam-se grânulos de amido aderidos às fibras do bagaço de mandioca sem tratamento enzimático. Essa mesma característica foi observada por Leonel (1999), sugerindo a existência de uma forte ligação do grânulo de amido à parede celular, fazendo com que, mesmo após a hidrólise, vestígios de grânulos de amido ainda permaneçam ligados ao parênquima celular (Figura 13).

Após a hidrólise sob ação das enzimas α -amilase e amiloglicosidase por 24h poucos grânulos de amido são visualizados ao microscópio e os que ainda restam estão, em sua maioria, ligados às paredes celulares do material fibroso, como na Figura 14. Poucas alterações estruturais nos grânulos foram observadas ao microscópio.

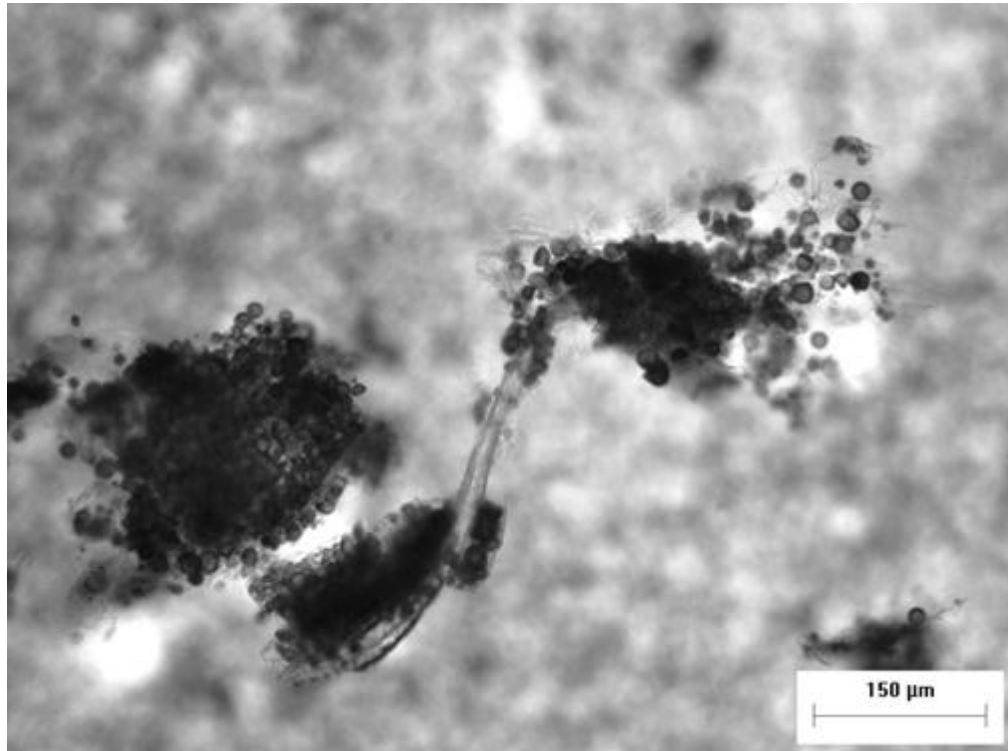


Figura 12 – Micrografia mostrando a presença de fibras com grânulos de amido aderidos em aumento de 100x no bagaço de mandioca sem tratamento enzimático

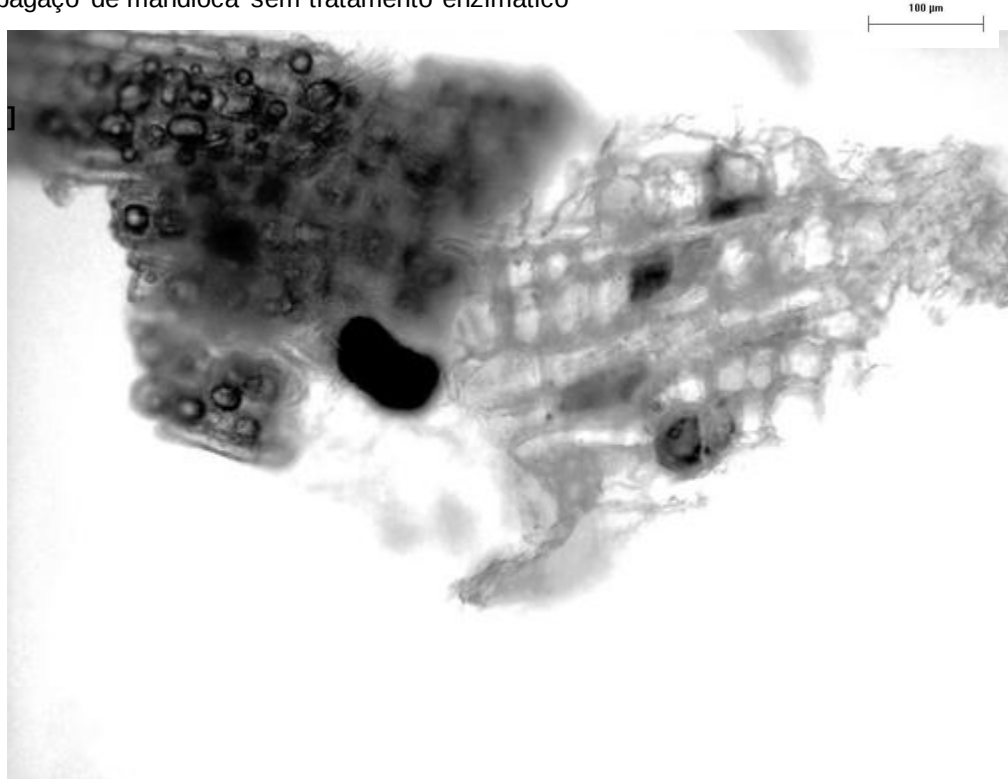


Figura 13 – Micrografia do bagaço de mandioca após tratamento enzimático de 24h (400x)

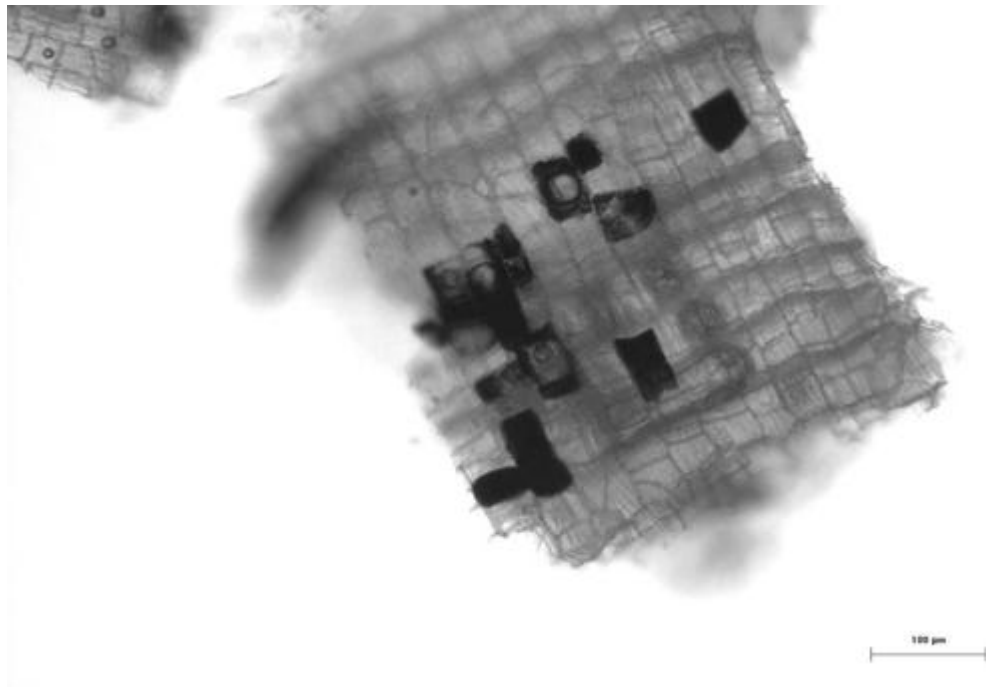


Figura 14 – Micrografia mostrando grânulos de amido ligados à parede celular do material fibroso do bagaço de mandioca (400x)

5.2 TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

5.2.1 Termogravimetria

A degradação térmica de materiais amiláceos tem sido estudada por diversos pesquisadores, destacando-se entre eles os estudos de Aggarwal e Dollimore (1998a, 1998b) e Marchessault *et al.* (1985). Análises termogravimétricas e de ressonância magnética nuclear (NMR) demonstraram, respectivamente, que o aquecimento desses materiais provoca despolimerização das macromoléculas conduzindo à formação de produtos solúveis em água fria, denominados pirodextrinas. Com o aumento gradual da temperatura, ocorre a formação de compostos como levoglucosanos, furfural e voláteis de baixo peso molecular. Após a eliminação desses compostos voláteis, permanece um resíduo carbonáceo sem alteração de massa, mesmo que o aquecimento continue até 1500 °C (BEAL, 1970).

Nas Figuras (10 a 13)15 a 18, são apresentados os comportamentos térmicos do bagaço de mandioca em seu estado não hidrolisado e hidrolisado por 1 hora com α -amilase, 12 e 24 horas com α -amilase e amiloglucosidase, ilustrados pelas curvas termogravimétricas (TG) e pelas diferenças de temperatura entre a amostra e a referência (DTA). As

Os gráficos das análises termogravimétricas do bagaço de mandioca apresentam perdas de massa em várias etapas. No primeiro evento exotérmico, entre 300 e 400 °C ocorre a perda de massa mais expressiva, com redução maior que 50 % da massa total, observa-se o efeito da redução da estabilidade térmica evidenciado quando grânulos de amido são submetidos à ação de enzimas amilolíticas. Pode-se notar o aumento gradativo da intensidade deste evento de acordo com o

comportamento das curvas DTA. Até aproximadamente 500 °C acontece a combustão da lignina, representada pelo evento exotérmico. Após esse evento não são percebidas perdas de massa adicionais.

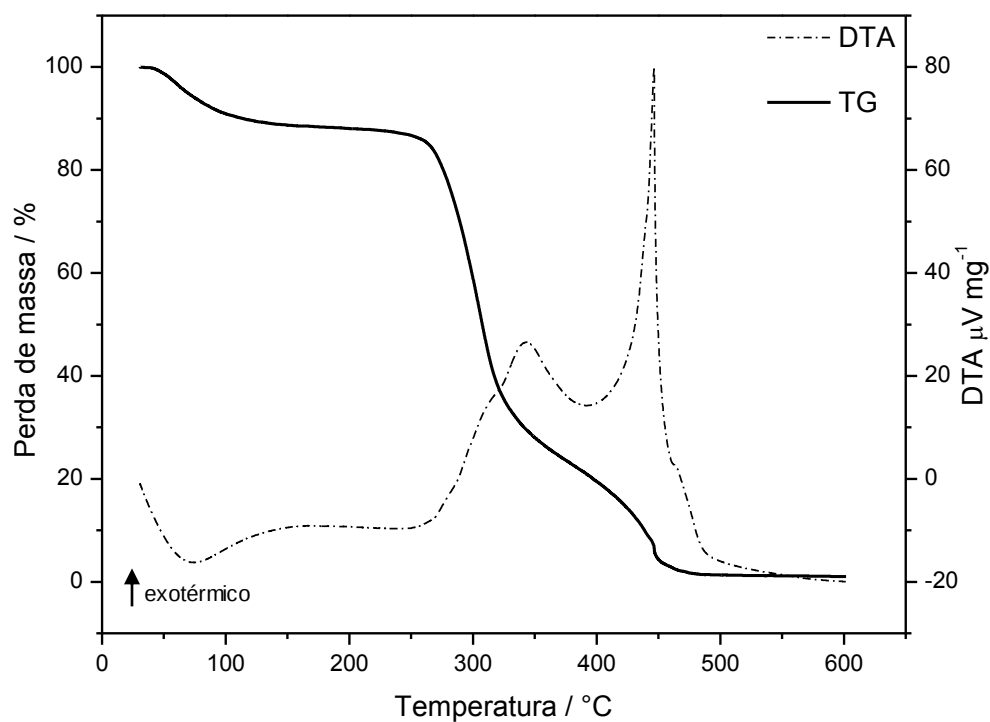


Figura 15 – Curva TG-DTA do bagaço da mandioca sem tratamento enzimático

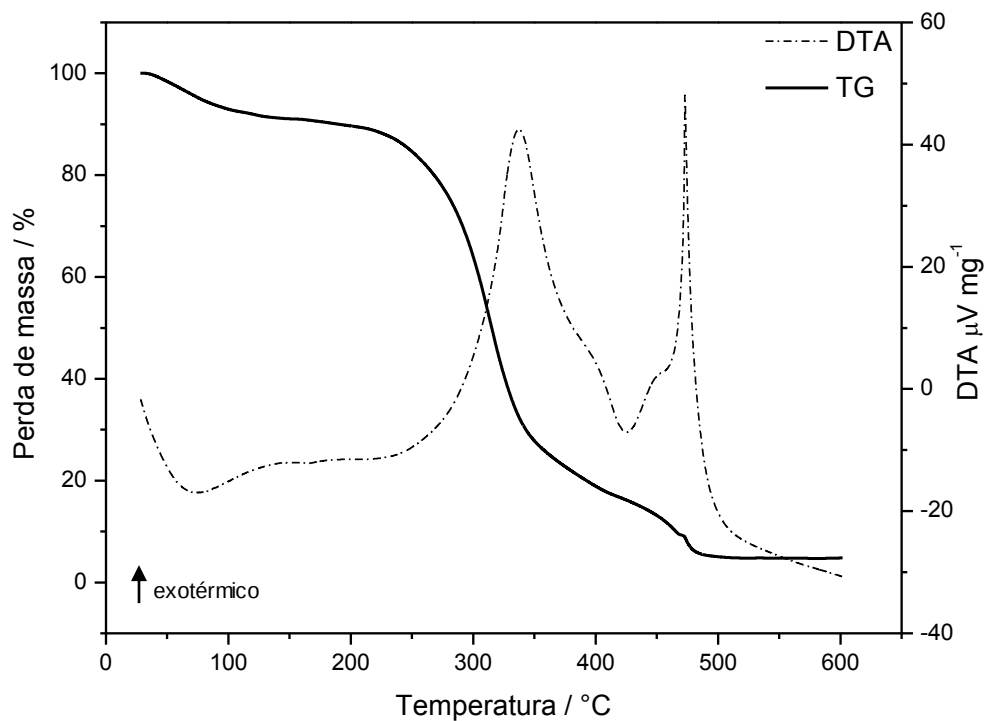


Figura 16 – Curva TG-DTA do bagaço de mandioca após tratamento enzimático por 1 hora sob ação da α -amilase

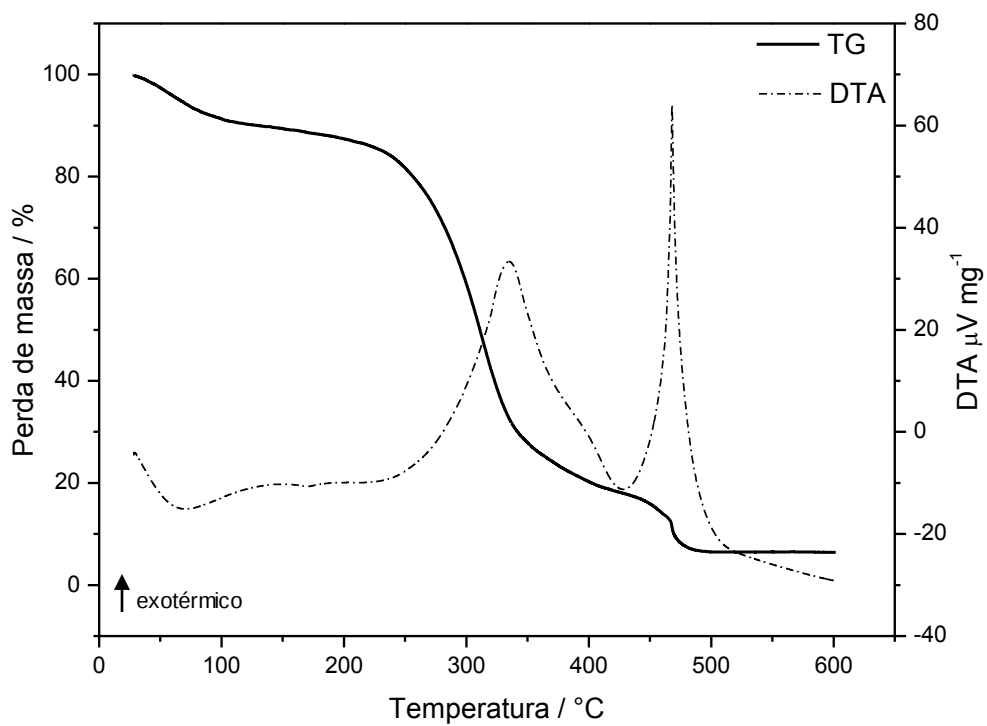


Figura 17 – Curva TG-DTA do bagaço de mandioca após tratamento enzimático por 12 horas sob ação da α -amilase e amiloglucosidase

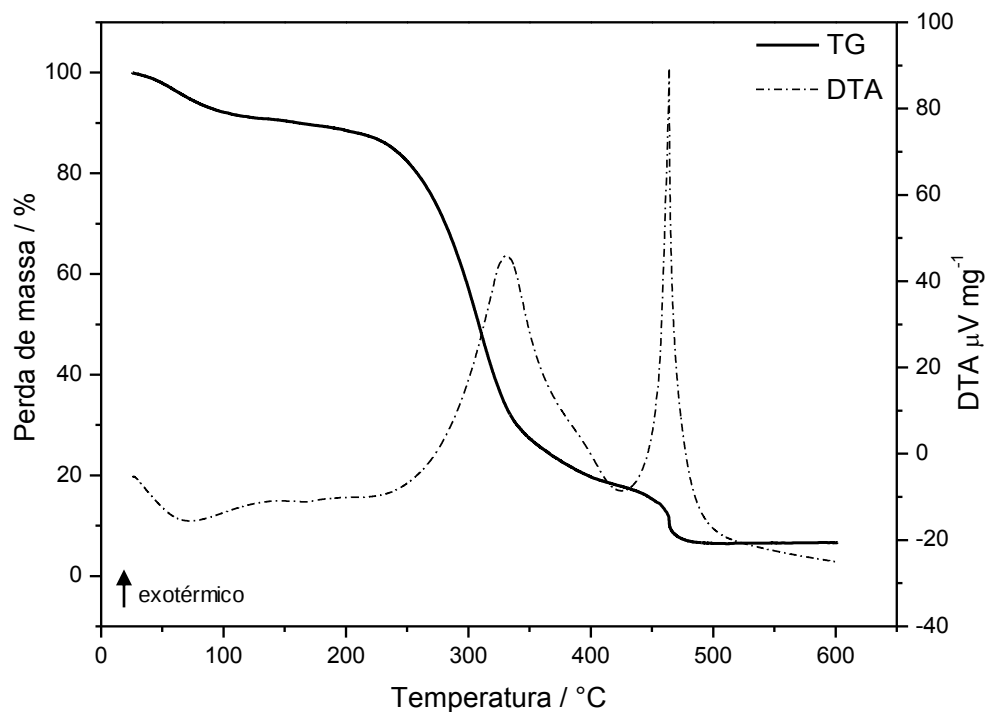


Figura 18 – CurvaTG-DTA do bagaço de mandioca após tratamento enzimático por 24 horas sob ação da α -amilase e amiloglucosidase

Tabela 3

Avaliação dos dados das curvas termogravimétricas do bagaço da mandioca

Bagaço de mandioca	Sem tratamento	1h α -amilase	12h α -amilase + amiloglucosidase	24h α -amilase + amiloglucosidase
Teor de umidade (%)	11,2	8,9	10,2	9,0
Perda total de massa (%)	98,3	94,9	92,4	95,6
Temp. On-set				
TG (°C) 2º evento	273,05	267,9	261,1	260,05

A Tabela 3 apresenta os valores referentes às análises termogravimétricas realizadas no bagaço de mandioca nativo e hidrolisado. Segundo Soliman *et al.* (1997) a temperatura até 150 °C representa a perda de compostos facilmente voláteis e água.

Avaliando-se a porcentagem de perda de massa até 150 °C, nota-se que a redução da massa referente à água nas amostras com tratamento enzimático varia de 8 a 20%, em relação à amostra de bagaço de mandioca sem o mesmo tratamento. Essa perda de massa é representada pelo evento endotérmico no início da curva DTA.

Assim como a perda referente à água, a amostra de bagaço de mandioca também apresentou alteração na perda total de massa, sendo menor a perda nas amostras submetidas à ação das enzimas em virtude do excipiente utilizado como veículo nas enzimas e do sal formado na neutralização do pH da suspensão de bagaço de mandioca.

Quando comparados os teores de umidade e cinzas obtidos pela termogravimetria e pelas metodologias do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985), sobre o material não hidrolisado, percebeu-se que havia divergência de 3,5 pontos percentuais entre os resultados para umidade e 0,1 pontos percentuais para cinzas.

Os valores que serviram de comparação para os resultados obtidos na termogravimetria são os que constam na Tabela 4.

Tabela 4

Composição média das amostras de bagaço de mandioca utilizadas no presente estudo

Composição	Distribuição por peso (%)
Umidade	14,7
Proteínas	1,4
Lipídios	0,5
Fibras	12,1
Cinzas	1,8
Amido	69,5

As temperaturas de início da principal zona de degradação foram obtidas pela intersecção de tangentes à linha base da curva TG (IONASHIRO, 2005). As temperaturas *onset*, confirmam a estabilidade térmica dos amidos até a temperatura de aproximadamente 300 °C. Confirma-se também a redução das temperaturas quando a hidrólise enzimática é empregada (AGGARWAL, 1998a).

O deslocamento das temperaturas de degradação durante a análise termogravimétrica do bagaço de mandioca se dá em virtude do aumento da área de exposição ao calor que ocorre com os grânulos de amido quando submetidos à hidrólise enzimática (AGGARWAL, 1998a; LACERDA, 2008b).

Pela análise DTA, os eventos exotérmicos são os mais significativos. O primeiro destes eventos está compreendido na faixa entre 300 °C – 350 °C, onde a celulose é degradada em compostos voláteis e levoglucosanos (BEAL, 1970). O segundo evento exotérmico entre 400 e 500 °C, presente na curva DTA é relacionado à ignição dos resíduos carbonáceos (LeVAN, 1998). Essa reação exotérmica é muito intensa tanto no

material nativo, quanto nas amostras hidrolisadas em virtude da quantidade de fibras no bagaço de mandioca, compostas por celulose, hemicelulose e lignina (LEONEL, 1999).

Na análise térmica, a termogravimetria derivada é utilizada quando se necessita distinguir uma sucessão de eventos que não pode ser claramente distinguida nas curvas da TG. Na Figura 19 as curvas DTG são apresentadas em grupo a fim de mostrar as alterações na forma dos picos, que correspondem ao quanto da massa da amostra foi perdido. Mas principalmente para comprovar que, mesmo após a hidrólise enzimática, o número de eventos permanece inalterado.

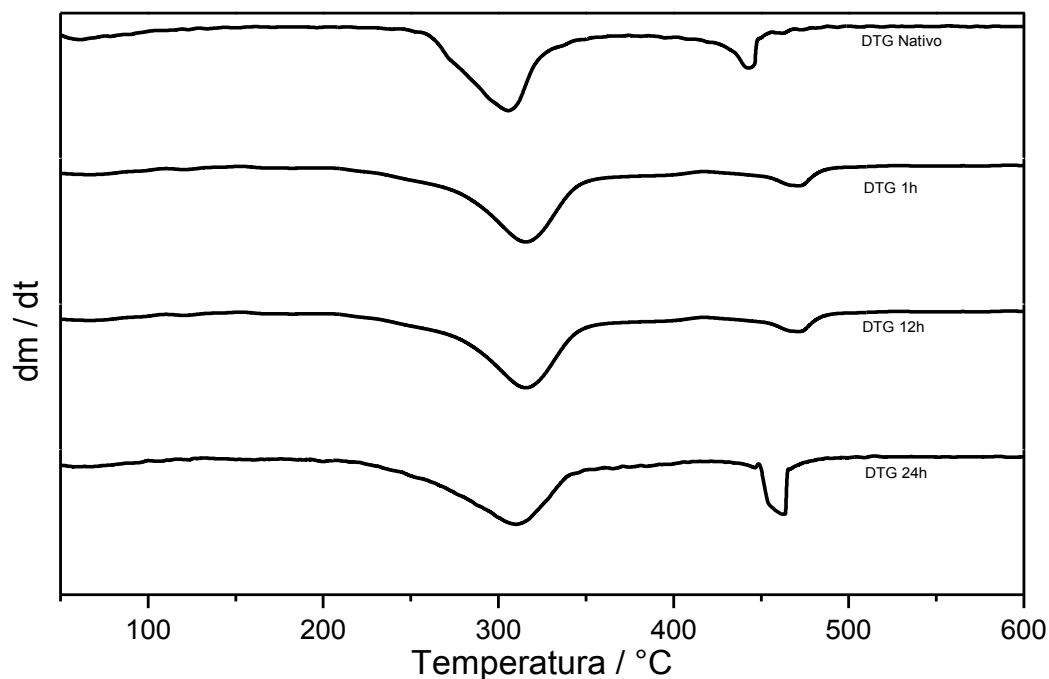


Figura 19 – Curvas DTG do bagaço de mandioca nativo e hidrolisados

Os valores referentes às temperaturas obtidas pela análise da termogravimetria derivada encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5

Avaliação dos dados das curvas de termogravimetria derivada das amostras

Bagaço de mandioca	Sem tratamento	1h α -amilase	12h α -amilase + amiloglucosidase	24h α -amilase + amiloglucosidase
Temp. 1º evento (°C)	60,3	62,9	59,6	66,6
Temp. 2º evento (°C)	303,7	315,7	311,5	310,8
Temp. 3º evento (°C)	444,5	472,5	466,75	460,7

5.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

5.2.2.1 Fusão do amido

Segundo Sriroth (2000), o amido com baixa concentração de umidade, próximo ao estado anidro, quando submetido a aquecimento, apresenta ponto de fusão em aproximadamente 170 °C.

O bagaço de mandioca analisado por meio da calorimetria exploratória diferencial evidenciou um evento endotérmico em 170,5 °C (Figura 20) e temperatura *onset* de 169,8 °C. O pico apresentado é característico da fusão. O valor da entalpia do amido presente no bagaço de mandioca foi 134 J g⁻¹.

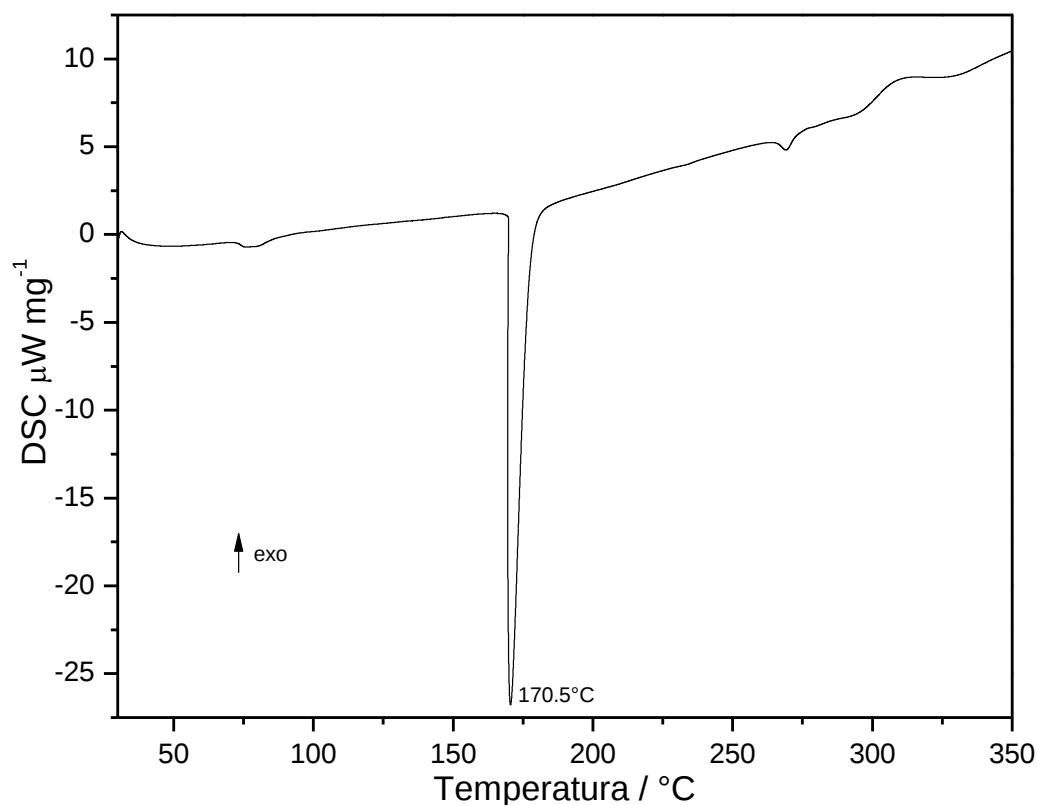


Figura 20 – DSC do bagaço de mandioca sem tratamento enzimático

Na Figura 21 as curvas DSC e TG-DTA foram sobrepostas e pode-se verificar a ausência de perda de massa durante o evento da fusão. De acordo com a curva DTA, não é possível visualizar o evento da fusão. Esse fato deve pela diferença nas condições de análise empregadas no DSC e na DTA. Enquanto no DSC as amostras são acondicionadas em cadinhos selados, com baixa concentração de O_2 e alta pressão, no DTA as amostras são analisadas em cadinhos abertos.

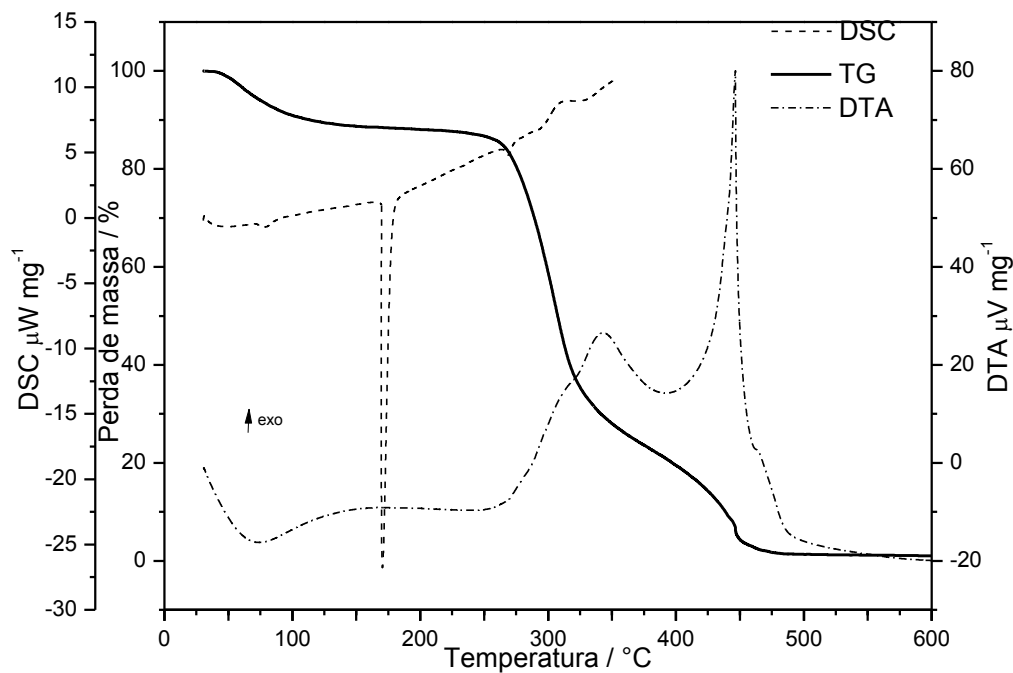


Figura 21 – Análise TG-DTA e DSC do bagaço de mandioca

As amostras submetidas à hidrólise enzimática foram igualmente submetidas à análise pelo DSC, sendo respeitadas massas da ordem de 5 mg. Embora outros parâmetros de análise tenham sido utilizados, foram observados picos semelhantes, mas em temperaturas diferentes. Para as análises com as amostras hidrolisadas a temperatura inicial foi de 50 °C e final de 200 °C. A atmosfera de ar sintético, vazão de 100 ml min⁻¹ e razão de aquecimento 10 °C min⁻¹ foram as condições utilizadas.

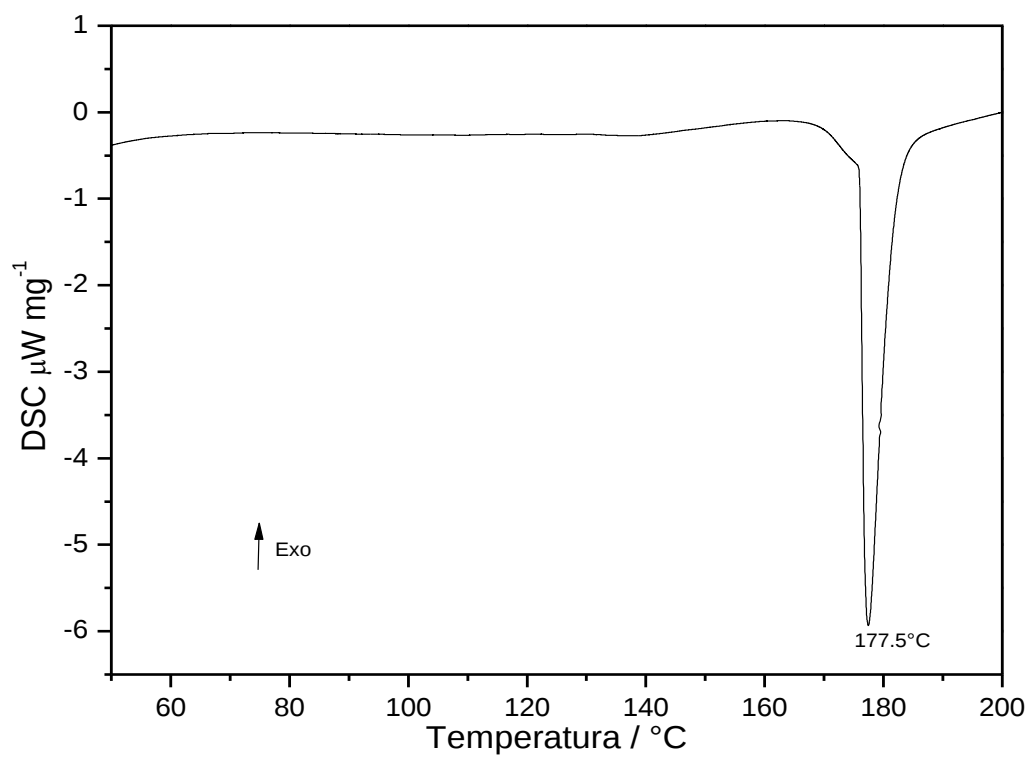


Figura 22 – DSC do bagaço de mandioca hidrolisado por 1 hora

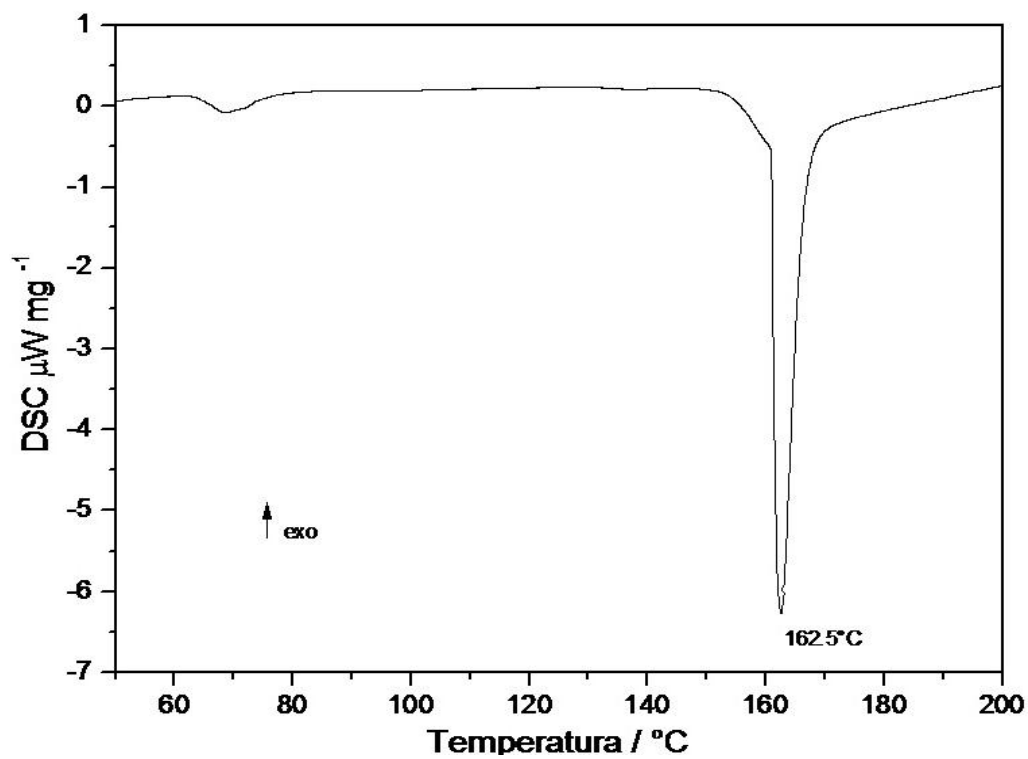


Figura 23 – DSC do bagaço de mandioca hidrolisado por 12 horas

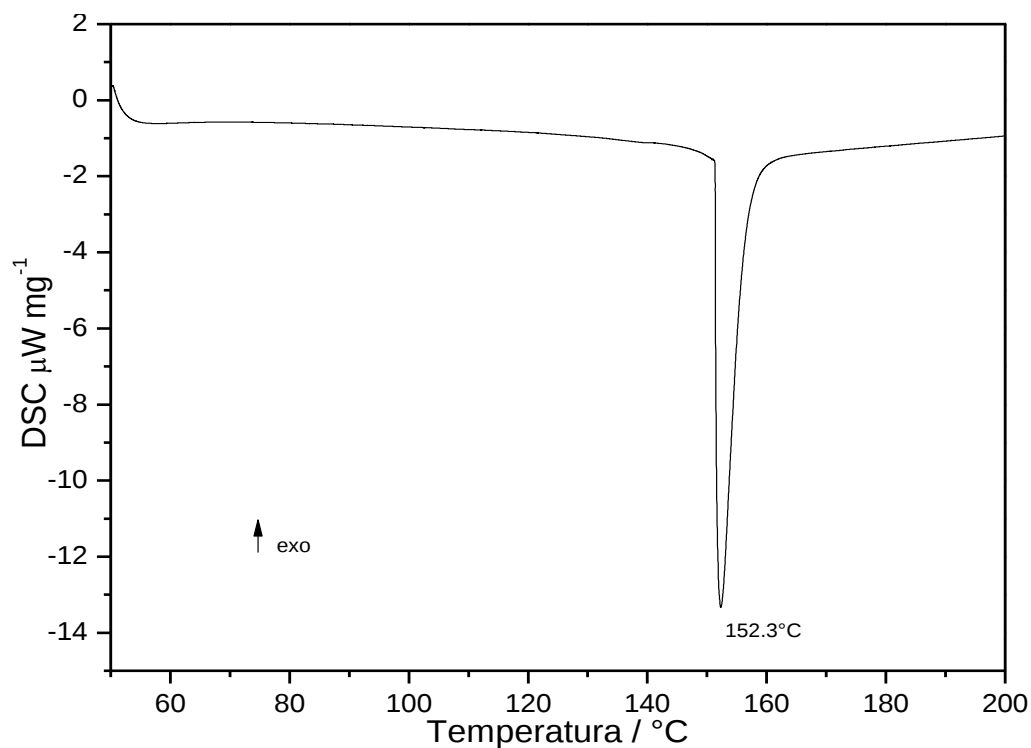


Figura 24 – DSC do bagaço de mandioca hidrolisado por 24 horas

Nas Figuras 22, 23 e 24 pode-se evidenciar a redução da temperatura de fusão à medida que o tempo de hidrólise aumenta, assim como o aumento na entalpia dos eventos.

Tabela 6

Valores de entalpia de fusão do bagaço de mandioca

Bagaço de mandioca	Nativo	Hidrólise 1 hora	Hidrólise 12 horas	Hidrólise 24 horas
Entalpia (J/g)	134,0	117,5	122,3	229,3
Temperaturas do pico (°C)	170,5	177,5	162,5	152,3
Temperaturas onset (°C)	168,95	175,7	160,7	151,2

5.2.2.2 Gelatinização

A calorimetria exploratória diferencial, fornece mediadas quantitativas do fluxo de calor associado à gelatinização dos amidos. Uma das vantagens do método DSC está na independência da birrefringência dos grânulos, importante quando os grânulos são pequenos ou casualmente orientados (ZOBEL & STEPHEN, 1995). As variações de entalpia observadas no DSC são geralmente relacionadas transição do tipo de ordem/desordem dos cristais presentes (SIEVERT & POMENRANZ, 1990). O amido presente na amostra de bagaço de mandioca apresentou valor de entalpia de gelatinização de $9,1 \text{ J g}^{-1}$. Nas tuberosas, tais como a mandioca e a batata, essa entalpia pode ser ainda maior, segundo Cereda (2002c).

O DSC foi utilizado para a análise da temperatura de gelatinização do amido presente no bagaço de mandioca. Segundo Gough & Pybus (1971), quando o amido é aquecido em presença de água ocorre a gelatinização, sendo que, para cada grupo de grânulos, há uma diferença entre as temperaturas de gelatinização de $0,5$ a $1,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a partir dos $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Rickard (1991) complementa o estudo afirmando os grânulos de amido não apresentam uma mesma temperatura de gelatinização e em uma população de grânulos naturais a transição pode ocorrer em um intervalo de 5 a $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Durante a análise do bagaço de mandioca a gelatinização do amido ocorreu a $68,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 25) de acordo com a temperatura obtida por Jane et al (1999). A temperatura encontrada nas análises do material foi semelhante à encontrada nas amostras de amido puro, mesmo tendo em vista que uma parcela dos grânulos de amido no bagaço encontra-se aprisionado à parede celular das fibras (LEONEL, 1999). Apesar de presença de fibras

no bagaço de mandioca, o amido residual apresentou características térmicas semelhantes ao amido isolado.

Apesar da temperatura de gelatinização obtida com o estudo da amostra de bagaço de mandioca estar muito próxima às encontradas por outros autores, divergências podem ocorrer sem que isso signifique erro na condução da análise. Ionashiro (2005) cita vários fatores pertinentes à análise térmica que podem interferir na reprodutibilidade dos resultados: natureza do suporte da amostra; raio do orifício de suporte no qual é colocada a amostra; localização, natureza e dimensões dos termopares diferenciais; natureza da referência e compactação da amostra.

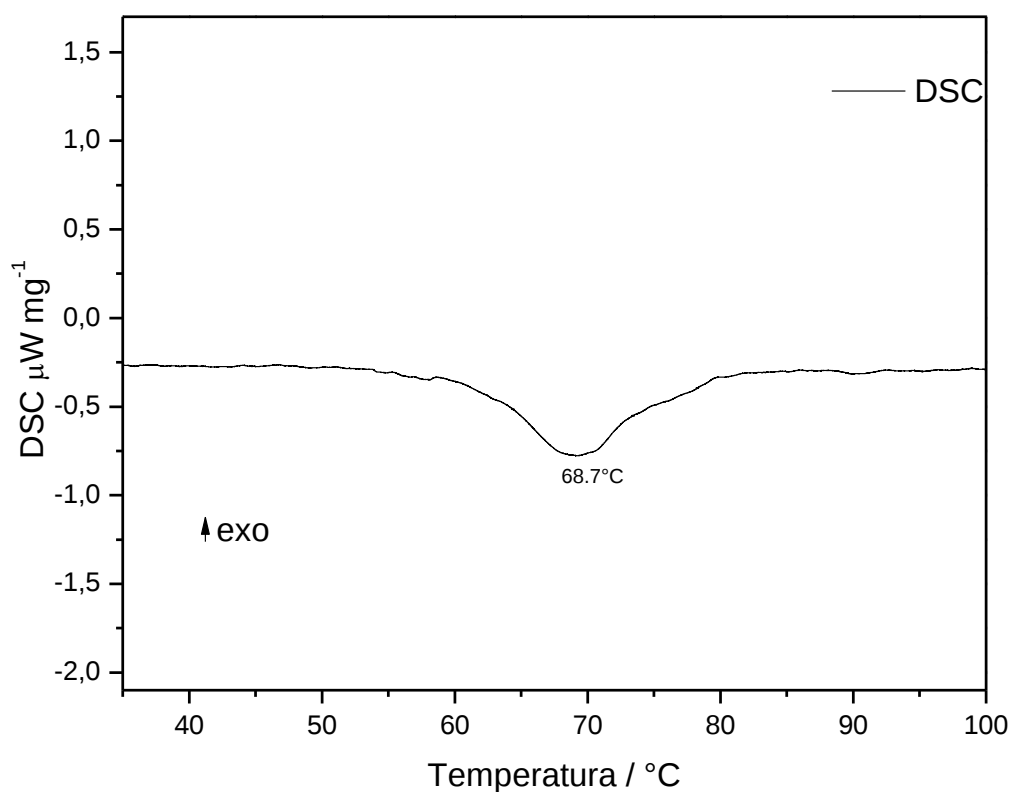


Figura 25 – Curva de gelatinização do amido presente no bagaço de mandioca

5.3 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

O amido é um polímero constituído por unidades de glucose. A conformação das moléculas de amido expõem açúcares redutores somente em suas porções terminais. Por esse motivo o amido não é considerado um açúcar redutor. À medida que o amido sofre o processo da hidrólise ocorre, por sua vez, a concentração crescente de terminais redutores, ou seja, açúcares redutores (MANLEY, 2000).

Na Figura 26, percebe-se o aumento gradativo na concentração de açúcares redutores à medida que o tempo de ação enzimática aumenta. Cada tempo de hidrólise foi realizado em triplicata.

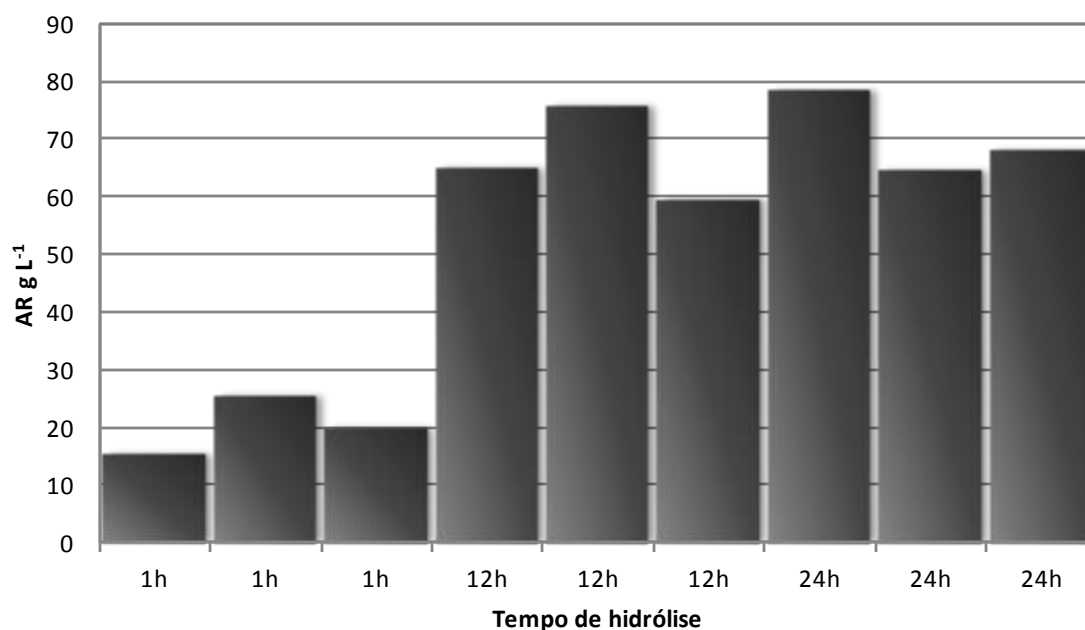


Figura 26 – Concentração de açúcares redutores (AR) em g L⁻¹, após hidrólise enzimática

Na Tabela 7 as concentrações das soluções são apresentadas em g L⁻¹. À medida que o tempo de hidrólise aumenta as concentrações de açúcares redutores

aumentam igualmente. Nas hidrólises de 12 e 24 horas, sob ação da α – amilase e amiloglucosidase, nota-se que a concentração de açúcares redutores mostra-se muito superior àquela na qual a hidrólise foi realizada por 1 hora somente sob ação da α – amilase. Esse fato corrobora a afirmação de Monna (1989) a respeito da ação sinérgica das duas enzimas na conversão do amido em glucose. Com auxílio da metodologia descrita por Miller (1959) foi possível verificar que a ação das enzimas realizou a quebra dos polímeros de glucose em suas unidades.

Tabela 7- Concentração de açúcares redutores em g L⁻¹

Bagaço de mandioca	Açúcares redutores (g.L⁻¹)	Açúcares redutores (g.L⁻¹)	Açúcares redutores (g.L⁻¹)
1 hora	15,30	25,32	19,82
12 horas	64,90	75,65	59,52
24 horas	78,32	64,50	67,90

5.4 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Os grânulos de amido consistem em camadas concêntricas contendo micelas cristalinas arranjadas perpendicularmente umas às outras (KARIM, 2000). Sendo parcialmente cristalinos, os grânulos de amido geram padrões de difração de raios x distintos entre si (SARKO, 1978). O arranjo amilose/amilopectina leva a formação de zonas mais e menos densas. A região onde se concentra a amilopectina é mais densa ou cristalina. Sendo mais compacta apresenta maior dificuldade de hidratação e penetração de moléculas, como as enzimas, e conseqüentemente apresentam maior

resistência ao processo de hidrólise (CEREDA, 2002c). Os padrões de cristalinidade classificam os grânulos de amido em tipos A, encontrados nos cereais (arroz, trigo e milho), B em tuberosas, frutas e amido de milho com alto teor de amilose (ceroso) e C, o qual é uma mistura entre os tipos A e B, encontrados em sementes de leguminosas (KARIM, 2000).

Segundo Mestres (1996), cada tipo de amido apresenta características de cristalinidade. Os amidos do tipo A apresentam os maiores picos nos ângulos de difração 2θ a 15, 17, 18 e 23 Å. Amidos tipo B apresentam picos de maior intensidade nos ângulos 2θ a 5.6, 15, 17, 22 e 23 Å sendo esses picos mais comuns às tuberosas.

A Figura 31 apresenta a análise de difração raios X do bagaço sem tratamento enzimático podendo ser evidenciada a presença de vários picos, muitos sobrepostos, dificultando a identificação dos picos característicos do tipo de amido ao qual a mandioca pertence.

As análises de difratometria de raios X demonstram que o aumento dos tempos de hidrólise proporcionou a redução da quantidade e intensidade dos picos presentes nos gráficos, levando à maior clareza na leitura dos mesmos (Figura 32, 33 e 34). Vários picos característicos tornaram-se visíveis após as hidrólises enzimáticas. Na Figura 34 é possível citar os picos nos ângulos 15, 22 e 23. Outros picos, tais como em 28 e 31, aparecem na análise do material após 24 horas de hidrólise.

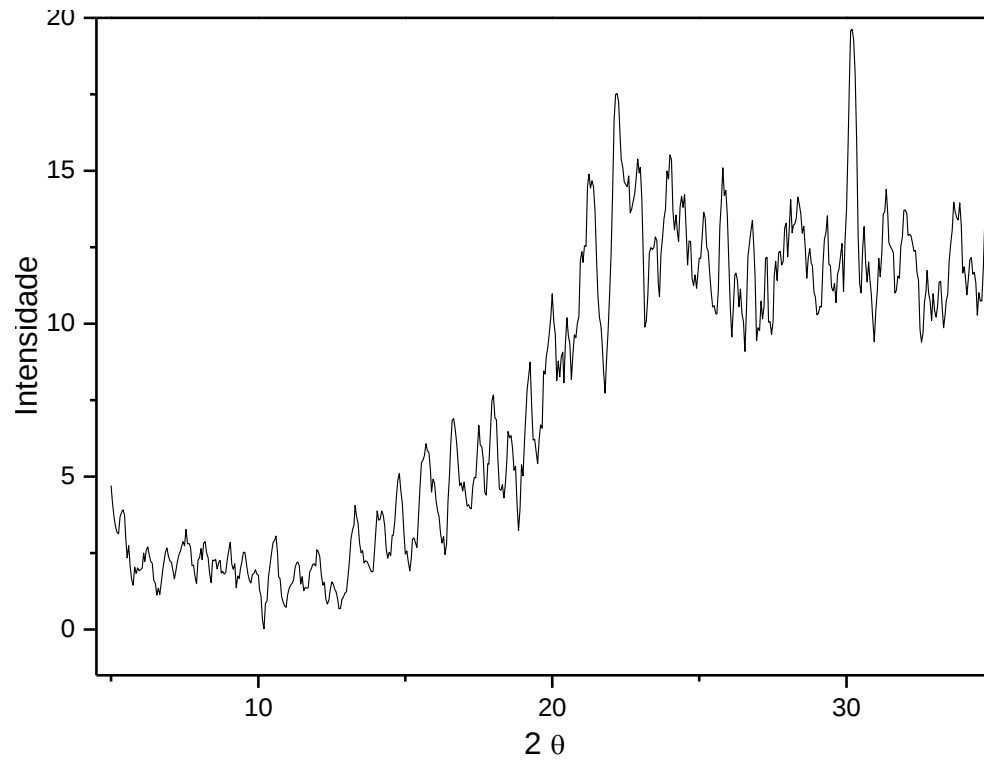


Figura 27 – Gráfico de difração de raios X do bagaço de mandioca nativo

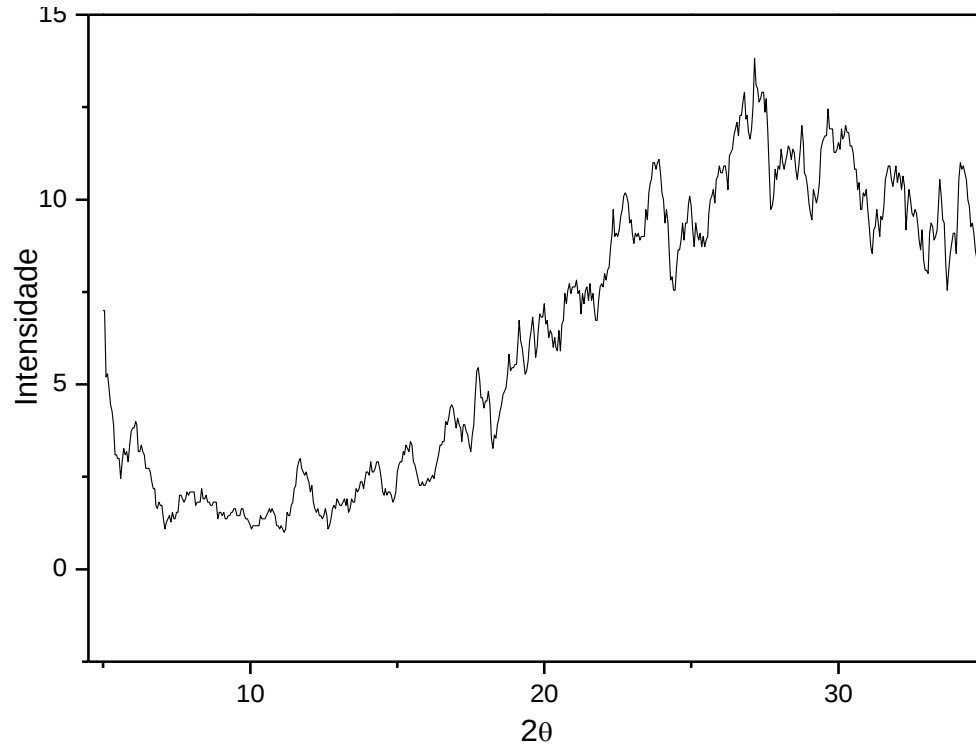


Figura 28 - Gráfico de difração de raios X do bagaço de mandioca após 1 hora de ação enzimática

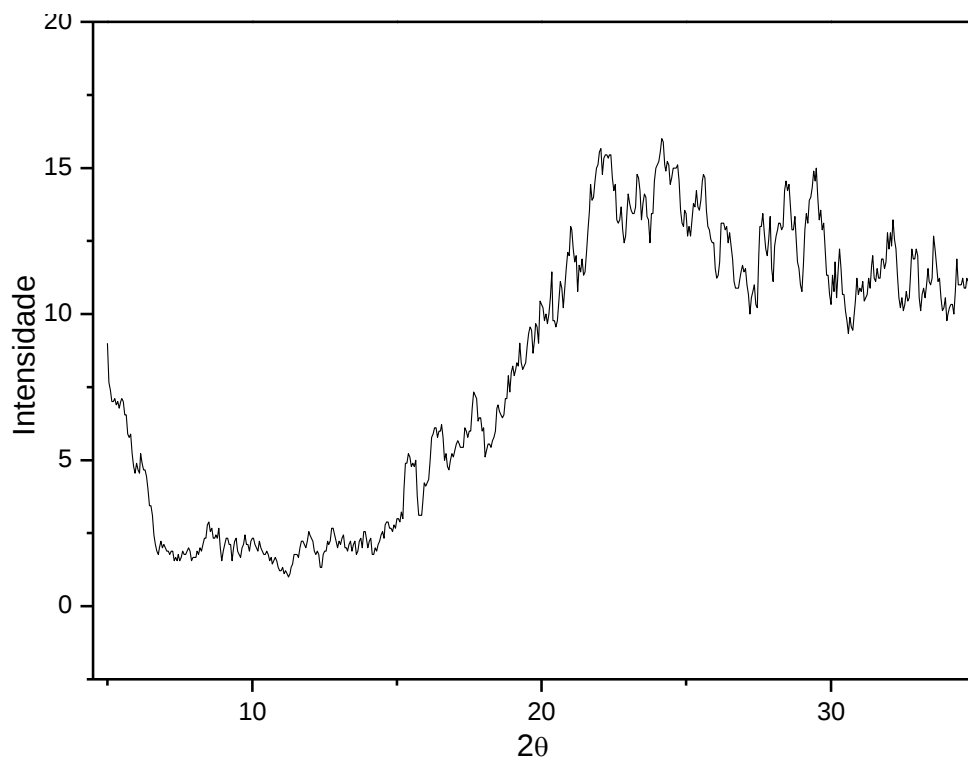


Figura 29 – Gráfico de difração de raios X do bagaço de mandioca após 12 horas de ação enzimática

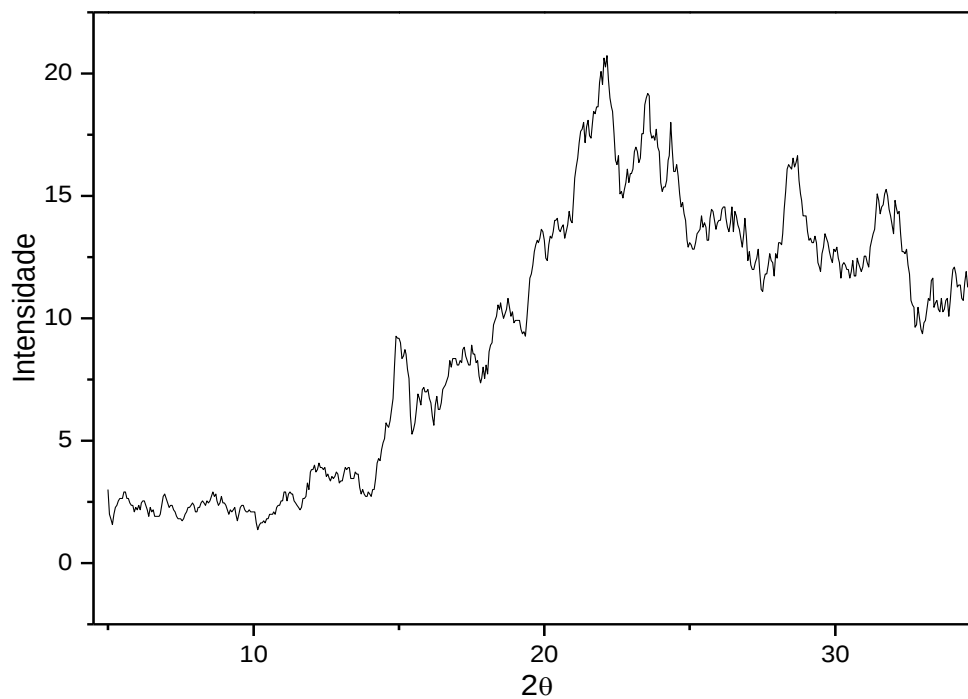


Figura 30 – Gráfico de difração de raios X do bagaço de mandioca após 24 horas de ação enzimática

6 CONCLUSÃO

Durante o presente estudo foram investigadas as características do bagaço de mandioca por meio de técnicas termoanalíticas entre outras e as seguintes conclusões foram obtidas:

A observação das amostras por meio da microscopia ótica mostrou que os grânulos apresentam a morfologia característica descrita na literatura, bem como auxiliou no estudo da hidrólise enzimática e do comportamento de uma parcela dos grânulos de amido ligados ao material fibroso. Análises quantitativas da composição físico-química do bagaço de mandioca, além de confirmar a presença de amido em grande quantidade, apresentaram teor de proteína significativo, o qual poderia apresentar um perfil de aminoácidos de interesse comercial.

As técnicas termoanalíticas utilizadas permitiram acompanhar alterações sofridas pela amostra em seu estado nativo e hidrolisado.

As análises de DSC confirmaram a presença de um evento característico de grande importância: a gelatinização. O bagaço de mandioca apresentou gelatinização em temperatura e entalpia semelhantes às descritas na literatura para o amido de mandioca isolado, concluindo que a presença de fibra não ocasionou interferência no aparecimento do evento. A temperatura de fusão do amido presente no bagaço da mandioca nativo foi confirmada pela análise de DSC, sendo semelhante à temperatura encontrada por outros autores em trabalhos anteriores. As amostras hidrolisadas foram igualmente submetidas à análise por DSC e apresentaram picos de fusão em temperaturas diferentes da amostra nativa demonstrando a ocorrência de alterações após a ação enzimática.

A análise termogravimétrica das amostras nativa e hidrolisada permitiu confirmar o aumento da disponibilidade dos grânulos de amido à ação do calor à medida que são submetidos à hidrólise enzimática.

A termogravimetria ainda possibilitou comparar resultados das análises de cinzas e umidade. Percebeu-se uma divergência de 3,5 pontos percentuais entre os resultados em umidade e 0,1 ponto percentual em cinzas quando comparados os valores obtidos pela termogravimetria e pelas metodologias do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985). Com base nessa comparação pode-se concluir que a análise termogravimétrica mostrou-se um método confiável e rápido de obtenção de resultados, dada a complexidade e possibilidades de erros experimentais que podem ocorrer com o emprego da metodologia usualmente aceita.

A ação enzimática resultou na produção de açúcares redutores a partir do bagaço de mandioca dosados através da reação com o ácido dinitrossalicílico. Durante os tempos de hidrólise de uma, doze e vinte e quatro horas os valores obtidos foram crescentes confirmando a presença de amido.

A análise da cristalinidade das amostras por meio da difratometria de raios X permitiu evidenciar alguns picos que são padrão dos amidos ao qual pertence o amido de mandioca. O aumento da definição dos picos também foi confirmado analisando-se as amostras após hidrólise enzimática. Alguns picos não corresponderam à literatura provavelmente em virtude de se tratar de um subproduto rico em fibras.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM <http://www.abam.com.br/revista/revista6/prod_aumenta.php> acessado em 22 de abril de 2009.

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

AGARWALL, P., DOLLIMORE, D. A Thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. **Thermochimica Acta**, v. 319, p. 17 – 25, 1998a.

AGARWALL, P., DOLLIMORE, D. The effect of chemical modification on starch studied using thermal analysis. **Thermochimica Acta**, v. 324, p. 1- 8, 1998b.

ALMEIDA, N. G. (ed) A importância das fibras alimentares. *Dieta e Saúde*. **Boletim Informativo da Kellogg's sobre Nutrição e Saúde**. Querétaro, v. 7, n. 1, 1997.

BEAL, F. C., EICKNER, H. W. **Thermal degradation of wood components**: a review of the literature. United States Department of Agriculture. Forest Service. 1970. 27p.

BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food constituents. **Canadian journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69 p. 60 – 78. 1991.

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

CARVALHO FILHO, M. A. S. **Preparação e estudo termoanalíticos de cinamatos de terras raras, exceto escândio, no estado sólido**. 2000, 145f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

CEREDA, M. P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In: **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Paulicéia, 1994. cap. 1, p. 11 – 50.

CEREDA, M. P., TAKAHASHI, M. Cassava wastes: their characterization and uses in treatment in Brazil. In: DUFOUR, D., O'BRIEN, G. M., BET, R. (Eds.), **Cassava Flour and Starch**. CIAT, Cali, Columbia, 1996a. p. 222.

_____. **Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca**. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais, 1996b. 56p.

_____. Importância das tuberosas tropicais. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002a. v. 2, p. 13 –

_____. Propriedades do amido. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-Americanas**. 1. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002b. v. 1 c.8.

_____. Estrutura dos grânulos de amido. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-Americanas**. 1. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002c. v. 2 c.6.

CHAPLIN, M. F; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press. 280p. 1990.

CIACCO, C. F., CRUZ, R. Fabricação de amido e sua utilização. São Paulo: Secr. da Ind. Com. Ciencia e Tecnologia, 1982.

CONNOLLY, J. R. **Introduction to X-ray powder diffraction**. Disponível em: <<http://epswww.unm.edu/xrd/xrdclass/01-XRD-Intro.pdf>>. Acessado em 17 de set. 2009.

DAIUTO, E.R. **Desenvolvimento dos grânulos de amido durante o crescimento secundário de raízes de mandioca dos cultivares Mico e Branca de Santa**

Catarina. Botucatu. 2000. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura). Faculdade de Ciências Agrômicas, Universidade Estadual Paulista, 2000. 140p.

DEMIATE, I.M.; CEREDA, M.P. Some physico-chemical characteristics of modified cassava starches presenting baking property. **Energia na Agricultura**, v. 15, n. 3, p. 36 – 46, 2000.

EDUARDO, M. P. **Hidrólise enzimática de mandioca e puba para obtenção de xarope de maltose.** São Paulo, 2002. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ELLIS, R. P., COCHRANE, M. P., DALE, M. F. B., DUFFUS, C. M., LYNN, A., MORRISON, I. M., PRENTICE, R. D. M., SWANSTON, J. S., TILER, S. A. Starch production and use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, n.3, p.289 – 311, 1998.

FAO. **Cassava for food and energy security.** Disponível em: <<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2008/1000899/index.html>>. Acessado em: 27 abr. 2009.

FENNEMA, O. **Química de los alimentos.** 2.ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 1258p.

FRANCO, C. M.; CIACCO, C. F. Efeito do tratamento térmico com baixa umidade sobre as propriedades físico-químicas de amostras comerciais de amido de milho e mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n.2, p.112-117, 1995.

GOUGH B. M., PYBUS, J. N. Effect on the Gelatinization Temperature of Wheat Starch Granules of Prolonged Treatment with Water at 50 °C. **Starch**, v.23, p. 210 – 212. 1971.

GROXKO, M. **Análise da conjuntura agropecuária.** Safra 2008/09. Mandioca. Disponível em:

<http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_0809.pdf>

Acessado em 15 de set. de 2009a.

GROXKO, M. **Mandioca.** Boletim Diário DERAL. Disponível em:

<http://www.seab.pr.gov.br/modules/qas/uploads/2043/mandioca_11ago2009.pdf>

Acessado em 15 de set. de 2009b.

HOOVER, R., RORKE, S. C., MARTIN, A. M. Isolation and characterization of lima bean (*Phaseolus lunatus*) starch. **Journal of Food Biochemistry**, v. 15 p. 117 – 136, 1991.

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

HOSTETTLER, F., BOREL, E., DEUEL, H. Über die Reduktion der 3,5 – dinitrosalicylsäure durch Zucker. **Helvetica Chimica Acta**, v. 34, p. 2132 – 2139. 1951.

IBGE. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=998> Acessado em 7 de abr. de 2009.

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3 ed. São Paulo: IMESP, 1985.

IONASHIRO, M. **Fundamentos da Termogravimetria. Análise Térmica Diferencial. Calorimetria Exploratória Diferencial.** São Paulo: Giz, 2005.

JANE, J., CHEN, Y. Y., LEE, L. F., MCPHERSON, A. E., WONG, K. S., RADOSAVLJEVIC, M., KASEMSUWAN, T. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76 p. 629 – 637, 1999.

KARAM, L. B. **Propriedades funcionais de multi-misturas de amidos de milho, mandioca e cará e sua relação com as características físicas e moleculares**. 2003, 133f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

KARIM, A. A., NORZIAH, M. H., SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, p. 9 – 36, 2000.

KRISHNAN, T., CHANDRA, A. K. Purification and Characterization of α -Amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 430 – 437. 1983.

LACERDA, L. G., AZEVEDO, J. A. M., CARVALHO FILHO, M. A. S., DEMATE, I. M., SCHNITZLER, E., VANDERBERGHE, L. P. S., SOCCOL, C. R. Thermal characterization of partially hydrolyzed cassava (*Manihot esculenta*) starch granules. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1209 – 1215. 2008a.

LACERDA, L. G., CARVALHO FILHO, M. A. S., DEMATE, I. M., BANNACH, G., IONASHIRO, M., SCHNITZLER, E. Thermal behaviour of corn starch granules under action of fungal alpha-amylase. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, p. 445 – 449. 2008b.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 2. ed. Simões AA, Lodi WRN. São Paulo: Sarvier. 975p. 1995.

LEONEL, M., CEREDA, M. P., ROAU, X. Aproveitamento do resíduo da produção de etanol a partir de farelo de mandioca, como fonte de fibras dietéticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 19 n. 2. p. 241 – 245. 1999.

LEONEL, M. O farelo, subproduto da extração de fécula de mandioca. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill. 2001a. v. 4 c.15, p. 210 – 217.

_____, CABELLO, C. Hidrólise enzimática do farelo de mandioca. In: **Culturas de tuberosas amiláceas Latino-Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill. 2001b. v. 4, cap.22, p. 280 – 291.

_____, CEREDA, M. P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 22 p. 65 – 69. 2002.

LeVAN, S. L. Thermal Degradation. In: Schniewind. A. P. **Concise Encyclopedia of Wood and Wood-Based Materials**. 1.ed. Elmsford, NY: Pergamon Press. p. 271 – 273. 1998.

MANLEY, D. J. R. **Technology of biscuits, cracker and cookies**. 3ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. 528p.

MANNERS, D. J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 11 p. 87 – 112. 1989.

MARCHESSAULT, R. H., TAYLOR, M. G., FYFE, C. A., VEREGIN, R. P. Solid-state ^{13}C -c.p.—m.a.s. n.m.r. of starches. **Carbohydrate Research**, v. 144 p. 1 – 5. 1987.

MARQUES, J. A., PRADO, I. N., ZEOULA, L. M., ALCALDE, C. R., NASCIMENTO, W. G. Avaliação da Mandioca e Seus Resíduos Industriais em Substituição ao Milho no

desempenho de Novilhas Confinadas. **Revista Brasileira de Zootecologia**, v. 29 n. 5 p. 1528 – 1536. 2000.

MESTRES, C. Los estados físicos del almidon. In: Conferencia Internacional Del Almidon, 1996, Quito. Anais...Quito, p. 2. 1996.

MILLER, G. L. Use os dinitrosalislyic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426 – 248, 1959.

MONNA, M., YAMAMOTO, Y., KAGEI, N., KAIMUNA, K. Raw starch digestion by α – amylase and glucoamylase from *Chalara paradoxa*. **Starch**, v.41, p. 382 – 385. 1989.

MOULD, D. L. Potentiometric and spectrophotometric studies of complexes of hydrolysis products of amylose with iodine and potassium iodide. **Biochemical Journal**, v. 58 p. 593 – 600. 1954.

NOVOZYMES A/S. Termamyl – Ficha técnica do produto

NOVOZYMES A/S. AMG – Ficha técnica do produto

PADILHA, A. F. **Materiais de Engenharia**: Microestrutura e Propriedades. São Paulo: Editora Hemus, Edição Eletrônica, 2000. v. 01. 343 p.

PANDEY, A. SOCCOL. C. R., NIGAM. P., SOCCOL, V., VANDERBERGHE, L. P. S., MOHAN, R. Biotechnological potencial of agro-industrial residues II: Cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74 p. 81 – 87. 2000a.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V. T. Biotechnological potencial of agro-industrial residues I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74 p. 69 – 80. 2000b.

_____. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13 p. 81 – 84. 2003.

RICKARD, J.E.; ASAOKA, M.; BLANSHARD, J.M.V. The physicochemical properties of cassava starch. **Tropical Science**, v.31, p.189 – 207, 1991.

ROBINSON, J. W. Atomic spectroscopy. 2ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 391p.

RUNDLE, R. E., BALDWIN, R. R. The configuration of starch and the starch – iodine complex. The dichroism of flow of flow of starch – iodine solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 65 p. 554 – 558. 1943.

SAITO, I. M., CABELLO, C. Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. **Energia na Agricultura**, v. 21, p. 34 – 44, 2006.

SARKO, A., WU, H. -C. H. The crystal structures of A-, B- and C-polymorphs of amylose and starch. **Starch**, v. 30, p. 73 – 78. 1978.

SIEVERT, D., POMERANZ, Y. Enzyme resistant starch II. Differential scanning calorimetry studies on heat treated starches and enzyme resistant starch residues. **Cereal Chemistry**, v. 67, p. 217 – 221. 1990.

SILVA, G. O., TAKIZAWA, F. F., PEDROSO, R. A., FRANCO, C. M. L., LEONEL, M., SARMENTO, S. B. S., DEMIATE, I. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26 p. 188 – 197. 2006.

SILVAJ. R. da., ASSUMPÇÃO, R. de., VEGRO, C. L. R. A inserção da fécula de mandioca no mercado de amido. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 31 – 47, Jul. 2000.

SOCCOL, C. R. Biotechnological products from cassava roots by solid state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 55 p. 358 – 364. 1996.

SOLIMAN, A, A. A., EL-SHINNAWY, N. A., MOBARAK. F. Thermal behaviour of starch and oxidized starch. **Thermochimica Acta**, v. 296, p. 149 – 153. 1997.

SPEYER, R. F. **Thermal Analysis of Materials**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994.

SRIROTH, K., CHOLLAKUP, R., PIYACHOMKWAN, K., OATES, C. G. **Biodegradable Plastics from Cassava Starch**. In Thailand, Paper presented at 6th Regional Workshop, 21-25 February, Ho Chi Min City, Vietnam. 2000.

SURMELY, R. **Determinação dos parâmetros experimentais para a conversão enzimática rápida da fécula de mandioca em xarope de maltose de baixo custo com um perfil adequado para cervejarias**. Botucatu: Centro de Raízes e Amidos Tropicais, Universidade Estadual Paulista, 1996. 20p. (Informações Técnicas).

SURMELY, R., ALVAREZ, H., CEREDA, M. P., VILPOUX, O. F. Hidrólise do amido. In: **Culturas de tuberosas amiláceas Latino-Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill. 2003. v. 3 c.15, p. 337 – 448.

WENDLANDT, W.W. Thermal Analysis. In: ELVING, P. J., WINEFORDNER, J. D. **Chemical Analysis**, 3. ed. v. 19. New York: John Wiley & Sons, 1986.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Molecular structure of starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Edit.). **Starch: chemistry and technology**. New York: Academic Press, 1984. p. 153 – 182.

WOICIECHOWSKI, A. L., NITSCHKE, S., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. **Brazilian Archives of biology and Technology**, v. 45, p. 393 – 400. 2002.

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

YU, L.; CHRISTIE, G. Measurement of starch thermal transitions using differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v.46, p.179-184, 2001.

ZOBEL, H. F., STEPHEN, A. M. Starch: structure, analysis and application. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their application**. 1ed. New York: Marcel Dekker, 1995, p.19 – 66.