

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu*
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TAIANA HUSILA GOMES DANIEL

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, OXIDAÇÃO E APLICAÇÃO
DE NANOCRISTAIS DE AMIDOS DE *Phaseolus vulgaris* L. (FEIJÃO), DE
Manihot esculenta Crantz (MANDIOCA) E DE *Zea mays* L. (MILHO) EM
EMULSÕES PICKERING

PONTA GROSSA
2018

TAIANA HUSILA GOMES DANIEL

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, OXIDAÇÃO E APLICAÇÃO
DE NANOCRISTAIS DE AMIDOS DE *Phaseolus vulgaris* L. (FEIJÃO), DE
Manihot esculenta Crantz (MANDIOCA) E DE *Zea mays* L. (MILHO) EM
EMULSÕES PICKERING

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate

PONTA GROSSA

2018

D183 Daniel, Taiana Husila Gomes
Obtenção, caracterização físico-química, oxidação e aplicação de nanocristais de amidos de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), de *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) e de *Zea mays* L. (milho) em emulsões Pickering/ Taiana Husila Gomes Daniel. Ponta Grossa, 2018.
79 f., il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Área de concentração – Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate

1. Amido. 2. Emulsões Pickering. 3. Nanocristais. 4. Mandioca. 5. Feijão. 6. Milho. 7. Hidrólise ácida. 8. Oxidação. 9. Hipoclorito de sódio. 10. Ácido sulfúrico. I. Demiate, Ivo Mottin. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa - Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD : 631.23

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia F. Bertholino dos Santos– CRB9/986

TERMO DE APROVAÇÃO

TAIANA HUSILA GOMES DANIEL

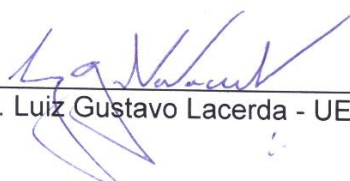
Obtenção, caracterização físico-química, oxidação e aplicação de nanocristais de amidos de *Phaseolus vulgares* L. (Feijão), de *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) e de *Zea mays* L. (milho) em emulsões *pickering*

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

Orientador:


Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate - UEPG-PR


Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney - UTFPR/Ponta Grossa-PR


Prof. Dr. Luiz Gustavo Lacerda - UEPG-PR

Ponta Grossa, 29 de novembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio, compreensão, ajuda, e, em especial, por todo carinho e amor ao longo deste percurso.

Ao professor Dr. Ivo Mottin Demiate, meu orientador, pela dedicação, paciência, incentivo e orientação e aos demais professores da Universidade Estadual de Ponta Grossa por todos seus ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que de alguma forma me ajudaram.

Aos colaboradores da Universidade Estadual de Ponta Grossa Denise, Vitor, Fernando, Rita, Eliane e demais técnicos que sempre estavam disponíveis e pacientes para ajudar no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Paulo Ricardo que me apoiou inúmeras vezes e alegrou meus dias.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

Por fim, agradeço à Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (Capes) pela concessão da bolsa de Mestrado.

RESUMO

Os nanocristais de amido são partículas de tamanho nanométrico que vêm recebendo atenção por parte dos pesquisadores pois são abundantes, biodegradáveis, não tóxicos e apresentam relativo baixo custo. Essas nanopartículas cristalinas podem ser utilizadas como estabilizantes de emulsões Pickering, sistemas onde o tamanho das partículas é fator primordial para a estabilidade. Entretanto, a forte tendência dessas partículas em formar agregados de tamanho micrométrico limita a aplicação tecnológica. Desta forma, a oxidação química com hipoclorito de sódio pode ser uma alternativa para minimizar esse comportamento indesejado. Os amidos de mandioca e de milho são abundantes e baratos, enquanto o amido de feijão, apesar de ter características tecnológicas interessantes e promissoras, ainda não é extraído comercialmente. O objetivo deste trabalho foi caracterizar nanocristais produzidos a partir de amidos de mandioca, de feijão e de milho, proceder a oxidação dos nanocristais e utilizá-los como estabilizadores de emulsões Pickering. Os nanocristais foram obtidos por hidrólise com ácido sulfúrico e oxidados com hipoclorito de sódio. As emulsões foram preparadas utilizando-se óleo de soja e água. O amido de feijão foi o mais resistente à hidrólise, seguido dos amidos de milho e de mandioca. Em ambas as fontes botânicas a hidrólise ácida diminuiu consideravelmente o conteúdo de amilose nas nanopartículas. A oxidação aumentou o potencial zeta de todos os nanocristais, além de diminuir a polidispersividade. Por meio da espectroscopia na região do infravermelho médio detectou-se um pico a 1735 cm^{-1} característico dos grupos carboxilas livres (forma ácida – COOH), típico de amidos oxidados. Os amidos de mandioca e de milho apresentaram padrão cristalino tipo A, assim como seus nanocristais. Contudo, foi observado no feijão padrão cristalino tipo C - A, que permaneceu no nanocristal; por meio da oxidação, entretanto, o padrão foi alterado para o tipo A. Após a hidrólise, a cristalinidade relativa aumentou para todas as amostras, porém com a oxidação a mesma diminuiu, exceto para o amido de feijão que resultou em efeito contrário. As amostras oxidadas apresentaram maior estabilidade coloidal, quando comparadas com as não oxidadas. Os nanocristais não apresentaram pico endotérmico detectável pela análise de DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial). Na análise de microscopia os nanocristais exibiram formas redondas ou ovais, independentemente da origem do amido, mesmo após terem sido submetidos à oxidação. Em geral a oxidação dos nanocristais melhorou o índice de emulsão das amostras, independente da fonte botânica de origem, além disso o índice foi maior para as amostras com maior proporção de óleo em relação com as com maior fração de água. Contudo o aumento da fase oleosa aumentou o diâmetro médio das gotículas. O valor de PDI variou de 1,6, para emulsão com proporções de água e óleo 1:1 estabilizada com 5% nanocristal de mandioca oxidado, até 3,5, para emulsão com proporção de água e óleo 1:3 estabilizada com 1% de nanocristal de feijão oxidado.

Palavras chave: amido, emulsões Pickering, nanocristais, mandioca, feijão, milho, hidrólise ácida, oxidação, hipoclorito de sódio, ácido sulfúrico.

ABSTRACT

The nanocrystals of starch are particles of nanometric size that have been studied, since they are abundant, biodegradable, non-toxic and with relative low cost. However, the tendency to form micrometric size aggregates limits the technological application; therefore, chemical oxidation with sodium hypochlorite may be an alternative for limiting such unwanted behavior. These nanocrystals can be used as stabilizers for Pickering emulsions, systems where particle size is a prime factor for stability. Cassava and maize starches are abundant and cheap, while bean starch, although an interesting and promising technological product, is not yet commercially available. The present work had as objective the production and characterization of nanocrystals from cassava, bean and corn starches, following chemical oxidation of the nanocrystals and using them as emulsion stabilizers. The nanocrystals were obtained by hydrolysis with sulfuric acid and oxidized with sodium hypochlorite. The emulsions were prepared using soybean oil and water. Bean starch was less susceptible to hydrolysis, followed by maize and cassava starches. In both botanical sources the acid hydrolysis greatly reduced the amylose content in the nanoparticles. Oxidation increased the zeta potential of all the nanocrystals, besides the value of polydispersity decreased. A peak at $1,735\text{ cm}^{-1}$ was detected by means of mid-infrared spectroscopy, which is characteristic of the free carboxyl group (acid form - COOH), expected on oxidized starches. Cassava and corn starches have A-type crystallinity pattern, as their nanocrystals. For bean starch, the original C-A-type crystallinity pattern remained for the non-oxidized nanocrystals but changed for A-type after oxidation. After hydrolysis, the relative crystallinity increased for nanocrystals, but decreased after oxidation. The exception was for bean starch that resulted in oxidized nanocrystals with higher relative crystallinity. Oxidized samples are considered as colloidal when compared to non-oxidized ones. Nanocrystals did not show detectable endothermic peak on DSC (differential scanning calorimetry) analysis. The microscopic analysis of the nanocrystals showed round or oval particles, independently of the botanical source and of oxidation treatment. In general, the oxidation of nanocrystals improved their emulsification index. The emulsification index was higher for the emulsions with larger amounts of oil, even though the average diameter of the droplets increased in this situation. The polydispersity index ranged from 1.6 for 1: 1 (water to oil ratio), stabilized with 5% oxidized cassava nanocrystal, up to 3.5 for 1: 3 (water to oil ratio), stabilized with 1% of oxidized bean nanocrystal.

Keywords: starch, Pickering emulsions, nanocrystals, cassava, beans, corn, acid hydrolysis, oxidation, NaClO, H₂SO₄.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação parcial das estruturas de amilose e amilopectina.	15
Figura 2 - Desenho esquemático da estrutura hierárquica do grânulo de amido .	16
Figura 3 - Fluxograma do processamento de amido de mandioca.....	20
Figura 4 - Estrutura em multi-escala do amido:.....	24
Figura 5 - Perfil viscoamilográfico para os amidos de mandioca, milho e feijão. .	39
Figura 6 - Porcentagem de hidrólise em função do tempo de reação para os amidos de mandioca, milho e feijão.	42
Figura 7 - Espectro FTIR dos amidos nativos e dos nanocristais de mandioca, milho e feijão com e sem oxidação.	48
Figura 8 - Difrátogramas de raios X dos amidos nativos e dos nanocristais, com e sem oxidação, de mandioca, de milho e de feijão.....	50
Figura 9 - Suspensões de nanocristais.	53
Figura 10 - Coloração diferencial dos nanocristais.....	54
Figura 11 - Micrografias dos amidos	57
Figura 12 - Micrografias MET de nanocristais	58
Figura 13 - Emulsões formadas após sete dias de armazenamento.....	60
Figura 14 - Índice de emulsão durante o armazenamento..	61
Figura 15 -Imagens de microscopia óptica de emulsões estabilizadas por nanocristais de mandioca.....	63
Figura 16 - Imagens de microscopia óptica de emulsões estabilizadas por nanocristais de milho.....	64
Figura 17 - Imagens de microscopia óptica de emulsões estabilizadas por nanocristais de feijão.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do perfil viscoamilográfico dos amidos de mandioca, milho e feijão.....	40
Tabela 2 - Rendimento da obtenção de nanocristais a partir dos amidos de mandioca, de milho e de feijão.	43
Tabela 3 - Conteúdo de amilose dos amidos nativos de mandioca, milho e feijão e de seus respectivos nanocristais, com e sem oxidação.	45
Tabela 4 - Tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão (PDI) dos nanocristais de mandioca, milho e feijão com e sem modificação.	46
Tabela 5 - Índice de cristalinidade relativa dos amidos nativos, nanocristais e nanocristais oxidados de mandioca, milho e feijão.	51
Tabela 6 - Resultados obtidos por meio da análise de DSC	56
Tabela 7 – Distribuição do tamanho das gotas e índice de polidispersão (PDI) das emulsões.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. AMIDO	13
3.2. FONTES DE AMIDO	17
3.2.1. Milho	18
3.2.2. Mandioca	19
3.2.3. Feijão	21
3.3. NANOCRISTAIS DE AMIDO	23
3.3.1. Nanocristais Oxidados	27
3.3.2. Nanocristais de amido como estabilizadores de emulsões	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. MATERIAL	30
4.2. MÉTODOS	31
4.2.1. Extração do amido de feijão	31
4.2.2. Obtenção dos nanocristais de amido de mandioca, de amido de feijão e de amido de milho	31
4.2.3. Obtenção dos nanocristais oxidados	32
4.2.4. Elaboração de emulsão Pickering	32
4.2.5. Técnicas de caracterização	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. PROPRIEDADES DE PASTA	38
5.2. HIDRÓLISE ÁCIDA DOS AMIDOS	41
5.3. TEOR DE AMIOLOSE	44
5.4. TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	45

5.5.	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (FTIR)	47
5.6.	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	49
5.7.	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE COLOIDAL	52
5.8.	COLORAÇÃO DIFERENCIAL.....	54
5.9.	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	55
5.10.	MORFOLOGIA DOS AMIDOS E DOS NANOCRISTAIS	56
5.11.	CAPACIDADE EMULSIONANTE	59
5.12.	MICROSCOPIA ÓPTICA DAS GOTÍCULAS DA EMULSÃO	62
6.	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

O amido está presente nos plastídios de vegetais superiores, sendo a mais importante fonte de reserva energética da maioria das plantas. Apresenta-se na forma de grânulos micrométricos, com formatos que variam de acordo com a origem botânica, incluindo aqueles esféricos, elipsoidais, poligonais e lenticulares. Dentre as fontes de amido, a mandioca é a segunda mais importante no Brasil, atrás do milho, o qual é o mais utilizado mundialmente. Além disso, a cada ano destaca-se a liderança paranaense nesta cadeia produtiva, sendo a fécula (amido, polvilho) de mandioca muito utilizada industrialmente por ser barata e abundante e por não apresentar o aroma típico e indesejado de cereais.

Outra potencial fonte de amido no Brasil é o feijão, pois o país está entre os maiores produtores mundiais desta leguminosa. Para suprir as necessidades da entre safra, o feijão necessita ser armazenado por longos períodos de tempo. Assim, condições desfavoráveis, comuns em regiões tropicais, como altas temperaturas ($> 25^{\circ} \text{C}$) e umidade relativa alta ($> 65\%$) favorecem perdas na qualidade das sementes ocasionando, por exemplo, o endurecimento fazendo com que se torne indesejável para o consumo *in natura*. Apesar de apresentar teor de amido em torno de 45 %, em base seca, a extração desse polissacarídeo a partir do feijão ainda não é realizada em escala industrial.

Uma das possibilidades para a utilização do amido é a obtenção de nanocristais, nanopartículas cristalinas, que são obtidos pela degradação das regiões amorfas e ruptura das regiões semicristalinas dos grânulos. Essas nanopartículas de amido apresentam características interessantes como abundância, baixo custo, biodegradabilidade e não toxicidade. Ainda, suas características podem ser influenciadas pela origem botânica do amido, motivo pelo qual se faz importante analisar diferentes fontes de obtenção desse polissacarídeo.

Entretanto, a tendência de se auto agregar e formar aglomerados em microescala, limita muito a sua aplicação. Isso ocorre porque a quantidade de grupos ésteres de sulfato formados na superfície dos nanocristais durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 , não consegue gerar forças eletrostáticas repulsivas suficientes para superar as ligações de hidrogênio ou de Van der Waals. Assim sendo, a modificação química por oxidação pode ser aplicada com a finalidade de

introduzir uma quantidade maior de cargas negativas na superfície dessas partículas, mitigando a indesejável formação de aglomerados de dimensões micrométricas. Para produzir amidos oxidados, o hipoclorito de sódio é um dos reagentes mais utilizados, pois apresenta baixo custo, moderada capacidade de oxidação e fácil processamento. Consequentemente, sua utilização em nanocristais com o objetivo de melhorar a dispersão e assim permitir a sua aplicação de maneira mais efetiva pode ser promissora.

A procura por emulsionantes não tóxicos para estabilizar emulsões levou a um grande interesse na pesquisa por novos sistemas; dentre esses sistemas estão as emulsões Pickering, que apresentam características únicas, incluindo a estabilidade em longo prazo. Um dos fatores mais importantes para estabilização desses sistemas é o reduzido tamanho de partículas, que faz com que os nanocristais sejam candidatos potenciais para essa aplicação.

Este trabalho tem como objetivos obter nanocristais a partir de amidos de mandioca, de milho e de feijão, modificá-los por oxidação com hipoclorito de sódio, proceder sua caracterização e testá-los como estabilizadores de emulsões Pickering.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir nanocristais a partir de amidos de mandioca, de feijão e de milho, realizar a oxidação dos mesmos e avaliar sua aplicação como estabilizadores de emulsões Pickering.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanocristais de amidos de feijão, de mandioca e de milho por hidrólise ácida;
- Realizar a oxidação dos nanocristais de amido com hipoclorito de sódio;
- Caracterizar os nanocristais quanto ao tamanho de partícula, morfologia e potencial zeta;
- Verificar, nos nanocristais formados, a presença de grupos funcionais por intermédio de espectroscopia na região do infravermelho médio (FTIR)
- Caracterizar os nanocristais quanto ao tipo cristalino e a cristalinidade relativa com a técnica da difração de raios X;
- Observar a estabilidade das suspensões de nanocristais de amido em água e realizar a coloração diferencial das amostras;
- Elaborar emulsões Pickering utilizando os nanocristais como emulsionantes;
- Avaliar as características das emulsões, considerando-se tamanho de partículas e estabilidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. AMIDO

O amido está presente nos plastídios de vegetais superiores, sendo a fonte de reserva energética mais importante da maior parte das plantas. Seus grânulos apresentam diâmetros que variam de 1 a 100 μm , com formatos que se diferenciam de acordo com a origem botânica, como esferas, elipsoides, polígonos, plaquetas e túbulos irregulares (ASHOGBON; AKINTAYO, 2014; DUFRESNE, 2014).

Na indústria de alimentos nacional e na internacional esse polissacarídeo é muito utilizado devido a suas propriedades físico-químicas e funcionais exclusivas, podendo, entre outras funções, facilitar o processamento, fornecer textura, servir como espessante, fornecer sólidos em suspensão e proteger os alimentos durante o processamento (SHEWAN; STOKES, 2013). Por ser biodegradável, abundante, renovável e possuir um custo relativamente baixo, é considerado um material promissor para diversas aplicações industriais. As fontes mais comuns de amido são milho, mandioca, trigo e batata (WATERSCHOOT et al., 2015), no entanto pela diversidade de suas aplicações pesquisas com outras fontes botânicas de amido têm despertado grande interesse acadêmico e industrial.

Estrutura do amido

Os principais componentes do amido são a amilose e a amilopectina, moléculas que diferem nas suas propriedades e funcionalidades. A amilose apresenta alta tendência à retrogradação e produz géis firmes e filmes fortes. A amilopectina, por outro lado, quando dispersa em água se mostra mais estável produzindo géis macios e filmes fracos. A relação entre esses polímeros varia dependendo da origem botânica; em amidos normais/regulares a amilose corresponde acerca de 15 a 30% do amido, enquanto em amidos cerosos representa aproximadamente 0 a 5%. Há ainda os amidos ricos em amilose (*high amylose*), que contêm de 35 a 70% dessa fração polissacarídica (ASHOGBON; AKINTAYO, 2014; CHUNG et al., 2008; PÉREZ; BERTOFT, 2010).

A amilose (Figura 1), polímero essencialmente linear, compõe-se de unidades de D- glicose ligadas em α (1 $\rightarrow$ 4) com poucas ramificações em α (1 $\rightarrow$

4), cerca de 0,1 a 2,2 %. As moléculas ramificadas, separadas por grandes distâncias, comportam-se como lineares, não diferenciando seu comportamento em solução. Esse polímero apresenta massa molar que varia entre aproximadamente 10^5 e 10^6 Da, dependendo da origem botânica, podendo conter cerca de 100 a 350 unidades de glicose anidra em sua estrutura.

Há entendimento de que essa molécula se encontra principalmente sob forma desorganizada no interior das regiões amorfas do grânulo e sua forma praticamente linear resulta na formação de hélices com o interior hidrofóbico (grupos metileno e oxigênios glicosídicos), o que permite a presença de pequenas moléculas em seu interior como ácidos graxos, álcoois e iodo; na parte externa polar encontram-se as hidroxilas. Em cereais, a amilose pode estar presente nos grânulos de amido nas formas livre ou na forma de complexos amilose-lipídeo, os quais podem afetar as propriedades estruturais e tecnológicas dos amidos (VAMADEVAN; BERTOFT, 2015; ZEEMAN; KOSSMANN; SMITH, 2010).

A amilopectina (Figura 1) apresenta massa molar estimada entre 10^7 e 10^9 Da e grau de polimerização variando entre 4700 e 12800 unidades de glicose anidra. Sua estrutura é altamente ramificada, formada por unidades de D-glicose ligadas em α ($1 \rightarrow 4$), com 5 a 6% de ligações α ($1 \rightarrow 6$) nos pontos de ramificação. No interior do grânulo as cadeias são organizadas radialmente de modo que a extremidade livre, não redutora, aponta para a região periférica, enquanto as adjacentes formam duplas hélices que se encaixam em matrizes organizadas originando camadas cristalinas (lamelas) no interior da molécula. Desta forma, a cristalinidade dos grânulos é descrita principalmente em função das duplas hélices formadas pelas ramificações da amilopectina (VAMADEVAN; BERTOFT, 2015; ZEEMAN; KOSSMANN; SMITH, 2010).

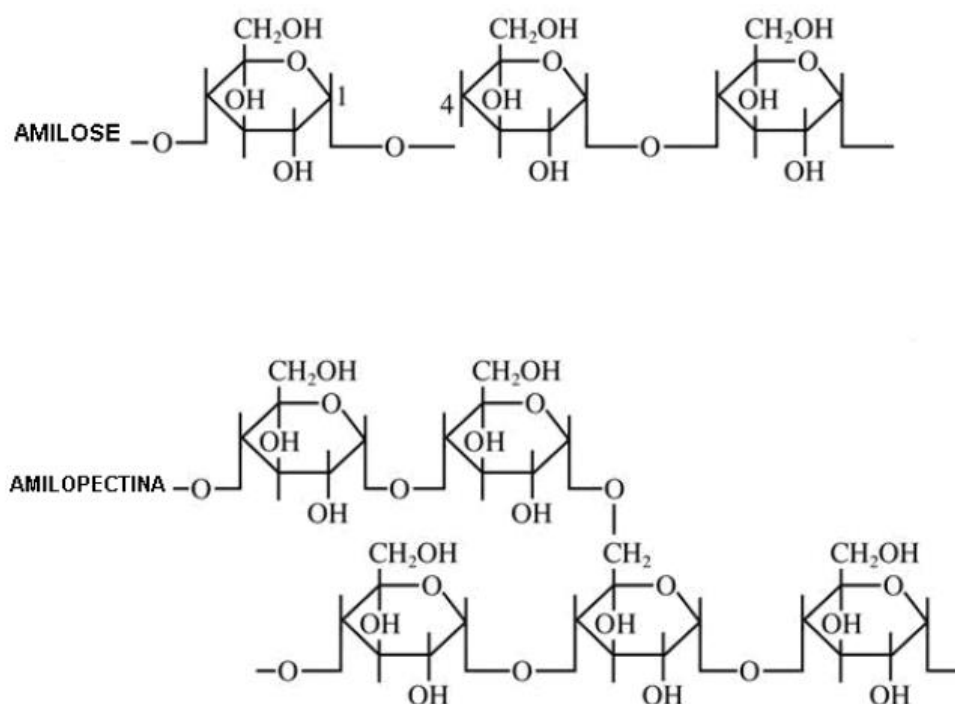


Figura 1 - Representação parcial das estruturas de amilose e amilopectina.

Fonte: Adaptado de Cornell (2000).

As moléculas de amido são biossintetizadas e densamente organizadas em grânulos. A maior parte dos amidos nativos (grânulos) exibe birrefringência, quando observado sob luz polarizada, resultando num modelo chamado “Cruz de Malta”. O centro da cruz ou “hilo” é considerado o ponto de origem do grânulo e a sua arquitetura interna é caracterizada por anéis de crescimento que correspondem a feixes contínuos que alternam entre lamelas cristalinas e amorfas da amilopectina, referidos como “blocklets”, os quais variam de tamanho de acordo com a fonte botânica: aproximadamente 30 nm para o amido de milho, 50 nm para o amido de batata de 130 a 150 nm para o amido de ervilha, contudo não há relação aparente entre o tamanho do “blocklet” e o grânulo. Em outras palavras, seu interior apresenta uma estrutura semelhante à de uma cebola, com anéis de crescimento alternando entre as regiões amorfas e cristalinas (Figura 2). A disposição radial da amilopectina dentro de tais estruturas é considerada a responsável pela formação da polarização óptica, uma vez que a essa polarização visível é da ordem do

comprimento da luz visível (100-1000 nm) (KIM; PARK; LIM, 2015; PÉREZ; BERTOFT, 2010; VAMADEVAN et al., 2013).

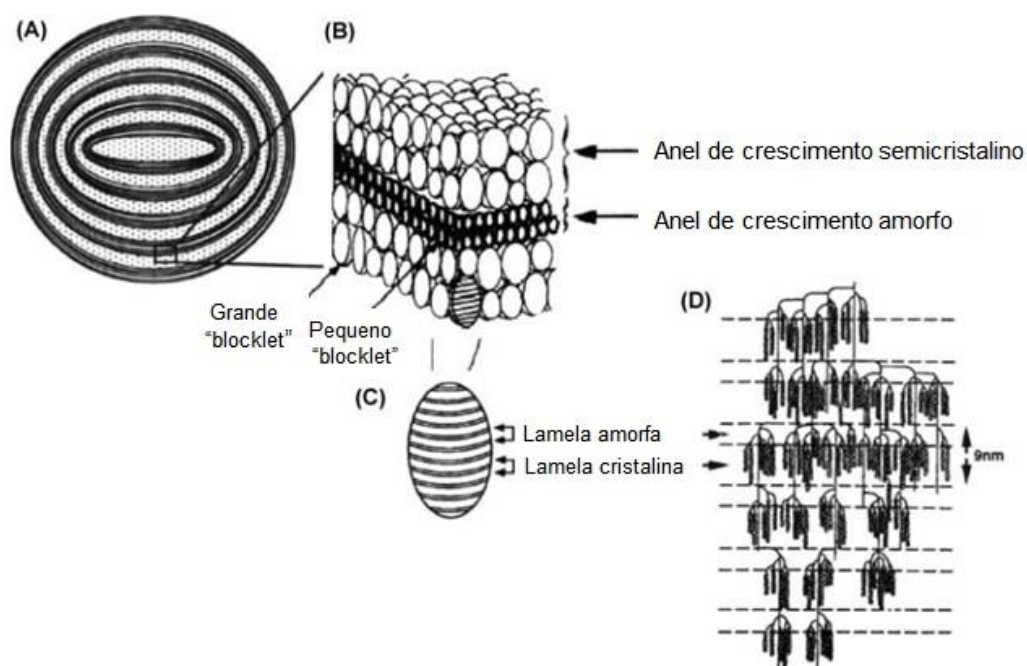


Figura 2 - Desenho esquemático do grânulo de amido; (A) anéis de crescimento semicristalinos e amorfos dentro dos grânulos de amido, (B) pequenos e grandes "blocklets", (C) lamelas cristalinas e amorfas, (D) hélices duplas alinhadas (compreendendo cadeias laterais de amilopectina) dentro das lamelas cristalinas e pontos de ramificação de amilopectina dentro das lamelas amorfas.

Fonte: Adaptado de Kim, Kim e Bail (2012).

Dependendo do difratograma de raios X, os amidos são classificados em três padrões de cristalinidade: A, B e C. As estruturas tipo A, características dos amidos de cereais (arroz, milho e trigo), são empacotadas de forma compactada com moléculas de água entre cada dupla hélice, apresentando picos em 15, 17, 18 e 23° em 2 θ . A estrutura tipo B, apresenta picos em 5,6; 15; 17; 18 e 23° em 2 θ , típica daqueles provenientes de cereais ricos em amilose e de tubérculos (batata),

sendo mais aberta, com moléculas de água localizadas na cavidade central formada por seis duplas hélices. Considera-se que as estruturas do tipo C, predominante em amidos de leguminosas, contêm os dois tipos de polimorfos: o tipo B no centro do grânulo e o tipo A na área circundante e apresentam picos em 5,5; 15; 17; 22 e 23° em 2θ (CAI et al., 2014; CHEETHAM; TAO, 1998; KIM; PARK; LIM, 2015).

De acordo com Biliaderis (1991), além de manter a estrutura granular do amido, as áreas cristalinas também controlam o seu comportamento em água, tornando-o relativamente resistente ao ataque enzimático e químico. Por outro lado, a região amorfa é menos densa que a cristalina e mais suscetível a modificações químicas, físicas e enzimáticas. O teor de água nos grânulos irá influenciar a aparência do padrão de difração de raios X; quanto mais hidratado o amido, mais fino será o padrão de difração até um determinado limite. A água é, portanto, um dos responsáveis pela organização cristalina do amido. A transição de cristalino para amorfo que ocorre mais comumente entre 60 e 70 °C, em excesso de água, é chamada gelatinização (DUFRESNE, 2014).

O DSC provou ser uma ferramenta extremamente valiosa na quantificação da gelatinização e tem sido amplamente utilizado desde a década de 1970 para estudar o comportamento térmico desse polissacarídeo. Termogramas de DSC permitem a análise das temperaturas de transição (isto é, início, T_o ; pico, T_p e conclusão, T_c), bem como a entalpia de transição (ΔH), a qual corresponde a quantidade de área cristalina (ou estrutura helicoidal dupla) em uma suspensão de amido que é rompida durante o aquecimento (WANG et al., 2015).

3.2. FONTES DE AMIDO

A utilização do amido em alimentos depende da origem botânica da planta da qual ele é extraído. Peculiaridades na estrutura granular e no teor de amilose, que são característicos da fonte, irão diferenciar as propriedades funcionais e químicas do polissacarídeo. O milho, a mandioca, o trigo e a batata são as matérias-primas mais utilizadas mundialmente para obtenção desse polissacarídeo. Contudo, as indústrias de alimentos e os produtores agrícolas estão buscando alternativas, como por exemplo o feijão, para suprir determinadas

demandas, tendo em vista uma maior diversidade de aplicações (DENARDIN; SILVA, 2009; LEONEL, 2007; WATERSCHOOT et al., 2015).

3.2.1. Milho

O milho é fonte de carboidrato, proteína, gordura e fibras, tanto para alimentação animal quanto para o consumo humano. Além disso, é a matéria prima mais utilizada para extração de amido em todo o mundo, correspondendo a aproximadamente 80% da produção. Por meio da moagem úmida o polissacarídeo é comercialmente isolado: o grão é separado em gérmen, fibra, amido e proteína, gerando subprodutos como uma farinha proteica, o pericarpo, a água de maceração, óleo e farinha integral desengordurada (WATERSCHOOT et al., 2015).

O principal e mais importante estágio da moagem úmida é a maceração dos grãos, onde o cereal é mergulhado em solução aquosa contendo dióxido de enxofre (0,1 a 0,2 % m/v) e mantido à temperatura que varia de 48 a 52 °C, por um período de 24 a 40 h. Esta etapa é realizada com a finalidade de produzir o amaciamento dos grãos, a fim de se obter uma separação ótima dos seus componentes. Durante a imersão, ocorre a absorção de água e de dióxido de enxofre. Este último induz o inchaço e a dispersão das proteínas, pois cliva as ligações dissulfeto inter- e intramoleculares, reduzindo a massa molar média e, conseqüentemente, aumentando a solubilidade (WATERSCHOOT et al., 2015).

As mudanças físicas, químicas e bioquímicas induzidas durante esse período são responsáveis pela qualidade e pelo rendimento dos produtos obtidos após a moagem. As condições adotadas no processo permitem o desenvolvimento de *Lactobacillus* sp, que produz ácido láctico a partir da utilização de açúcares disponíveis e reduz o pH do meio facilitando a separação dos componentes do grão. Durante essa etapa um efeito secundário importante do processo de imersão é o processo de anelamento do amido, que altera as suas propriedades estruturais e aumenta a temperatura de gelatinização. Além disso, durante o tratamento ocorre o amolecimento dos grãos, a liberação dos grânulos de amido das matrizes de proteína por meio da quebra das ligações dissulfeto, e a inibição do crescimento microbiano, que ocorre como uma evolução natural do processo. Após a moagem úmida, o gérmen é removido e o amido e a proteína são separados dos polissacarídeos não amiláceos por peneiramento. Em seguida, a fibra dietética é

removida e as frações amido e proteína são separadas por centrifugação ou sedimentação e, finalmente, ocorre a secagem (APARECIDA; GERALDI, 2012; WATERSCHOOT et al., 2015).

3.2.2. Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um alimento consumido principalmente em regiões tropicais, estando entre os vinte mais produzidos no mundo, sobretudo na África, Ásia e América Latina (FAO, 2018). No Brasil, essa planta apresenta rendimento médio de 15,4 t ha⁻¹ e é a quarta mais colhida, perdendo apenas para a cana de açúcar, soja e milho (IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016). Sua tolerância à seca, à baixa fertilidade do solo e seu desenvolvimento em diferentes condições climáticas facilita a produção, permitindo que seja cultivada em praticamente todo o território nacional (CARVALHO et al., 2016).

A planta da mandioca tem entre 1,0 a 3,5 m de altura, sendo um arbusto perene tropical de curta duração de crescimento. As raízes são compostas por água e carboidratos, principalmente amido (até 80% de seu peso seco) o que faz dessa planta uma importante fonte de energia. A mandioca é muito utilizada no Brasil para o processamento de farinhas e amido (polvilho), e ainda na produção do polvilho azedo (fécula de mandioca fermentada e seca ao sol). O Paraná é o maior produtor desse amido, atingindo cerca de 520 milhões de kg em 2015, o que correspondeu a 68,8% da produção brasileira (CEPEA, 2016). O segundo produtor é o Mato Grosso do Sul (184,9 mil t e 24,5%), seguido por São Paulo (43,4 mil t e 5,7%), Bahia (4,53 mil t e 0,6 %) e Santa Catarina (2,4 mil t e 0,3%) (CEPEA, 2016). Esse ingrediente é muito utilizado industrialmente por ser barato, abundante e adaptável, seu processamento de dá de acordo com a Figura 3, que consiste nas etapas de lavagem e descascamento das raízes, moagem, extração, para separação das fibras, purificação, com o objetivo da retirada dos carboidratos solúveis, concentração para retirada da água em excesso, secagem e envase. Um grande desafio do setor industrial tem sido gerar novas tecnologias para a utilização dos derivados da mandioca, com o objetivo de criar produtos inovadores, visando o

acesso a novos mercados (CARVALHO et al., 2016; CEREDA; VILPOUX, 2003; DEMIATE; KOTOVICZ, 2011).

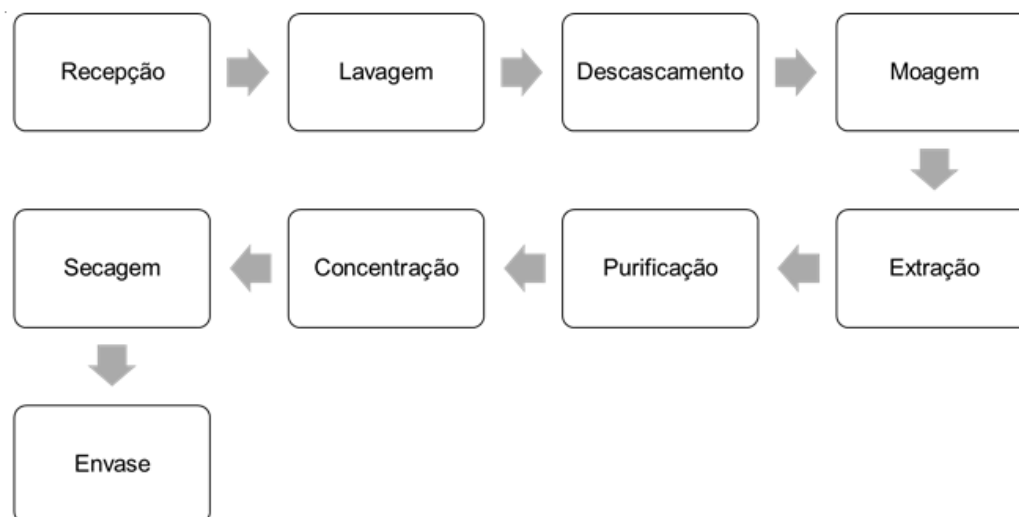


Figura 3 - Fluxograma do processamento de amido de mandioca.

Fonte: Cohen; Oiveira e Chisté (2008)

As variações nas propriedades do amido de mandioca podem ser atribuídas a fatores como a genética, estação de plantio, data da colheita, entre outros. O padrão de cristalinidade do amido de mandioca pode ser do tipo A ou do tipo C e o formato de seus grânulos são redondos ou truncados com dimensões entre 3-32 μm . Uma das principais propriedades que favorecem a aplicação desse carboidrato é a ausência de um típico "odor de cereais", atribuído ao baixo conteúdo lipídico e proteico (comum em amido de milho, por exemplo). Outro fator importante é seu comportamento físico-químico quando cozido em dispersão aquosa, que permite a produção de pastas de alta viscosidade e com alta claridade/transparência (51 – 81 % de transmitância de luz). Além disso, quando comparado com amidos de cereais, apresenta elevado poder de inchamento, temperatura de gelatinização mais baixa e menor tendência à retrogradação (DEMIATE; KOTOVICZ, 2011; GARRIDO et al., 2012; WATERSCHOOT et al., 2015).

3.2.3. Feijão

As leguminosas são a segunda principal fonte de alimentos à humanidade, perdendo apenas para os cereais. Desempenham um papel importante na dieta, principalmente aos residentes em países em desenvolvimento, pois apresentam grande importância na luta contra problemas de desnutrição devido aos seus elevados teores de fibra dietética, amido lentamente digerível, amido resistente, e proteína com baixo custo, quando comparada com as obtidas de fonte animal (BATISTA; PRUDÊNCIO; FERNANDES, 2010).

Entretanto fatores antinutricionais presentes no grão, como inibidores de tripsina, ácido fítico, taninos e oligossacarídeos (rafinose, estaquiase e verbascose) podem reduzir a atividade de algumas enzimas, a ação biológica de vários compostos químicos e a absorção de metabolitos. Contudo é possível inativar ou destruir esses fatores antinutricionais por meio do tratamento térmico, o que aumenta significativamente a qualidade das proteínas presentes leguminosas. Assim, o cozimento em tempos e temperaturas ideais resulta na redução de ácido fítico e taninos, porém um tratamento térmico excessivo pode reduzir o valor nutritivo do feijão (BATISTA; PRUDÊNCIO; FERNANDES, 2010).

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), planta com grande relevância em várias regiões do mundo, é cultivado em uma ampla gama de ambientes e em distintos níveis tecnológicos de produção. Popularmente é servido cozido com sementes inteiras (integrais) e consumido juntamente com arroz polido; essa combinação faz parte da alimentação básica para quase todos os brasileiros independente do nível de renda. Raramente é processado para a produção de amido ou de concentrado proteico ao contrário dos cereais e da soja, respectivamente (DEMIATE et al., 2016; DU et al., 2014; FERNANDES; GUERRA; ARAÚJO, 2015).

O Brasil encontra-se entre os maiores produtores mundiais de feijão, tendo colhido cerca de 310 bilhões de quilogramas no ano de 2014 (FAOTAST, 2016). A maior parte do mercado nacional consome o tipo comercial Carioca, que corresponde a 60% da produção anual. Para suprir as necessidades da entressafra, o feijão necessita ser armazenado por longos períodos de tempo. Condições desfavoráveis, comuns em regiões tropicais, como altas temperaturas (> 25° C) e umidade relativa alta (> 65%) favorecem perdas na qualidade das sementes,

ocasionando, por exemplo, o endurecimento denominado *Hard to cook*. Esse fenômeno é caracterizado pela utilização de tempos prolongados de cozimento, tendo em vista o amolecimento do grão, uma vez que a absorção de água nesse caso é dificultada. Esse defeito além de reduzir o valor nutricional, diminuiu a qualidade sensorial e culinária dessas sementes, pois mesmo após longo tempo de preparo o alimento continua duro e com textura indesejável, diminuindo a aceitação pelo consumidor e, conseqüentemente, o valor comercial do produto (DEMIATE et al., 2016; RUIZ-RUIZ et al., 2008; YI et al., 2016). O endurecimento dos grãos está relacionado à ação de polifenóis, que se polimerizam no tegumento ou pela lignificação dos cotilédones (DE ARAÚJO DELFINO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

De modo geral, o feijão apresenta teor de amido em torno de 45 % (base seca) e seus grânulos têm quantidades elevadas de amilose quando comparados aos amidos provenientes de outras fontes convencionais. Desse modo, a utilização do amido extraído do feijão seria uma alternativa para agregação de valor aos grãos com baixa qualidade para consumo *in natura*, incentivando a cadeia produtiva. Além disso, as características diferenciadas desse polissacarídeo têm despertado grande interesse para a criação de novos produtos (VANIER et al., 2012).

Um fato importante a ser considerado sobre o amido obtido de leguminosas refere-se ao mesmo ser constituído por frações que são lentamente digeríveis no organismo e por amido não digerível (amido resistente). Isso ocorre devido a sua resistência à hidrólise enzimática que está relacionada com o tipo de cristal do amido, o tipo C, o qual corresponde a uma mistura dos polimorfos A e B. Quando comparados o tipo B apresenta uma maior resistência a hidrólise do que o padrão de cristalinidade do tipo A (OVANDO-MARTÍNEZ et al., 2011; SÁNCHEZ-ZAPATA et al., 2015).

O amido resistente pode ser classificado em quatro tipos principais: (i) no tipo 1 (RS1), encontrado em grãos inteiros ou parcialmente moídos de cereais, leguminosas entre outros, o grânulo fica fisicamente inacessível em função das paredes celulares e das proteínas; o tamanho das partículas e/ou a composição impedem ou retardam a ação das enzimas digestivas; (ii) no tipo 2 (RS2), a digestibilidade é lenta devido às características intrínsecas da estrutura cristalina dos grânulos (não gelatinizados); (iii) o tipo 3 (RS3), por sua vez, é constituído de

polímeros de amido retrogradado (principalmente de amilose), produzidos quando o amido é resfriado após a gelatinização; e ainda o (iv) tipo 4 (RS4), que é proveniente de amidos modificados. Em um único alimento pode existir mais de um tipo de amido resistente., como é o caso do feijão, por exemplo, que possui amidos dos tipos 1 e 3 (LOBO; DE LEMOS-SILVA, 2003; MOORE et al., 2015; OVANDO-MARTÍNEZ et al., 2011).

Além de apresentar dois tipos de amido resistente, o feijão acumula outras características que o torna extremamente benéfico à saúde e importantes para utilização em sistemas alimentares: baixo índice glicêmico, alta temperatura de gelatinização, resistência ao cozimento sob cisalhamento e rápida retrogradação (AMBIGAIPALAN et al., 2011). Contudo, apesar de seus benefícios na utilização como ingrediente na indústria de alimentos, suas características tecnológicas são pouco estudadas, havendo necessidade de mais pesquisas para facilitar a extração, purificação e aplicação dessa matéria prima (VANIÉR et al., 2012).

3.3. NANOCRISTAIS DE AMIDO

O amido é constituído de regiões amorfas e cristalinas. Quando a remoção das regiões amorfas e a ruptura das regiões semicristalinas presentes no grânulo são conduzidas, ocorre a formação dos nanocristais (WEI et al., 2014a). Os nanocristais de amido muitas vezes são referidos como nanopartículas; a distinção entre as denominações pode se dar pela permanência de regiões cristalinas nos nanocristais, o que não ocorre nas nanopartículas. De todo modo, a diferenciação entre os termos é muito difícil, pois ambos são utilizados para se referir a partículas de amido de tamanho nanométrico obtidas por hidrólise ou outros tratamentos físicos ou químicos (DUFRESNE, 2014; KIM; PARK; LIM, 2015).

Um dos métodos mais utilizados para preparar os nanocristais é a hidrólise ácida, pois é simples e relativamente fácil de ser controlada. As regiões cristalinas do grânulo são mais resistentes à hidrólise que as regiões amorfas, podendo-se isolar as regiões cristalinas pela hidrólise ácida branda. A maior parte dos amidos apresenta hidrólise inicial rápida seguida por hidrólise subsequente lenta. Na fase inicial ocorre a degradação das regiões amorfas enquanto que na lenta a erosão

de regiões cristalinas pode acontecer (KIM; PARK; LIM, 2015). Na Figura 4 pode ser observada a possível região onde os nanocristais são originados.

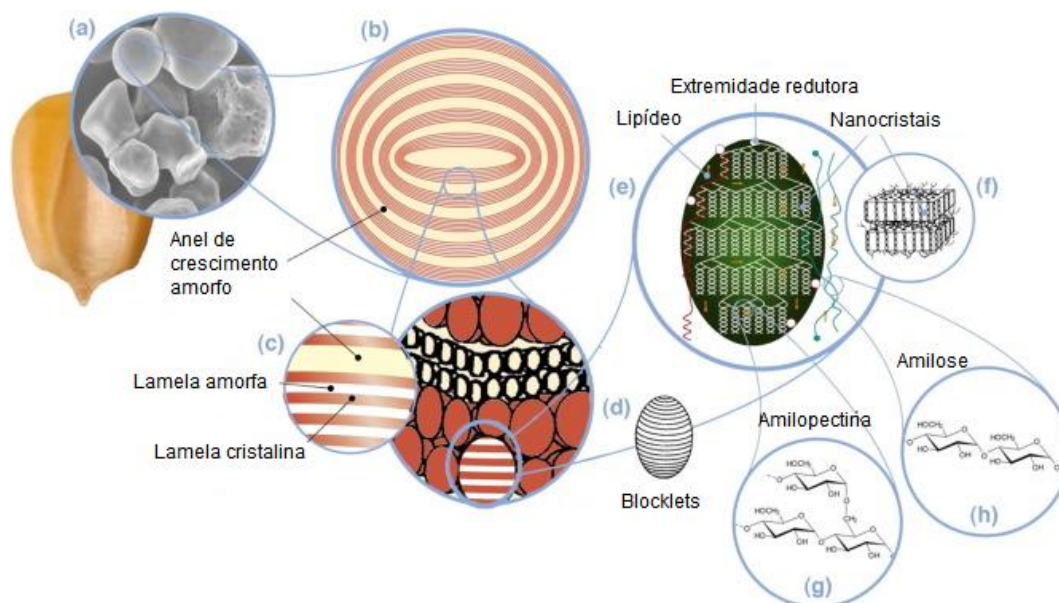


Figura 4 - Estrutura em multi-escala do amido: (a) grânulos de amido de milho normal (30 μm);(b) anéis de crescimento amorfos e semicristalinos (120-500 nm);(c) lamelas amorfas e cristalinas (9 nm);(d) blocklets (20-50 nm) que constituem a unidade dos anéis de crescimento;(e) hélices duplas de amilopectina formando as lamelas cristalinas dos blocklets;(f) nanocristais quando separados por hidrólise ácida;(g) estrutura molecular de amilopectina;(h) estrutura molecular de amilose (0,1-1 nm).

Fonte: Adaptado de Le Corre, Bras, Dufresne (2010).

Um dos trabalhos precursores para a produção de nanocristais foi realizado por Dufresne, Cavaille e Helbert (1996) que relataram um método para produzir "amido microcristalino". O procedimento consistiu na hidrólise do amido (5% em peso) em uma solução de HCl 2,2 mol L⁻¹ a 35° C durante 15 dias e produziu aglomerados de partículas de algumas dezenas de nanômetros de diâmetro. Mais tarde, Putaux et al. (2003) submeteram o amido de milho ceroso à hidrólise com HCl (2,2 mol L⁻¹) a 36° C e verificaram que um certo número de ligações α (1 $\rightarrow$ 6) situadas nas regiões amorfas no grânulo foram hidrolisadas resultando em nanopartículas cristalinas com cerca de 6-8 nm de espessura, 20-40 nm de comprimento e 15-30 nm de largura. Esse tratamento exigiu um longo período de

reação (40 dias) e resultou em um baixo rendimento (0,5 % m/m). Ainda, as nanopartículas tendiam a formar agregados.

Em outro estudo, Angellier et al. (2004) realizaram a otimização da preparação de nanocristais de amido de milho ceroso utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4). O melhor rendimento obtido pelos autores (14,69%) apresentou como parâmetros: concentração de $3,16 \text{ mol L}^{-1}$, temperatura de 40°C e período de reação de cinco dias. Em comparação com a hidrólise com HCl, a hidrólise com H_2SO_4 apresentou um maior rendimento e um tempo de tratamento mais curto. Assim, o ácido sulfúrico tem se mostrado um reagente mais eficiente, uma vez que produz suspensões aquosas mais estáveis. A estabilidade pode estar relacionada à incorporação de grupos éster de sulfato na superfície dos nanocristais durante o tratamento. Esses grupos são ácidos fortes que se dissociam em pH baixo, resultando em superfícies carregadas negativamente promovendo a repulsão eletrostática das nanopartículas e aumentando a estabilidade da suspensão. Outro fator que interfere na estabilidade da suspensão é a dimensão das partículas e a polidispersidade; quanto menores e mais uniformes, maior a estabilidade (DUFRESNE, 2014; KIM; PARK; LIM, 2015).

Nas últimas duas décadas, muitos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver aplicações para os nanocristais. Angellier et al. (2005) verificaram que os nanocristais obtidos a partir da hidrólise ácida com HCl seriam interessantes agentes de reforço em matrizes poliméricas. Zheng et al. (2009) incorporaram nanocristais de amido de ervilha, preparados com H_2SO_4 em matrizes de isolado proteico de soja e observaram que a adição de 2% (m/m) melhorou as propriedades de reforço. Os autores atribuíram esse resultado a dispersão uniforme das partículas na matriz.

As características morfológicas dos nanocristais dependem da origem e do método de preparação. A influência do teor de amilose e origem botânica sobre a morfologia dessas partículas tem sido investigada. Em um estudo para verificar a estrutura molecular do amido de milho ceroso, Angellier-Coussy et al. (2009) isolaram dois grandes grupos de dextrinas e caracterizaram cada grupo estruturalmente. No referido estudo foram utilizadas as enzimas β -amilase e enzimas desramificadoras (isoamilase e pululanase) em combinação com cromatografia de troca aniônica. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que

os comprimentos de cadeias das dextrinas em ambos os grupos correspondiam à espessura das lamelas cristalinas nos grânulos de amido. Foi também demonstrado que muitas das ligações das ramificações eram resistentes à ação das enzimas desramificadoras. A distribuição de moléculas ramificadas nas duas populações de dextrinas sugeriu que os nanocristais possuíam uma estrutura molecular regular e principalmente homogênea.

LeCorre, Bras e Dufresne (2011) prepararam nanocristais a partir de amidos de cinco fontes diferentes: milho (normal, alta amilose e ceroso), batata e trigo. Portanto, consideraram três origens botânicas, dois tipos cristalinos e três faixas de teor de amilose (0,25 e 70%) para o amido de milho. Apenas uma pequena influência da origem botânica foi relatada em propriedades como tamanho, distribuição de tamanho e espessura das nanopartículas, bem como a viscosidade da suspensão. Por outro lado, diferenças mais acentuadas foram encontradas quando comparados formatos e cristalinidade. As partículas cristalinas produzidas a partir de amido tipo A apresentaram morfologia semelhantes a quadrados, enquanto que as produzidas a partir de amido tipo B produziram partículas redondas. Isso foi explicado pelas diferentes configurações de empacotamento das cadeias de amilopectina para cadeias tipo A e B.

LeCorre, Bras e Dufresne (2011b) realizaram um estudo a fim de avaliar se as partículas de amido solubilizadas durante a hidrólise correspondem a quantidade real de nanocristais obtidos após ao final da reação. Os autores sugeriram pela primeira vez que os nanocristais são misturados com outras micropartículas, ou seja, grânulos de amido que não foram efetivamente hidrolisados e, além disso, parte do polissacarídeo pode se converter em açúcar ao final do processo, o que explicaria os baixos rendimentos encontrados durante a preparação. A capacidade dos nanocristais para estabilização de emulsões Pickering foi evidenciada por Li, Sun e Yang (2012), que observaram que o tamanho das partículas dos sistemas diminuiu com o aumento da concentração de nanocristais e que as emulsões eram muito estáveis à coalescência ao longo de meses.

As propriedades térmicas de cinco tipos de amidos (milho ceroso, milho normal, milho rico em amilose, batata e trigo), e seus correspondentes nanocristais de amido foram caracterizadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG) por LeCorre, Bras, Dufresne (2012). Os nanocristais

de amido de cristalinidade do tipo B foram mais estáveis quando comparados com os nanocristais do tipo A, mas o teor de amilose apresentou uma influência limitada. Este estudo forneceu informações importantes para as condições de processamento de nanocompósitos baseados em nanocristais de amido.

Li et al. (2015) relataram que a adição de nanocristais de amido de milho ceroso em filmes de amido de ervilha, melhorou as propriedades de barreira ao vapor d'água, propriedades mecânicas e propriedades morfológicas dos filmes. A aplicação dessas partículas provenientes do amido é vasta, podendo ainda serem utilizadas em compósitos (KRISTO; BILIADERIS, 2007), material de implante e suporte de medicamentos (XIAO et al., 2016), adsorventes para tratamentos de águas residuais (ALILA et al., 2011) e substitutos de gordura (JANE et al., 1992).

Entretanto, a tendência de se auto agregar e formar aglomerados em microescala, limita a utilização desse material em nível industrial. Isso ocorre, pois a quantidade de grupos de éster de sulfato formados em sua superfície durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 não consegue gerar forças eletrostáticas repulsivas suficientes para superar as ligações de hidrogênio ou de Van der Waals que ocorrem devido ao grande número de grupos hidroxilas (KIM; PARK; LIM, 2015). Alguns tratamentos podem ser utilizados para evitar esse comportamento, como *cross-linking* (ligações cruzadas) (ZHOU et al., 2016), esterificação (MOLINA-BOISSEAU; BELGACEM; DUFRESNE, 2005) e oxidação (WEI et al., 2016).

3.3.1. Nanocristais Oxidados

A modificação do amido através da oxidação permite a formação de pastas com baixa viscosidade e com altas concentrações de sólidos devido à introdução de grupos carboxila na sua superfície. Muitos reagentes podem ser utilizados para promover essa modificação, dentre os quais, o periodato, o ácido crômico, o permanganato, o dióxido de nitrogênio e o hipoclorito de sódio (WEI et al., 2015, 2016).

A produção de amido oxidado em escala comercial geralmente utiliza o hipoclorito de sódio ($NaClO$) como agente oxidante devido a sua disponibilidade, custo relativamente baixo e efeitos bem conhecidos na modificação do amido. Durante a oxidação com $NaClO$, alguns grupos hidroxila da amilose e da

amilopectina são oxidados a radicais carboxila (COOH) (preferencialmente) e uma pequena quantidade a radicais carbonila (C=O). Essa reação é realizada em meio alcalino e ocorre aleatoriamente nos radicais terminais redutores (C-1) e não redutores (C-4) e nas hidroxilas dos carbonos C-2 e C-3, rompendo a ligação C - C, com formação de radicais aldeídos intermediários em ambos os carbonos, resultando em amido 2,3 dicarboxilas (FRANCO et al., 2001; WANG et al., 2015).

A estratégia de oxidação, para introdução de cargas negativas, pode igualmente se aplicar ao nanocristal. Weiet al. (2015) estudaram o comportamento de nanocristais oxidados com hipoclorito de sódio e verificaram uma diminuição no teor de ésteres de sulfato e um aumento no teor de grupos carbonila e carboxila na superfície dos nanocristais. Em outro estudo, Wei et al. (2016) observaram que a oxidação dos nanocristais poderia formar suspensões estáveis por pelo menos 20 dias utilizando 2% ou mais de reagente na reação. Liu et al. (2017) prepararam nanopartículas de amido de milho ceroso através da desramificação das cadeias com pululanase seguida de recristalização e liofilização; em seguida os autores realizaram a oxidação das nanopartículas. No referido estudo, os potenciais zeta das amostras aumentaram significativamente devido a introdução de grupos carboxilas, apresentando uma carga máxima de -30 mV. Além disso, a modificação melhorou a estabilidade das suspensões, principalmente quando foram utilizados 4% e 5% de cloro ativo. Sendo assim, a oxidação pode ser uma estratégia promissora para introduzir cargas negativas na superfície dos nanocristais e minimizar a formação de aglomerados.

3.3.2. Nanocristais de amido como estabilizadores de emulsões

Define-se como emulsão sistemas heterogêneos de pelo menos duas fases imiscíveis. Uma delas chamada de fase dispersa (interna), distribuída como pequenas partículas através da segunda chamada fase contínua (externa). Um sistema que consiste em gotículas de óleo dispersas numa fase aquosa é chamado de emulsão óleo-em-água (O/W). A maioria das emulsões não apresenta estabilidade termodinâmica e tende a separar durante o armazenamento, através de mecanismos como a formação de creme, sedimentação, floculação ou coalescência. De forma geral, o sistema precisa de agentes emulsionantes ou

surfactantes para estabilizar-se, sendo que estes agentes têm duas funções básicas: a primeira de diminuir a tensão interfacial favorecendo a formação da emulsão, e a segunda de evitar a coalescência da fase dispersa (KRÓLIKOWSKA et al., 2017).

A busca crescente por emulsionantes naturais e não tóxicos levou a um grande interesse na pesquisa de novos sistemas de emulsão tais como as emulsões Pickering, as quais consistem em sistemas líquidos ou semissólidos isentos de surfactantes e estabilizados por partículas sólidas. Algumas vantagens desse sistema em relação às emulsões convencionais são a possibilidade de bloquear completamente o processo de maturação de Ostwald e apresentar maior estabilidade a longo prazo (LI; SUN; YANG, 2012; MARTO et al., 2016; SAARI et al., 2016).

Em emulsões Pickering as partículas estabilizadoras são necessariamente menores que as gotículas da emulsão. A estabilidade desse tipo de emulsão pode estar relacionada com a concentração de partículas, pH e força iônica. Seu mecanismo de adsorção se difere daquele dos surfactantes uma vez que não necessita ser feito de moléculas anfifílicas e a solvatação parcial da superfície das nanopartículas por água e óleo é a origem da sua forte ancoragem. Os principais parâmetros das partículas que interferem nas suas propriedades físico-químicas são a forma, o tamanho, as características superficiais e a estrutura interna.

Vários trabalhos relataram a utilização de partículas não alimentícias na estabilização de emulsões Pickering, como sílica (YIN et al., 2014), látex(NALLAMILLI et al., 2015) e argila (NONOMURA; KOBAYASHI, 2009), ou partículas de origem alimentícia como cristais de gordura (ROUSSEAU, 2013) e hidrocolóides (DICKINSON, 2009). Entretanto, partículas de amido variando de tamanho nanométrico a micrométrico têm sido cada vez mais estudadas para estabilizar emulsões, pois ao contrário das partículas não alimentícias o amido é um ingrediente natural com valor nutricional, ideal para aplicação em alimentos (MARTO et al., 2016).

O tamanho da partícula desempenha um papel chave na formação de emulsões estáveis com pequeno tamanho de gotícula. Conforme ocorre a diminuição do tamanho das partículas, há diminuição do tamanho das gotículas, desde que propriedades como a molhabilidade, a forma e a superfície não se

alterem. O tamanho do amido pode ser reduzido por intermédio de vários métodos físico e químicos, como a hidrólise ácida com a obtenção dos nanocristais de amido. Essas partículas vêm sendo objeto de várias pesquisas devido a sua abundância, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade (LI; SUN; YANG, 2012; SAARI et al., 2016).

Li et al. (2014) estudaram o efeito do pH e concentração salina na estabilização de emulsões e observaram que os nanocristais de amido de milho poderiam adsorver-se na interface óleo-água fazendo com que as emulsões apresentassem alta estabilidade à coalescência. Além disso, devido à quantidade de grupos sulfatados na superfície, os nanocristais eram carregados negativamente. Valores baixos de pH ou teores elevados de sal, portanto, reduziram a repulsão eletrostática na superfície das nanopartículas cristalinas formando agregados e levando a um aumento no tamanho das partículas nas emulsões. Outra pesquisa realizada por Saari et al. (2016) demonstrou que as pequenas partículas obtidas a partir da hidrólise dos grânulos de amido de diferentes tamanhos (quinoa, aveia e cevada cerosa) criaram emulsões estáveis com um tamanho de gota menor; além disso, a capacidade de emulsificação dos nanocristais foi maior em comparação com os grânulos intactos a partir da mesma fonte botânica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados amido de mandioca e de milho obtidos comercialmente, enquanto o amido de feijão foi extraído em laboratório. Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica, cumprindo as exigências necessárias para as análises.

Para a realização das análises os equipamentos utilizados foram disponibilizados pelo Centro de Tecnologia Agroalimentar (CTA/ Departamento de Engenharia de Alimentos) e pelo Complexo de laboratórios Multiusuários (C-Labmu) da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Extração do amido de feijão

O amido de feijão foi extraído de acordo com Bedin (2014), com algumas modificações. Para tanto, 100 g de farinha de feijão foram suspensos em solução de NaOH 0,005 mol L⁻¹ na proporção de 1:10 (farinha: água), por 45 min sob agitação constante com agitador mecânico IKA RW-20 (IKA-Werke, Staufen, Alemanha) em temperatura ambiente. Após isso, a suspensão foi centrifugada (Hettich Rotina 420R, Tuttlingen, Alemanha), a 8514 xg, a 10°C, por 10 min. Do precipitado foram obtidos dois resíduos: a proteína insolúvel, retirada com uma espátula da camada superior do *pellet* que contém o amido decantado. Em seguida, o amido foi re-suspenso em água e tamisado em peneiras para remoção da parte fibrosa (primeiro de 60 mesh para remoção grosseira, finalizando com 325 mesh). Após a realização de ciclos de re-suspensão em água e centrifugação até a completa remoção da proteína, o pH foi ajustado para 6,5 com HCl 0,01 mol L⁻¹. Na sequência, o amido foi lavado com água destilada com auxílio de bomba a vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil), até que a completa remoção dos sais pudesse ser verificada pingando gotas de nitrato de prata no sobrenadante. Para finalizar a amostra foi seca em estufa de circulação de ar (Tecnal, TE 394/1, Piracicaba, SP, Brasil) a 40°C por 24h, tamisada em malha de 60 mesh e armazenada em recipientes fechados.

4.2.2. Obtenção dos nanocristais de amido de mandioca, de amido de feijão e de amido de milho

Os nanocristais foram obtidos por meio da hidrólise com H₂SO₄ de acordo com o método descrito por Angellier et al. (2004). Primeiramente, foi preparada uma suspensão de amido a 15% (m/v) com uma solução de H₂SO₄ (3,16 mol L⁻¹, 200 mL). A amostra foi mantida sob agitação constante a 40°C e 120 rpm (incubadora shaker NT 714, Novatecnica, Santa Rosa, Piracicaba, SP, Brasil) durante cinco dias. Após hidrólise, a suspensão foi dialisada em membrana de celulose (14.000 Da) até o pH se tornar neutro. Em seguida foi adicionada azida sódica à suspensão, para evitar o crescimento microbiano e, por fim, ocorreu a liofilização (liofilizador LD 1500, Terroni, São Carlos, SP, Brasil).

Durante a hidrólise com H_2SO_4 , a cada 24 h, alíquotas de 2 mL da suspensão eram coletadas e centrifugadas (centrífuga MiniSpin/Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para a determinação de carboidratos solúveis presentes no sobrenadante utilizando o método fenol –sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), adaptado para leitura em microleitora de absorbância (FOX; ROBYT, 1991). A extensão da hidrólise foi determinada pela razão entre a quantidade de açúcares totais solubilizados e o peso inicial de amido. Ao final dos cinco dias foram verificados os rendimentos finais da hidrólise relacionando a massa inicial de amido e o resíduo insolúvel da hidrólise.

4.2.3. Obtenção dos nanocristais oxidados

A oxidação dos nanocristais com hipoclorito de sódio (NaClO) foi realizada de acordo com Wang e Wang (2003) e Wei et al. (2015), com modificações. Para tanto, foram preparadas suspensões contendo 2% de nanocristais em água (m/v). O pH das amostras foi ajustado para 9,5 com NaOH 1 mol L^{-1} e as mesmas foram mantidas sob agitação em temperatura ambiente (25°C). Ao longo de 30 min adicionou-se lentamente hipoclorito de sódio à suspensão até atingir a concentração de 4,0% (v/v). Após a adição do hipoclorito de sódio o pH da amostra foi mantido em 9,5 com a adição de H_2SO_4 1 mol L^{-1} por um período adicional de 50 min. Após essa etapa o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de H_2SO_4 1 mol L^{-1} . A amostra foi então centrifugada uma vez (15 min, $10642,5 \times g$) em centrífuga Rotina 420R (Hettich, Tullingen, Alemanha), dialisada até completa remoção do cloro, verificando-se com nitrato de prata, e por fim, liofilizada.

4.2.4. Elaboração de emulsão Pickering

As emulsões foram preparadas usando-se água deionizada, óleo de soja e nanocristais, conforme Li, Sun e Yang (2012), com modificações. Foram utilizados água e óleo nas proporções 1:1, 3:1 e 1:3 (v:v), respectivamente. Diferentes concentrações de nanocristais, 1, 3 e 5% (m/m de água) foram adicionadas na fase aquosa e a mistura foi homogeneizada em vortex por 1 min, em seguida a fase oleosa foi adicionada e ocorreu a homogeneização com o mesmo equipamento, durante 1 min. As emulsões foram armazenadas por 21 dias a temperatura ambiente (25°C).

4.2.5. Técnicas de caracterização

Propriedades de Pasta

O perfil viscoamilográfico dos amidos foi determinado pelo emprego do Rápido Visco-Analisador RVA 4 (RVA-4, Newport Scientific Pvt. Ltd., Narabeen, Austrália). Uma suspensão de amido (8% m/m, bs; 28g, massa total) foi misturada no porta amostras de alumínio, equilibrada a 50°C por 1 min, aquecida a 95°C numa taxa de 6°C min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 5 min. Em seguida, a pasta foi resfriada a 50°C, a uma taxa de 6°C min⁻¹, e mantida nesta temperatura por 2 min. A análise foi realizada a 160 rpm durante todo o experimento. Foi avaliado o perfil de cozimento das pastas pela observação da temperatura de empastamento, viscosidade máxima (pico), viscosidade mínima durante manutenção da temperatura a 95°C, quebra (viscosidade máxima - viscosidade mínima durante a manutenção) e viscosidade final das pastas a 50°C (DEMIATE et al., 2005).

Teor de Amilose

O teor de amilose das amostras de amido nativo e dos nanocristais foi determinado de acordo com Schoch (1964). Os amidos nativos foram previamente desengordurados com metanol 85% (v/v) usando extratores de Soxhlet por 6 h. Para realização da análise foram pesados o conjunto béquer e agitador magnético, e adicionou-se 100 mg de amostra em base seca, 1 mL de água deionizada e 5 mL de KOH 1,0 mol L⁻¹. Essa solução foi mantida em agitação por 30 min, e após esse período, três gotas de alaranjado de metila foram adicionados, como indicador. Em seguida realizou-se o gotejamento de HCl 0,5 mol L⁻¹ até coloração rósea e adicionou-se 10 mL de KI 0,5 mol L⁻¹. O peso do conjunto mais a solução foi completado para 100,9 g com água deionizada.

Uma solução estoque, foi previamente preparada. Para tanto, foram solubilizadas, com auxílio de ultrassom, 83 g de KI e 2 g de I₂ e adicionados 37 g de KCl. O volume foi completado para 1 L com água deionizada. Em seguida foi realizada a diluição 1:10 da solução.

A amostra foi titulada em autotitulador potenciométrico modelo 848 Titrimo Plus (Methohm, Herisau, Suíça) com a solução estoque diluída como titulante, em banho a uma temperatura de 30°C. O resultado foi demonstrado em afinidade de

iodo, o qual foi dividido por 0,2 para calcular a concentração de amilose presente nas amostras.

Espectroscopia na região do infravermelho médio

Para uma observação clara dos grupos carboxila, as amostras de nanocristais e nanocristais oxidados foram convertidas nas suas formas ácidas por permuta iônica, o que levou a banda de absorção de carboxilato de sódio a maiores comprimentos de onda. Para tanto, adicionou-se lentamente HCl (5 mL, 1 mol L⁻¹) à suspensão de nanocristais (0,1% m/v, 15 mL) com agitação magnética durante 5 h. Em seguida, as suspensões foram lavadas, por centrifugação, com HCl 0,01 mol L⁻¹ e água destilada pelo menos cinco vezes. Os grupos carboxilato de sódio (-COONa) nos nanocristais foram convertidos em grupos carboxílicos livres (-COOH) após o tratamento de troca iônica (LIN; BRUZZESE; DUFRESNE, 2012; WEI et al., 2016).

Para obtenção dos espectros foi utilizado o equipamento Shimadzu FT-IR8400 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) na região de 700-4000 cm⁻¹, com as amostras devidamente dispersas em pastilhas de KBr.

Difração de Raios X

Os difratogramas de raios X dos nanocristais foram obtidos de acordo com Beninca et al. (2008), a 20 °C num intervalo de ângulo 2θ de 3 -30° com um período de medição de 5s/2h, em um difratômetro XRD-6000 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) com CuK α (λ = 1,5406 Å), radiação a 40 kV e 30 mA. A cristalinidade relativa foi calculada pela equação 1, onde Ac é a área cristalina e Aa a área amorfa, de acordo com Nara e Komiya (1983).

$$CR (\%) = \frac{Ac}{Ac + Aa} \cdot 100 \quad (1)$$

Morfologia dos amidos nativos e dos nanocristais

A morfologia dos amidos nativos foi observada em um microscópio eletrônico de varredura por efeito de campo (MEV/FEG) (Tescan, MIRA 3, Kohoutovice, República Checa). Antes da obtenção das imagens as amostras foram recobertas

com ouro e paládio durante 150s e corrente elétrica de 20 mA. A análise foi conduzida sob uma tensão de aceleração de 15 kV (BET et al., 2016).

A análise para verificar a morfologia dos nanocristais foi realizada na Universidade Federal do Paraná (UFPR), no Centro de Microscopia Eletrônica, em um equipamento de microscopia eletrônica de transmissão (MET) modelo JEM 1200EX-II (Jeol, Akishima, Tóquio, Japão). Para tanto, suspensões contendo 0,002 % (m/v) de nanocristais foram homogeneizadas durante 120 s em banho de ultrassom. Uma alíquota da suspensão foi depositada sobre uma grade de microscopia revestida de carbono e seca a temperatura ambiente. As imagens foram obtidas a uma tensão de aceleração de 80 kV (COSTA et al., 2018).

Coloração diferencial

Para realizar a coloração diferencial das amostras 1 mg de nanocristais foram suspensas em 2,5 mL de solução de azul de metileno 0,1%, em seguida ocorreu a homogeneização em vortex, e em seguida a suspensão foi centrifugada sucessivas vezes até a completa remoção do corante em excesso. A diferença de cor foi verificada visualmente tirando uma foto logo após a realização do procedimento (SILVA et al., 2008).

Calorimetria Exploratória Diferencial

Para realização dessa análise, foi adicionada água destilada (1:4, amido: água) em 2 mg de amido nativo, nanocristais ou nanocristais oxidados (base seca) previamente pesada em cadinhos de alumínio, após isso a suspensão permaneceu em repouso durante 1 h até atingir o equilíbrio. Para evitar perda de água durante o aquecimento os cadinhos foram mantidos fechados. A análise foi feita em um equipamento Shimadzu DSC 60 (Quioto, Japão) que foi programado para aquecimento a razão de 5 °C min⁻¹, de 30-100 °C, utilizando atmosfera de ar sintético com uma vazão de 150 mL min⁻¹. Os cadinhos de alumínio foram selados (amostra e referência). As curvas endotérmicas com as temperaturas de início e pico foram produzidas, bem como as entalpias de transição (J g⁻¹) (VATANASUCHART et al., 2005).

Microscopia óptica

As gotículas de emulsão foram analisadas utilizando um microscópio óptico Axio Lab. A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Para tanto, uma alíquota da amostra foi colocada no centro de uma lâmina de vidro e coberta por uma lamínula. As imagens foram obtidas por meio do *software AxioVision V 4.8.2.0* com ampliações de 200x e analisadas pelo *software ImageJ*. Para tanto 100 gotas de cada emulsão tiveram seu diâmetro determinado. O diâmetro médio da superfície (d_{32}) e diâmetro médio volumétrico (d_{43}) das gotas foram calculados a partir das equações 1 e 2 (LI; SUN; YANG, 2012; SAARI et al., 2017).

$$d_{32} = \frac{\sum d_i^3}{\sum d_i^2} \quad (1)$$

$$d_{43} = \frac{\sum d_i^4}{\sum d_i^3} \quad (2)$$

Onde d_i é o diâmetro de uma gota, d_{43} é sensível à presença de grandes gotas. O índice de polidispersividade dos tamanhos das gotas (PDI) pode ser determinado pela equação 3:

$$PDI = \frac{d_{43}}{\sum d_i / N} \quad (3)$$

Onde N é o número total de gotas

Potencial Zeta e tamanho de partícula

A medida da presença de cargas na superfície dos nanocristais e do tamanho das partículas (técnica de espalhamento de luz - DLS) foram realizadas utilizando-se o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK), após a preparação de suspensões contendo 0,001 % de nanocristais em água (BEL HAAJ et al., 2016).

Capacidade emulsionante

A capacidade emulsionante dos nanocristais foi determinada a partir de fotografias que foram obtidas após a emulsificação. O índice de emulsão foi calculado de acordo com Rayner et al. (2012) conforme com a Equação 1:

$$EEu = \frac{V_{\text{Emuls}}}{V_{\text{total}}} \quad (4)$$

Onde:

V_{emuls} é o volume ocupado pela emulsão

V_{total} é o volume total de todas as fases

Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a diferença estatística, considerando-se o nível de significância estatística ($p < 0,05$). A homogeneidade de variâncias foi checada pelo teste de Brown-Forsythe ($p \geq 0,05$). Para avaliar os resultados dos procedimentos experimentais foi utilizada a análise de variância, seguida pelo teste de Fisher. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PROPRIEDADES DE PASTA

Dois fatores parecem determinar a viscosidade das pastas de amido avaliadas em viscoamilógrafo: o grau de inchamento dos grânulos e a resistência desses grânulos à dissolução pelo calor ou fragmentação pela agitação mecânica. O tratamento térmico seguido por ação mecânica sobre grânulos de amido conduz a quebras estruturais e, conseqüentemente, perda da integridade dos mesmos (FRANCO et al., 2001). Os perfis viscoamilográficos dos amidos nativos, determinados por Rápido Visco Analisador (RVA), estão apresentados na Figura 5. O perfil de viscosidade dos amidos é característico de cada fonte botânica. As viscosidades de pico dos amidos estão apresentadas na Tabela 1. Essa viscosidade representa o ponto de máximo inchamento dos grânulos, e a partir deste momento, com agitação e temperatura constantes, ocorre rompimento na estrutura do amido, e a redução de viscosidade é conduzida, até atingir um ponto mínimo. A diferença entre estes dois pontos de viscosidade permite o cálculo da viscosidade de quebra. O amido de feijão apresentou um menor valor de viscosidade de quebra ($122,5 \pm 108,2$ cP), quando comparado com o amido de milho ($960,0 \pm 121,6$ cP) e com o amido de mandioca ($1408,0 \pm 1,4$ cP).

Amidos nativos de tuberosas exibem um padrão viscoamilográfico típico, com um aumento da viscosidade até o máximo seguido de uma queda sob agitação e aquecimento (ROCHA; CARNEIRO; FRANCO, 2010). Em contraste, os amidos de leguminosas apresentam ausência de pico de viscosidade, aumento da viscosidade durante o período em que a temperatura permanece constante a 95 °C e elevado valor de viscosidade *setback* (HOOVER et al., 2010). As maiores viscosidades finais foram observadas para os amidos de milho e feijão, $2168,0 \pm 120,2$ e $2166,0 \pm 1,4$, respectivamente, enquanto o amido de mandioca apresentou o menor valor ($1222,5 \pm 94,0$).

A capacidade das cadeias de amilose se recrystalizarem durante o resfriamento, formando um gel de textura firme está diretamente ligada com a retrogradação do amido (FIGUEROA et al., 2015). O *setback* é um indicativo da tendência a retrogradação, pois o equipamento encerra a análise em 50 °C, e o processo de reorganização dos polímeros pode ser lento (GRANZA, 2015). Os

amidos de milho e feijão apresentaram as maiores tendências a retrogradação, com viscosidade *setback* de $946,5 \pm 167,6$ e $857,0 \pm 104,7$ cP, respectivamente. A temperatura de pasta determina o início do inchamento dos grânulos, sendo que altas temperaturas refletem uma maior resistência do amido a gelatinização causada por uma maior estabilidade estrutural (TESTER; MORRISON, 1990). O amido de mandioca exibiu a menor temperatura de empastamento ($67,6^{\circ}\text{C}$).

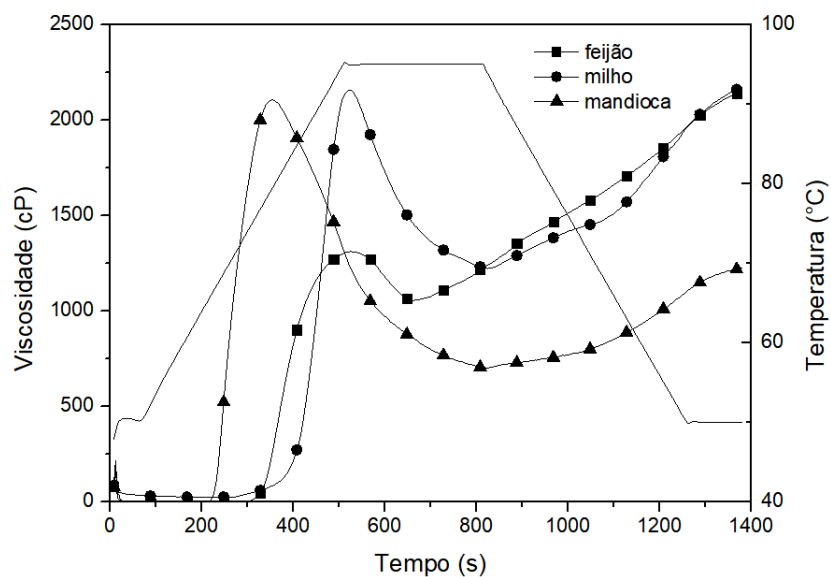


Figura 5 - Perfil viscoamilográfico para os amidos de mandioca, milho e feijão.

Tabela 1 - Resultados do perfil viscoamilográfico dos amidos de mandioca, milho e feijão.

Amido	Viscosidade (cP)				Temperatura de pasta (°C)
	Pico	Final	Quebra	Setback	
Mandioca	2106,0 ^a ± 43,8	1222,5 ^b ± 94,0	1408,0 ^a ± 1,4	524,5 ^b ± 51,6	66,1 ^b ± 0,3
Milho	2181,5 ^a ± 74,2	2168,0 ^a ± 120,2	960,0 ^b ± 121,6	946,5 ^{ab} ± 167,6	82,9 ^a ± 0,9
Feijão	1431,5 ^b ± 4,9	2166,0 ^a ± 1,4	122,5 ^c ± 108,2	857,0 ^a ± 104,7	79,6 ^a ± 2,8
p – valor (ANOVA)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD

5.2. HIDRÓLISE ÁCIDA DOS AMIDOS

As amostras de amido de mandioca, de milho e de feijão foram submetidas a hidrólise ácida por cinco dias e a porcentagem de hidrólise, medida pela quantidade de carboidratos solúveis, está mostrada na Figura 6. A diferença na susceptibilidade dos amidos à hidrólise pode ser atribuída aos tamanhos distintos dos grânulos, ao número de poros na superfície dos mesmos e principalmente, à organização granular (BILIADERIS; GRANT; VOSE, 1981).

De acordo com a Figura 6 pode-se observar que todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de hidrólise, com dois estágios, sendo um inicial e relativamente rápido até o terceiro dia e outro mais lento até o final. Segundo Hoover (2000), a etapa mais rápida ocorre pela degradação das regiões amorfas, sendo influenciada principalmente por aspectos como tamanho dos grânulos, poros presentes na sua superfície e teor de amilose. O segundo passo, mais lento, se dá pela hidrólise da região cristalina e pode sofrer interferência do conteúdo de amilopectina, pela distribuição das ramificações α (1 $\rightarrow$ 6) entre as lamelas amorfas e cristalinas e pelo grau de empacotamento das hélices duplas dentro dos cristalitos (LE CORRE; BRAS; DUFRESNE, 2010).

A reação de hidrólise ácida do amido envolve o ataque unilateral eletroquímico dos prótons nas ligações glicosídicas. O empacotamento menos ordenado da amilose e da amilopectina em regiões amorfas favorece esse ataque, enquanto que o empacotamento denso das hélices duplas nas regiões cristalinas dificulta a penetração dos íons H_3O^+ , resultando em uma taxa mais lenta de hidrólise em comparação com as regiões amorfas. Além disso, essa reação requer uma alteração na conformação das estruturas de D-glicose de cadeira para meia cadeira, o que é dificultado nas regiões cristalinas, pois ocorre a imobilização da configuração (CAMPANHA; FRANCO, 2011; JIVAN; MADADLOU; YARMAND, 2013).

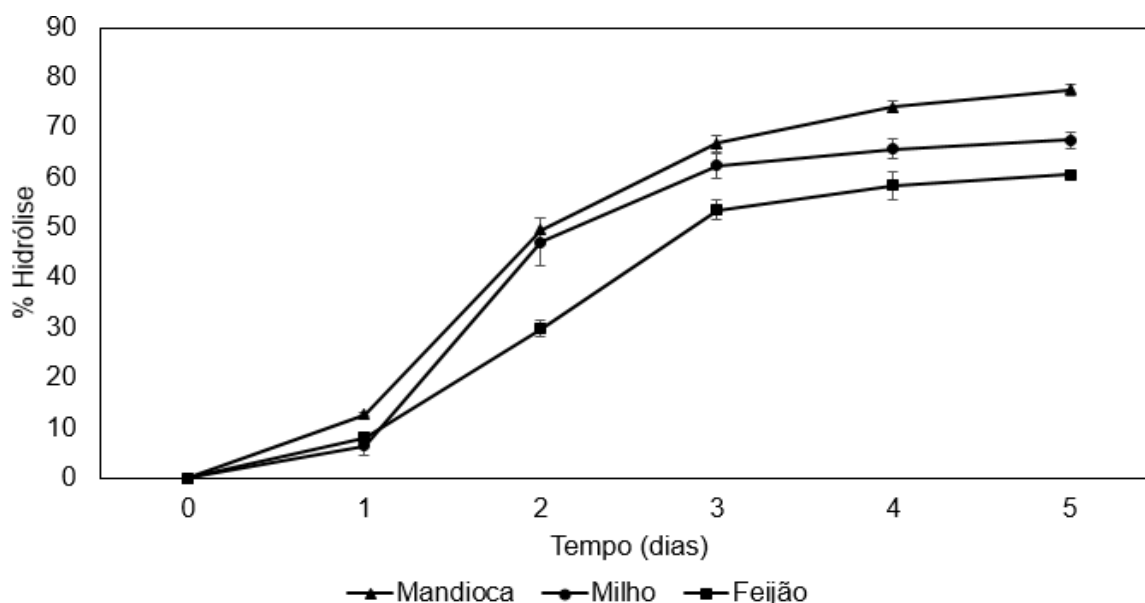


Figura 6 - Porcentagem de hidrólise em função do tempo de reação para os amidos de mandioca, milho e feijão.

De acordo com a Figura 6, o amido de mandioca foi o mais suscetível a hidrólise, o que pode ser atribuído a imperfeições na estrutura cristalina desse polissacarídeo. Rocha et al. (2011) realizaram análises usando cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detector amperométrico pulsado (HPAEC-PAD) e descobriram que os amidos de mandioca e mandioquinha salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) exibiam um ombro na distribuição de comprimento das cadeias ramificadas de amilopectina. Esses ombros indicam imperfeições na estrutura cristalina dos amidos. Defeitos na sua estrutura tornam os grânulos menos resistentes ao ataque ácido. Observações semelhantes foram realizadas por Campanha e Franco (2011). Em outro trabalho, Costa et al. (2018) estudaram a hidrólise ácida com H_2SO_4 de amidos de batata, mandioca e milho. Os autores verificaram o mesmo comportamento, sendo a hidrólise realizada em dois estágios e o amido de mandioca o mais susceptível à hidrólise, seguido do amido de milho e de batata.

O feijão se mostrou mais resistente a hidrólise, o que pode ser explicado por seu padrão cristalino tipo C, uma mistura dos polimorfos A e B. Sabe-se que o polimorfo tipo B apresenta uma maior resistência à hidrólise quando comparado ao padrão de cristalinidade do tipo A (OVANDO-MARTÍNEZ et al., 2011; SÁNCHEZ-ZAPATA et al., 2015). Alguns trabalhos encontraram maior resistência

dos amidos tipo B, quando comparados ao tipo A. Gérard et al. (2002) encontraram uma relação clara entre os parâmetros de hidrólise e a quantidade de cristais do tipo B, estudando vários mutantes de milho com várias proporções de alomorfos A, B e V, ou seja, ocorreu uma menor susceptibilidade do amido ao ataque ácido à medida que a quantidade de cristais do tipo B aumentou e, além disso, houve um aumento no número de estruturas residuais. Xia et al. (2010) observaram uma menor susceptibilidade dos amidos de *F. ussurensis* (tipo B) e *R. dioscorea* (tipo C) à hidrólise com HCl 2,2 molL⁻¹, durante 32 dias, quando comparados ao amido de milho (tipo A). A susceptibilidade dos amidos também pode estar ligada ao seu teor de amilose. Jayakody e Hoover (2002) estudaram a susceptibilidade de diferentes amidos de cereais à hidrólise e verificaram que, de modo geral, a extensão da reação foi mais pronunciada no milho ceroso do que nos amidos de aveia, arroz, milho normal, milho V (50-60% de amilose) e milho VII (70% de amilose).

Os resultados de rendimento da obtenção de nanocristais, apresentados na Tabela 2, concordam com os observados para a porcentagem de hidrólise, ou seja, o feijão apresentou o maior rendimento, sendo sua massa final pode ser composta por nanocristais e por fragmentos não completamente hidrolisados, seguido da mandioca e do milho.

Tabela 2 - Rendimento da obtenção de nanocristais a partir dos amidos de mandioca, de milho e de feijão.

Nanocristal	Rendimento (%)
Mandioca	12,21 ± 1,3
Milho	16,32 ± 1,9
Feijão	22,08 ± 1,6

Visando a otimização das condições de preparo, Angellier et al. (2004) obtiveram rendimento da hidrólise de 15,7% utilizando como fonte o amido de milho ceroso, cinco dias de hidrólise com H₂SO₄ 3,16 mol L⁻¹ a 40 °C com agitação de 100 rpm e concentração de amido de 14,69%. As condições ótimas de hidrólise podem variar de acordo com a origem botânica do amido. Em outro estudo, Xu et al. (2014), utilizando as mesmas condições, encontraram rendimentos de 14,1 ± 0,6 para o milho, 15,1 ± 0,2 para a mandioca e 35,7 ± 2,3 para o feijão mungo.

5.3. TEOR DE AMILOSE

De acordo com Lecorre, Bras e Dufresne (2011a) aceita-se que os nanocristais são constituídos de cadeias laterais de amilopectina. A fim de validar essa suposição pode-se avaliar a relação entre amilose e amilopectina nos amidos antes e após a hidrólise. Para tanto a técnica mais comumente utilizada consiste na avaliação da capacidade de formação de complexos amilose-iodo no amido. Embora as determinações espectrofotométricas sejam mais amplamente utilizadas para determinar a capacidade de ligação com o iodo de uma amostra, a titulação potenciométrica ofereça uma medida mais definitiva para esse fim.

Os conteúdos de amilose dos amidos nativos e de seus respectivos nanocristais, oxidados ou não, podem ser observados na Tabela 3. Os amidos nativos de mandioca, milho e feijão apresentaram respectivamente 25,2; 27,5 e 45,3% de amilose. Para todas as fontes botânicas, o tratamento ácido diminuiu o conteúdo de amilose em aproximadamente 90%. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al. (2018), que observaram redução de pelo menos 70% da amilose já no primeiro dia de hidrólise. Isso ocorre, pois esse polímero faz parte das áreas amorfas dos grânulos que são mais suscetíveis ao ácido. Durante a hidrólise, os grânulos de amido incham e permitem a saída da amilose da região amorfa para a fase aquosa, onde é facilmente hidrolisada pelos íons H_3O^+ .

Tabela 3 - Conteúdo de amilose dos amidos nativos de mandioca, milho e feijão e de seus respectivos nanocristais, com e sem oxidação.

Amostra	Amilose (%)
Mandioca	25,2 ^c ± 0,2
Nano Mandioca	1,3 ^f ± 0,3
Nano Mandioca Oxidado	1,2 ^{ef} ± 0,4
Milho	27,5 ^b ± 0,8
Nano Milho	2,1 ^{ef} ± 0,1
Nano Milho Oxidado	2,4 ^e ± 0,4
Feijão	45,3 ^a ± 1,3
Nano Feijão	4,9 ^d ± 0,1
Nano Feijão Oxidado	4,5 ^d ± 0,7
p – valor (ANOVA)	<0,001

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD

As amostras de nanocristais de feijão apresentaram os maiores conteúdos de amilose, sendo $4,9 \pm 0,1$ para o nanocristal sem modificação e $4,5 \pm 0,7$ para o oxidado, o que pode estar relacionado ao maior conteúdo de amilose no feijão nativo $45,3 \pm 1,3$. XU et al. (2014), não detectaram a presença de amilose em nanocristais obtidos a partir de mandioca, milho e feijão mungo utilizando o método espectrofotométrico.

5.4. TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

As distribuições de diâmetro hidrodinâmico de nanocristais e nanocristais oxidados foram determinadas por DLS (espalhamento de luz). Essa técnica possibilita estimar o tamanho médio dos aglomerados em suspensão aquosa. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão (PDI) dos nanocristais de mandioca, milho e feijão com e sem modificação.

Nanocristais	Tamanho de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	PDI
Mandioca	317,9 ^a ± 26,1	- 28,7 ^{cd} ± 0,9	0,790 ^a ± 0,051
Mandioca Oxidado	174,6 ^c ± 13,6	- 33,9 ^a ± 1,5	0,470 ^c ± 0,022
Milho	286,6 ^{ab} ± 18,3	- 18,3 ^b ± 1,2	0,643 ^b ± 0,013
Milho Oxidado	175,2 ^c ± 17,0	- 29,3 ^{cd} ± 1,8	0,437 ^d ± 0,034
Feijão	282,5 ^{ab} ± 22,1	- 27,5 ^d ± 1	0,648 ^b ± 0,013
Feijão Oxidado	232,9 ^{bc} ± 8,4	- 30,9 ^c ± 0,5	0,398 ^{cd} ± 0,018
p – valor (ANOVA)	<0,001	<0,001	<0,001

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD

Os nanocristais obtidos pela hidrólise ácida mostram uma forte tendência de formar agregados, pois apresentam uma grande superfície específica, e, além disso, os grupos sulfato e hidroxila não conseguem fornecer forças suficientes para se tornarem independentes, ocasionando a associação por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila, que são encontrados em um número significativamente grande para uma única área de nanocristais (RIBBA et al., 2009). Condés et al. (2015) observaram essa tendência de agregação, obtendo partículas que variaram de 823 ± 9 nm para o amido de milho normal e 1287 ± 125 nm para o milho ceroso.

No entanto, após a oxidação com hipoclorito de sódio ocorreu uma diminuição no tamanho dos agregados, ou seja, as forças de repulsão se tornaram as forças dominantes e superaram as forças atrativas de Van der Waals e das ligações de hidrogênio entre os nanocristais (WEI et al., 2016). Pesquisas anteriores confirmaram a relação entre tamanho de partícula e oxidação. Liu et al. (2017) oxidaram nanopartículas de amido de milho ceroso e perceberam uma diminuição no tamanho que variou de 263 nm para as amostras sem oxidação e 183 nm para as amostras oxidadas com NaClO na concentração de 5%.

O potencial zeta é o indicador principal da carga de superfície estando relacionado com a estabilidade da suspensão coloidal que por sua vez pode ser influenciada pelo grau de oxidação dos nanocristais. Um alto valor de potencial zeta, em módulo, indica uma grande repulsão entre as partículas, ou seja, uma

maior resistência a agregação. Como mostrado na Tabela 4 o potencial dos nanocristais foi negativo indicando a presença de cargas de superfície negativas, devido à formação de grupos carboxila e sulfatos na superfície dos mesmos. Após a oxidação com NaClO, ocorreu um aumento do potencial zeta, em módulo, o que demonstrou que a introdução de grupos carboxila causou aumento significativo da carga superficial dos nanocristais de amido.

Esses resultados estão de acordo com o trabalho realizado por Liu et al. (2017), que promoveram a oxidação de nanopartículas de amido de milho e observaram que a introdução de grupos carboxila e carbonila na superfície das partículas aumentou o potencial zeta absoluto das suspensões de -13 mV para aproximadamente -30 mV quando a concentração de cloro ativo foi de 4 %.

O índice de polidispersão (PDI) define a distribuição de tamanhos de partículas obtidas pelo DLS. Valores de 0,1 a 0,5 indicam distribuições adequadas, mostrando boa qualidade na suspensão coloidal, enquanto valores próximos ou maiores que 0,7 sugerem a presença de grandes partículas ou agregados na suspensão com ampla distribuição de tamanho. Pode-se observar na Tabela 4, que antes da oxidação tanto os nanocristais de mandioca quanto de milho e feijão apresentaram valores de PDI maiores que 0,5, o que mostra que havia certa heterogeneidade nessas suspensões; após a oxidação, entretanto, esses valores diminuíram para todas as amostras ficando abaixo de 0,5, mostrando uma maior homogeneidade dos aglomerados. Zhou et al. (2016) também verificaram uma melhora na qualidade das suspensões quando modificaram nanocristais de amido de milho ceroso por meio de ligações cruzadas utilizando ácido cítrico. Os valores diminuíram de 0,63 para 0,45 com 2 h de tratamento.

5.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho médio foi utilizada para monitorar as mudanças ocorridas na estrutura do amido pela hidrólise ácida e pela oxidação. Os espectros FTIR dos amidos e dos nanocristais podem ser observados na Figura 7.

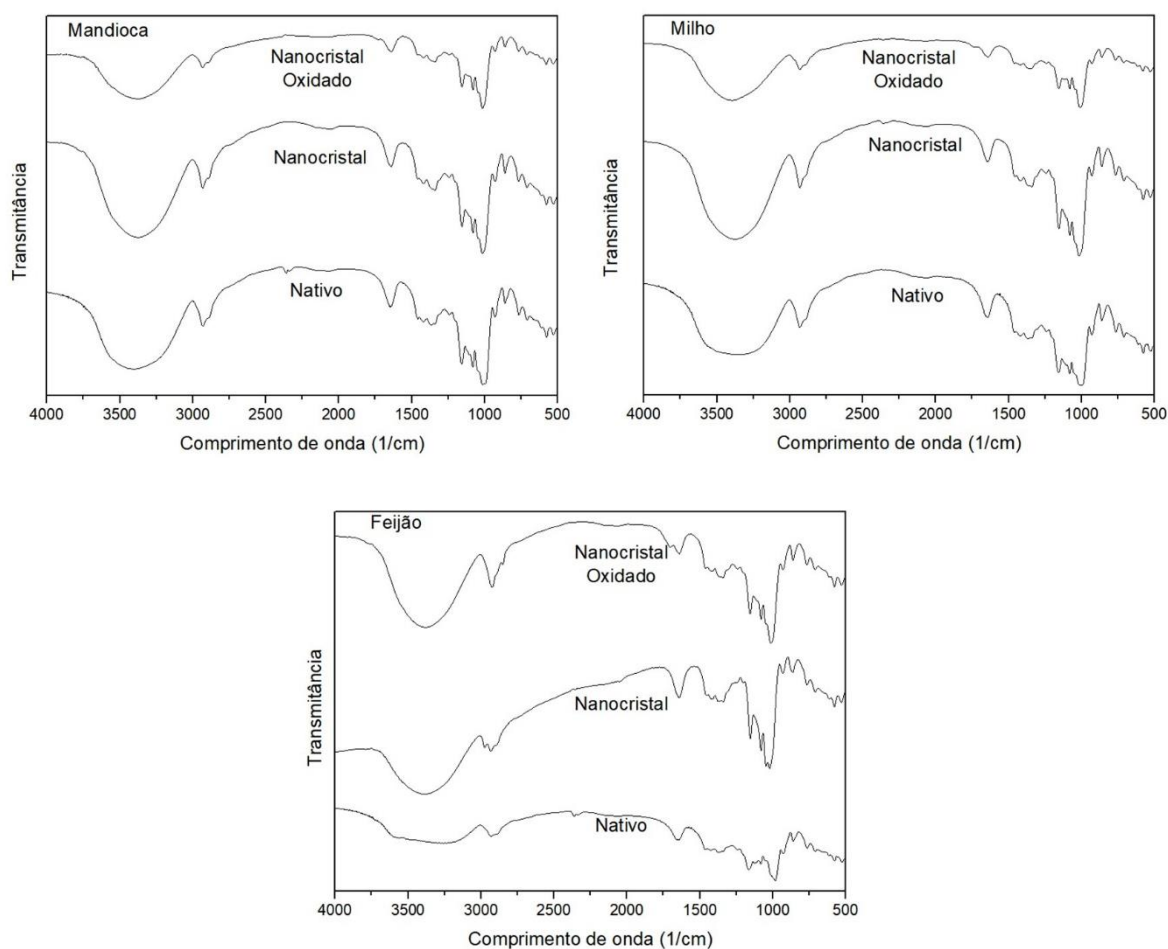


Figura 7 - Espectro FTIR dos amidos nativos e dos nanocristais de mandioca, milho e feijão com e sem oxidação.

Uma das principais bandas observadas em ambos os espectros, tanto no amido nativo quanto nos nanocristais, é uma faixa larga na região de 3000 a 3600 cm^{-1} que está relacionada ao alongamento dos grupos OH e CH, o que pode ser atribuído aos complexos trechos vibracionais associados a grupos hidroxila livres, inter e intra-moleculares ligados que formam a estruturado amido. A presença desses grupos nos nanocristais favorece a formação de aglomerados, em função das ligações de hidrogênio entre as hidroxilas das partículas que são mais fortes que a força de repulsão. Outros picos presentes em ambas as amostras encontram-se a 1650 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} que correspondem, respectivamente a vibração de flexão de OH e CH (MANO; KONIAROVA; REIS, 2003; MUKURUMBIRA et al., 2017). De acordo com Kizil, Irudayaraj, Seetharaman (2002), a faixa de 1650 cm^{-1}

é resultado da água adsorvida nas regiões amorfas do amido e pode variar de acordo com a cristalinidade.

A presença das bandas próximas a 1070 cm^{-1} e a 860 cm^{-1} nos nanocristais pode ser atribuída à vibração da ligação C-O-S, que ocorrem devido à formação de grupos éster sulfato durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 (WEI et al., 2014b).

Após a oxidação, com o objetivo de eliminar a interferência da banda de água absorvida e observar claramente as mudanças no nanocristal, foi realizado o tratamento ácido das amostras para converter os grupamentos – COONa em COOH . Assim, após o tratamento por troca iônica com HCl , detectou-se um pico a 1735 cm^{-1} , característico dos grupos carboxilas livres (forma ácida – COOH), indicando uma oxidação bem sucedida do nanocristal. Resultados semelhantes foram encontrados por Wei et al. (2016).

5.6. DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Para verificar o comportamento semicristalino dos amidos nativos e modificados foi empregada a difratometria de raios X. Os difratogramas dos amidos e nanocristais estão apresentados na Figura 7. Os amidos de mandioca e milho apresentaram padrão cristalino tipo A, com picos em 15° , 17° , 18° e 23° em $2(\theta)$; o padrão cristalino foi mantido após as reações de hidrólise ácida e oxidação. O amido de feijão nativo apresentou padrão tipo C - A, apresentando picos em $5,6^\circ$; 15° ; 17° ; 18° e 23° em $2(\theta)$, preservado após a hidrólise, porém, com a reação de oxidação o pico em $5,6^\circ$ desapareceu e a amostra passou a exibir padrão tipo A.

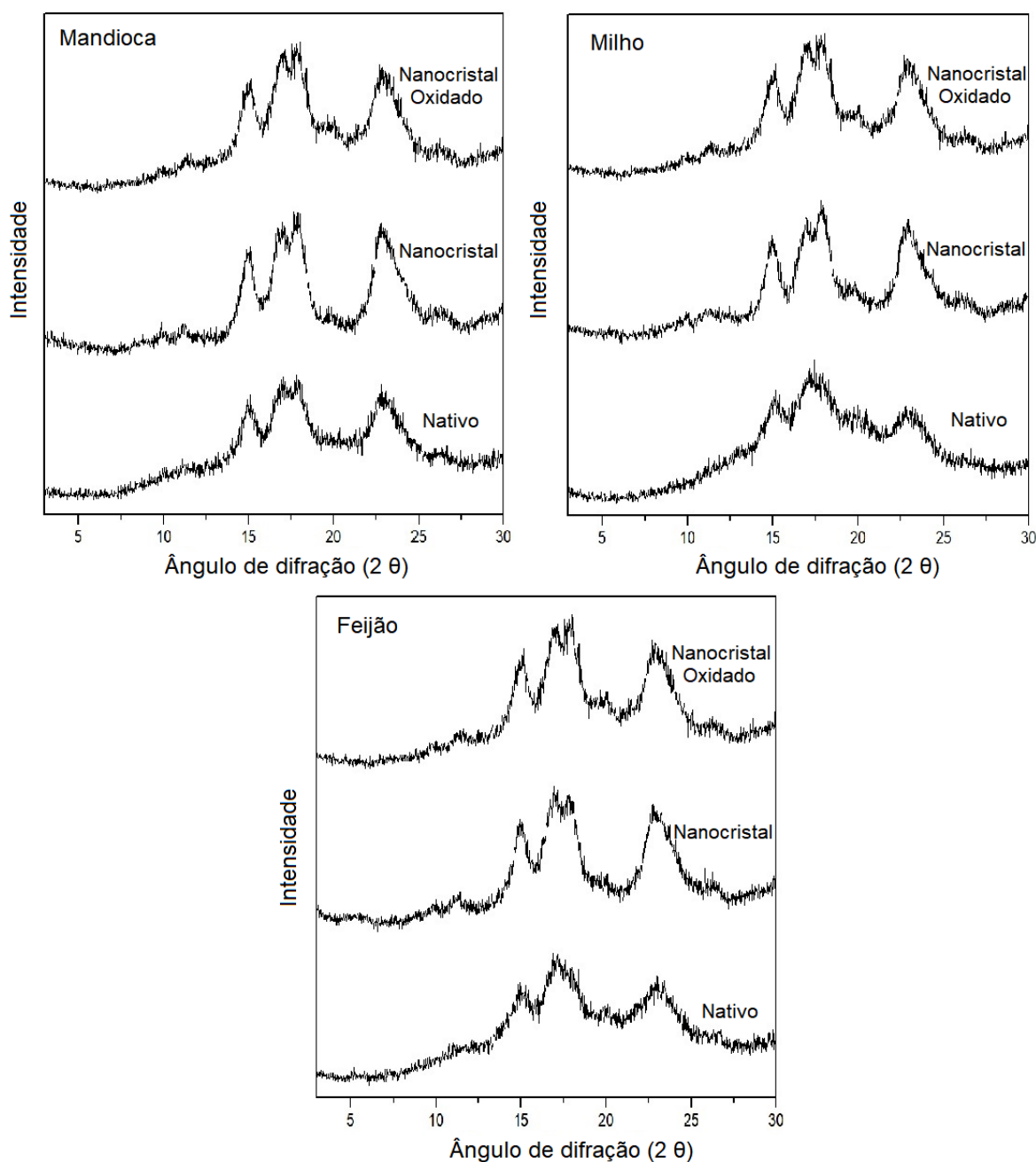


Figura 8 - Difratogramas de raios x dos amidos nativos e dos nanocristais, com e sem oxidação, de mandioca, de milho e de feijão.

Após a reação com H_2SO_4 as partículas apresentam um aumento na intensidade dos picos no difratograma em comparação aos respectivos amidos nativos. Isto é esperado, pois a hidrólise ocorre preferencialmente nas regiões amorfas resultando em uma estrutura cristalina mais distinta, tendo em vista que essas são menos densas e mais suscetíveis a modificações químicas e enzimáticas (MUKURUMBIRA et al., 2017). Gonzáles e Alvarez Igarbazal (2015) relataram

conclusões semelhantes ao analisarem nanocristais de amido de milho. Os autores atribuíram o aumento nos picos de reflexão a uma maior proporção de amilopectina nos nanocristais; além disso, mesmo após a hidrólise, os amidos preservaram o padrão cristalino.

Tabela 5 - Índice de cristalinidade relativa dos amidos nativos, nanocristais e nanocristais oxidados de mandioca, milho e feijão.

Amostra	IC (%)
Mandioca	36,4 ^g ± 0,4
Nano Mandioca	57,7 ^b ± 0,8
Nano Mandioca Oxidado	44,9 ^f ± 0,8
Milho	25,4 ⁱ ± 0,7
Nano Milho	54,0 ^c ± 0,6
Nano Milho Oxidado	47,4 ^e ± 0,8
Feijão	30,9 ^h ± 0,9
Nano Feijão	51,4 ^d ± 0,5
Nano Feijão Oxidado	65,5 ^a ± 0,9
p – valor (ANOVA)	<0,001

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher LSD

A cristalinidade relativa pode ser usada para verificar se a hidrólise ácida removeu efetivamente as regiões amorfas dos grânulos, preservando os domínios cristalinos. Na Tabela 5 pode ser observada a cristalinidade relativa dos amidos. Percebe-se que o valor aumentou após o tratamento ácido, o que mostra que ocorreu um incremento das regiões cristalinas quando comparadas com as regiões amorfas nos nanocristais; no entanto, esses valores não atingem 100 %, o que indica que mesmo após o tratamento ácido ainda há presença de materiais não organizados nas amostras (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011a). Resultados semelhantes foram encontrados por XU et al. (2014), que analisaram amidos de várias fontes botânicas e observaram um aumento na cristalinidade relativa de ambas as amostras, sendo que essas foram de $22,7 \pm 1,1$; $26,3 \pm 2,3$ e $24,9 \pm 1,9$ para os amidos de milho, mandioca e feijão mungo, respectivamente, e de $44,0 \pm 0,6$; $51,1 \pm 2,8$ e $45,8 \pm 0,5$ para os nanocristais correspondentes.

A oxidação dos nanocristais provocou alterações na cristalinidade relativa dos mesmos. Para os amidos de mandioca e milho ocorreu uma diminuição na cristalinidade, o que pode ser explicado pela despolimerização de aglomerados

cristalinos presentes na amilopectina. No amido de feijão, entretanto, ocorreu o inverso e a cristalinidade relativa aumentou. É possível que nesse caso o NaClO tenha formado grupos carboxilas nas regiões amorfas das partículas, o que resultou em uma reorganização parcial dessas região (GARRIDO et al., 2012). Outra hipótese é que como a cristalinidade relativa é calculada pela relação entre área cristalina e amorfa, um decréscimo significativo na área amorfa pode ter resultado no aumento da cristalinidade relativa. Chávez-Murillo, Wang e Bello-Pérez (2008) também observaram esse aumento na cristalinidade ao oxidar amidos de cevada e de milho utilizando NaClO em diferentes níveis de cloro ativo (1,5, 3 e 5%).

5.7. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE COLOIDAL

As amostras oxidadas com NaClO 4% foram fotografadas em diferentes períodos a fim de se observar a estabilidade da solução coloidal. Logo após a homogeneização (30 s), todas as amostras eram visivelmente estáveis, porém depois de passada 1 h era possível observar a precipitação das amostras que não foram modificadas por oxidação (Figura 9). O mesmo comportamento se manteve após 24 h e 72 h. O tratamento com NaClO melhorou a estabilidade das partículas cristalinas e apenas após sete dias consegue-se ver uma leve precipitação das amostras oxidadas que é maior após 30 dias.

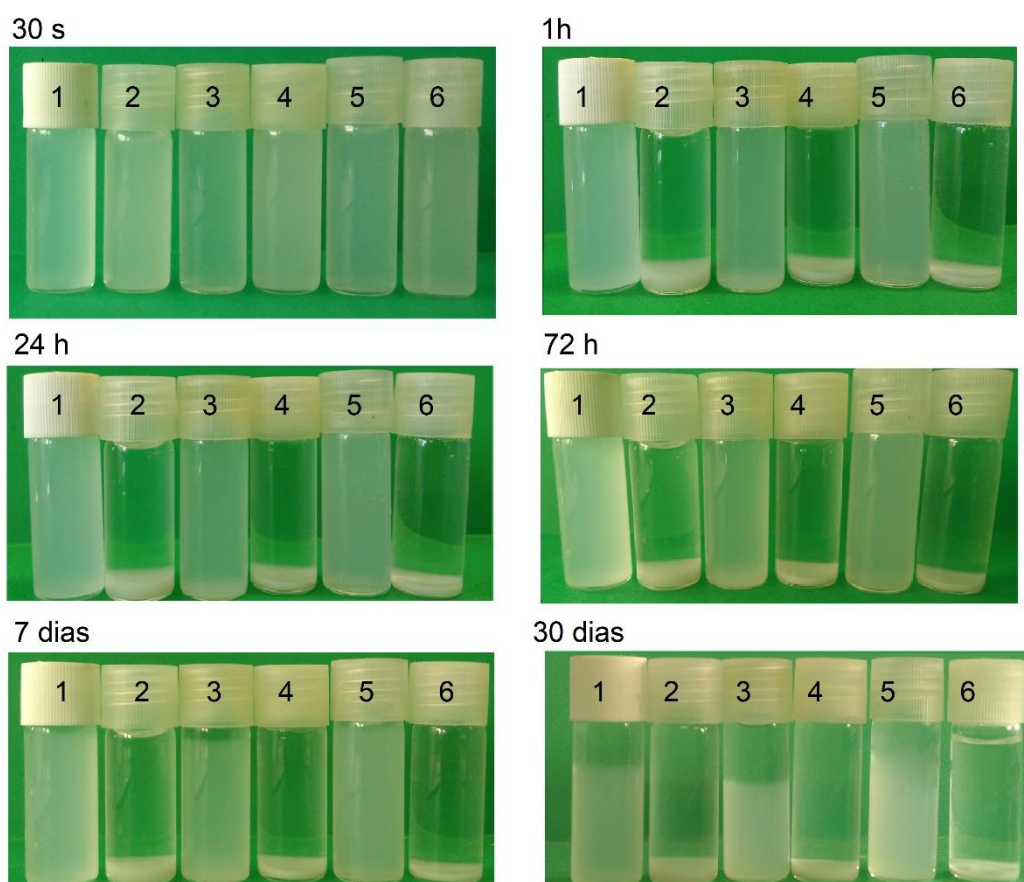


Figura 9 - Suspensões de nanocristais: Mandioca oxidados (1), mandioca (2), milho oxidados (3), milho (4), feijão oxidado (5), feijão (6).

A menor velocidade de sedimentação dos nanocristais oxidados está associada à diminuição da floculação devido a presença de cargas negativas dos grupos carboxilas presentes nas partículas (WEI et al., 2016). Zhou et al. (2016) modificaram nanocristais por ligações cruzadas utilizando ácido cítrico e verificaram que as suspensões contendo 1% de nanopartículas modificadas permaneceram estáveis, mesmo após 60 min em repouso; em contraste, as partículas de nanocristais intactos começaram a decantar após poucos minutos, o que indica que a modificação alterou a natureza superficial dos nanocristais e impediu a agregação dos mesmos. Outro estudo também relatou resultados semelhantes (LIU et al., 2017). Estes autores avaliaram a estabilidade coloidal de suspensões contendo 0,4 % de nanopartículas de amido oxidadas com NaClO e verificaram que as partículas modificadas com 4% e 5% de cloro ativo ainda mantinham um certo grau de

estabilidade e não se depositavam facilmente mesmo depois de 48 horas de repouso.

5.8. COLORAÇÃO DIFERENCIAL

O amido oxidado possui caráter aniônico, por isso, o corante azul de metileno, que é carregado positivamente, cora intensamente esse tipo de amostra. A intensidade da coloração do amido com a solução de azul de metileno é um indicador da extensão da modificação ocorrida (FRANCO et al., 2001a).

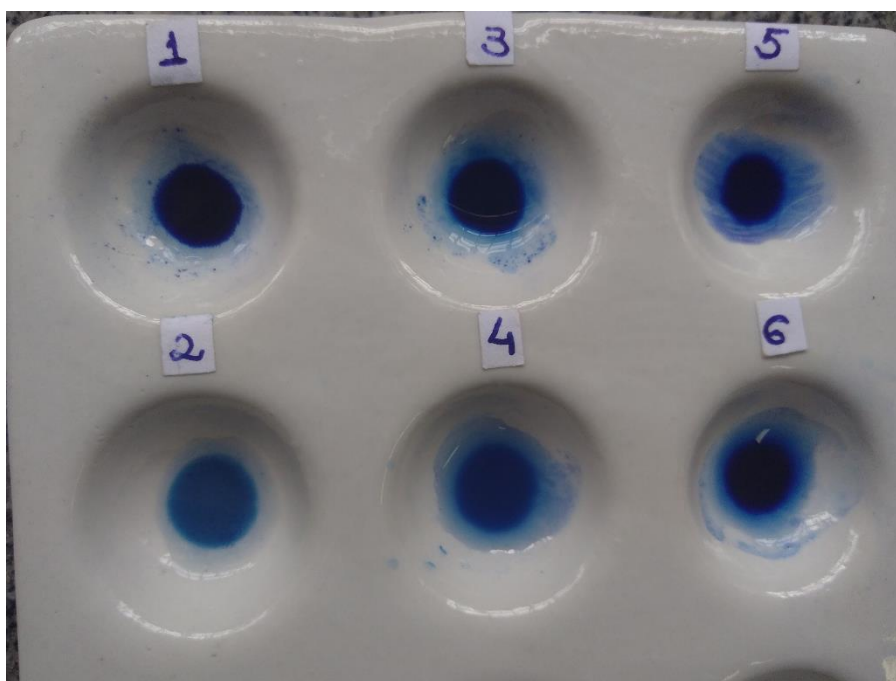


Figura 10 - Coloração diferencial dos nanocristais de feijão oxidados (1), feijão (2), milho oxidados (3), milho (4), mandioca oxidados (5), mandioca (6).

Na Figura 10 pode ser observado que os nanocristais oxidados absorveram intensamente o corante e por isso apresentaram coloração azul intensa, contudo, mesmo nas partículas não oxidadas a coloração azul apresentada era bastante forte, em especial para o amido de mandioca. Esse fato pode ser explicado pela formação de grupos ésteres de sulfato na superfície dos nanocristais durante a hidrólise com H_2SO_4 , os quais são grupos carregados negativamente que têm afinidade pelo corante azul de metileno (KIM; PARK; LIM, 2015).

Silva et al. (2008) utilizaram a coloração diferencial com azul de metileno para verificar a extensão das modificações com permanganato de potássio/ácido láctico e hipoclorito de sódio/ácido láctico de amidos de diferentes fontes botânicas. Relataram que, dentre os amidos nativos e modificados, apenas os amidos de batata apresentaram coloração azul intensa, o que se deve à presença de grupos fosfato na fécula de batata. Portanto, não foi possível diferenciar os amidos modificados daqueles nativos, pela coloração, o que possivelmente se deve ao fato de as modificações químicas terem sido muito discretas.

5.9. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial DSC é uma ferramenta termodinâmica que permite avaliar mudanças de energia de um material sujeito ao aquecimento ou resfriamento programado. Durante a análise de DSC a energia é introduzida simultaneamente em um cadinho contendo a amostra de interesse e uma célula de referência, comumente um cadinho de alumínio aberto ou fechado. As temperaturas de ambas as células são aumentadas de forma idêntica ao longo do tempo, assim a medida é baseada na diferença de fluxo de calor entre a amostra de interesse e a referência (GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010; XIE et al., 2010).

As propriedades térmicas dos amidos nativos de mandioca milho e feijão estão apresentadas na Tabela 6. O amido de mandioca apresentou temperatura inicial de gelatinização, temperatura de pico e temperatura final mais baixas, o que condiz com a análise de RVA, onde apresentou a menor temperatura de empastamento, seguido do amido de milho e do amido de feijão. A variação de entalpia foi de 14,3 J/g para a mandioca, 14,5 J/g para o milho e 15,4 J/g para o feijão. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al.(2018) ao analisarem amidos de mandioca e de milho e por Demiate et al. (2016) ao analisar o feijão carioca.

Tabela 6 - Resultados obtidos por meio da análise de DSC

Amido	T ₀ (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
Mandioca	58,5	64,7	73,8	15,2	14,3
Milho	60,0	67,9	74,1	14,1	14,5
Feijão	64,9	74,2	80,4	15,51	15,4

Para todos os nanocristais o endoterma de fusão desapareceu após a hidrólise ácida, uma hipótese para tal fato ter ocorrido é que os cristais remanescentes foram prontamente rompidos na dispersão de água para análise do DSC, de modo que nenhum endoterma de fusão pode ser visualizado. Resultados semelhantes foram encontrados por KIM et al. (2012) ao analisarem nanocristais provenientes de amidos de batata e feijão mungo. Em contrapartida outro estudo realizado por Bel Haaj et al. (2016) mostrou que os nanocristais obtidos a partir de amido de milho ceroso apresentaram um grande pico endotérmico de 65 a 80 °C, atribuído a gelatinização do amido e a fusão dos cristais. Em outro estudo LeCorre, Bras e Dufresne (2012) observaram dois picos endotérmicos para os nanocristais em excesso de água, um em torno de 90 - 95°C e outro em torno de 103–107 °C, o primeiro pico foi atribuído ao descompactamento das hélices, no primeiro estágio de fusão dos cristais e o segundo ao desenrolamento das hélices. Entretanto, não há consenso sobre a transição térmica dos nanocristais, o que pode ocorrer devido ao número limitado de publicações e a diferentes origens dos amidos utilizados na preparação das partículas.

5.10. MORFOLOGIA DOS AMIDOS E DOS NANOCRISTAIS

Os amidos nativos exibem grânulos de diversas formas: ovais, elípticas, esféricas e muitas vezes irregulares, dependendo especificamente da origem botânica (KIM et al., 2012). As micrografias dos amidos nativos estão apresentadas na Figura 11. Os grânulos de amido de mandioca exibiram uma forma redonda com

extremidades truncadas (COSTA et al., 2018; NWOKOCHA et al., 2009; SRIROTH et al., 1999), o milho apresentou grânulos de formatos irregulares e formas poliédricas conforme também encontrado por Costa et al.(2018) e Oliveira et al. (2018). O amido de feijão, por sua vez, mostra grânulos de forma oval a esférica (DEMIATE et al., 2016; GANI et al., 2012; GRANZA et al., 2015). A maior resistência do feijão a hidrólise pode estar relacionada ao tamanho do grânulo, o maior dentre as três fontes botânicas estudadas, além disso os poros presentes no amido de milho tendem a favorecer a hidrólise nessa planta, porém, esse fator não foi significativo, levando-se em conta que a mandioca apresentou a maior susceptibilidade.

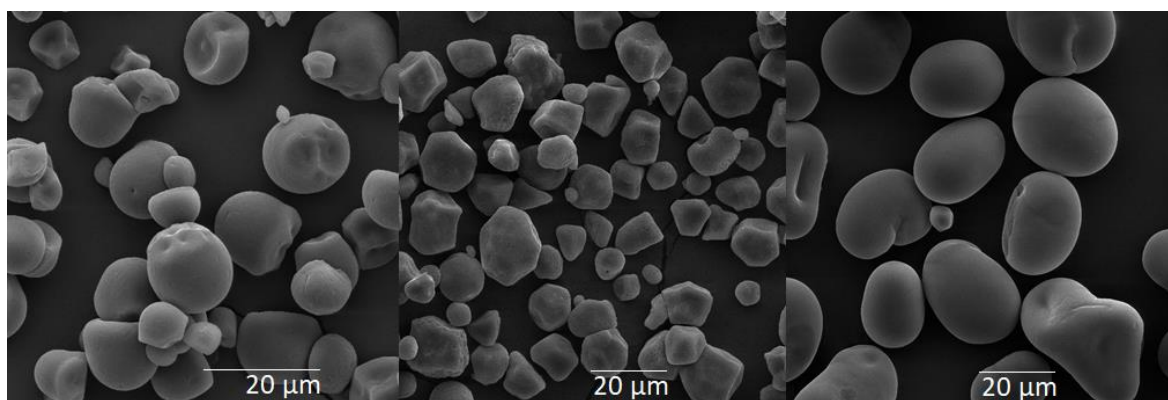


Figura 11 - Micrografias dos amidos de mandioca (a), milho (b) e feijão (c). Aumento de 2 mil vezes.

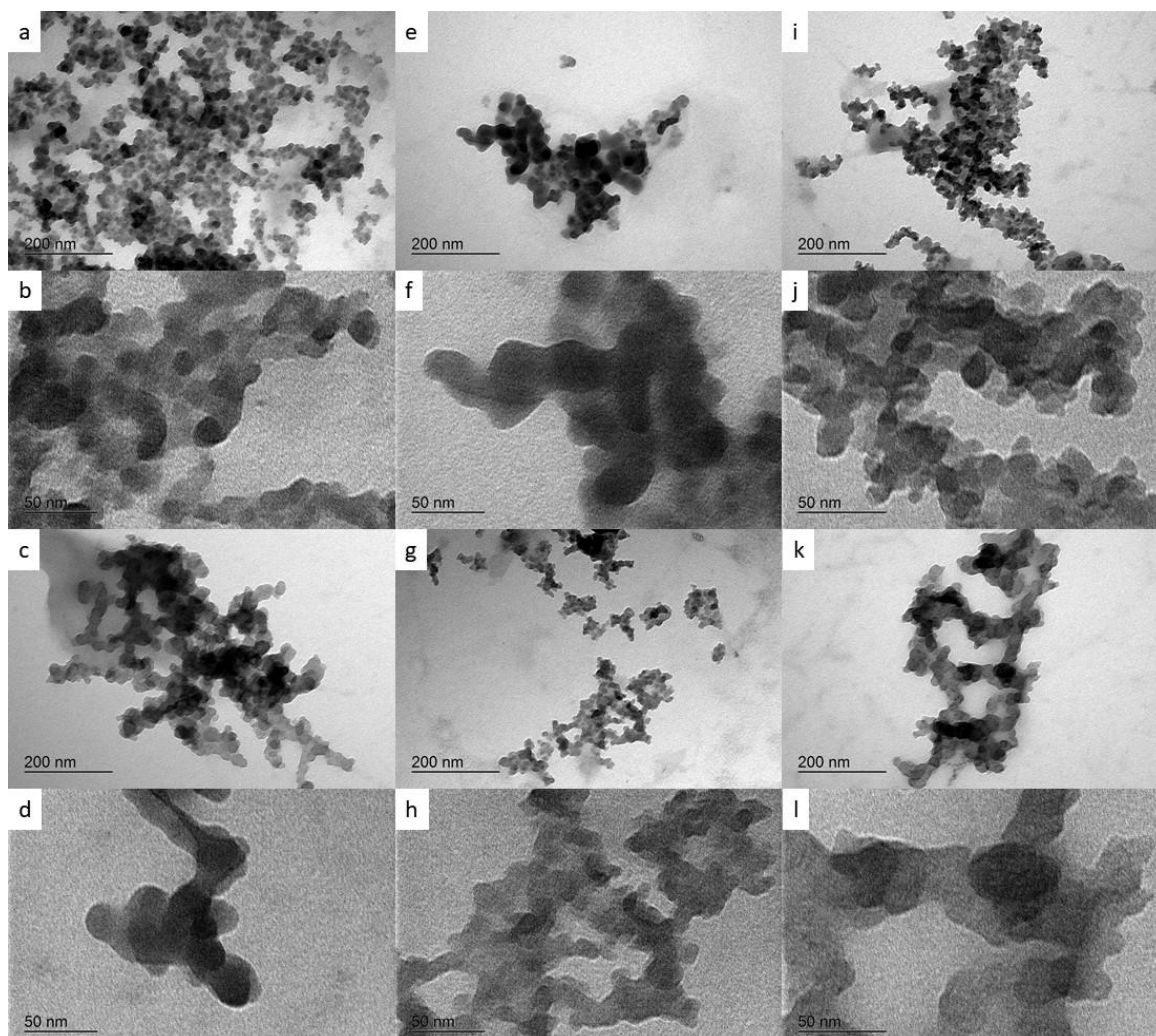


Figura 12 - Micrografias MET de nanocristais de mandioca (a, b), mandioca oxidado (c, d), milho (e, f), milho oxidado (g, h), feijão (i, j), feijão oxidado (k, l).

As observações em MET estão apresentadas na Figura 12. Nanocristais gerados por hidrólise ácida exibiram formas redondas ou ovais, independentemente da origem do amido ou da oxidação. Além disso, encontravam-se em forma de aglomerados análogos a cachos de uva, semelhantes aos reportados por Kim et al. (2012), Mohammad, Amini e Ravazi (2016) e Oliveira et al. (2018). Em contraste, Molina-Boisseau, Belgagem e Dufresne (2005) e Thielemans, Belgagem, Dufresne (2006) obtiveram partículas em formato descrito como de paralelepípedos a partir do amido de milho ceroso. Alguns pesquisadores também relataram morfologia de plaquetas de bordas arredondadas, polígonos ou de forma irregular (KIM; PARK; LIM, 2015; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011a).

As partículas observadas nas imagens MET podem ser correspondentes aos *blocklets* de amilopectina, ou seja, blocos de construção das lamelas cristalinas, pois os mesmos apresentam diâmetros que variam entre 20 e 500 nm, tamanho compatível com os nanocristais (KIM et al., 2012; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011c).

5.11. CAPACIDADE EMULSIONANTE

Para verificar a capacidade emulsionante dos nanocristais primeiramente foram analisadas emulsões com fases oleosa e aquosa na proporção de 1:1 (v:v), para tanto variou-se a concentração de nanocristais entre 1%, 3% e 5%. Após 24 h, pode-se observar que quanto maior a concentração de nanocristais utilizado (5%) maior o índice de emulsão. Isso pode explicado pelo aumento na formação de redes inter-gotículas nas emulsões à medida que o teor de nanocristais aumenta. Esses resultados estão de acordo com Saari et al. (2016) que observaram que quanto maior a concentração de amido maior a estabilidade da emulsão. Sendo assim para o estudo da influência da proporção entre fase aquosa e oleosa na formação das emulsões a concentração de nanocristais foi fixada em 5%.

A estabilidade ao armazenamento da emulsão Pickering preparada foi verificada após 1, 7, 14 e 21 dias. O índice de emulsão reduz de acordo com o tempo de armazenamento, essa diminuição é mais clara no sétimo dia. Isso indica que o processo de formação de creme está em andamento devido ao efeito de empuxo e das diferentes densidades do óleo e da água. No entanto, após 14 e 21 dias não há diferença significativa no índice de emulsão, quando comparados aos resultados obtidos após sete dias, sugerindo uma estabilidade da emulsão após uma semana.

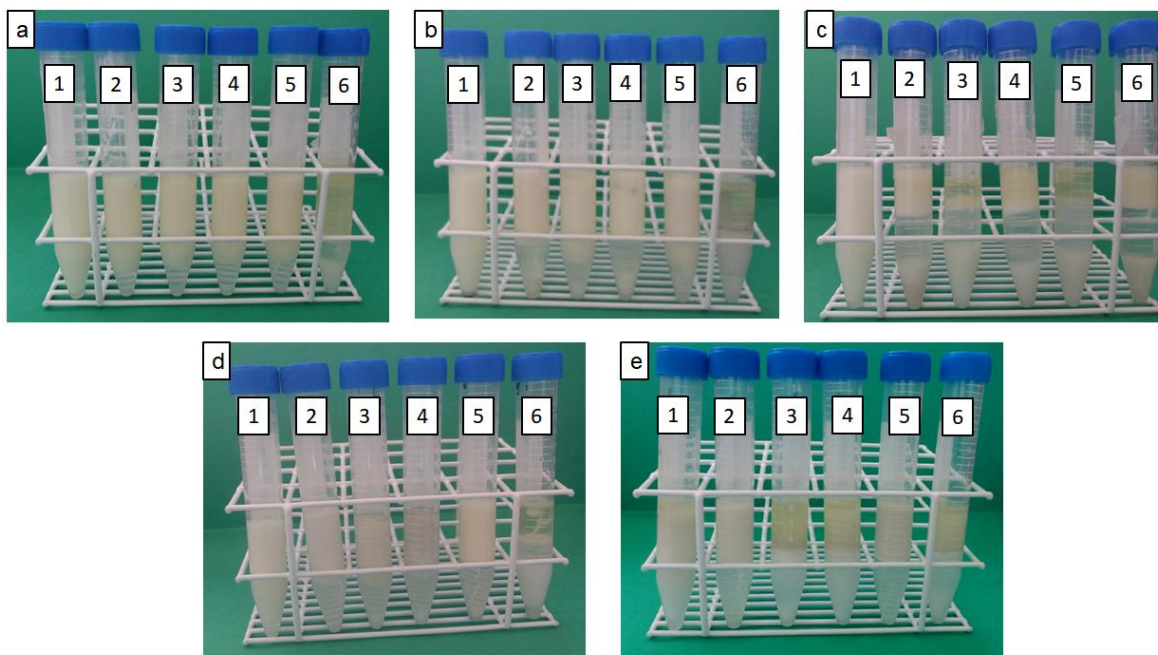


Figura 13 - Emulsões formadas após 7 dias de armazenamento, (a), água: óleo (1:1), 5% de nanocristais, (b), água: óleo (1:1), 3% de nanocristais, (c), água: óleo (1:1), 1% de nanocristais, (d), água: óleo (1:3), 5% de nanocristais, (e), água: óleo (3:1), 5 % de nanocristais. Nanocristais adicionados, (1), mandioca oxidado, (2) mandioca, (3) milho oxidado, (4) milho, (5) feijão oxidado, (6), feijão.

Em geral a oxidação dos nanocristais melhorou o índice de emulsão das amostras, independente da fonte botânica de origem. O que pode ter ocorrido pela maior repulsão entre as partículas, resultando em aglomerados de tamanho menor. Saari et al. (2016) estudaram a formação de emulsões Pickering, utilizando amidos de cevada cerosa, milho ceroso, quinoa e batata, tratados ou não pela hidrólise ácida e verificaram que o índice de emulsão aumentou com a diminuição do tamanho de partícula, obtido pelo tratamento ácido, além disso grânulos mais arredondados como os do amido de cevada foram mais favoráveis para estabilização do sistema devido sua capacidade de se posicionar na interface, estabilizando pequenas gotas de emulsão.

O nanocristal de mandioca oxidado se mostrou mais eficiente na estabilidade das emulsões, quando comparado as demais fontes botânicas, pois quando foram utilizados na concentração de 5 %, independentemente da quantidade de óleo e água utilizados as emulsões praticamente não apresentaram separação de fases durante o armazenamento. Já as demais amostras apresentaram características diferentes dependendo da proporção de água e óleo das emulsões. O nanocristal

de mandioca apresentou maior índice de emulsão quando a quantidade de óleo era maior que a de água. O de milho e milho oxidado mostraram maior estabilidade quando as concentrações das fases eram iguais, o mesmo ocorreu para o amido de feijão oxidado, porém o feijão sem oxidação se mostrou melhor com uma maior proporção de água e não formou emulsão quando havia uma maior quantidade de óleo.

Yang et al. (2018) estudaram a formação de emulsões Pickering utilizando nanocristais de amido de milho ceroso, os autores verificaram que valores de fase interna de óleo de 0,75 a 0,85 formavam emulsões mais estáveis e semelhantes a gel. Em outro estudo Ahmad e Lazim (2018) utilizando nanocristais de amido de sagu-de-jardim não obtiveram emulsões quando a concentração de óleo foi maior que 50%, essas diferenças podem ocorrer devido a diversos fatores como a condição de homogeneização, o uso de diferentes óleos e também a matéria prima da qual as partículas são obtidas.

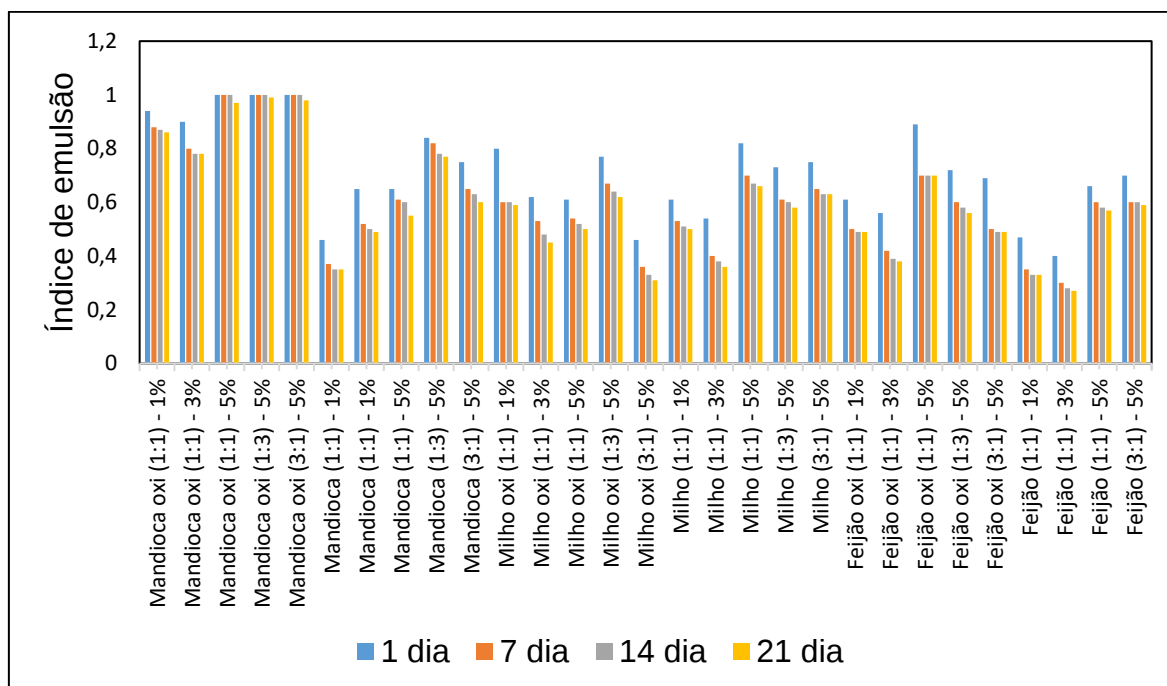


Figura 14 - Índice de emulsão durante o armazenamento. Nanocristal adicionado (água: óleo) - % nanocristal.

5.12. MICROSCOPIA ÓPTICA DAS GOTÍCULAS DA EMULSÃO

As gotas da emulsão estão apresentadas nas Figuras 15, 16 e 17. O aumento na quantidade de nanocristais resultou em uma diminuição no diâmetro médio das gotículas, isso provavelmente ocorre pois quanto maior a concentração de nanocristais, mais partículas estão disponíveis para estabilizar as gotas de óleo menores, esse resultado concorda com o encontrado por LI, SUN e YANG (2012) e SAARI et al. (2016).

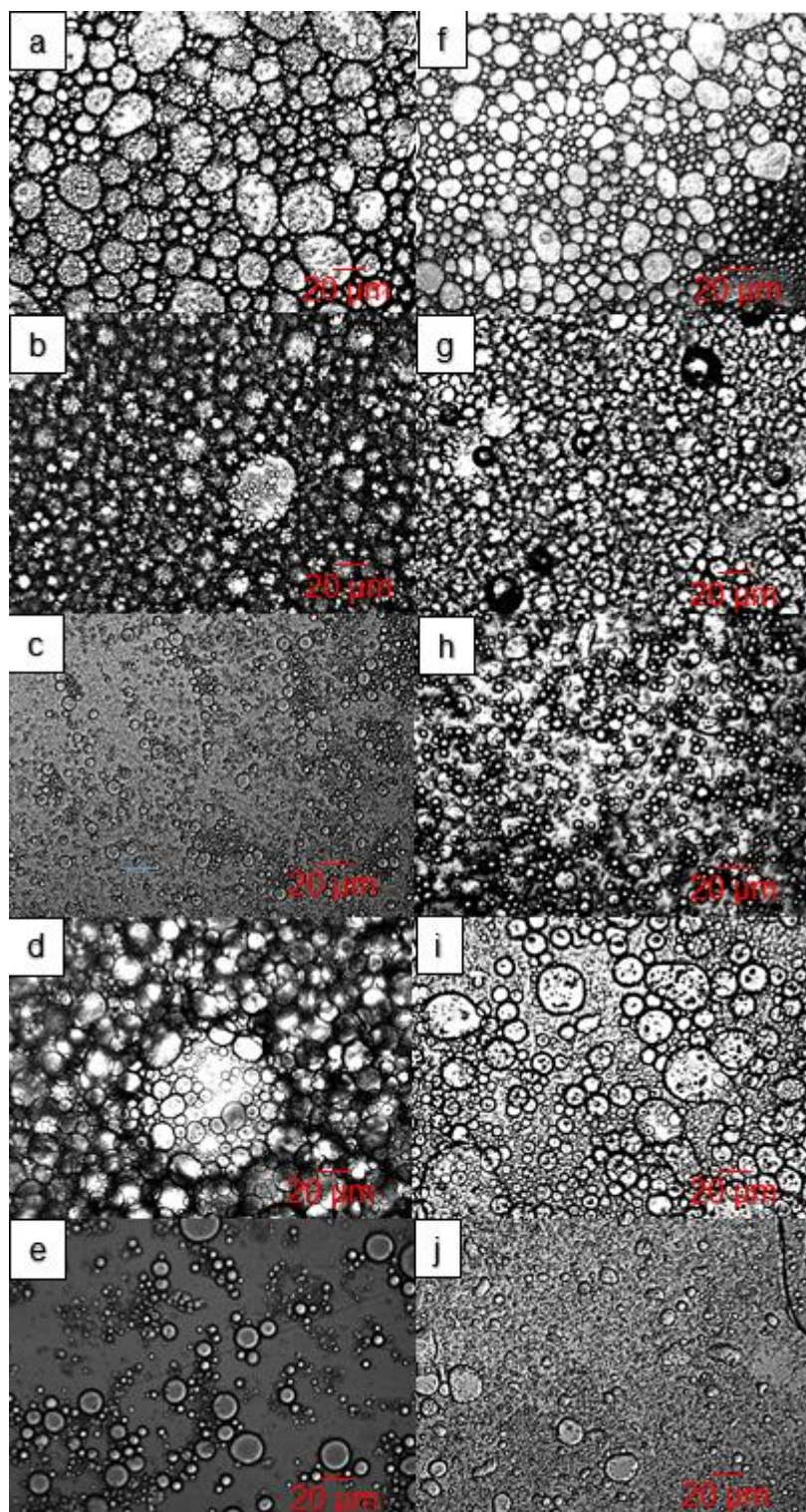


Figura 15 - Imagens de microscopia óptica de emulsões estabilizadas por nanocristais de mandioca (a - e) e nanocristais de mandioca oxidado (f - j); (a, f), água - óleo (1:1), 1%; (b,g), água - óleo (1:1), 3%; (c,h) água - óleo (1:1), 5%; (d, i), água - óleo (1:3), 5%; (e,j), água - óleo (3:1), 5%.

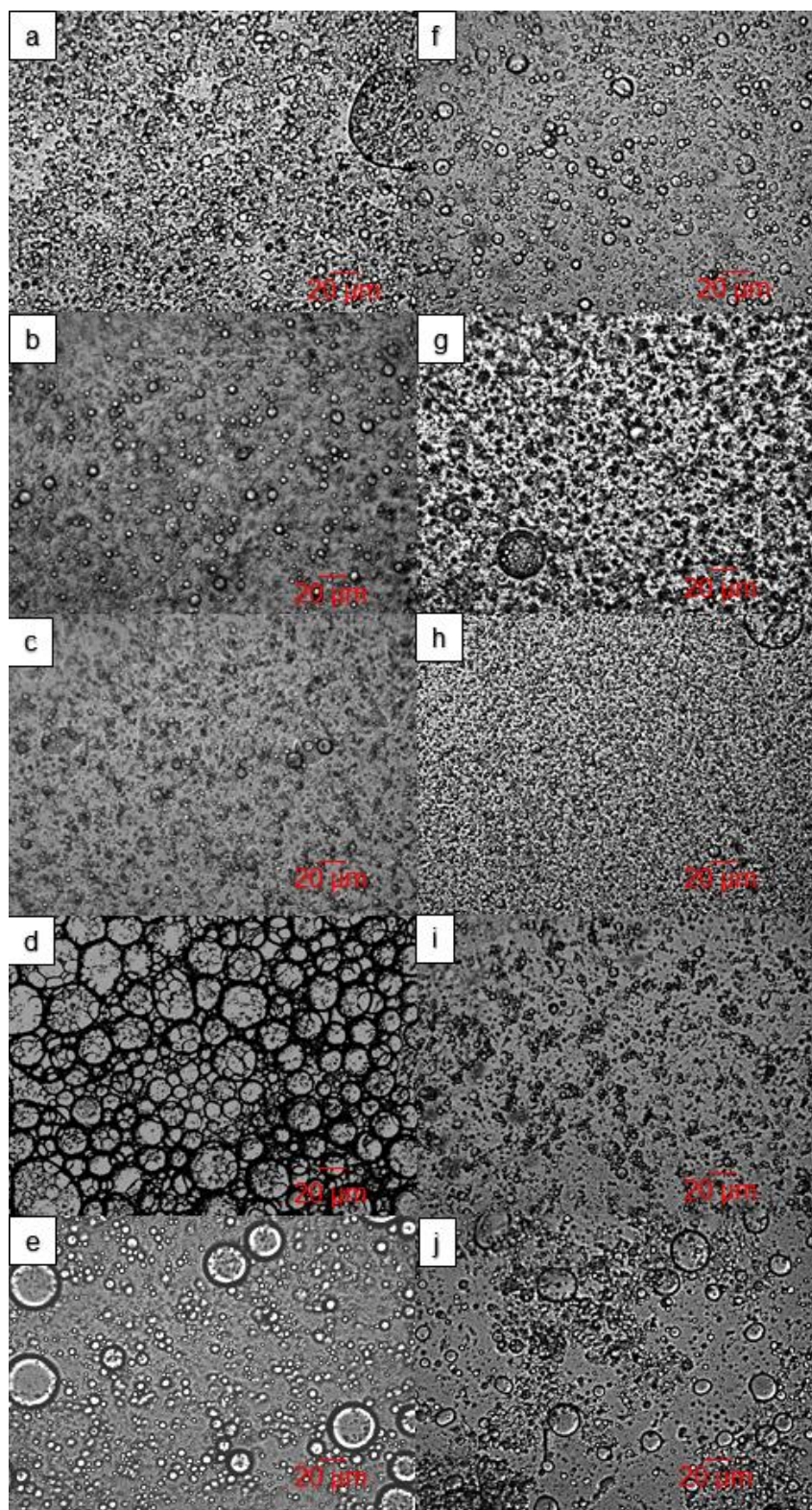


Figura 16 - Imagens de microscopia óptica de emulsões estabilizadas por nanocristais de milho (a - e) e nanocristais de milho oxidado (f - j); (a, f), água - óleo (1:1), 1%; (b, g), água - óleo (1:1), 3%; (c, h) água - óleo (1:1), 5%; (d,i), água - óleo (1:3), 5%; (e, f), água - óleo (3:1), 5%.

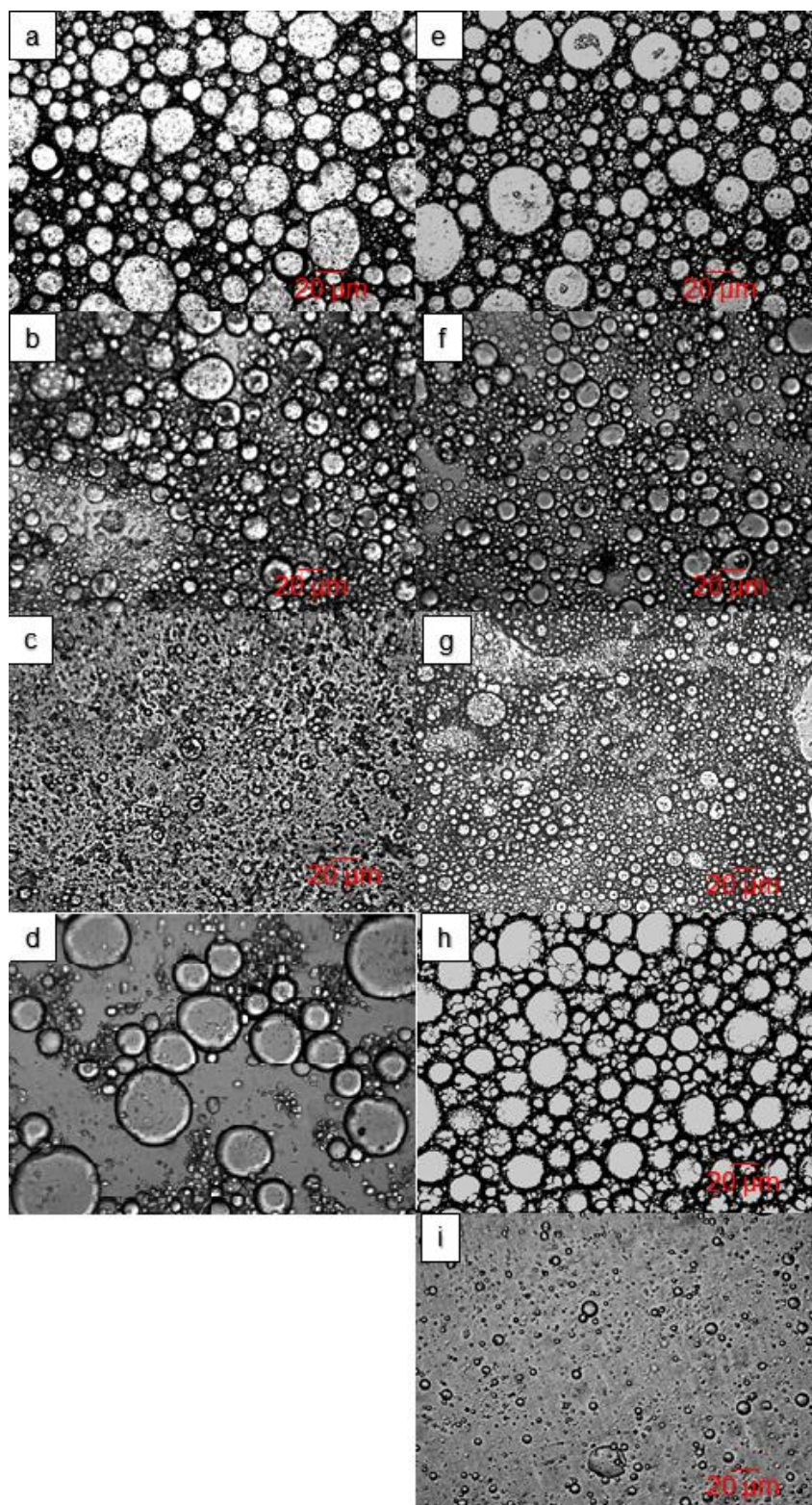


Figura 17 - Imagens de microscopia óptica de emulsões estabilizadas por nanocristais de feijão (a - d) e nanocristais de feijão oxidado (e - i); (a, i), água - óleo (1:1), 1%; (b, f), água - óleo (1:1), 3%; (c, g) água - óleo (1:1), 5%; (h), água - óleo (1:3), 5%; (d, i), água - óleo (3:1), 5%.

O tamanho médio das partículas foi determinado utilizando o diâmetro médio de Sauter (d_{32}), que é definido como o diâmetro da esfera que possui a mesma relação volume/ área superficial que a partícula de interesse e também pelo diâmetro médio “De Brouckere” (d_{43}), o qual reflete o tamanho das partículas que constituem a maior parte do volume da amostra, sendo mais sensível à presença de partículas grandes na distribuição de tamanhos. Os resultados encontrados para os diâmetros das gotas e também para o índice de polidispersão (PDI) são apresentados na Tabela 7.

O aumento na proporção da fase oleosa aumentou o d_{32} e o d_{43} para as amostras. Song et al. (2015) encontraram tendência semelhante ao prepararem emulsões estabilizadas por partículas de amido de arroz hidrofóbico, os autores verificaram um aumento no tamanho das gotas quando a fração de óleo aumentou de 16 para 67%. Em outro estudo, Ye et al. (2017) verificaram que o d_{43} das gotas da emulsão Pickering preparada com triacilglicerol de cadeia média (MCT) em água utilizando nanopartículas à base de amido modificado (nanopartículas de amido solúvel tratadas com octenilsuccinilação e nanopartículas de amido insolúvel, obtidas após a hidrólise ácida com ácido sulfúrico) aumentaram com o aumento da fração de MCT.

Tabela 7 – Distribuição do tamanho das gotas e índice de polidispersão (PDI) das emulsões.

Concentração de nanocristais (%)/ Proporção água: óleo	Diâmetro médio da superfície, d_{32} (μm)	Diâmetro médio volumétrico, d_{43} (μm)	PDI
Mandioca oxi 1% / 1:1	48,7	55,6	3,0
Mandioca oxi 3% / 1:1	37,4	38,7	1,9
Mandioca oxi 5% / 1:1	13,2	14,0	1,6
Mandioca oxi 5% / 1:3	32,3	33,9	1,8
Mandioca oxi 5% / 3:1	26,6	30,4	2,4
Mandioca 1% / 1:1	59,8	65,1	3,2
Mandioca 3% / 1:1	37,9	39,7	1,9
Mandioca 5% / 1:1	14,0	15,1	1,7
Mandioca 5% / 1:3	56,7	59,7	1,9
Mandioca 5% / 3:1	28,3	30,1	2,0
Milho oxi 1% / 1:1	34,7	39,5	2,5
Milho oxi 3% / 1:1	23,4	26,8	2,5
Milho oxi 5% / 1:1	15,2	16,6	2,3
Milho oxi 5% / 1:3	44,3	45,4	2,9
Milho oxi 5% / 3:1	26,3	30,1	2,4
Milho 1% / 1:1	77,0	79,7	2,4
Milho 3% / 1:1	27,3	30,2	2,5
Milho 5% / 1:1	25,4	29,4	2,7
Milho 5% / 1:3	51,3	54,7	3,2
Milho 5% / 3:1	29,2	33,0	2,3
Feijão oxi 1% / 1:1	39,6	44,0	1,9
Feijão oxi 3% / 1:1	32,9	36,9	1,8
Feijão oxi 5% / 1:1	18,6	20,0	2,0
Feijão oxi 5% / 1:3	79,2	77,1	3,5
Feijão oxi 5% / 3:1	19,4	21,1	2,0
Feijão 1% / 1:1	44,0	49,8	2,6
Feijão 3% / 1:1	24,9	26,3	1,9
Feijão 5% / 1:1	17,8	18,5	1,7
Feijão 5% / 3:1	45,0	45,5	2,3

A oxidação dos nanocristais, em geral, resultou em um menor diâmetro de partícula. Saari et al. (2016) verificaram que amidos com tamanho de partículas menores resultaram em gotas menores de emulsão. De acordo com as Figuras 15, 16 e 17, os tamanhos das gotas variaram para uma mesma emulsão, em geral apresentavam-se gotas maiores circundadas por gotículas menores. O índice de polidispersão (PDI) indica a uniformidade na distribuição do tamanho de partículas, quanto maior esse índice, mais heterogêneo é o sistema. O valor de PDI variou de 1,6, encontrado para a emulsão com proporções de água e óleo 1:1, estabilizada

com 5% nanocristal de mandioca oxidado, até 3,5 encontrado para emulsão com proporção de água e óleo 1:3 estabilizada com 1% de nanocristal de feijão oxidado.

6. CONCLUSÃO

O amido de feijão foi o que apresentou a maior resistência à hidrólise ácida e, conseqüentemente, o maior rendimento entre as fontes botânicas estudadas; isso pode estar relacionado a maior quantidade de amilose presente nessa fonte botânica, além do padrão cristalino, tipo C. Em contraste, o amido de mandioca apresentou a maior susceptibilidade à hidrólise.

Após a oxidação dos nanocristais ocorreu uma melhora na estabilidade coloidal das suspensões e o aumento do potencial zeta das amostras. Além disso, a medida dos aglomerados, pela técnica de DLS, e o índice de polidispersão diminuíram, mostrando que o tratamento aumentou as cargas negativas presentes na superfície dos nanocristais diminuindo a formação de aglomerados. Isso pode ser observado pela estabilidade das suspensões de nanocristais e água que foi maior para as partículas oxidadas quando comparadas as sem oxidação. Para todas as amostras, a hidrólise aumentou a cristalinidade relativa e o teor de amilose diminuiu consideravelmente, o que se relaciona com a degradação da área amorfa e preservação da área cristalina durante o tratamento ácido.

Os nanocristais mostraram-se potenciais estabilizadores de emulsões Pickering, pois mantiveram a estabilidade do sistema após armazenamento por 21 dias. As emulsões com fração de óleo maior apresentaram tamanho de partícula maior, porém maior índice de emulsão quando comparadas as com maior proporção de água. Em geral, foi possível observar uma melhor estabilidade das emulsões quando as partículas oxidadas foram utilizadas, além disso o tamanho das gotas também foi menor. O amido de mandioca oxidado se mostrou o mais promissor, especialmente com a adição de 5% de nanocristais, pois para todas as proporções de água e óleo as emulsões apresentaram pouca ou nenhuma separação de fases durante o armazenamento.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. A. A.; LAZIM, A. M. Evaluation of emulsion emulsified by starch nanocrystal: A preliminary study. **AIP Conference Proceedings**, v. 1940, 2018.
- ALILA, S.; ALOULOU, F.; THIELEMANS, W.; BOUFI, S. Sorption potential of modified nanocrystals for the removal of aromatic organic pollutant from aqueous solution. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 350–357, 2011.
- AMBIGAIPALAN, P.; HOOVER, R.; DONNER, E.; LIU, Q.; JAISWAL, S.; CHIBBAR, R.; NANTANGA, K. K. M.; SEETHARAMAN, K. Structure of faba bean, black bean and pinto bean starches at different levels of granule organization and their physicochemical properties. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2962–2974, 2011.
- ANGELLIER-COUSSY, H.; PUTAUX, J. L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; DUFRESNE, A.; BERTOFT, E.; PEREZ, S. The molecular structure of waxy maize starch nanocrystals. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 12, p. 1558–1566, 2009.
- ANGELLIER, H.; CHOISNARD, L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; OZIL, P.; DUFRESNE, A. Optimization of the preparation of aqueous suspensions of waxy maize starch nanocrystals using a response surface methodology. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 4, p. 1545–1551, 2004.
- ANGELLIER, H.; PUTAUX, J. L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; DUPEYRE, D.; DUFRESNE, A. Starch nanocrystal fillers in an acrylic polymer matrix. **Macromolecular Symposia**, v. 221, p. 95–104, 2005.
- APARECIDA, C.; GERALDI, Q. Análise econômico-financeira de um novo processo de produção de derivados de milho. **Engvista**, v. 14, n. 2, p. 185–195, 2012.
- ASHOGBON, A. O.; AKINTAYO, E. T. Recent trend in the physical and chemical modification of starches from different botanical sources: A review. **Starch/Stärke**, v. 66, n. 1–2, p. 41–57, 2014.
- BATISTA, K. A.; PRUDÊNCIO, S. H.; FERNANDES, K. F. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans (*phaseolus vulgaris*, L.). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 286–290, 2010.
- BEDIN, A. C. **Caracterização de misturas de amidos de feijão e tuberosas (mandioca e batata-doce) e sua aplicação na obtenção de biofilmes**. 2014. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- BEL HAAJ, S.; THIELEMANS, W.; MAGNIN, A.; BOUFI, S. Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: A comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 310–317, 2016.
- BENINCA, C.; DEMIATE, I. M.; LACERDA, L. G.; CARVALHO FILHO, M. A. S.; IONASHIRO, M.; SCHNITZLER, E. Thermal behavior of corn starch granules modified by acid treatment at 30 and 50°C. **Ecletica Química**, v. 33, n. 3, p. 13–17, 2008.

BET, C. D.; DO PRADO CORDOBA, L.; RIBEIRO, L. S.; SCHNITZLER, E. Common Vetch (*Vicia sativa*) as a New Starch Source: Its Thermal, Rheological and Structural Properties After Acid Hydrolysis. **Food Biophysics**, v. 11, n. 3, p. 275–282, 2016.

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

BILIADERIS, C. G.; GRANT, D. R.; VOSE, J. R. Structural characterization of legume starches. I. Studies on amylose, amylopectin, and beta-limit dextrins. **Cereal Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 496–502, 1981.

CAI, J.; CAI, C.; MAN, J.; ZHOU, W.; WEI, C. Structural and functional properties of C-type starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 289–300, 2014.

CAMPANHA, R. B.; FRANCO, C. M. L. Gelatinization properties of native starches and their Nægeli dextrins. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 3, p. 799–804, 2011.

CARVALHO, L. M.; OLIVEIRA, H. W. L.; RANGEL, I. R.; SEDREZ, M. A.; SANTOS, V. S. Productivity and drought tolerance of cassava cultivars in the Coastal Tablelands of Northeastern Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 796–801, 2016.

CEPEA (PIRACICABA). . **Expansão industrial e maior oferta de raiz sustentam produção recorde de fécula em 2015: Quantidade de fécula produzida cresceu 17% e superou 750 mil toneladas em 2015.** Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/pdf/Producao_mandioca_2015_2016.pdf>. Acesso em: 24 maio. 2016.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas.** São Paulo: Fundação Cargill, 2003.

CHÁVEZ-MURILLO, C. E.; WANG, Y. J.; BELLO-PÉREZ, L. A. Morphological, physicochemical and structural characteristics of oxidized barley and corn starches. **Starch/Stärke**, v. 60, n. 11, p. 634–645, 2008.

CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: An X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 4, p. 277–284, 1998.

CHUNG, H.-J.; LIU, Q.; DONNER, E.; HOOVER, R.; WARKENTIN, T. D.; VANDENBERG, B. Composition, molecular structure, properties, and in vitro digestibility of starches from newly released Canadian pulse cultivars. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 471–479, 2008.

COHEN, K. DE O.; OLIVEIRA, S. S.; CHISTÉ, R. C. Quantificação de teores de compostos cianogênicos totais em produtos elaborados com raízes de mandioca. **Embrapa Amazônia Oriental**, p. 23, 2008.

CONDÉS, M. C.; AÑÓN, M. C.; MAURI, A. N.; DUFRESNE, A. Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 146–157, 2015.

CORNELL, H. The functionality of wheat starch, Reino Unido: A. Eliasson, **Woodhead Publishing**, v. 7, p. 211-240, 2004.

COSTA, M. S.; VOLANTI, D. P.; GROSSMANN, M. V. E.; FRANCO, C. M. L. Structural, thermal, and morphological characteristics of cassava amyloextrins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 7, p. 2751–2760, 2018.

DE ARAÚJO DELFINO, R.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade proteica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L .) cultivar Pérola. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, v. 30 (2), n. 2, p. 308–312, 2010.

DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P.; MESTRES, C. Características viscoamilográficas de amidos de mandioca quimicamente modificados. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 11, n. 1, p. 7–17, 2005.

DEMIATE, I. M.; FIGUEROA, A. M.; ZORTÉA GUIDOLIN, M. E. B.; RODRIGUES DOS SANTOS, T. P.; YANGCHENG, H.; CHANG, F.; JANE, J. LIN. Physicochemical characterization of starches from dry beans cultivated in Brazil. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 812–820, 2016.

DEMIATE, I. M.; KOTOVICZ, V. Cassava starch in the Brazilian food industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 388–397, 2011.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. DA. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009.

DICKINSON, E. Food Hydrocolloids Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers q. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1473–1482, 2009.

DU, S.; JIANG, H.; AI, Y.; JANE, J. Physicochemical properties and digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 200–205, 8 ago. 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

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

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

FAO. **Organização das nações unidas para a Alimentação e a Agricultura**. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/pt/>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

FAOTAST. **Food and agricultural commodities production: Country rank in the world, by commodity**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

FERNANDES, R. C.; GUERRA, J. G. M.; ARAÚJO, A. P. Desempenho de cultivares de feijoeiro-comum em sistema orgânico de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 9, p. 797–806, 2015.

FIGUEROA, A. M.; LACERDA, L. G.; SCHNITZLER, E.; DEMIATE, I. M. Caracterização Das Propriedades De Pasta E Térmicas De Amidos De Feijão Branco, Carioca, Fradinho E Preto. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v. 4, n. 3, p. 12, 2015.

FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 195, n. 1, p. 93–96, 1991.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. ; VILPOUX, O. F. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001.

GANI, A.; BASHIR, M.; WANI, S. M.; MASOODI, F. A. Modification of bean starch by γ -irradiation: Effect on functional and morphological properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 162–169, 2012.

GARRIDO, L. H.; SCHNITZLER, E.; ZORTÉA, M. E. B.; DE SOUZA ROCHA, T.; DEMIATE, I. M. Physicochemical properties of cassava starch oxidized by sodium hypochlorite. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2640–2647, 2012.

GÉRARD, C.; COLONNA, P.; BULÉON, A.; PLANCHOT, V. Order in maize mutant starches revealed by mild acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 2, p. 131–141, 2002.

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, n. 4, p. 167–193, 2010.

GONZÁLEZ, A.; ALVAREZ IGARZABAL, C. I. Nanocrystal-reinforced soy protein films and their application as active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 777–784, 2015.

GRANZA, A. G.; TRAVALINI, A. P.; FARIAS, F. O.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E.; DEMIATE, I. M. Effects of acetylation and acetylation-hydroxypropylation (dual-modification) on the properties of starch from Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 119, n. 1, p. 769–777, 2015.

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

HOOVER, R.; HUGHES, T.; CHUNG, H. J.; LIU, Q. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 399–413, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de tabelas estatísticas**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

JANE, J.; SHEN, L.; WANG, L.; MANINGAT, C. C. Preparation and Properties of Small-Particle Corn Starch. **Cereal Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 280–283, 1992.

JAYAKODY, L.; HOOVER, R. The effect of lintnerization on cereal starch granules. **Food Research International**, v. 35, n. 7, p. 665–680, 2002.

JIVAN, M. J.; MADADLOU, A.; YARMAND, M. An attempt to cast light into starch nanocrystals preparation and cross-linking. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1661–1666, 2013.

KIM, H.; PARK, S. S.; LIM, S. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Preparation , characterization and utilization of starch nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 607–620, 2015.

KIM, H. S.; KIM, B. Y.; BAIK, M. Y. Application of ultra high pressure (UHP) in starch chemistry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 2, p. 123–141, 2012.

KIM, H. Y.; LEE, J. H.; KIM, J. Y.; LIM, W. J.; LIM, S. T. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. **Starch/Stärke**, v. 64, n. 5, p. 367–373, 2012.

KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J.; SEETHARAMAN, K. Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3912–3918, 2002.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 146–158, 2007.

KRÓLIKOWSKA, K.; FORTUNA, T.; PIETRZYK, S.; GRYSZKIN, A. Effect of modification of octenyl succinate starch with mineral elements on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 118–127, 2017.

LE CORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: A review. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1139–1153, 2010.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of botanic origin and amylose content on the morphology of starch nanocrystals. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 12, p. 7193–7208, 2011a.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Evidence of micro- and nanoscaled particles during starch nanocrystals preparation and their isolation. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 8, p. 3039–3046, 2011b.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Ceramic membrane filtration for isolating starch nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1565–1572, 2011c.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of native starch's properties on starch nanocrystals thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 658–666, 2012.

LEONEL, M. Analysis of the shape and size of starch grains from different botanical

species. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 579–588, 2007.

LI, C.; LI, Y.; SUN, P.; YANG, C. Starch nanocrystals as particle stabilisers of oil-in-water emulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 9, p. 1802–1807, 2014.

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

LI, X.; QIU, C.; JI, N.; SUN, C.; XIONG, L.; SUN, Q. Mechanical, barrier and morphological properties of starch nanocrystals-reinforced pea starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 155–162, 2015.

LIN, N.; BRUZZESE, C.; DUFRESNE, A. TEMPO-oxidized nanocellulose participating as crosslinking aid for alginate-based sponges. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 4, n. 9, p. 4948–4959, 2012.

LIU, Q.; LI, F.; LU, H.; LI, M.; LIU, J.; ZHANG, S.; SUN, Q.; XIONG, L. Enhanced dispersion stability and heavy metal ion adsorption capability of oxidized starch nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 242, n. September 2017, p. 256–263, 2017.

LOBO, A. R.; DE LEMOS-SILVA, G. Resistant starch and its physicochemical properties. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 219–226, 2003.

MANO, J. F.; KONIAROVA, D.; REIS, R. L. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 2, p. 127–135, 2003.

MARTO, J.; GOUVEIA, L. F.; GONÇALVES, L.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; ISAAC, V.; PINTO, P.; OLIVEIRA, E.; ALMEIDA, A. J.; RIBEIRO, H. M. Design of novel starch-based Pickering emulsions as platforms for skin photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 56–64, 2016.

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

MOLINA-BOISSEAU, S.; BELGACEM, M. N.; DUFRESNE, A. Surface Chemical Modification of Waxy Maize Starch. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, n. 22, p. 2425–2433, 2005.

MOORE, S. A.; AI, Y.; CHANG, F.; JANE, J. L. Effects of alpha-amylase reaction mechanisms on analysis of resistant-starch contents. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 465–471, 2015.

MUKURUMBIRA, A.; MARIANO, M.; DUFRESNE, A.; MELLEM, J. J.; AMONSOU, E. O. International Journal of Biological Macromolecules Microstructure , thermal properties and crystallinity of amadumbe starch nanocrystals. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 241–247, 2017.

NALLAMILLI, T.; BINKS, B. P.; MANI, E.; BASAVARAJ, M. G. Stabilization of Pickering Emulsions with Oppositely Charged Latex Particles: Influence of Various Parameters and Particle Arrangement around Droplets. **Langmuir: the ACS**

journal of surfaces and colloids, v. 31, p. 2–10, 2015.

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

NONOMURA, Y.; KOBAYASHI, N. Journal of Colloid and Interface Science Phase inversion of the Pickering emulsions stabilized by plate-shaped clay particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 330, n. 2, p. 463–466, 2009.

NWOKOCHA, L. M.; AVIARA, N. A.; SENAN, C.; WILLIAMS, P. A. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 362–367, 2009.

OLIVEIRA, A. V.; SILVA, A. P. M.; BARROS, M. O.; FILHO, M. DE SÁ M. S.; ROSA, M. F.; AZEREDO, H. M. C. Nanocomposite Films from Mango Kernel or Corn Starch with Starch Nanocrystals. **Starch/Stärke**, p. 1–7, 2018.

OVANDO-MARTÍNEZ, M.; BELLO-PÉREZ, L. A.; WHITNEY, K.; OSORIO-DÍAZ, P.; SIMSEK, S. Starch characteristics of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in different localities. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 54–64, 22 abr. 2011.

PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch/Stärke**, v. 62, n. 8, p. 389–420, 2010.

PUTAUX, J. L.; MOLINA-BOISSEAU, S.; MOMAUR, T.; DUFRESNE, A. Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 5, p. 1198–1202, 2003.

RAYNER, M.; TIMGREN, A.; SJÖÖ, M.; DEJMEK, P. Quinoa starch granules: A candidate for stabilising food-grade Pickering emulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 9, p. 1841–1847, 2012.

RIBBA, L.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M. I.; GARCI, N. L.; GOYANES, S. Physico-Mechanical Properties of Biodegradable Starch Nanocomposites. **Macromolecular**, v. 294, n. 3, p. 169–177, 2009.

ROCHA, T. DE S.; CARNEIRO, A. P. DE A.; FRANCO, C. M. L. Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of root and tuber granular starches. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 544–551, 2010.

ROCHA, T. S.; CUNHA, V. A. G.; JANE, J. L.; FRANCO, C. M. L. Structural characterization of peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) starch and the effect of annealing on its semicrystalline structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 4208–4216, 2011.

ROUSSEAU, D. Current Opinion in Colloid & Interface Science Trends in structuring edible emulsions with Pickering fat crystals. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 18, n. 4, p. 283–291, 2013.

RUIZ-RUIZ, J.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; DRAGO, S.; GONZÁLEZ, R.; BETANCUR-

ANCONA, D.; CHEL-GUERRERO, L. Extrusion of a hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and quality protein maize (*Zea mays* L.) flour blend. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1799–1807, 2008.

SAARI, H.; HERAVIFAR, K.; RAYNER, M.; WAHLGREN, M.; SJÖÖ, M. Preparation and characterization of starch particles for use in pickering emulsions. **Cereal Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 116–124, 2016.

SAARI, H.; FUENTES, C.; SJÖÖ, M.; RAYNER, M.; WAHLGREN, M. Production of starch nanoparticles by dissolution and non-solvent precipitation for use in food-grade Pickering emulsions. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 558–566, 2017.

SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; VIUDA-MARTOS, M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Resistant starch as functional ingredient. **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 1911–1931, 2015.

SCHOCH, J. C. Iodimetric determination of amylose. Potentiometric titration Standard methods. In: **Methods in Carbohydrate Chemistry**. London: Academic Press, 1964.

SHEWAN, H. M.; STOKES, J. R. Review of techniques to manufacture micro-hydrogel particles for the food industry and their applications. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 781–792, 2013.

SILVA, R. M.; FERREIRA, G. F.; SHIRAI, M. A.; HAAS, Â.; SCHERER, M. L.; MARIA, C.; FRANCO, L.; DEMIATE, I. M. Características físico-químicas de amidos modificados com permanganato de potássio / ácido láctico e hipoclorito de sódio / ácido láctico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 66–77, 2008.

SONG, X.; PEI, Y.; QIAO, M.; MA, F.; REN, H.; ZHAO, Q. Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 256–263, 2015.

SRIROTH, K.; SANTISOPASRI, V.; PETCHALANUWAT, C.; KUROTJANAWONG, K.; PIYACHOMKWAN, K. Cassava starch granule structure - function properties : infuence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 161–170, 1999.

TESTER, R. F.; MORRISON, W. R. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 551–557, 1990.

THIELEMANS, W.; BELGACEM, M. N.; DUFRESNE, A. Starch nanocrystals with large chain surface modifications. **Langmuir**, v. 22, n. 10, p. 4804–4810, 2006.

VAMADEVAN, V.; BERTOFT, E.; SOLDATOV, D. V.; SEETHARAMAN, K. Impact on molecular organization of amylopectin in starch granules upon annealing. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 1045–1055, 2013.

VAMADEVAN, V.; BERTOFT, E. Structure-function relationships of starch components. **Starch/Staerke**, v. 67, n. 1–2, p. 55–68, 2015.

VANIER, N. L.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; PINTO, V. Z.; KLEIN, B.; BOTELHO, F.

T.; DIAS, A. R. G.; ELIAS, M. C. Physicochemical, crystallinity, pasting and morphological properties of bean starch oxidised by different concentrations of sodium hypochlorite. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1255–1262, 2012.

VATANASUCHART, N.; NAIVIKUL, O.; CHAROENREIN, S.; SRIROTH, K. Molecular properties of cassava starch modified with different UV irradiations to enhance baking expansion. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 1, p. 80–87, 2005.

WANG, S.; LI, C.; COPELAND, L.; NIU, Q.; WANG, S. Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, p. 568–585, 2015.

WANG, Y. J.; WANG, L. Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 3, p. 207–217, 2003.

WATERSCHOOT, J.; GOMAND, S. V.; FIERENS, E.; DELCOUR, J. A. Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. **Starch/Stärke**, v. 67, n. 1–2, p. 14–29, 2015.

WEI, B.; HU, X.; LI, H.; WU, C.; XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Effect of pHs on dispersity of maize starch nanocrystals in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 369–373, 2014a.

WEI, B.; XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Surface chemical compositions and dispersity of starch nanocrystals formed by sulfuric and hydrochloric acid hydrolysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–7, 2014b.

WEI, B.; LI, H.; TIAN, Y.; XU, X.; JIN, Z. Thermal degradation behavior of hypochlorite-oxidized starch nanocrystals under different oxidized levels. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 124–130, 2015.

WEI, B.; ZHANG, B.; SUN, B.; JIN, Z.; XU, X.; TIAN, Y. Aqueous re-dispersibility of starch nanocrystal powder improved by sodium hypochlorite oxidation. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 29–37, 2016.

XIA, L.; WENYUAN, G.; JUAN, W.; QIANQIAN, J.; LUQI, H. Comparison of the morphological, crystalline, and thermal properties of different crystalline types of starches after acid hydrolysis. **Starch/Stärke**, v. 62, p. 686–696, 2010.

XIAO, H.; YANG, T.; LIN, Q.; LIU, G. Q.; ZHANG, L.; YU, F.; CHEN, Y. Acetylated starch nanocrystals: Preparation and antitumor drug delivery study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 456–464, 2016.

XIE, F.; LIU, W. C.; LIU, P.; WANG, J.; HALLEY, P. J.; YU, L. Starch thermal transitions comparatively studied by DSC and MTDSC. **Starch/Stärke**, v. 62, n. 7, p. 350–357, 2010.

XU, Y.; SISMOUR, E. N.; GRIZZARD, C.; THOMAS, M.; PESTOV, D.; HUBA, Z.; WANG, T.; BHARDWAJ, H. L. Morphological, structural, and thermal properties of starch nanocrystals affected by different botanic origins. **Cereal Chemistry**, v. 91, n. 4, 2014.

YANG, T.; ZHENG, J.; ZHENG, B. S.; LIU, F.; WANG, S.; TANG, C. H. High internal phase emulsions stabilized by starch nanocrystals. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 230–238, 2018.

YE, F.; MIAO, M.; JIANG, B.; CAMPANELLA, O. H.; JIN, Z.; ZHANG, T. Elucidation of stabilizing oil-in-water Pickering emulsion with different modified maize starch-based nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 229, p. 152–158, 2017.

YI, J.; NJOROGI, D. M.; SILA, D. N.; KINYANJUI, P. K.; CHRISTIAENS, S.; BI, J.; HENDRICKX, M. E. Detailed analysis of seed coat and cotyledon reveals molecular understanding of the hard-to-cook defect of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 210, p. 481–490, 2016.

YIN, D.; MA, L.; LIU, J.; ZHANG, Q. Pickering emulsion: A novel template for microencapsulated phase change materials with polymer e silica hybrid shell. **Energy**, v. 64, p. 575–581, 2014.

ZEEMAN, S. C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A. M. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 209–234, 2010.

ZHENG, H.; FUJIN, A.; CHANG, P. R.; HUANG, J.; DUFRESNE, A. Structure and Properties of Starch Nanocrystal-Reinforced Soy Protein Plastics. **Polymers and Polymer Composites**, p. 474–480, 2009.

ZHOU, J.; TONG, J.; SU, X.; REN, L. Hydrophobic starch nanocrystals preparations through crosslinking modification using citric acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 186–1193, 2016.