

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOADSORVENTE À BASE DE AMIDO DE  
ARROZ HIDROLISADO ENZIMATICAMENTE**

**Liziane Dantas Lacerda**

**Tese de Doutorado**

Porto Alegre, dezembro de 2018

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOADSORVENTE À BASE DE AMIDO DE  
ARROZ HIDROLISADO ENZIMATICAMENTE**

**Liziane Dantas Lacerda**

Tese realizada sob a orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nádyá Pesce da Silveira e co-orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosane Michele Duarte Soares, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, dezembro de 2018

“Tudo tem dia, hora e momento para acontecer”  
Sargento Lacerda

Para as incríveis mulheres da minha vida,  
Luiza, Helena e Vanir

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por absolutamente tudo,

À professora Nádyá pela sábia e tranquila orientação, por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis e pela amizade desde o período do Mestrado,

Ao meu pai que partiu fisicamente na metade desta tese, e mesmo assim sentia a sua presença ao meu lado o tempo todo,

À minha mãe, incansável e dedicada em me proporcionar o suporte necessário para que tudo fosse possível,

Ao meu marido por toda a força, compreensão, amor e companheirismo,

Às minhas filhas, Luiza por sempre me fazer acreditar que eu iria conseguir e Helena por acelerar o final desta trajetória,

Aos professores presentes no exame de qualificação pelas sugestões,

Aos professores da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite,

À UFRGS, ao Instituto de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais pela excelente oportunidade,

À Unisinos, professora Janice e pessoal da Engenharia de Alimentos, Gastronomia e IttFuse pela ajuda na parte experimental,

À Rosane, Andresa, Daiani, Suse e Roberta pelas magníficas contribuições,

A todos os familiares, amigos, colegas e alunos que auxiliaram na realização deste trabalho e que torceram tanto por mim. A verdadeira realização é ter alguém com quem compartilhar a alegria da conquista!

## LISTA DE TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA TESE

### PUBLICAÇÕES

**Lacerda, D. L.;** Leite, D. C.; Soares, R. M. D.; da Silveira, N. P. *Effects of reaction time and  $\alpha$ -amylase, amyloglucosidase and their mixture on hydrolysis of rice starch granules.* Starch-Starke 2018, [s. l.], v. 1800008, p. 1–7.

**Lacerda, D. L.;** Leite, D. C.; da Silveira, N. P. *Relationships between structure and functional properties of rice starches and enzymatic hydrolysis conditions* (em submissão).

### PUBLICAÇÕES NÃO RELACIONADAS AO PLANO DA TESE

Nied, D. D.; **Lacerda, L. D.** *Elaboração e avaliação de massas alimentícias isentas de glúten a partir de farinhas funcionais de arroz integral vermelho (*Oryza sativa* L.), amaranto (*Amaranthus cruentus*) e quinoa (*Chenopodium quinoa*).* Higiene Alimentar, v. 31, p. 574, 2017.

Vasconcelos, C. B.; da Silva, J.; Scherer, J.; **Lacerda, L. D.;** Frota, M. L. C.; da Silva, P. R. S. *Desperdício de alimentos e bioengenharia de alimentos.* In: Zaro, M. *Desperdício de alimentos: velhos hábitos, novos desafios.* Caxias do Sul, 2018. P 222-249.

da Silva, S. B.; de Souza, D.; **Lacerda, L. D.** *Food applications chitosan and its derivatives.* In: Broek, L. A. M. & Boeriu, C. G. *Chitin and Chitosan: Properties and Applications.* John Wiley & Sons Limited, United Kingdom, 2018 (em submissão).

## CONFERÊNCIAS, SIMPÓSIOS E CONGRESSOS

Gomes, C. F.; Souza, D.; **Lacerda, L. D.**; Zigler, D. R.; Marczak, L. D. F.; Tessaro, I. C. *Evaluation of technological properties of rice protein concentrates for use in the food industry.* Apresentação de pôster em 17th IUFoST World Congress on Food Science and Technology, 2014, Montreal, Canadá.

Sabino, A. L. L.; **Lacerda, L. D.**; Zigler, D. R.; Souza, D. *Study of the application of washings for the purification of native rice starch obtained from alkaline extraction of Brazilian broken rice.* Apresentação de pôster em 17th IUFoST World Congress on Food Science and Technology, 2014, Montreal, Canadá.

**Lacerda, L. D.**; Sabino, A. L. L.; Rodrigues, E. T.; Soares, R. M. D.; da Silveira, N. P. *Rice Porous starch: Preparation and characterization.* Apresentação de pôster em XIV SLAP XII CIP, 2014, Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil.

**Lacerda, L. D.**; da Silveira, N. P.; Soares, R. M. D.; Rodrigues, E. T. *Desenvolvimento de bioadsorvente à base de amido de arroz hidrolisado enzimaticamente.* Apresentação oral em 13º CBPol Congresso Brasileiro de Polímero, 2015, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

Teixeira, C. J.; **Lacerda, L. D.** *Propriedades morfológicas e tecnológicas de variedades de arroz integral da região de Barra do Ribeiro/RS.* Apresentação de pôster em XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA, 2016, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

Santos, A. H. B.; Martins, J. P. S.; Menzel, A. W.; **Lacerda, L. D.** *Massa alimentícia à base de arroz (*Oriza Sativa L.*) e feijão (*Phaseolus Vulgaris L.*) restritiva ao glúten e lactose contendo aminoácidos essenciais.* Apresentação de pôster em XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA, 2016, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

Melo, L.; Martins, J. P. S.; **Lacerda, L. D.** *Fermentado alcóolico de arroz quebrado.* Apresentação de pôster em XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA, 2016, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

Demarchi, B.; **Lacerda, L. D.** *Desenvolvimento de doce a base de arroz (Oriza Sativa L.) e feijão (Phaseolus Vulgaris L.)*. Apresentação de pôster em 6º Simpósio de Segurança Alimentar (SSA), 2018, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil.

Daffner, M.; da Silveira, B. O.; Machado, A. M. K.; **Lacerda, L. D.** *Avaliação do processo fermentativo para produção de bebida alcoólica a partir de arroz quebrado (Oryza Sativa L.), kiwi (Actinidia Chinensis) e banana (Musa Spp)*. Apresentação de pôster em XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA, 2018, Belém do Pará, Pará, Brasil.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1 ADSORVENTES .....	4
2.2 POROSIDADE .....	10
2.3 BIOPOLÍMEROS PARA O “FOOD DESIGN” .....	13
2.4 AMIDO DE ARROZ.....	16
2.5 AMIDO POROSO .....	26
2.6 APLICAÇÕES DO AMIDO POROSO.....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>33</b>
4.1 MATERIAIS .....	34
4.2 PREPARO DOS AMIDOS POROSOS DE ARROZ.....	34
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS NATIVOS E POROSOS DE ARROZ.....	36
4.3.1 Composição Centesimal .....	36
4.3.2 Conteúdo de Amilose.....	36
4.3.3 Amido Danificado.....	37
4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
4.3.5 Granulometria por Difração a Laser.....	38
4.3.6 Capacidade de Adsorção.....	39
4.3.7 Porosimetria de Nitrogênio.....	39
4.3.8 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	39
4.3.9 Difração de Raio X (DRX) .....	40
4.3.10 Espalhamento de Raio X a Baixos Ângulos (SAXS).....	40
4.3.11 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	41
4.3.12 Potencial Zeta.....	40
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS NATIVOS DE ARROZ.....	42

<b>5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS POROSOS DE ARROZ - PRIMEIRO ESTUDO.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS POROSOS DE ARROZ - SEGUNDO ESTUDO.....</b>	<b>59</b>
<b>5.4 COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO E DETERMINAÇÃO ENTRE AS PROPRIEDADES DOS AMIDOS POROSOS.....</b>	<b>76</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das isotermas de adsorção.....	5
Figura 2: Micrografias e estruturas básicas dos adsorventes porosos mais comuns utilizados..	8
Figura 3: Tipos de poros encontrados em materiais porosos.....	10
Figura 4: Relação entre as isotermas de adsorção e dessorção e a estrutura capilar adsorvente: (a) poros cônicos, (b) poros cilíndricos, (c) ambas as extremidades dos poros abertos.....	11
Figura 5: Biopolímeros naturais renováveis.....	14
Figura 6: Evolução da produção, utilização e estoques do arroz .....	17
Figura 7: Mapa da produção do arroz no Brasil.....	18
Figura 8: Quantidades aproximadas de produtos e coprodutos obtidos a partir do beneficiamento do arroz em casca.....	19
Figura 9: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de grânulos de diferentes amidos nativos, (a) amido de arroz, (b) amido de trigo, (c) amido de milho, (d) amido de mandioca, (e) amido de batata.....	21
Figura 10: Estrutura química da amilose (A) e da amilopectina (B).....	22
Figura 11: Estrutura molecular da amilose (esquerda) e da amilopectina (direita). $\Phi$ , $\Psi$ e $\Omega$ representam os ângulos torcionais das ligações glicosídicas .....	23
Figura 12: Representação esquemática da organização interna do grânulo de amido.. .....	24
Figura 13: Modificações realizadas no grânulo de amido nativo.....	25
Figura 14: Representação esquemática da ação das amilases, círculos pretos indicam açúcares redutores.. .....	27
Figura 15: Micrografias de amidos nativos e hidrolisados utilizando mistura de $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase à 35°C por 24 horas.....	28
Figura 16: Lecitina (33 %) em contato com (a) maltodextrina, (b) amido nativo de milho e (c) Pure-Dent B730.....	31
Figura 17: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura e histograma do tamanho dos grânulos dos amidos nativos de arroz Ceroso (a) e Regular (b).....	44

Figura 18: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	46
Figura 19: Estrutura química do corante azul de metileno.....	49
Figura 20: Estrutura química do corante violeta de metila.....	50
Figura 21: Espectros de FTIR transmitância do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	52
Figura 22: Espectros de FTIR absorvância do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	53
Figura 23: Curvas de espalhamento de raios X do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	54
Figura 24: Representações das diferentes morfologias das partículas secundárias de materiais à base de sílica.....	55
Figura 25: Termogramas de DSC do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	56
Figura 26: Potencial zeta do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	59
Figura 27: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.....	61
Figura 28: Difractogramas de raios X dos amidos nativos e porosos de arroz ceroso (a) e regular (b), segundo estudo.....	67
Figura 29: Espectros de FTIR absorvância dos amidos nativos e porosos de arroz, ceroso (a) e regular (b), segundo estudo.....	69
Figura 30: Razão de intensidade de absorvância R(1045/995) e R(1022/995) dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.....	70
Figura 31: Curvas de espalhamento de raios X dos amidos nativos e porosos de arroz, ceroso (a) e regular (b), segundo estudo.....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos poros conforme seu tamanho.....	11
Tabela 2: Classificação dos biopolímeros.....	13
Tabela 3: Formulações utilizadas para a obtenção dos amidos porosos do primeiro estudo....	35
Tabela 4: Formulações utilizadas para a obtenção dos amidos porosos do segundo estudo....	35
Tabela 5: Composição centesimal dos amidos nativos de arroz.....	42
Tabela 6: Conteúdo de amilose, amido danificado, diâmetro médio, temperatura de gelatinização, cristalinidade relativa, pH e potencial zeta dos amidos nativos de arroz.. .....	43
Tabela 7: Fração volumétrica da área média e diâmetro Feret do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	47
Tabela 8: Porosimetria de nitrogênio do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	48
Tabela 9: Capacidade de adsorção do amido nativo e dos amidos porosos de arroz aos corantes violeta de metila e azul de metileno, primeiro estudo.....	49
Tabela 10: Granulometria por difração a laser do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	51
Tabela 11: Raio de giro e expoente da lei de potência das curvas ajustadas de SAXS do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	55
Tabela 12: Temperaturas e entalpia de gelatinização do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.....	57
Tabela 13: Diâmetro médio, fração volumétrica e diâmetro Feret dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.....	63
Tabela 14: Conteúdo de amilose, amido danificado e cristalinidade relativa dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.....	65
Tabela 15: Temperaturas e entalpia de gelatinização e potencial zeta dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.....	74
Tabela 16: Coeficientes de correlação de Pearson para morfologia, estrutura, cristalinidade, propriedades térmicas e potencial zeta dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.....	77

Tabela 17: Coeficientes de determinação para morfologia, estrutura, cristalinidade, propriedades térmicas e potencial zeta dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.....	80
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACV	Análise do Ciclo da Vida
AGU	Unidades de glucoamilase
AM	Amilose
AMG	Amiloglucosidase
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASTM	American Society for Testing and Materials
BET	Brunauer, Emmet e Teller
BJH	Barret, Joyner e Halenda
C	Ceroso
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DE	Equivalente de dextrose
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DRX	Difração de Raio X
FAU	Unidades de fungal $\alpha$ amilase
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LR	Logística Reversa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OSA	Anidrido Octenil Succínico
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.	Vetor de dispersão
R	Regular
Rg	Raio de giro
SAXS	Espalhamento de Raio X a Baixos Ângulos
WAXS	Espalhamento de Raio X a Altos Ângulos
PNRS	Política Nacional dos Resíduos Sólidos
$\alpha$	Expoente da lei de potências

## RESUMO

Amidos nativos de arroz com diferentes teores de amilose foram tratados com  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase e sua mistura a 50 °C utilizando tempos de reação de 3, 6 e 12 horas. O tempo de reação de 6 horas foi o mais adequado dentre os estudados. As técnicas utilizadas para caracterizar os amidos porosos revelaram uma distribuição de porosidade, possibilitando identificar a presença de macroporos (microscopia eletrônica de varredura), mesoporos (porosimetria de nitrogênio) e microporos (capacidade de adsorção). A morfologia, estrutura, cristalinidade e estabilidade dos amidos porosos foram investigadas e relacionadas. Os resultados mostraram que o tipo de enzima e a classe de amilose do amido de arroz conferem um impacto substancial nas propriedades funcionais dos amidos porosos, sendo independentes ao tempo de reação. Os coeficientes de correlação e determinação revelaram correlação forte e positiva entre diâmetro médio e cristalinidade relativa e temperaturas de gelatinização; entre conteúdo de amilose e entalpia de gelatinização; entre amido danificado e temperaturas de pico e de conclusão; entre cristalinidade relativa e temperaturas de gelatinização. Uma correlação forte e negativa foi identificada entre diâmetro médio e entalpia de gelatinização; entre conteúdo de amilose e cristalinidade relativa e temperaturas de gelatinização; entre cristalinidade relativa e entalpia de gelatinização.

**Palavras-chave:** *Amido de arroz; Amilase; Amiloglucosidase; Amilose; Correlação; Hidrólise Enzimática; Porosidade hierárquica.*



## ABSTRACT

Rice starches with different amylose content were treated with  $\alpha$ -amylase, amyloglucosidase and their mixture at 50 °C for reaction times of 3, 6, and 12 h. The reaction time of 6 h was found to be the more appropriate among those studied. The techniques used to characterize the porous starches revealed a porosity distribution. It was possible to identify the presence of macropores (scanning electron microscopy), mesopores (porosimetry of nitrogen) and micropores (adsorption capacity). The morphology, structure, crystallinity, and stability of porous starches were investigated, and their relationships were studied. The results showed that the type of enzyme and starch amylose class have a substantial impact on the functional properties of the porous starches obtained, been independent of reaction time. Correlation and determination coefficients revealed the following strong and positive correlation; medium diameter with relative crystallinity and gelatinization temperatures; amylose content with gelatinization enthalpy; damaged starch with peak and conclusion temperatures; relative crystallinity with medium diameter and gelatinization temperatures. A strong and negative correlation was identified between medium diameter and gelatinization enthalpy; amylose content and relative crystallinity and gelatinization temperatures; relative crystallinity and gelatinization enthalpy.

**Keywords:** *Amylase; Amyloglucosidase; Amylose; Correlation; Enzymatic hydrolysis; Hierarchical porosity; Rice starch*

# 1 INTRODUÇÃO

O amido é amplamente usado em aplicações alimentares e industriais. Modificações físicas, químicas ou enzimáticas são na maioria das vezes adotadas para alcançar as propriedades funcionais que não são encontradas em amidos nativos. No processo enzimático convencional, soluções aquosas de amidos nativos são gelatinizadas ocorrendo a ruptura física do grânulo e a abertura da estrutura cristalina para posterior ação da enzima. Recentemente, a hidrólise direta do amido em temperaturas de sub-gelatinização tem sido conduzida; entretanto, a ação das enzimas em grânulos de amido nativo não é tão eficiente quanto em amidos gelatinizados.

O amido poroso pode ser obtido por hidrólise das regiões amorfas de grânulos de amidos nativos com enzimas. Isto ocorre porque a região amorfa é relativamente exposta e acessível na superfície dos grânulos. As enzimas mais comuns utilizadas para a modificação de amido incluem  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, glucoamilase, pululanase e isoamilase. A utilização de um único tipo de enzima pode não hidrolisar o amido eficiente e completamente. Estudos demonstram que há um efeito sinérgico quando utilizadas duas enzimas simultaneamente no processo. Geralmente, dependendo do tipo de enzima, ocorre corrosão na superfície do grânulo todo ou parte dele (exocorrosão) ou digestão de canais pontuais selecionados sobre a superfície em direção ao centro do grânulo (endocorrosão).

Alguns autores reportaram variação substancial nas propriedades de amido poroso associada a diferenças quanto aos fatores extrínsecos utilizados na reação enzimática, como a razão da massa adicionada de  $\alpha$ -amilase para a massa adicionada de amiloglucosidase ( $m_{\alpha\text{-amilase}} / m_{\text{amiloglucosidase}}$ ), a razão da massa total adicionada de enzimas para a massa utilizada de amido ( $m_{\text{enzima}} / m_{\text{amido}}$ ), a razão do volume adicionado de solução tampão para a massa utilizada de amido ( $v_{\text{solução}} / m_{\text{amido}}$ ), pH, temperatura e tempo da reação enzimática. Por outro lado, outros pesquisadores focaram na influência de fatores intrínsecos nas propriedades dos amidos porosos, por exemplo, os amidos do tipo B são mais resistentes à hidrólise enzimática do que os amidos do tipo A. Outro fator frequentemente discutido é que grânulos de amido da mesma espécie, mas diferindo na relação amilose/amilopectina, são conhecidos por apresentarem diferentes comportamentos de resistência enzimática. Em outras palavras, a maioria dos estudos mostrou os efeitos desses fatores separadamente. Além disso, poucas tentativas se concentraram na redução do tempo de reação enzimática associado à contribuição individual e combinada de enzimas para a produção de amido poroso relacionando com as características específicas da matéria-prima utilizada.

Comparado ao amido nativo ou a outro amido modificado, o amido poroso tem excelente propriedade de adsorção devido à sua grande área superficial específica. Ele pode ser usado como um adsorvente em alimentos, medicamentos, cosméticos, produtos químicos e outros. Este bioadsorvente de recurso renovável apresenta vantagens distintas como atoxicidade, biodegradabilidade e impacto ambiental positivo. Além disso, o amido de arroz é hipoalergênico devido às proteínas presentes em sua composição. Entretanto, vários trabalhos utilizam amido de milho, sendo muito pouco explorado o amido de arroz.

Um subproduto que ultimamente tem recebido especial atenção é o arroz quebrado, facilmente encontrado em diversas agroindústrias da região sul do Brasil, que pode ser inserido em vários projetos e mercados potenciais. No beneficiamento do arroz branco são produzidos em média 14 % de grãos quebrados, um problema econômico para a indústria arroseira porque seu valor de venda representa apenas a quinta parte daquele obtido na comercialização do grão inteiro. Porém, é uma fonte rica em amido, aproximadamente 88 %. Este bioproduto do arroz pode ser processado tecnologicamente, incentivando a transformação de frações consideradas resíduos em produtos altamente funcionais.

De forma geral, os resíduos do processamento de produtos de origem vegetal (frutas, oleaginosas, fibrosas, madeiras, etc.) e origem animal (laticínios, avicultura de corte, aquicultura, etc.) apresentam em suas composições diferentes constituintes, que propiciam muitas oportunidades através da aplicação do conceito de biorrefinaria. A biorrefinaria é uma unidade produtiva que integra a geração de energia e produtos de valor agregado elevado a partir de biomassa. É fundamentada na conversão integral de recursos renováveis como fonte de macromoléculas a exemplo da celulose, hemicelulose, lignina, pectina, taninos, amido, ácidos graxos, colágeno, quitosana, corantes naturais e outros constituintes químicos, em produtos processados com valor agregado (energia, produtos químicos, biomateriais e alimentos).

Neste contexto, os biopolímeros, principalmente os originários de polissacarídeos de resíduos agrícolas, envolvem materiais derivados de biomassa, ou seja, materiais de origem biológica. São vistos como polímeros de monômeros derivados de qualquer sistema biológico ou organismo vivo, condicionados por três parâmetros básicos: produção a partir de matérias renováveis, utilização de processos amigos do ambiente e biodegradabilidade.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um bioadsorvente à base de amido de arroz hidrolisado enzimaticamente, investigando o efeito da  $\alpha$ -amilase, da amiloglicosidase e da combinação destas duas enzimas no tratamento enzimático à temperatura de sub-gelatinização utilizando os tempos de reação de 3, 6 e 12 horas e duas variedades de amido de arroz nativo. As

investigações foram conduzidas com especial ênfase na microscopia eletrônica de varredura (MEV), capacidade de adsorção de corantes (violeta de metila e azul de metileno), porosimetria de nitrogênio, granulometria por difração a laser, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raio X (DRX), espalhamento de raio X a baixos ângulos (SAXS), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e potencial zeta, indicando as interações entre os fatores intrínsecos e extrínsecos envolvidos no processo de obtenção do amido poroso.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ADSORVENTES

O fenômeno da adsorção / dessorção foi descoberto há mais de dois séculos por Carl Wilhelm Scheele em 1773 e por Felice Fontana em 1777. Em 1785, os pesquisadores descobriram que ao aquecer o carvão contido em um tubo de ensaio este dessorvia gases. Os gases então eram absorvidos quando o carvão era resfriado. A natureza da adsorção / dessorção sempre foi controversa ao longo do século XIX. Faraday (1834) discutiu a possibilidade de os gases serem retidos na superfície por uma força elétrica e sugeriu que os mesmos poderiam reagir mais facilmente quando estivessem no estado adsorvido. No entanto, Berzelius (1836) observou que os melhores adsorventes eram materiais altamente porosos. Portanto, Berzelius propôs que a adsorção seria um processo em que a tensão superficial ou alguma outra força fazia com que o gás fosse condensado nos poros de um meio poroso. A ideia de que a maioria dos processos de adsorção / dessorção eram realmente apenas poros de condensações foi ativamente debatida na literatura nas décadas de 1850 a 1920. Magnus (1825, 1853) e Magnus (1929) mostraram que a condensação nos poros ocorre. No entanto, outros pesquisadores descobriram que havia alguns dados que não estavam de acordo com a ideia de que a condensação de poros sozinha explicava o fenômeno da adsorção / dessorção <sup>1,2</sup>.

Os materiais adsorventes são substâncias naturais ou sintéticas, sólidos amorfos ou cristalinos com estrutura altamente porosa, capacidade de adsorção e elevada área superficial específica <sup>3,4</sup>. Um bom material adsorvente apresenta seletividade, eficiência, resistência mecânica, menor perda de carga possível, inércia química e baixo custo, além da possibilidade de regeneração das propriedades adsorptivas, reversão da adsorção, ou seja, dessorção <sup>5</sup>.

A capacidade de adsorção de um adsorvente depende de sua textura (distribuição dos tamanhos de poros, volume de poros e área superficial específica) e das interações com o adsorvato (fisissorção e quimissorção) <sup>6,7</sup>. A fisissorção ocorre como resultado de forças de coesão, forças de *van der Waals*, dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio. As moléculas adsorvidas se sujeitam a um movimento de translação dentro da interface, não se fixando em locais específicos da superfície, fenômeno reversível. A adsorção física é caracterizada por uma energia relativamente baixa, atingindo rapidamente o equilíbrio. Na quimissorção há a formação de uma ligação química entre a molécula do adsorvato e a superfície do adsorvente, sendo caracterizada por altas energias de adsorção ocasionando as seguintes características: formação

de uma única camada sobre a superfície sólida, irreversibilidade e liberação de uma quantidade de energia considerável (da ordem de uma reação química) <sup>8</sup>.

Os adsorventes possuem propriedades específicas, dependendo do campo de aplicação. Dentre os adsorventes mais empregados industrialmente destacam-se o carvão ativado, a sílica gel, a alumina e as peneiras moleculares <sup>9</sup>.

As isotermas de adsorção representam as relações de equilíbrio entre a concentração de um componente na fase fluida e nas partículas do adsorvente, em determinada temperatura. São determinantes na seleção do material, uma vez que descrevem a forma como o adsorvato interage com o adsorvente. As isotermas podem ser representadas por meio de modelos teóricos, empíricos ou pela combinação destes, que, através de equações, relacionam a massa adsorvida com a concentração do adsorvato restante na fase fluida <sup>10,11</sup>. As quatro curvas típicas que caracterizam um processo específico de adsorção são exemplificados na Figura 1.

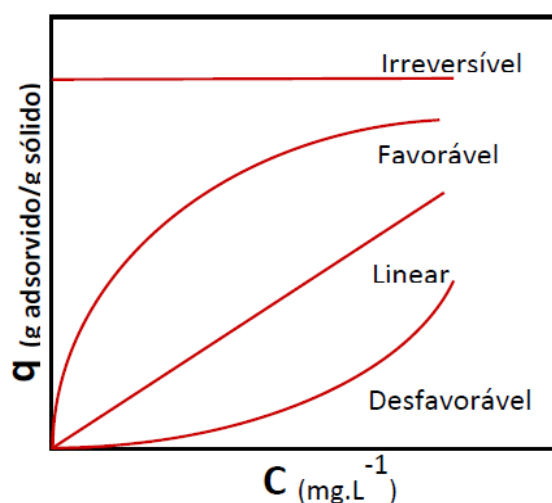


Figura 1: Representação esquemática das isotermas de adsorção <sup>8</sup>.

A isoterma linear que sai da origem indica que a quantidade adsorvida é proporcional à concentração do fluido, não indicando uma capacidade máxima de adsorção. Já a isoterma irreversível, caracterizada por um aumento inicial muito abrupto, traduz uma elevada afinidade do adsorvente para o soluto. As isotermas côncavas são chamadas favoráveis, por representarem processos que extraem quantidades relativamente altas mesmo em baixos níveis de concentração de adsorvato no fluido. Por fim, as isotermas convexas são denominadas desfavoráveis, devido à pequena capacidade de remoção em baixas concentrações e ao desenvolvimento de longas zonas de transferência de massa no leito. Isotermas desfavoráveis são raras, mas são importantes para

descrever o processo de regeneração, isto é, a transferência de massa do sólido de volta para a fase fluida, quando a isoterma é favorável <sup>8</sup>.

A determinação da área específica da superfície, do volume de poro, da distribuição do volume e tamanho do poro faz com que haja uma grande utilização das isotermas de adsorção para substratos sólidos. Foram feitas numerosas tentativas no sentido de desenvolver expressões matemáticas a partir dos mecanismos de adsorção propostos, que se adaptassem às diferentes isotermas experimentais. As duas equações de isotermas usadas com mais frequência são aquelas devidas a Langmuir e a Brunauer, Emmet e Teller <sup>12</sup>.

As seguintes considerações foram feitas para que se obtivesse uma isoterma o mais simples possível:

1. As condições de adsorção das demais camadas acima da primeira são iguais;
2. Em todas as camadas, exceto a primeira, a energia de adsorção é igual à energia de condensação;
3. Quando  $P = P_0$ , a multicamada tem espessura infinita.

Brunauer, Emmett e Teller (BET) fizeram estas considerações e foram hábeis ao simplificar o somatório das quantidades adsorvidas em todas as camadas e chegar em sua primeira e mais útil forma de equação:

$$\left[ \frac{P}{X} * (P - P_0) \right] = (1 - X_m * C) + [(C - 1) / (X_m * C)] * (P / P_0) \quad (1)$$

Onde:  $P$  = pressão parcial do gás (pascal).

$P_0$  = pressão de vapor de saturação do adsorvato (pascal).

$X$  = quantidade de gás adsorvido (mL).

$X_m$  = quantidade de gás correspondente à monocamada de moléculas adsorvidas (mL).

$C$  = constante relacionada com a energia de interação entre o adsorvato (gás) e o adsorvente (sólido) <sup>13</sup>.

Através do método de BET a adsorção de nitrogênio pode ser relacionada à área superficial. A área da superfície específica,  $s_{ABET}$  (m<sup>2</sup>/g), de um sólido poroso é igual a soma de suas áreas de superfície interna e externa. A área de superfície interna origina as paredes do

poro. Para a maioria das amostras, mais de 97 % da área de superfície específica é a área de superfície interna devido aos poros. A área de superfície pode ser calculada pela seguinte equação:

$$s_{ABET} = X_m * a_m * N \quad (2)$$

Onde:  $X_m$  = quantidade de gás adsorvido quando a monocamada é completa ( $\text{mol/m}^2$ ).

$a_m$  = área ocupada por uma molécula de gás ( $0,162 \text{ nm}^2$  por molécula de nitrogênio).

$N$  = número de Avogadro ( $6,02 \times 10^{23}$  moléculas/mol) <sup>14</sup>.

Para se obter a curva de distribuição de mesoporos a partir da adsorção de nitrogênio foram propostos procedimentos computacionais diferentes e têm sido desenvolvidos vários modelos para estimar a distribuição do tamanho de poro baseados nos diferentes modelos de poro (cilíndrico, esferas compactadas,...). Eles estão baseados na equação de Kelvin e todos estão relacionados ao conhecido procedimento Barret, Joyner e Hallenda (BJH).

O método permite a utilização da curva de adsorção ou dessorção da isoterma. A isoterma de dessorção é preferida porque esta isoterma corresponde a mais baixa energia, portanto, um estado mais estável <sup>15</sup>. Quando é usada a curva de dessorção da isoterma, a quantidade dessorvida do gás é devida à evaporação do líquido, ou dessorção de uma multicamada. A partir dos valores de volume de gás adsorvido ou dessorvido,  $V_a$ , da pressão relativa,  $P/P_0$ , obtidos experimentalmente, e do diâmetro de poros calculado a partir da equação de Kelvin, podem-se construir as curvas de distribuição de tamanho de poros. O modelo de BJH pode ser aplicado na faixa de 0,42 até 0,995  $P/P_0$  da isoterma e não se aplica aos microporos. Não se pode avaliar macroporos com suficiente precisão a partir das isotermas de nitrogênio. Isso quer dizer que a aplicação da equação de Kelvin nas isotermas de nitrogênio é experimentalmente limitada para a faixa do tamanho de mesoporos. Os cálculos envolvem algoritmos pelo fato da condensação capilar e espessura das multicamadas serem consideradas na mesma faixa de  $P/P_0$  <sup>16</sup>. O volume específico de poro,  $sV$  ( $\text{mL/g}$ ) é a quantidade de vapor adsorvido na pressão relativa de 1, assumindo que os poros são cheios com líquido adsorvido, que preenche o volume total dos



poros por grama de adsorvente. A distribuição do volume de poro pode ser feita através de tratamentos matemáticos complexos.

Em relação aos processos que ocorrem nos limites de fase: sólido-gás e sólido-líquido, a superfície específica é entendida como a superfície acessível às moléculas de gás ou líquidos e engloba a superfície externa de um corpo sólido, bem como à sua superfície interna produzida por sua porosidade. É definido como a superfície real do adsorvente por unidade de massa e é geralmente expressa em  $\text{m}^2/\text{g}$ . A área de superfície específica e o raio médio dos poros são inversamente proporcionais. Uma grande superfície específica indica a presença de pequenos poros, enquanto pequenos valores de superfície específica são característicos de macroporosos e materiais não porosos <sup>17</sup>.

Os chamados adsorventes amorfos – carvão ativado, sílica gel e alumina - apresentam áreas específicas entre 200-1000  $\text{m}^2/\text{g}$ , e uma faixa de distribuição de tamanho de poros bem ampla, enquanto que as peneiras moleculares, em sua maioria zeólitas, apresentam um tamanho de poro de ordem de grandeza molecular definido pela estrutura cristalina, que praticamente não varia, podendo ser seletivo para moléculas específicas <sup>18-20</sup>. Atualmente, a fim de reduzir custos, aumentar a capacidade de adsorção e regenerar os adsorventes, a sílica gel, zeólita e carvão ativado tornaram-se os adsorventes porosos mais utilizados, Figura 2.

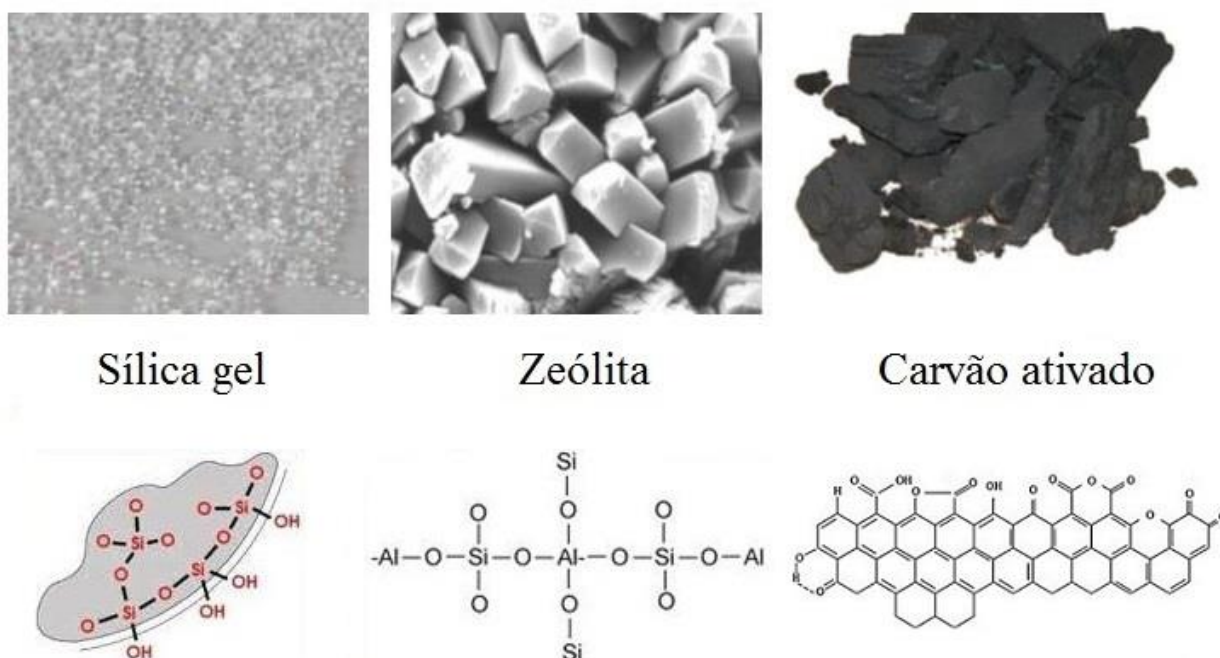


Figura 2: Micrografias e estruturas básicas dos adsorventes porosos mais comuns utilizados <sup>21</sup>.

A capacidade de adsorção do vapor de água da sílica gel é devido à sua estrutura porosa física e à grande área superficial. Pode absorver 50 % da sua massa de vapor sem alterar a sua massa inicial. A capacidade da adsorção da sílica gel aumenta quando a polaridade aumenta. Uma hidroxila pode adsorver uma molécula de água. Cada tipo de sílica gel tem apenas um tipo de poro, que geralmente é confinado em canais estreitos. Os diâmetros de poros da sílica gel comuns são de 2 a 3 nm (Tipo A) e 7 nm (Tipo B), e a área superficial específica é de cerca de 100–1000 m<sup>2</sup>/g. A sílica gel Tipo A é um gel de sílica de poro fino que possui uma grande área de superfície interna. Possui uma alta capacidade de adsorção de água em baixa umidade e é utilizada como um adsorvente no sistema de resfriamento de adsorção <sup>22</sup>.

O Tipo B contém poros grandes, adsorvendo vapor de água em baixas temperaturas e libera em calor elevado, sendo mais indicado para sistemas projetados para dessorver vapor de água em alta umidade e adsorver em baixa umidade. A sílica gel do tipo C é conhecida como sílica gel de poros amplos disponível em esferas, este tipo também funciona como um bom adsorvente em sistema de refrigeração de adsorção. É importante comparar a capacidade de adsorção de diferentes tipos de sílica gel, pois isso ajuda a determinar qual sílica gel apresenta o melhor desempenho para as diferentes aplicações <sup>22</sup>.

A zeólita é um material adsorvente altamente poroso, que pertence à classe dos silicatos de alumina. Esses adsorventes são caracterizados por uma estrutura tridimensional de poros. A correspondente estrutura cristalográfica é formada por cristais de óxido de alumínio (AlO<sub>4</sub>) e óxido de silício (SiO<sub>4</sub>). Estes cristais são a base estrutural para várias zeólitas, como as zeólitas A e X, comuns adsorventes utilizados na aplicação do sistema de refrigeração por adsorção. A porosidade da zeólita é entre 0,2 e 0,5 nm. Existem cerca de 40 tipos de zeólitas <sup>23</sup>.

A estrutura do carvão ativado é mostrada na Figura 2. A área específica do carvão ativado está entre 500 e 1500 m<sup>2</sup>/g, com valores de porosidade menores que 2 nm até maiores que 50 nm. A estrutura da rede de poros do carvão ativado é composta de canais irregulares, que têm maior área de poros na superfície do grão e área de poros estreitos dentro do grão. A diferença entre o carvão ativado e outros tipos de adsorvente é a característica da superfície. Toda a superfície do carvão ativado é coberta por uma matriz de óxido e por alguns inorgânicos materiais e, portanto, é apolar ou tem uma polaridade fraca. O calor de adsorção de pares de carbono ativado é menor que o de outros tipos de pares adsorventes físicos <sup>24,25</sup>.

## 2.2 POROSIDADE

Porosidade refere-se à fração de volume de poros ou espaços vazios, podendo este espaço vazio ser preenchido com um ou mais fluidos. Basicamente, os poros em materiais porosos podem ser divididos em três grupos como ilustrado na Figura 3.

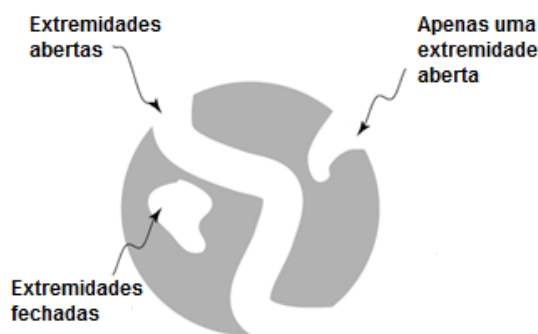


Figura 3: Tipos de poros encontrados em materiais porosos<sup>26,27</sup>.

O estágio final do processo de adsorção, envolvendo condensação nos poros, também fornece algumas informações sobre o formato dos poros. Onde os poros são cilíndricos, um menisco cuja forma é desenvolvida a partir da superfície da esfera seria formada na extremidade do capilar. No instante em que a condensação capilar inicia, o nível de líquido aumenta enquanto o raio da curvatura do menisco permanece inalterado. Todo o capilar é preenchido com o líquido à pressão constante, que é visto como uma seção de linha reta da isoterma paralela ao eixo que representa o volume do adsorvato e perpendicular ao eixo de pressão relativa. Neste caso, a parte final da isoterma de adsorção é paralela ao eixo determinando os valores de pressão relativa, o que resulta do fato de que um aumento na pressão não causa qualquer aumento adicional do volume de adsorvato<sup>28</sup>.

As isotermas de adsorção dos grânulos de amido não apresentam semelhante comportamento, assim pode-se supor que os poros dos grânulos de amido não possuem formato cilíndrico, e sim formato cônico, Figura 4. Como resultado da adsorção de vapores na superfície adsorvente, uma camada de adsorção com superfície côncava será formada nas paredes dos poros cônicos. A curvatura máxima desta superfície será encontrada na extremidade mais estreita do capilar. Um menisco com a sua forma desenvolvida a partir da superfície da esfera é então formado, como no caso de poros cilíndricos. A condensação capilar começa quando a pressão dos vapores do adsorvato sobre a superfície atinge determinado valor. Como resultado, o menisco é deslocado para o segmento capilar mais amplo e seu raio se torna maior. Os vapores

de adsorção se condensarão novamente desde que a pressão é aumentada. É por isso que a porção isotérmica representando a condensação capilar apresenta comportamento de uma curva onde o volume de adsorvato é aumentado com o aumento da pressão relativa. O mesmo processo, embora em ordem inversa, é observado durante a dessorção<sup>28</sup>.

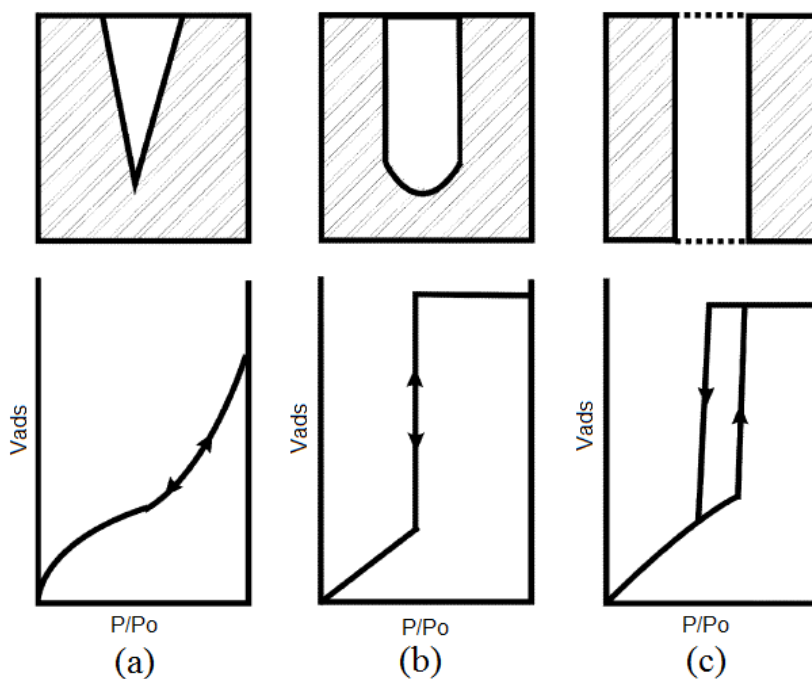


Figura 4: Relação entre as isotermas de adsorção e dessorção e a estrutura capilar adsorvente: (a) poros cônicos, (b) poros cilíndricos, (c) ambas as extremidades dos poros abertos<sup>12</sup>.

Quanto ao tamanho de poros, estes podem classificar-se em três categorias, conforme sugere a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), Tabela 1<sup>29</sup>.

Tabela 1: Classificação dos poros conforme seu tamanho<sup>30</sup>.

Tipo de poro	Diâmetro médio	Função principal
Microporos	< 2 nm	Contribuem para a maior parte da área superficial que proporciona alta capacidade de adsorção para moléculas de dimensões pequenas, como gases.
Mesoporos	2 nm a 50 nm	São importantes para a adsorção de moléculas médias, corantes.
Macroporos	> 50 nm	São normalmente considerados sem importância para a adsorção.

A distribuição do volume de poros em função do raio dos poros mostra como o grupo de poros contribui à porosidade total do sistema. Devido à sua diversidade e desempenho, estruturas hierarquicamente porosas têm atraído considerável atenção como uma importante família de materiais funcionais nos últimos anos. Geralmente, os materiais hierarquicamente porosos são altamente porosos, com alta área superficial, grande espaço acessível, baixa densidade, variável composição química e porosidade interconectada em diferentes escalas de comprimento. Estas características são muito favoráveis para a retenção de luz, transporte de elétrons, íons e cargas e difusão de massa, conferindo-lhes importância tecnológica no armazenamento e conversão de energia, catálise, fotocatalise, adsorção, separação, detecção de gás e biomedicina <sup>31</sup>.

A natureza vem produzindo materiais inorgânicos e compósitos híbridos com uma eficiência notável por milhões de anos fazendo uso de estruturas hierárquicas. A construção de materiais que apresentam estruturas hierárquicas complexas é um desafio particularmente interessante para os cientistas de materiais. O imperativo desenvolvimento de novas abordagens para fabricar sistemas hierárquicos bi, ou mesmo sistema tri-modais porosos revela possíveis procedimentos e métodos para preparar este tipo de material <sup>32</sup>.

O termo "zeólitas hierárquicas" é geralmente empregado para se referir a materiais zeolíticos de porosidade hierárquica com pelo menos dois níveis de poros. Isso significa que as zeólitas hierárquicas possuem, além dos microporos zeolíticos típicos e uniformes, uma porosidade secundária. Este último pode consistir em poros com diferentes tamanhos que se estendem de supermicroporos a mesoporos ou mesmo macroporos. No entanto, na maioria dos casos, a porosidade secundária encontra-se dentro do intervalo mesoporo, com o tamanho do poro dependendo fortemente da estratégia de síntese que está sendo empregada. De modo geral, as zeólitas hierárquicas exibem vantagens quando comparadas com as convencionais. Este fato é especialmente notável no caso de reações que ocorrem com a participação de grandes compostos. Isso pode ser realmente considerado como a consequência geral de uma série de efeitos derivados da presença dessa porosidade secundária, que são listados da seguinte forma:

- 1) Redução das limitações estéricas para converter moléculas volumosas;
- 2) Aumento na taxa de difusão intracristalina;
- 3) Variação da seletividade para os produtos-alvo;
- 4) Diminuição do efeito de desativação do coque <sup>33</sup>.

## 2.3 BIOPOLÍMEROS PARA O “FOOD DESIGN”

Os biopolímeros não são materiais recentes, foram pesquisados e desenvolvidos nos anos de 1930 e 1940, porém nessa época sua utilização para fins comerciais era muito restrita. Os biopolímeros podem ser divididos em dois grupos: polímeros naturais e polímeros produzidos por síntese química; e assim classificados de acordo com sua origem <sup>34</sup>, Tabela 2.

Tabela 2: Classificação dos biopolímeros <sup>35</sup>.

Origem do biopolímero	Exemplos de biopolímeros
Fontes renováveis	Polissacarídeos: amido, celulose
	Proteínas e lipídeos: animal (colágeno, caseína), vegetal (soja, glúten)
Microorganismos	Poli-hidroxicarboxilatos (PHAs), ex. PHB, PHBV
Biotecnologia	Poliactídeos, Poli(ácido láctico) (PLA)
Petroquímicos	Policaprolactona (PCL), poliésteramida (PEA) e copoliéster alifático e aromático

Segundo a norma ASTM D883-99 da American Society for Testing and Materials, biopolímeros ou polímeros biodegradáveis são plásticos que podem ser convertidos em gás carbônico, metano e componentes celulares microbianos entre outros produtos, quando em presença de micro-organismos de origem natural tais como bactérias, fungos e algas. Neste contexto, para Stevens <sup>36</sup> a definição de biopolímeros é condicionada por três parâmetros básicos: produção a partir de matérias renováveis, utilização de processos amigos do ambiente e biodegradabilidade. Já Vilaplana, Strömberg & Karlsson <sup>37</sup> consideram que a definição de biopolímeros envolve materiais derivados de biomassa, ou seja, materiais de origem biológica. Desta maneira, são vistos como polímeros de monômeros derivados de qualquer sistema biológico ou organismo vivo. Geralmente são unidades repetidas de glicose ou aminoácidos ou produtos fermentativos (poliésteres alifáticos) de resíduos agrícolas.

Polissacarídeos e proteínas, como o amido, o colágeno, a gelatina, o alginato, a celulose e a quitina, são as duas maiores classes de biopolímeros alimentícios. Biopolímeros naturais renováveis são compostos atrativos, principamene baseados em polissacarídeos, pois podem reduzir e, até mesmo, substituir o uso de produtos sintéticos, Figura 5 <sup>38</sup>.

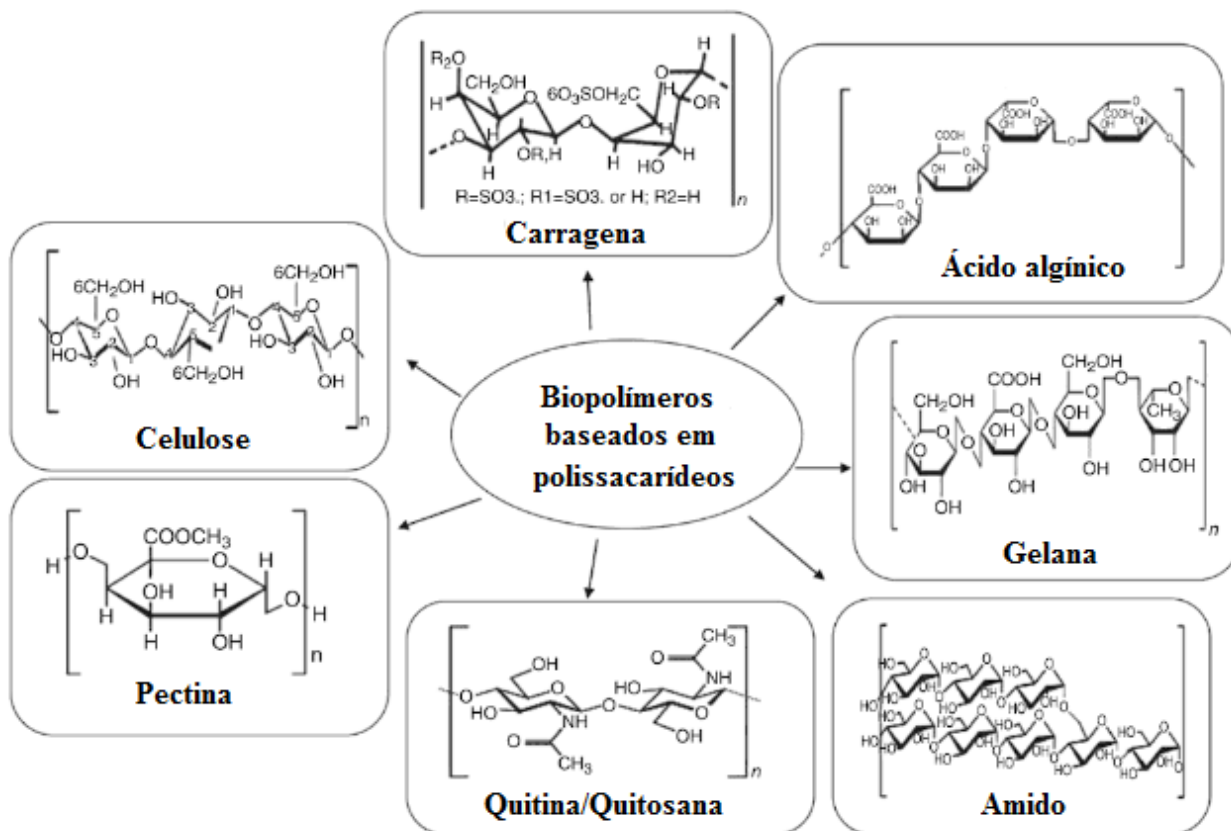


Figura 5: Biopolímeros naturais renováveis <sup>38</sup>.

Para exibir a funcionalidade desejada no produto final, estes biopolímeros devem ser cuidadosamente projetados e manufaturados, os chamados materiais feitos “sob encomenda” <sup>39</sup>. Há uma tendência crescente em direção ao desenvolvimento racional de produtos inovadores para a indústria alimentícia. A principal justificativa para este cenário é o número limitado de ingredientes legalmente permitidos para utilização em alimentos. Para o *design* de ingredientes biopoliméricos novos, pesquisadores devem selecionar um biopolímero apropriado e as metodologias a serem seguidas para realizar modificações na estrutura da matéria, ou seja, são projetados para usos específicos, assim, podem proporcionar soluções com maior intensidade de desempenhos <sup>38,40</sup>.

Além disso, atenção especial tem sido voltada à minimização ou reuso de resíduos e ao estabelecimento de novos usos de produtos e subprodutos agropecuários em substituição aos recursos não renováveis. Em razão disso, a química verde, química limpa ou química autossustentável já é realidade, especialmente em países com indústria química bastante desenvolvida e que apresentam controle rigoroso na emissão de poluentes. Um bom exemplo é a

adoção crescente do conceito de biorrefinaria, cuja lógica é análoga às refinarias de petróleo e integra processos visando à valorização total da matéria-prima <sup>41</sup>.

Biorrefinaria é uma unidade produtiva que constitui a geração de energia e produtos de valor agregado elevado a partir de biomassa. O conceito de biorrefinaria é fundamentado na conversão integral de recursos renováveis como fonte de macromoléculas a exemplo da celulose, hemicelulose, lignina, pectina, taninos, amido, ácidos graxos, colágeno, quitosana, corantes naturais e outros constituintes químicos, em produtos processados com valor agregado (energia, produtos químicos, biomateriais e alimentos). Esse conceito preconiza ainda a minimização dos impactos ambientais e maximização do uso do recurso renovável, considerando o ciclo de vida dos produtos obtidos <sup>42</sup>.

A biomassa é convertida em uma variedade de produtos, com pouco desperdício e emissões, trazendo novas oportunidades de ganho. O processo envolve um conjunto de rotas tecnológicas capazes de fracionar, extrair, separar e converter a matéria-prima em diferentes produtos intermediários ou finais, incluindo alimentos, produtos químicos, biomateriais e energia, maximizando os ganhos econômicos, minimizando os aspectos ambientais negativos, e melhorando a eficácia e sustentabilidade das cadeias agroindustriais.

O uso da análise do ciclo de vida (ACV) no desenvolvimento de produtos auxilia nos empreendimentos, baseando-se no conceito de biorrefinaria por facilitar a identificação de pontos críticos e a escolha de rotas tecnológicas com menor potencial de impacto. O conhecimento advindo com estudos de ACV em biorrefinarias permite a identificação de materiais e fontes de energia, a escolha de processos de produção, o design de produtos e a identificação de estratégias de disposição de resíduos que acarretam em menor impacto ambiental. De forma geral, os resíduos da agroindústria de processamento de produtos de origem vegetal (frutas, oleaginosas, fibrosas, madeiras, etc.) e origem animal (laticínios, avicultura de corte, aquicultura, etc.) apresentam em suas composições diferentes constituintes, que abrem muitas oportunidades de agregação de valor pela aplicação do conceito de biorrefinaria <sup>43</sup>.

A Política Nacional dos Resíduos Sólidos (PNRS) que, por meio da Logística Reversa (LR), objetiva maximizar o uso dos recursos a partir da produção sustentável e revalorização de resíduos por meio da reinserção destes aos ciclos de produção. Se o resíduo for reinserido em um ciclo produtivo distinto do original, um ciclo reverso aberto é definido. Por tratar do retorno de materiais, a LR relaciona-se à satisfação dos clientes, com garantia de sustentabilidade empresarial. Nas empresas, gestores percebem o impacto da LR na relação com clientes e público geral, pelo reflexo de sua imagem <sup>44</sup>.



## 2.4 AMIDO DE ARROZ

Segundo Brondani et al.<sup>45</sup> o arroz foi, provavelmente, o principal alimento e a primeira planta cultivada na Ásia, há cerca de 5.000 anos com as mais antigas referências do arroz encontradas na literatura chinesa. Existem na literatura duas formas silvestres do arroz cultivado: a espécie *Oryzarufipogon*, procedente da Ásia Ocidental, originando a *Oryza sativa* e a *Oryzabarthii*, derivada da África Ocidental, dando origem à *Oryzaglaberrima*. O gênero *Oryza* é o mais rico e importante da tribo *Oryzeae* e representa 23 espécies, espalhadas pelas regiões tropicais da Ásia, África e Américas.

No continente americano, o Brasil é apontado por alguns autores como o primeiro país a cultivar o arroz. Os tupis guaranis chamavam o arroz de “milho d’água” (abatiuaupé), e colhiam nos alagados próximos ao litoral. Isso antes mesmo de conhecer os portugueses. Dizem que na expedição de Pedro Álvares Cabral, após uma peregrinação em solo brasileiro, traziam amostras de arroz das grandes áreas alagadas da Amazonas. A literatura afirma que em 1587, já havia lavouras arrozeiras na Bahia, e em 1745 no Maranhão. Em 1766 surgiu a primeira descascadora de arroz no Brasil na cidade do Rio de Janeiro, autorizado pela Coroa Portuguesa<sup>46</sup>.

A produtividade do arroz este ano estava estimada em 6.114 kg/ha, a segunda melhor da série histórica, inferior apenas à safra 2016/17, tendo em vista que apesar das condições climáticas próximas do normal, elas não foram totalmente favoráveis no país todo, como foi na safra passada, Figura 6<sup>47</sup>.

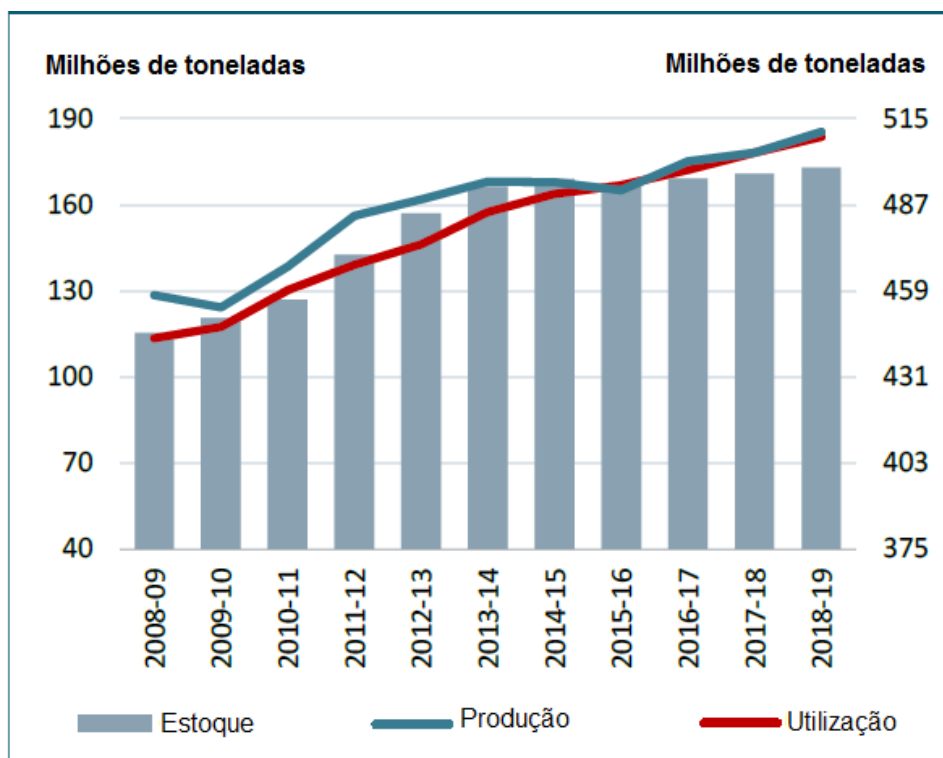


Figura 6: Evolução da produção, utilização e estoques do arroz <sup>48</sup>.

O Brasil é o maior produtor de arroz fora da Ásia. Apesar de o arroz ser uma cultura comum em quase todo o país, a maior parte da produção ocorre em 5 estados. O Rio Grande do Sul destaca-se como o maior estado produtor de arroz no Brasil, sendo que a colheita da safra 2017/208 já foi concluída, Figura 7. Com a confirmação dos resultados da safra 2017/18, a produtividade média nesse levantamento foi ajustada para 7.851 kg/ha (3,2 % superior ao levantamento anterior), seguindo tendência já verificada desde março, quando a expectativa que era de produtividade ligeiramente inferior à média histórica foi substituída por produtividade superior. Assim, esse resultado é um dos melhores já verificados no estado <sup>47</sup>.

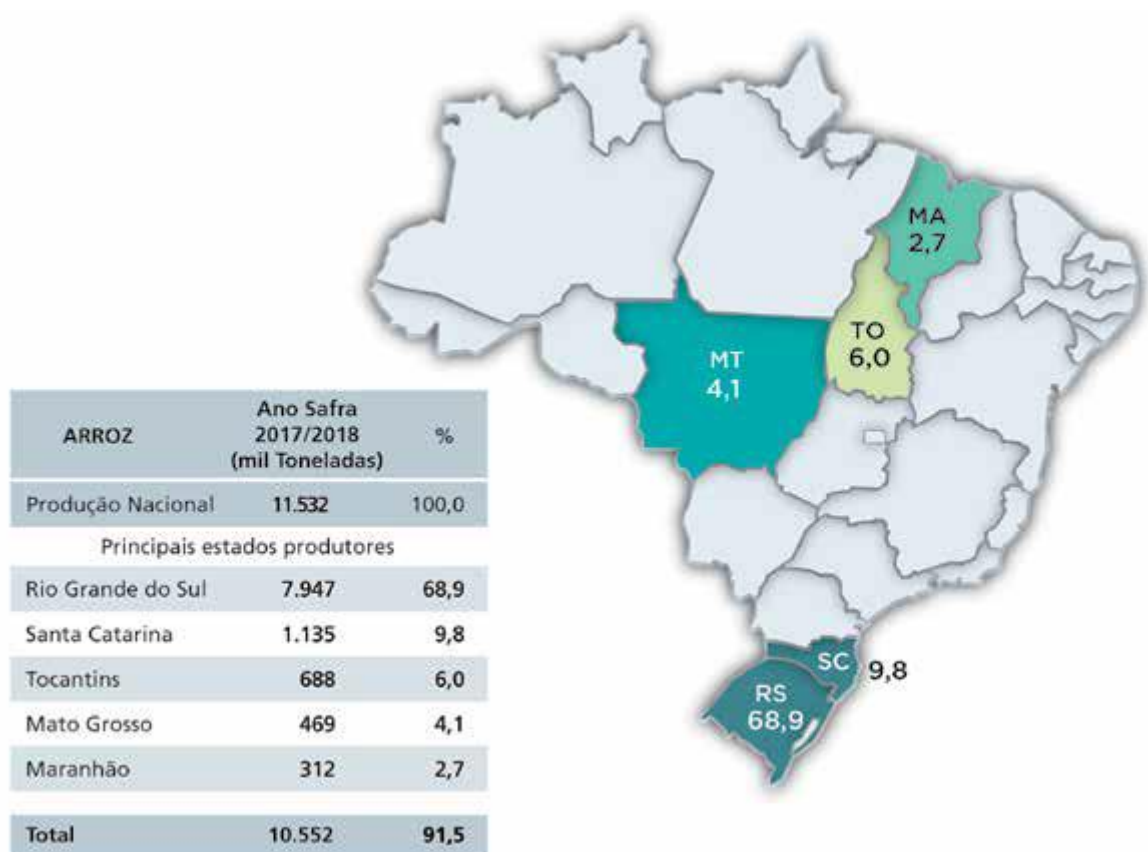


Figura 7: Mapa da produção do arroz no Brasil <sup>47</sup>.

A produção projetada para 2027/28 é de 11,9 milhões de toneladas, e um consumo de 12,2 milhões de toneladas. Projeta-se um aumento pequeno da produção de arroz nos próximos 10 anos, 0,4 % de crescimento anual. Segundo técnicos da Embrapa os números da projeção de produção são realistas. Podendo aumentar de forma mais significativa se o Brasil conseguir uma inserção mais expressiva no mercado internacional deste produto, no qual atualmente apenas 8 % da produção global é exportada. O consumo de arroz nos próximos anos deve manter-se constante ou diminuir. Para os especialistas do setor, o consumo projetado parece adequado à realidade atual, ainda que os cálculos de consumo aparente per capita tenham demonstrado quedas nos últimos anos. Para mudar essa tendência de longo prazo, somente se o Brasil conseguir desenvolver novas formas de utilização e consumo de arroz (produtos elaborados a partir de grãos de arroz, o que depende de pesquisa e desenvolvimento e, sobretudo da indústria se interessar pelo assunto, fato que não se percebe hoje) <sup>49</sup>.

O grão de arroz antes de ser entregue ao consumidor passa por um processo de beneficiamento. Existem três formas de beneficiamento do arroz, que são: branco, parboilizado e integral <sup>50</sup>. A primeira etapa de beneficiamento é a separação da casca do resto do grão, obtendo-

se o arroz integral, que é removido aproximadamente 20 % da casca; esse processo é o que menos prejudica o grão em termos nutricionais <sup>51</sup>. Após a retirada da casca ocorre a brunição e o polimento, que é um complemento da brunição. Nesta etapa são retirados o embrião total ou parcial, e uma parte da película que recobre o grão integral. No polimento ocorre a formação do farelo do grão, provocando a separação do gérmen e das camadas por abrasão para se obter o arroz branco. Com isso o produto ganha aspecto de maior cotação comercial, com uniformidade e brilho nos grãos. Segundo Castro et al. <sup>52</sup>, Figura 8, o farelo corresponde a aproximadamente 8 % do volume do produto em casca. Logo após, ocorre a separação das frações de grãos quebrados (aproximadamente 14 %) e inteiros (em torno de 58 %), bem como a classificação dos grãos quebrados em grandes, médios e quirera <sup>53</sup>.

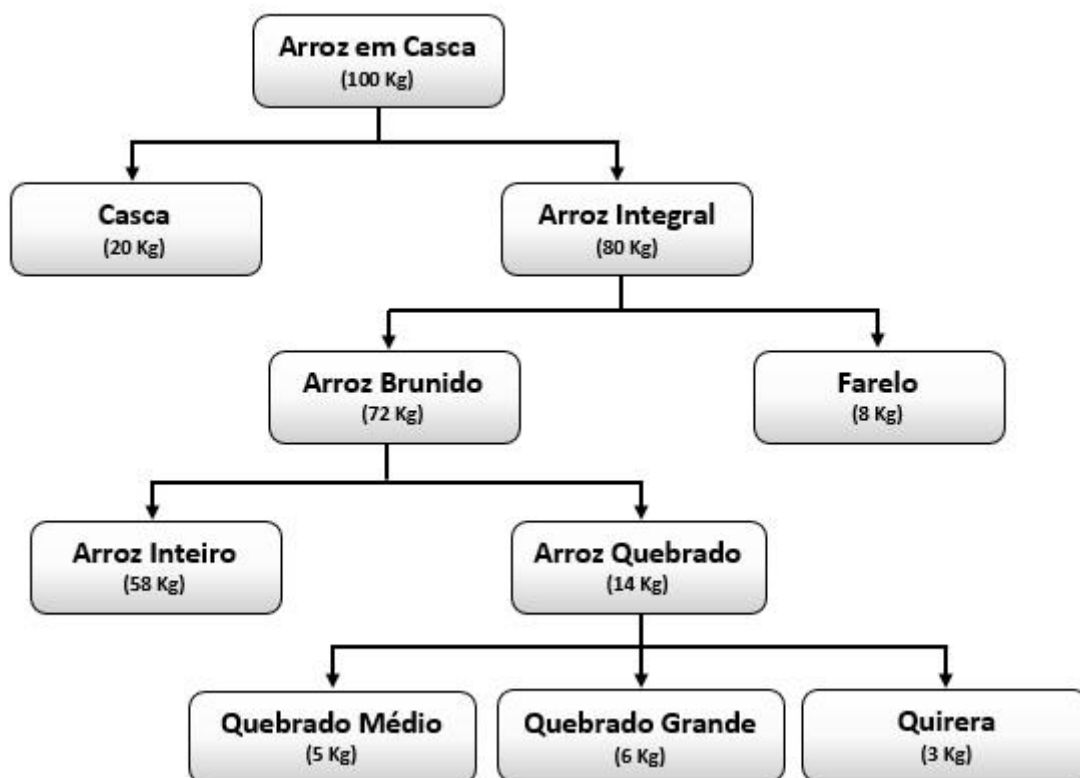


Figura 8: Quantidades aproximadas de produtos e coprodutos obtidos a partir do beneficiamento do arroz em casca <sup>52</sup>.

Os coprodutos do beneficiamento são a casca, o farelo e os grãos quebrados. De acordo com a Instrução Normativa nº 6, 16 de fevereiro de 2009, a quirera é o fragmento do arroz que pode passar pela peneira de furos circulares de 1,60 mm de diâmetro, e o grão quebrado é uma parte do grão de arroz descascado e polido que fica retido na mesma peneira. Faz parte desta

categoria (arroz quebrado ou quirera) todo o produto que na sua forma original apresenta mais de 50 % de fragmentos de arroz da categoria predominante <sup>54</sup>.

A preferência do consumidor de arroz é obter um produto uniforme com baixo conteúdo de grãos quebrados ou danificados <sup>52</sup>. A quebra durante o processo afeta o valor do produto no mercado, que é um fator determinante de aceitação. É de grande interesse comercial que o beneficiamento tenha obtenção de um maior número de grãos inteiros para que seu valor econômico seja maior.

Um dos critérios determinantes para o beneficiamento do arroz é o brunimento, etapa determinante para conferir qualidade ao arroz. Essa etapa se dá por abrasão, pelo contato dos grãos contra uma superfície áspera em movimento. Quase a metade desses grãos quebrados provem dessa operação de brunimento <sup>55</sup>. A quebra do arroz durante o brunimento pode ocorrer por diversos fatores tais como, grãos gessados, secagem muito rápida, grãos imaturos, distribuição da umidade nos grãos e fissuras ocorridas antes da colheita <sup>56</sup>.

Atualmente, a quirera de arroz é muito usada na alimentação animal <sup>57</sup>. O contínuo aperfeiçoamento das condições higiênicas de recolhimento e armazenagem de coprodutos para a padronização, normatização e regulamentação das características de qualidade e identidade comercial, incentiva o aproveitamento para o setor produtivo. Isto é importante para as entidades que trabalham com pesquisas e novas tecnologias aperfeiçoar essas condições higiênicas.

O arroz é constituído principalmente de amido, apresentando quantidades menores de proteínas, lipídeos, fibras e cinzas. Entretanto, a composição do grão e de suas frações está sujeita a diferenças varietais, variações ambientais, de manejo, de processamento e de armazenamento <sup>58</sup>. Silva et al. <sup>59</sup> relatam que o arroz quebrado e a quirera de arroz contêm uma composição nutricional bem próxima aos valores nutricionais do arroz branco polido. A composição nutricional do arroz branco em 100 gramas de amostra é composta de 11,1 % de umidade; 7,5 % de proteínas; 0,3 % de lipídios; 2,1 % de fibras; 78,9 % de carboidratos; 2,1 % de cinzas e 349 kcal.

O amido vem sendo muito estudado pelas indústrias de alimentos que estão interessadas no desenvolvimento de espécies que produzam amidos nativos com características físico-químicas especiais. O amido pode conferir textura, facilitar o processamento, servir como espessante, fornecer sólidos em suspensão e proteger os alimentos durante o processamento. O amido de arroz é utilizado como ingrediente em vários alimentos e produtos industriais, tais como, sobremesas, produtos de panificação e substituto de gorduras <sup>60</sup>.

O procedimento para isolar amido de arroz depende principalmente das diferenças no conteúdo de proteínas e propriedades do amido proveniente de cada fonte botânica, portanto, é diferente do procedimento para extrair amido de milho, trigo e batata. As proteínas presentes no grão de arroz estão fortemente associadas com a superfície do grânulo de amido dificultando assim sua remoção, podendo ser observada sua especificidade morfológica na Figura 9 quando comparado com outros cereais <sup>61</sup>.

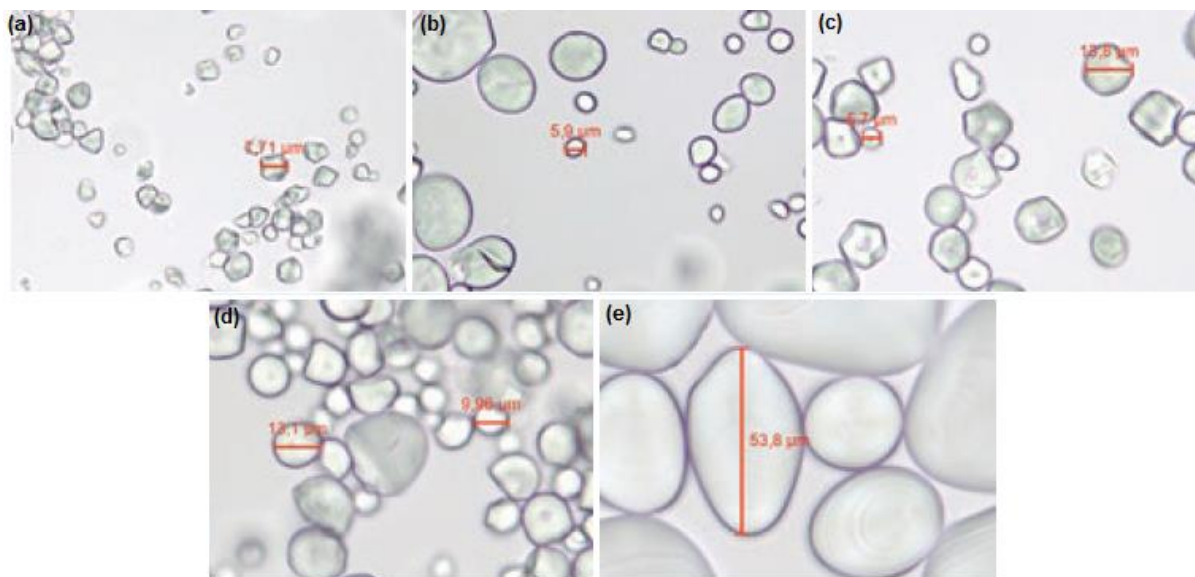


Figura 9: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de grânulos de diferentes amidos nativos, (a) amido de arroz, (b) amido de trigo, (c) amido de milho, (d) amido de mandioca, (e) amido de batata <sup>62</sup>.

A separação das proteínas do amido nativo de arroz pode ser conduzida através de tratamento químico (alcalino) ou enzimático (protease) <sup>63</sup>. Para o processo de extração do amido ser eficiente, as substâncias como lipídios, proteínas e sais minerais devem estar em pequenas quantidades na sua composição. Quanto menor o teor dessas substâncias, mais eficiente será o método de extração e purificação do amido e melhor a qualidade do produto <sup>64</sup>.

O amido é uma substância de alta massa molar, cuja capacidade hidrofílica é determinada pela presença de grupos hidroxila (OH) fortemente polares. Um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose (massa molar tipicamente da ordem de 250000 Daltons) e amilopectina (massa molar varia entre 50 e 500 x 10<sup>6</sup> Daltons) <sup>65,66</sup> Figura 10.

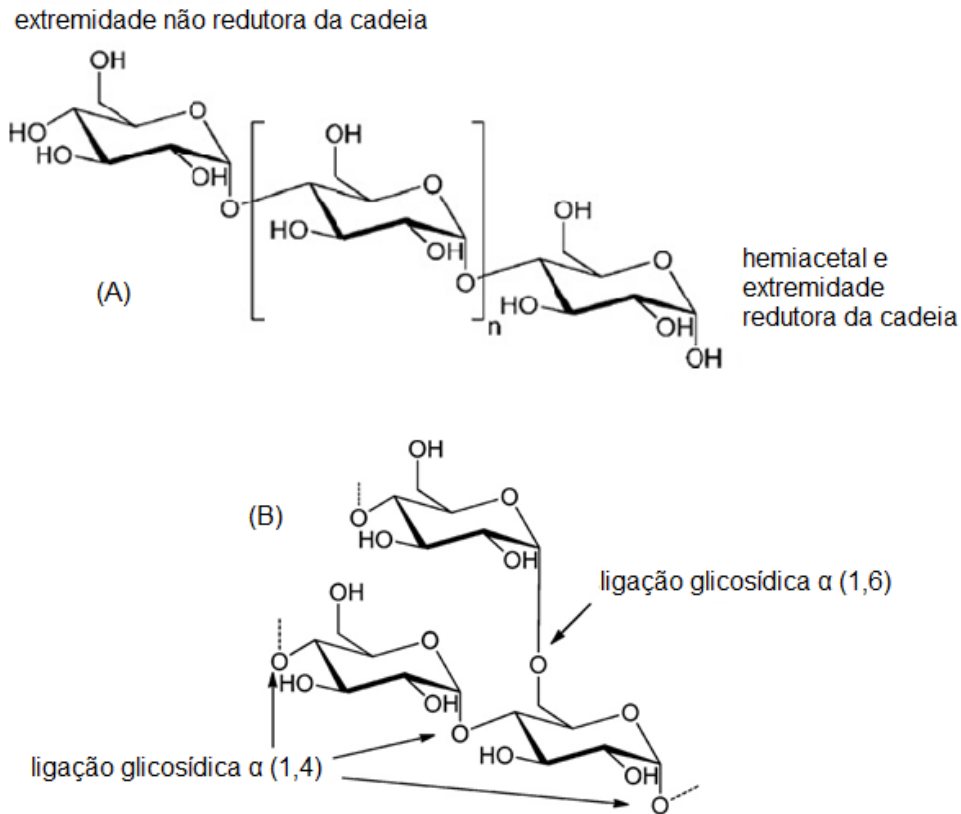


Figura 10: Estrutura química da amilose (A) e da amilopectina (B) <sup>67</sup>.

A amilose é um polímero linear em que as unidades de  $\alpha$ -D-glicose são conectadas através de ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,4), já a amilopectina é uma macromolécula ramificada contendo segmentos lineares ligados através de ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,4) e pontos de ramificação através de ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,6) <sup>68-70</sup>. Os ângulos torcionais  $\Phi$  (phi),  $\Psi$  (psi) e  $\Omega$  (ômega) das ligações glicosídicas definem a conformação da complexa estrutura do amido, Figura 11. Esses polímeros, em função de aspectos físico-químicos e da sua relação amilose/amilopectina, podem alterar a digestibilidade, o grau de cristalinidade, o tipo de processamento e as interações com outros constituintes <sup>71</sup>. Normalmente a proporção de amilose/amilopectina em cereais é de 1/3 <sup>72</sup>.

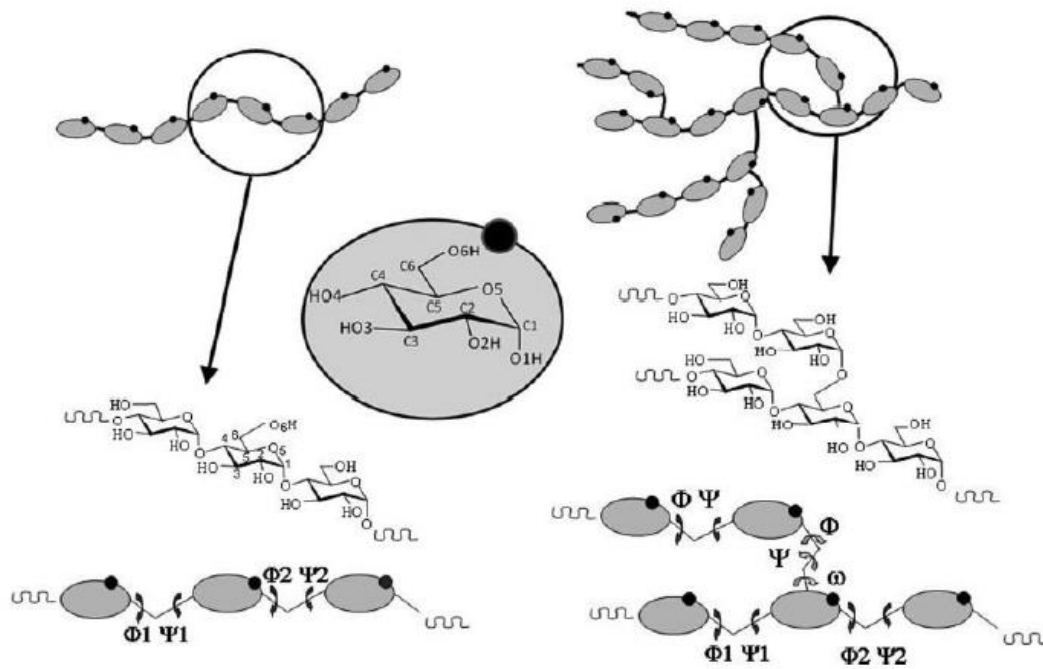


Figura 11: Estrutura molecular da amilose (esquerda) e da amilopectina (direita).  $\Phi$ ,  $\Psi$  e  $\Omega$  representam os ângulos torcionais das ligações glicosídicas<sup>73</sup>.

O teor de amilose é usado para avaliar a qualidade dos grãos de arroz. As proporções em que estas cadeias aparecem diferem entre genótipos, podendo-se classificar os grãos como ceroso (0-2 % de conteúdo de amilose) e regular ou comum com conteúdo de amilose muito baixo (2-12 %), baixo (12-20 %), intermediário (20-25 %) e alto (>25 %)<sup>74-76</sup>.

A amilopectina é, estrutural e funcionalmente, a mais importante das duas frações, pois sozinha é suficiente para formar o grânulo. Quanto à amilose, acredita-se que esteja localizada entre as cadeias da amilopectina e aleatoriamente entremeadada entre as regiões amorfas e cristalinas, Figura 12. As moléculas de amilose maiores estão concentradas no centro do grânulo e, provavelmente, participam das duplas hélices com a amilopectina, enquanto as moléculas menores presentes na periferia<sup>75</sup>. A refração das regiões cristalinas resulta no modelo típico de Cruz de Malta, o que caracteriza a orientação radial das macromoléculas. Essa propriedade de birrefringência é devida ao alto grau de orientação molecular interna, não tendo qualquer relação com a forma cristalina em particular. Geralmente os grânulos de amido nativos contêm entre 15 % e 45 % de material cristalino<sup>77</sup>.



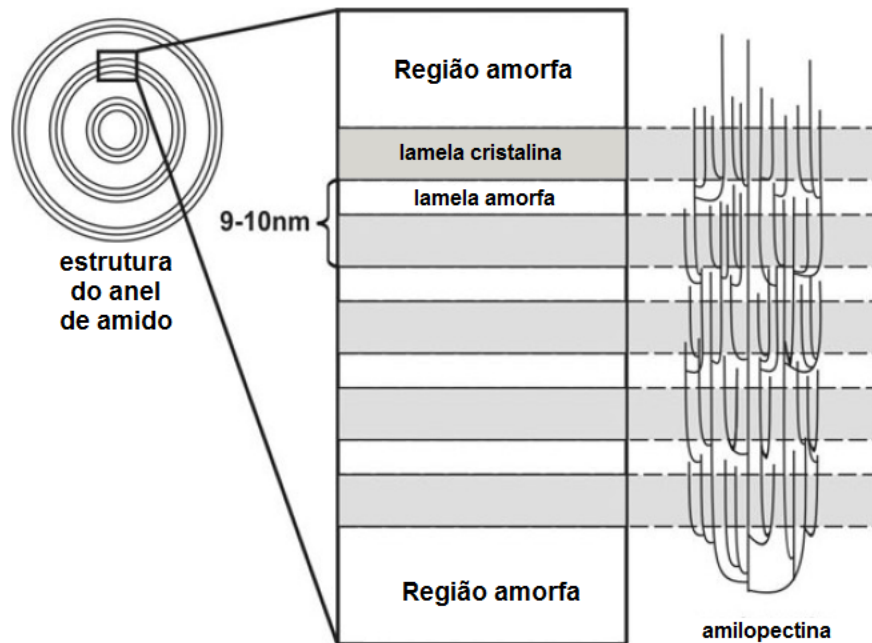


Figura 12: Representação esquemática da organização interna do grânulo de amido <sup>78</sup>.

Enquanto amidos com alto conteúdo de amilose são hábeis na formação de gel ou manter sua estrutura quando moldados, amidos sem amilose intumescem, mas não formam gel. Amidos com alto percentual de amilopectina espessam uma mistura, porém não conseguem formar um gel porque, ao contrário da amilose, as moléculas de amilopectina não se associam impossibilitando o surgimento de ligações químicas. Assim, conteúdo alto de amilopectina resulta em pasta de amido mais viscosa (não gel) e conteúdo alto de amilose resulta em força de gel <sup>79</sup>.

Além da sua importância nutricional, o amido apresenta importante papel tecnológico em alimentos processados. Na forma nativa o seu uso é mais restrito devido a algumas propriedades indesejáveis, tais como: insolubilidade em água fria, instabilidade frente a ciclos de congelamento e descongelamento e tendência a retrogradação. Porém, estas podem ser melhoradas através de métodos biológicos, físicos, químicos e enzimáticos <sup>80,81</sup>. Como os processadores de alimentos preferem não usar a designação no rótulo de amido modificado quando são utilizados amidos alterados quimicamente, há um interesse considerável em fornecer amidos com funcionalidades desejadas que não foram quimicamente modificados <sup>82</sup>.

Em termos simples, a modificação química envolve a introdução de vários grupos funcionais na estrutura do amido, tais como carboxila, acetila, hidroxipropila, amina e amida. Geralmente, a modificação química pode ser classificada como reticulação, enxerto, oxidação,

esterificação, eterificação e assim por diante. A presença de grupos funcionais específicos aprimora e atende às diferentes demandas de aplicações <sup>83</sup>. Já a modificação química por tratamento ácido rompe as ligações glicosídicas das cadeias  $\alpha$ -glucanas afetando desse modo a estrutura e as propriedades do amido nativo, Figura 13.

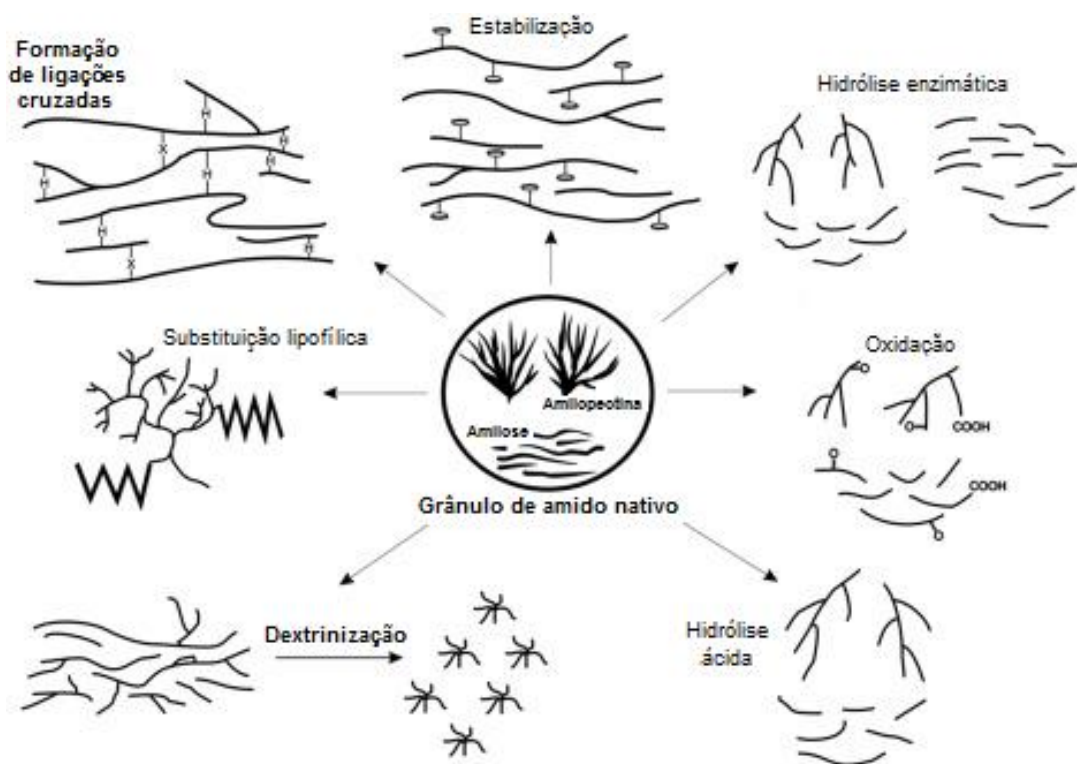


Figura 13: Modificações realizadas no grânulo de amido nativo <sup>84</sup>.

A modificação física inclui pré-gelatinização, moagem, extrusão, solubilização, etc. O tratamento através do controle da umidade e calor leva a interações e reassociações das cadeias de amilose e amilopectina, que afetam as propriedades do amido nativo. O ultrassom também pode ser usado como método físico para modificar as propriedades dos amidos nativos <sup>85</sup>. Por ser um material heterogêneo apresentando microestrutura sofisticada com transições multifásicas, o processamento térmico de materiais à base de amido é muito mais complexo quando comparado aos polímeros convencionais <sup>86</sup>. Já os amidos biologicamente modificados são amidos que sofreram alterações nas condições de crescimento da planta, seleção da variedade da semente ou expressão genética e rota bioquímica <sup>87</sup>.

No processo convencional enzimático, soluções aquosas contendo concentrações de 15 a 35 % de amido são gelatinizadas a 105 °C ocorrendo a ruptura física do grânulo e a abertura da

estrutura cristalina para posterior ação da enzima, Figura 13. A hidrólise direta do amido em temperaturas de sub-gelatinização tem sido conduzida como uma maneira de reduzir os problemas com viscosidade e custos associados com as altas temperaturas requeridas para o processo de gelatinização<sup>88,89</sup>. Entretanto, a ação das enzimas em grânulos de amido nativo não é tão eficiente quanto em amidos gelatinizados<sup>90</sup>. Recentemente, Benavent-Gil & Rosell<sup>91</sup> observaram que os amidos à base de cereais são mais suscetíveis à hidrólise enzimática do que os amidos de tubérculos.

## 2.5 AMIDO POROSO

Amido poroso pode ser obtido por hidrólise das regiões amorfas de grânulos de amidos com enzimas. Isto ocorre porque a região amorfa é relativamente exposta e acessível na superfície dos grânulos<sup>73,89,92,93</sup>. Geralmente, as enzimas podem corroer a superfície do grânulo todo ou parte dele (exocorrosão) ou digerir canais de pontos selecionados sobre a superfície em direção ao centro do grânulo (endocorrosão). Além disso, cinco padrões de ataque de enzimas já foram identificados até o momento: buracos de alfinete, erosão esponjosa, numerosos buracos de tamanho médio, distintos locais levando a buracos únicos em grânulos individuais e erosão de superfície<sup>90,94,95</sup>.

Enzimas são catalisadores biológicos derivados de organismos vivos, tais como fungos e bactérias e são muito específicas em suas reações. Em 1816, Kirchoff descobriu que as enzimas poderiam converter amido em “açúcar”, desta maneira o uso de enzimas não é novo para a indústria do amido. As enzimas mais comuns para a modificação de amido incluem  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, glucoamilase, pululanase e isoamilase<sup>65</sup>.

A  $\alpha$ -amilase é uma endoamilase, hidrolisando randomicamente as ligações glicosídicas  $\alpha(1,4)$  internas das cadeias polissacarídeas e a  $\beta$ -amilase é uma exoamilase, clivando as ligações glicosídicas  $\alpha(1,4)$  das extremidades não redutoras da cadeia de amido. A glucoamilase (amiloglucosidase) é uma exoamilase, podendo não somente hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha(1,4)$  como também as ligações glicosídicas  $\alpha(1,6)$  das extremidades não redutoras da cadeia do amido e as pululanases e isoamilases são enzimas desramificantes que hidrolisam exclusivamente  $\alpha(1,6)$  ligações glicosídicas, deixando os polissacarídeos lineares longos, Figura 14<sup>96-98</sup>.

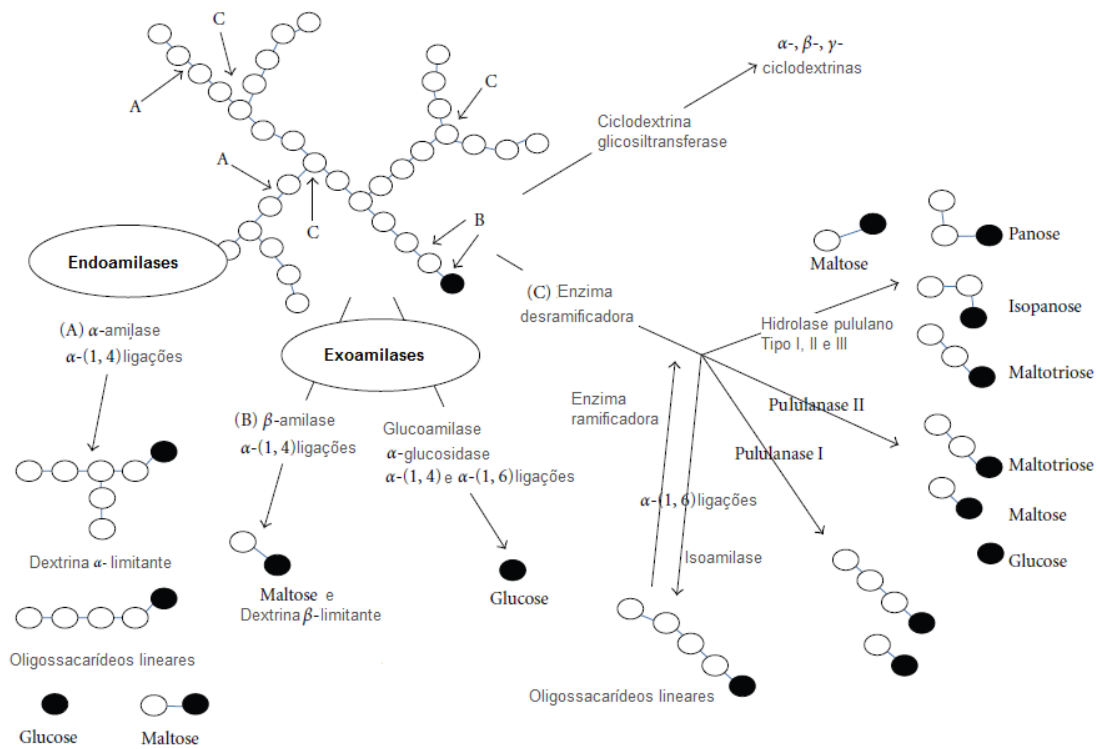


Figura 14: Representação esquemática da ação das amilases, círculos pretos indicam açúcares redutores<sup>99</sup>.

O grau de hidrólise da glucoamilase é baixo quando comparado ao da  $\alpha$ -amilase, entretanto, a utilização de um único tipo de enzima pode não hidrolisar o amido eficiente e completamente. Vários estudos demonstram que há um efeito sinérgico entre estas duas enzimas<sup>68,96</sup>. A Figura 15 apresenta micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura de alguns amidos nativos e os mesmos após tratamento com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase.

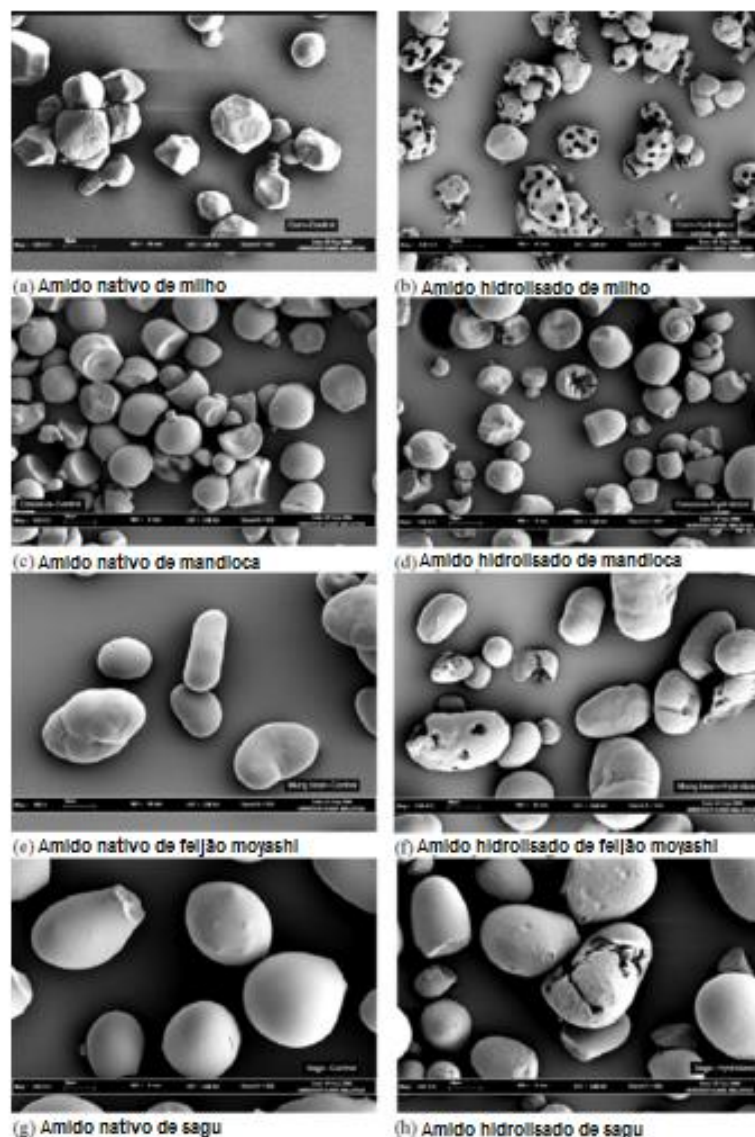


Figura 15: Micrografias de amidos nativos e hidrolisados utilizando mistura de  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase à 35°C por 24 horas <sup>88</sup>.

A utilização de uma mistura de  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase com tempos de reação enzimática variando de 12 a 30 horas demonstrou aumento na eficiência da hidrólise do amido nativo de mandioca, milho, feijão, batata doce e sagu, devido à ação sinérgica destas duas enzimas <sup>88,100-103</sup>. Zhang et al. <sup>104</sup> e Li et al. <sup>105</sup> estudaram sistematicamente as condições da reação, incluindo a razão da massa adicionada de  $\alpha$ -amilase para a massa adicionada de amiloglucosidase ( $m_{\alpha\text{-amilase}} / m_{\text{amiloglucosidase}}$ ), a razão da massa total adicionada de enzimas para a massa utilizada de amido ( $m_{\text{enzima}} / m_{\text{amido}}$ ), a razão do volume adicionado de solução tampão para a massa utilizada de amido ( $v_{\text{solução}} / m_{\text{amido}}$ ), pH, temperatura e tempo da reação enzimática. Os autores concluíram que o tempo ótimo de reação enzimática foi de 10 e 12 horas para amido

de milho e mandioca, respectivamente. No entanto, poucas tentativas se concentraram na redução do tempo de reação enzimática associado à contribuição individual e combinada de enzimas para a produção de amido poroso.

Gao et al.<sup>101</sup>, Malucelli et al.<sup>102</sup> e Dhital et al.<sup>106</sup> também identificaram variação substancial nas propriedades dos amidos porosos em termos dos fatores extrínsecos, ou seja, as condições específicas utilizadas na hidrólise enzimática. Por outro lado, alguns pesquisadores relataram a influência de fatores intrínsecos nas propriedades dos amidos porosos, por exemplo, os amidos do tipo B são mais resistentes à hidrólise enzimática do que os amidos do tipo A<sup>107-110</sup>. Outro fator também muito discutido é que grânulos de amido da mesma espécie, mas diferindo na relação amilose/amilopectina, são conhecidos por apresentarem diferentes comportamentos de resistência enzimática<sup>91,111-113</sup>. Em outras palavras, a maioria dos estudos mostrou os efeitos desses fatores separadamente.

## 2.6 APLICAÇÕES DO AMIDO POROSO

Comparado com o amido nativo ou outro amido modificado, o amido poroso tem excelente propriedade de adsorção devido à sua grande área superficial específica. Pode ser utilizado, por exemplo, como carreadores de aromas<sup>114</sup>, probióticos<sup>115</sup> e bioflavonoides<sup>116</sup>, como adsorventes para íons de metais pesados<sup>117</sup> e corantes orgânicos<sup>118</sup> e como pré-tratamento para a preparação de nanocristais de amido<sup>119</sup> e esferas de carbono porosas<sup>120</sup>.

Neste contexto, este bioadsorvente de recurso renovável apresenta vantagens distintas como atoxicidade, biodegradabilidade e impacto ambiental positivo<sup>95,110,121,122</sup>. Características importantes já que o carvão ativado e a sílica são produtos severamente controlados pela legislação de alimentos<sup>123</sup>.

Além disso, o amido de arroz é hipoalergênico devido às proteínas presentes em sua composição<sup>124</sup>. Os produtos sem glúten são importantes para pessoas que sofrem de doença celíaca, uma enteropatia mediada pelo sistema imunológico que causa inflamação no intestino delgado. É desencadeada pela ingestão de prolaminas presentes no trigo, centeio e cevada em indivíduos geneticamente suscetíveis. A doença celíaca é uma das mais comuns intolerâncias alimentares e um distúrbio comum ao longo da vida, afetando aproximadamente 1 % da população em geral<sup>125</sup>.

Em situações onde um aroma ou um óleo essencial necessitam ser incorporados em misturas em pó para bebidas, bolos e biscoitos, um meio sólido é preferível a uma forma líquida

<sup>126</sup>. Por exemplo, aromas são de grande importância na satisfação do cliente e afetam diretamente no consumo de produtos alimentícios.

Interações entre compostos aromáticos e alimentos envolvem três mecanismos: a distribuição das moléculas aromáticas entre as diferentes fases do produto alimentício, a difusão das moléculas aromáticas através da matriz e as ligações das moléculas aromáticas com os componentes do alimento. As ligações dos voláteis com amidos são classificadas em dois tipos: formação de complexo de inclusão onde o composto aromático fica aprisionado na dupla hélice da amilose através de ligações hidrofóbicas e interações polares envolvendo ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxil do amido e voláteis <sup>127</sup>.

A preservação dos aditivos aromáticos é muitas vezes uma das principais preocupações dos fabricantes de alimentos porque aromas são geralmente caros, voláteis e difíceis de manusear. A técnica de encapsulação proporciona uma eficaz proteção contra reações indesejáveis e evaporação durante o armazenamento e processamento. Tem havido uma crescente demanda por amidos na encapsulação de aromas uma vez que podem ser facilmente modificados em derivados com várias propriedades, como as ciclodextrinas, os amidos hidrolisados, os amidos OSA (tratados com anidrido octenil succínico) e os amidos porosos <sup>95,98</sup>.

Existem várias vantagens na aplicação de amidos porosos na encapsulação de aromas. Em primeiro lugar, o custo do processo de revestimento é baixo quando comparado com o processo de secagem por atomização (*spray-dryer*). Em segundo lugar, os aromas podem ser revestidos para dissolver em solventes, o que não pode ser realizado em processo de secagem por pulverização <sup>128</sup>.

No estudo de Buttery et al. <sup>129</sup>, o sucesso da adsorção de vários compostos aromáticos voláteis (limoneno, hexanal, octanol e benzaldeído) pelo amido poroso demonstrou que este amido comestível é potencialmente útil no transporte de aromas para aplicação em alimentos. Além disso, Weirong & Huiyuan <sup>130</sup> investigaram a adsorção de aroma de café em amido poroso. A capacidade de adsorção do amido poroso para o óleo de café atingiu o ponto de saturação após 30 minutos em contato a 70 °C, enquanto que o óleo de café adsorvido foi completamente liberado após aquecimento a 130 °C durante 10 minutos. Aproximadamente 80 % de aroma de café ficou retido no amido poroso quando exposto ao ar à temperatura ambiente durante 2 semanas, o que foi muito mais lento do que o amido natural.

Belingheri et al. <sup>128</sup> compararam o diacetil encapsulado em amido poroso comercial na presença de solventes com várias polaridades, ao processo de secagem por pulverização. Alta eficiência de carregamento inicial foi observada para todos os solventes utilizados, variando de

63 a 90 %, percentuais maiores do que os 53 % apresentados pelos produtos secos por pulverização. O aroma encapsulado foi liberado segundo um padrão contínuo ao longo de um longo período de armazenagem, com retenção do aroma de 15 a 40 % em 60 dias. Observou-se também que os solventes mais polares, propilenoglicol e etanol proporcionaram as menores perdas de aroma durante o armazenamento, indicando que a polaridade do solvente é um fator crítico na determinação da eficiência de encapsulação de aromas.

Pure-Dent B730 produzido pela Grain Processing Corporation é um amido modificado de milho. Em 2011 quando foi lançado no setor alimentício era o único amido modificado com alta absorvidade de materiais aquosos e não aquosos, sua estrutura apresentava maior área de superfície, sendo o material adsorvido internalizado nos grânulos de amido. A Figura 16 mostra a aparência de três adsorventes após adsorção de lecitina de soja <sup>131</sup>.

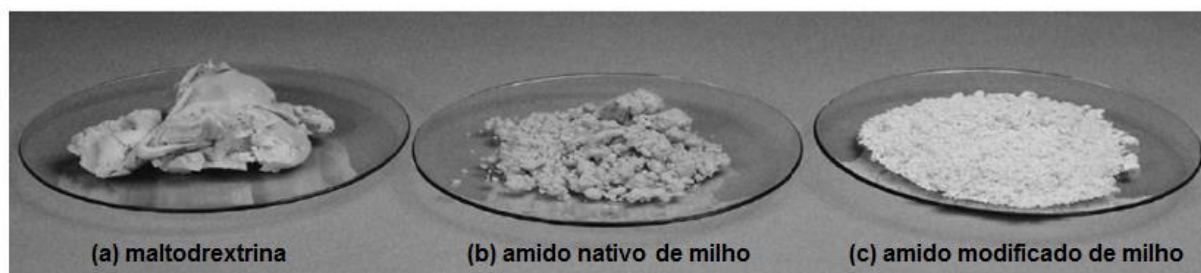


Figura 16: Lecitina (33 %) em contato com (a) maltodextrina, (b) amido nativo de milho e (c) Pure-Dent B730 <sup>131</sup>.

Maltodextrinas são, por definição, hidrolisados amiláceos que consistem de unidades  $\alpha$ -D-glicose ligadas primariamente por  $\alpha$  (1,4) ligações glicosídicas com um DE (equivalente de dextrose) menor que 20 e fórmula geral  $[(C_6H_{10}O_5)_n H_2O]$ . Em termos de massa molecular, estão posicionados entre o amido e açúcar. O DE reflete o poder de redução do material, indicando estabilidade e funcionalidade. De intensa aplicação na indústria alimentícia devido ao baixo custo, aroma neutro, alta solubilidade em água (75 %) e baixa viscosidade das soluções formadas, a maltodextrina não é considerada um adsorvente e sim um agente de volume <sup>132-134</sup>.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o amido poroso obtido através de hidrólise enzimática direta em temperaturas de sub-gelatinização a partir de amido de arroz e com vistas a sua potencialidade como bioadsorvente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar dois amidos de arroz nativos comerciais com teores de amilose diferentes através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), composição centesimal (umidade, proteínas, lipídios, fibra bruta, carboidratos, cinzas), conteúdo de amilose, amido danificado, temperatura de gelatinização (DSC), cristalinidade relativa (DRX), potencial hidrogeniônico (pH) e potencial zeta;
- ✓ Definir os parâmetros mais adequados da reação enzimática para o desenvolvimento dos poros no amido de arroz nativo ( $m_{enzima1}/m_{enzima2}$  e tempo de reação) utilizando o amido de arroz nativo ceroso comercial através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), capacidade de adsorção de corantes (violeta de metila e azul de metileno), porosimetria de nitrogênio, granulometria por difração a laser, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espalhamento de raio X a baixos ângulos (SAXS), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e potencial zeta;
- ✓ Relacionar as metodologias analíticas utilizadas para a caracterização da porosidade obtida nos grânulos de amido após hidrólise enzimática direta em temperaturas de sub-gelatinização com a hierarquia de poros;
- ✓ Verificar a influência da classe de amilose do amido utilizando as duas amostras de amidos de arroz nativos comerciais caracterizadas e do tipo de enzima e tempo de reação na formação dos poros nos grânulos de amido através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), conteúdo de amilose, amido danificado, difração de raio X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR),

espalhamento de raio X a baixos ângulos (SAXS), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e potencial zeta, determinando o valor da probabilidade;

- ✓ Indicar interações entre os fatores intrínsecos (classe de amilose do amido) e fatores extrínsecos (tipo de enzima e tempo de reação) através da determinação de coeficientes de determinação e correlação.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAIS

Foram utilizadas duas amostras de amido de arroz, grau alimentício, fornecidas pela Clariant produzidas pela Beneo-Remy (Leuven, Bélgica); o produto comercial Remyline AX-DR (amido nativo de arroz ceroso, não modificado e não-transgênico) e Remy DR (amido nativo de arroz regular, não modificado e não transgênico), denominadas como C e R respectivamente.

Enzimas,  $\alpha$ -amilase produzida por *Aspergillus oryzae* (Fungamyl 800L), 800 FAU/g e amiloglicosidase produzida por *Aspergillus niger* (AMG 300L), 300 AGU/g fornecidas pela Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Todos os outros reagentes utilizados foram grau analítico.

### 4.2 PREPARO DOS AMIDOS POROSOS DE ARROZ

Nos experimentos do primeiro estudo, os amidos porosos foram preparados de acordo com o método proposto por Zhang et al.<sup>104</sup>, com algumas modificações. Exatamente 10 g de amido de arroz nativo ceroso (C) foram suspensos em 80 mL de solução tampão de ácido cítrico/fosfato dissódico pH 5,5, com uma certa quantidade de enzima sendo adicionada por um tempo determinado, Tabela 3. As amostras foram mantidas numa incubadora com agitação de 120 rpm e temperatura controlada de 50 °C. Em seguida, uma solução de hidróxido de sódio 0,1M foi adicionada para inativar as enzimas e finalizar a reação através do ajuste do pH das suspensões para 10. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 4000 rpm e 20 °C. Os amidos foram lavados várias vezes com água deionizada e centrifugados nas mesmas condições citadas anteriormente. Foram neutralizados com solução de ácido clorídrico 0,1M, secos a 40 °C durante 48 horas em estufa de circulação forçada de ar e moídos para posterior caracterização. Nove amidos de arroz porosos foram obtidos, conforme Tabela 3.

Tabela 3: Formulações utilizadas para a obtenção dos amidos porosos do primeiro estudo.

Formulação	Enzima	Tempo de reação
CAM3	0,925 mL Fungamyl 800L	3 horas
CAM6	0,925 mL Fungamyl 800L	6 horas
CAM12	0,925 mL Fungamyl 800L	12 horas
CAMG3	2,466 mL AMG 300L	3 horas
CAMG6	2,466 mL AMG 300L	6 horas
CAMG12	2,466 mL AMG 300L	12 horas
CAM+AMG3	0,463 mL Fungamyl 800L + 1,233 mL AMG 300L	3 horas
CAM+AMG6	0,463 mL Fungamyl 800L + 1,233 mL AMG 300L	6 horas
CAM+AMG12	0,463 mL Fungamyl 800L + 1,233 mL AMG 300L	12 horas

Nos experimentos do segundo estudo, foram utilizados 10 g de amido de arroz nativo ceroso (C) e 10 g de amido de arroz nativo regular (R) e seguidos os procedimentos descritos anteriormente. Doze amidos de arroz porosos foram obtidos, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Formulações utilizadas para a obtenção dos amidos porosos do segundo estudo.

Formulação	Enzima	Tempo de reação
CAM3	0,925 mL Fungamyl 800L	3 horas
CAM6	0,925 mL Fungamyl 800L	6 horas
CAMG3	2,466 mL AMG 300L	3 horas
CAMG6	2,466 mL AMG 300L	6 horas
CAM+AMG3	0,463 mL Fungamyl 800L + 1,233 mL AMG 300L	3 horas
CAM+AMG6	0,463 mL Fungamyl 800L + 1,233 mL AMG 300L	6 horas
RAM3	0,925 mL Fungamyl 800L	3 horas
RAM6	0,925 mL Fungamyl 800L	6 horas
RAMG3	2,466 mL AMG 300L	3 horas
RAMG6	2,466 mL AMG 300L	6 horas
RAM+AMG3	0,463 mL Fungamyl 800L + 1,233 mL AMG 300L	3 horas
RAM+AMG6	0,463 mL Fungamyl 800L + 1,233 mL AMG 300L	6 horas

## 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS NATIVOS E POROSOS DE ARROZ

### 4.3.1 Composição Centesimal

A composição centesimal dos dois amidos de arroz nativos foi determinada de acordo com os métodos analíticos da Association of Official Analytical Chemists<sup>135</sup>. A determinação da umidade foi realizada pelo método de secagem em estufa de circulação de ar forçada a 105 °C até peso constante, calculado através da perda de massa, método n° 925.10. O resíduo mineral fixo, cinzas, foi determinado por incineração em forno mufla a 550 °C, método n° 923.03. Os lipídios, matéria-graxa, foram extraídos com éter etílico através do uso do Extrator *Soxhlet*, método n° 920.39. A quantificação da proteína residual foi determinada pelo método *Kjeldahl*, onde a amostra passa pelas etapas de digestão ácida, destilação e titulação, utilizando-se o fator de correção % N x 5,95, protocolo 2055. O conteúdo de fibra bruta foi determinado através de digestão ácida e básica da amostra desumidificada e desengordurada, método n° 962.09. O teor de carboidratos foi determinado por diferença. A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) a temperatura ambiente foi realizada em potenciômetro, previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, em soluções com concentração de 10 % de amostra, método n° 943.02. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 4.3.2 Conteúdo de Amilose

Os amidos de arroz nativos e porosos foram caracterizados pelo conteúdo de amilose por método colorimétrico, onde uma amostra de 100 mg foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, sendo acrescida de 1 mL de álcool etílico 96 % GL e 9 mL de solução de hidróxido de sódio 1 N e colocada em banho-maria a 100 °C por 10 minutos, sendo resfriada durante 30 minutos e o volume completado com água destilada. De cada amostra, foi retirada uma alíquota de 5 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL, em que foi adicionado 1 mL de ácido acético 1 N e 2 mL de solução de iodo 2 % (p/v) preparada três horas antes da análise, sendo, então, completado o volume de cada balão volumétrico com água destilada.

Para a construção da curva padrão, foi utilizado 40 mg de amilose pura (Sigma) submetida ao mesmo procedimento utilizado nas amostras de amido de arroz. Foram retiradas alíquotas de 1, 2, 3, 4, e 5 mL do balão volumétrico e foram acrescidos de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mL de ácido acético e de 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2 mL de iodo, respectivamente, completando-se o volume a 100 mL com água destilada. A leitura de absorvância foi realizada em espectrômetro Cary 60 UV-

Vis (Agilent Technologies, Estados Unidos da América), 30 minutos após adição da solução de iodo a 610 nm <sup>136,137</sup>.

### 4.3.3 Amido Danificado

Para a quantificação do amido danificado, em uma amostra de 9 g foi adicionado 45 mL de solução tampão ácido acético/acetato de sódio e 50 mg de  $\alpha$ -amilase, grau analítico, a mistura foi colocada em banho-maria a 30 °C por 25 minutos. Após, houve a adição de 3 mL de solução de ácido sulfúrico 3,58 N e 2 mL solução de tungstato de sódio 12 % (p/v) e filtração. Para a realização dos cálculos o mesmo procedimento foi seguido, porém sem a presença da enzima. A leitura dos sólidos solúveis totais, valor Brix, foi realizada imediatamente em refratômetro PAL-1 (Atago, Japão) previamente calibrado, utilizando a Equação 3 para expressar os resultados <sup>138</sup>.

$$\text{Amido\_Danificado\_ \%} = \frac{(\text{valorBrix}_{\text{Amostra}} - \text{valorBrix}_{\text{Branco}}) * V * F}{P} \quad (3)$$

Onde: V = volume do meio, 50 mL.

F = fator de conversão, 1,64.

P = massa de amostra.

### 4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos grânulos foi observada em microscópio eletrônico de varredura ZEISS EVO LS 15 (Zeiss International, Alemanha), usando voltagem de aceleração de 5 kV e alto vácuo. As amostras desidratadas foram então distribuídas uniformemente em suportes metálicos contendo fita adesiva dupla-faces e revestidas com uma camada de 10 nm de ouro.

As imagens foram tratadas e analisadas com o auxílio do software *Image J* (National Institute of Health, Estados Unidos), a partir de uma calibração prévia com um padrão de comprimento conhecido. Para evidenciar as fases e o tamanho dos grânulos foi utilizado o seguinte algoritmo: definição do comprimento, da linha a ser traçada *Straight Line Selection*, ampliação da imagem para melhorar o ajuste *Image Zoom*, comando analisar *Analyse*, seguido da seleção do subcomando medir *Measure*. Foram gerados histogramas com base nos comprimentos determinados em 30 grânulos com o intuito de verificar a distribuição granulométrica para as duas amostras de amido de arroz <sup>139</sup>.

Para evidenciar os contornos de grãos e porosidade superficial dos grânulos foi utilizado o seguinte algoritmo: ampliação da imagem para melhorar o ajuste *Image Zoom*, definição do grânulo, objeto a ser traçado *Freehand Selection*, eliminação do plano de fundo *Clear Outside*, limiarização da imagem separando as fases de interesse *Threshold*, comando analisar *Analyse*, seguido da seleção do subcomando *Set Measurements* e após *Analyses Particles*. Para a quantificação da porosidade superficial foram analisados 5 grânulos em cada uma das 3 imagens dos amidos nativos e porosos de arroz com o intuito de verificar a fração volumétrica dos poros e o diâmetro de Feret (distância entre duas retas paralelas que tangenciam cada poro) <sup>140,141</sup>.

#### 4.3.5 Granulometria por Difração a Laser

A distribuição de tamanho de partícula foi determinada através da espectroscopia de difração a laser, utilizando-se os equipamentos Hydro 2000 SM e Small Volume Sample Dispersion Unit (Malvern Instrument, Estados Unidos da América).

O volume da esfera equivalente é utilizado para medir o tamanho de uma partícula. O diâmetro desta esfera equivalente é considerado o tamanho da partícula. A unidade óptica captura o padrão real de espalhamento de um conjunto de partículas e então calcula o tamanho das partículas que geraram aquele padrão. Sabendo-se o tamanho de uma partícula e outros detalhes sobre sua estrutura, pode-se precisamente prever a forma que ela irá espalhar a luz. Cada tamanho de partícula terá o seu padrão de espalhamento característico.

O intervalo de determinação foi de 0,02  $\mu\text{m}$  a 2000  $\mu\text{m}$ , utilizando água destilada como meio dispersante e os parâmetros granulométricos foram determinados automaticamente para cada medição:

D[3,2], diâmetro médio de Sauter, superfície média das partículas;

D[4,3], diâmetro médio de Broucker, volume médio das partículas;

$d_{10}$ , diâmetro máximo apresentado por 10 % da distribuição granulométrica da amostra;

$d_{50}$ , diâmetro máximo apresentado por 50 % da distribuição granulométrica da amostra;

$d_{90}$ , diâmetro máximo apresentado por 90 % da distribuição granulométrica da amostra;

Fator Span, polidispersão,  $(d_{90} - d_{10})/d_{50}$  <sup>119,120</sup>.

#### 4.3.6 Capacidade de Adsorção

Cerca de 0,25 g de amido de arroz nativos e porosos foram adicionados a 11 mL de solução de violeta de metila ou azul de metileno, concentrações de 100 ppm e 400 ppm, respectivamente, e agitou-se durante 5 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos. A quantidade de violeta de metila ou azul de metileno não adsorvido foi quantificada por determinação da absorbância do sobrenadante em espectrômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, Estados Unidos da América) a 583 nm e 660 nm, respectivamente<sup>104,124</sup>. A capacidade de adsorção foi calculada usando a Equação 4.

$$\text{Capacidade de Adsorção} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} * 100\% \quad (4)$$

Onde:  $C_0$  = absorbância da solução inicial do corante.

$C_1$  = absorbância da solução do corante após a atuação do adsorvente.

#### 4.3.7 Porosimetria de Nitrogênio

As isotermas de adsorção de nitrogênio foram obtidas utilizando equipamento Gemini 2375 (Micromeritics, Estados Unidos da América). As medidas da área superficial específica foram efetuadas para pressões relativas de nitrogênio ( $P/P_0$ ) no intervalo de 0,05 a 0,35. As amostras (cerca de 150 mg) foram previamente desgasificadas por 12 horas a 50 °C e  $10^{-4}$  Pa. Os dados foram tratados pelo método Brunauer, Emmet e Teller (BET). Essas análises permitiram igualmente determinar a distribuição do volume de poros através da aplicação do método Barret, Joyner e Halenda (BJH)<sup>20,100</sup>.

#### 4.3.8 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram obtidos por FTIR utilizando o equipamento Shimadzu FTIR-8300 (Shimadzu Corporation, Japão) em modo de transmitância com 32 varreduras e  $4 \text{ cm}^{-1}$  de resolução, restrito à região do infravermelho médio de 4000 a  $500 \text{ cm}^{-1}$ . Para a análise foram preparadas pastilhas de aproximadamente 1 mm de espessura e 5 mm de diâmetro. A diluição a cerca de 1 % de amostra foi efetuada em brometo de potássio dessecado, utilizando um pastilhador e uma prensa hidráulica manual<sup>20,104</sup>. Os espectros foram convertidos em



absorbância, corrigindo a linha de base e traçando uma linha reta a 1200 e 800  $\text{cm}^{-1}$  para obter as razões de intensidade de absorbância R(1047/1022), R(1045/1022) e R(1022/995).

#### **4.3.9 Difração de Raio X (DRX)**

Análises de DRX foram realizadas em um difratômetro D500 (Siemens, EUA). O grau de cristalinidade das amostras foi estimado quantitativamente seguindo o método de Wei et al.<sup>142</sup> com modificações. Uma curva conectando as linhas de base dos picos foi plotada por computador no difratograma. A área dos picos a 5,6°, 15°, 17°, 18°, 20° e 23° a  $2\theta$  acima da curva traçada foi designada como a porção cristalina, e a área inferior entre a curva e a linha de base linear conectando os pontos de intensidade  $2\theta$  de 30° e 4° nas amostras foi definida como a seção amorfa. A área de pico de difração superior e a área de difração total foram integradas utilizando o Origin (OriginLab Corporation, EUA). A razão entre a área superior e a área de difração total foi tomada como o grau de cristalinidade.

#### **4.3.10 Espalhamento de Raio X a Baixos Ângulos (SAXS)**

Os experimentos de SAXS foram realizados nas linhas D2A e D11A no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) utilizando um comprimento de onda do feixe de  $\lambda=1,488$  nm. A distância amostra-detector foi de 3000 nm, cobrindo valores de  $q$  entre 0,04 a 1,5  $\text{nm}^{-1}$ . O tempo de exposição foi de 10 minutos. Amostras secas foram dispostas entre duas fitas Kapton e o feixe de raios X colimado foi passado através de uma câmara contendo o porta-amostras de aço inoxidável. Todas as medidas foram executadas à temperatura ambiente e um pó de behenato de prata foi utilizado como padrão de calibração para a distância detector-amostra, a inclinação e a posição do feixe direto.

Os dados foram ajustados por um fator de forma esférica de distribuição Gaussiana e um fator de estrutura de esfera dura com modelo de aproximação monodispersa utilizando o software SASFit (Paul Scherrer Institut, Suíça)<sup>143</sup>. A distribuição do tamanho foi ajustada usando o modelo de Schultz-Zimm aplicando o mesmo software.

#### 4.3.11 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica dos amidos de arroz nativos e porosos foi feita em equipamento DSC Q2000 (TA Instruments, Estados Unidos da América). Aproximadamente 25 mg de uma suspensão aquosa a 25 % de amido foram transferidas diretamente para uma panelinha de alumínio, a qual foi selada hermeticamente e deixada em repouso por 2 horas a 20 °C. A amostra foi aquecida de 40 °C a 95 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min, vazão de nitrogênio ultra-puro de 50 mL/min. Os parâmetros térmicos determinados foram:

$T_{onset}$ , temperatura inicial;

$T_{peak}$ , temperatura do pico ou temperatura de gelatinização;

$T_{endset}$ , temperatura final;

$\Delta H$ , entalpia <sup>144,145</sup>.

#### 4.3.12 Potencial Zeta

Foram suspensos 4 mg de cada amostra em 20 mL de água destilada. A suspensão sofreu agitação vigorosa e, após, sedimentação por 5 minutos. O sobrenadante com apenas as partículas mais finas em suspensão foi introduzido diretamente em célula capilar fechada (DTS 1060), realizando as leituras do potencial zeta no equipamento Zetamaster (Malvern Instrument, Estados Unidos da América) <sup>146</sup>.

### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados do presente estudo foram realizados no mínimo em duplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA), onde se obteve a média e o desvio padrão. As médias obtidas foram submetidas ao teste de comparação de médias, pelo teste t de Student ou teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %. Além disso, foram determinados o valor da probabilidade (valor P), indica correlações e nível de significância exato, o coeficiente de correlação de Pearson (r), mede o grau da relação linear entre duas variáveis e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), fornece a porcentagem de variação em uma variável que é explicada estatisticamente pela variação da outra variável. O tratamento estatístico foi realizado utilizando o software SPSS versão 18 (SPSS Inc., EUA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS NATIVOS DE ARROZ

A Tabela 5 mostra a composição centesimal dos dois amidos nativos de arroz pesquisados neste estudo. A quantidade de umidade, carboidratos, proteínas, lipídios, cinzas e fibra bruta foram similares aos resultados encontrados em outros estudos<sup>66,137,147,148</sup>. Os elevados valores de carboidratos se deve ao fato do arroz, assim como outros cereais, ser rico em carboidratos<sup>74,75</sup>.

Tabela 5: Composição centesimal dos amidos nativos de arroz.

	% em base seca					
	Umidade, %	Carboidratos, %	Proteínas, %	Lipídios, %	Cinzas, %	Fibra bruta, %
Ceroso	13,01 <sup>a</sup> ± 0,29	95,78 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup> ± 0,03	0,06 <sup>a</sup> ± 0,02	3,78 <sup>a</sup> ± 0,35	1,26 <sup>a</sup> ± 0,11
Regular	13,88 <sup>a</sup> ± 0,08	95,51 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup> ± 0,08	0,07 <sup>a</sup> ± 0,02	3,83 <sup>a</sup> ± 0,25	1,16 <sup>a</sup> ± 0,09

Resultados expressos como média ± desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As amostras Ceroso e Regular não diferiram significativamente na composição centesimal, Tabela 5, e nos valores de potencial zeta, Tabela 6. Entretanto, estes amidos apresentaram diferença significativa quanto ao conteúdo de amilose, amido danificado, diâmetro médio, temperatura de gelatinização, cristalinidade relativa e pH, Tabela 6. Os teores de amilose presentes nas duas amostras de amido nativo de arroz, apresentaram diferenças permitindo classificá-las como: amostra Ceroso como amido ceroso e amostra Regular como amido regular com baixo conteúdo de amilose<sup>74-76</sup>.

Tabela 6: Conteúdo de amilose, amido danificado, diâmetro médio, temperatura de gelatinização, cristalinidade relativa, pH e potencial zeta dos amidos nativos de arroz.

	Conteúdo de amilose, %	Amido danificado, %	Diâmetro médio, $\mu\text{m}$	Temperatura de gelatinização, $^{\circ}\text{C}$	Cristalinidade relativa, %	pH	Potencial zeta, mV
Ceroso	1,79 <sup>a</sup> $\pm$ 0,25	12,98 <sup>a</sup> $\pm$ 0,41	7,67 <sup>a</sup> $\pm$ 0,17	68,86 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	27,93 <sup>a</sup> $\pm$ 0,50	6,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	4,38 <sup>a</sup> $\pm$ 4,34
Regular	17,61 <sup>b</sup> $\pm$ 0,41	18,06 <sup>b</sup> $\pm$ 0,09	6,27 <sup>b</sup> $\pm$ 0,19	64,05 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	21,09 <sup>b</sup> $\pm$ 0,28	6,4 <sup>b</sup> $\pm$ 0,04	1,84 <sup>a</sup> $\pm$ 1,34

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Um maior teor de amido danificado é encontrado para os amidos de cereais quando comparado aos amidos de tubérculos e raízes, refletindo o efeito do processo de moagem<sup>111,149</sup>. O amido Regular apresentou maior percentual de amido danificado que o amido Ceroso, indicando que os grânulos do amido Regular sofreram mais danos durante o processo de moagem, forças de cisalhamento e compressão, a que foram submetidos seus grãos. Este tipo de alteração pode ser vista externamente ou até incluindo alterações internas do amido<sup>150</sup>. Valores mais baixos de amido danificado foram também detectados em amostras de amido ceroso por Tester<sup>151</sup>.

O dano causado pode ocasionar uma maior absorção de água e um aumento da quantidade de expansão do amido. Conforme as regiões amorfas do grânulo passam por estas tensões, pode ocorrer uma divisão da molécula de amilopectina, diminuindo o intumescimento do amido, facilitando a sua gelatinização<sup>152</sup>. Outro fator interferente na temperatura de gelatinização dos amidos de arroz é o grau de cristalinidade, como descrito por Amagliani et al.<sup>153</sup> e Tao et al.<sup>154</sup>. A estrutura cristalina dos grânulos de amido é formada pelo empacotamento de duplas hélices de amilopectina (estrutura ordenada de longo alcance). Como observado, maior quantidade de amilopectina deve ter maior cristalinidade<sup>113</sup>.

Os valores de pH em torno de 6,5 indicam caráter levemente ácido dos amidos nativos, não apresentando diferença significativa técnica e as temperaturas de gelatinização acima de 60  $^{\circ}\text{C}$  garantem que não haverá gelatinização dos grânulos durante o processo de obtenção do amido poroso, que nesta tese é conduzido a 50  $^{\circ}\text{C}$ .

O estudo utilizando a microscopia eletrônica de varredura, Figura 17, revelou, como esperado, que as características morfológicas do amido variam de acordo com a sua origem botânica<sup>155</sup>. Quanto à forma dos grânulos, as duas amostras de amido de arroz nativo apresentaram formato irregular e poligonal, com ângulos e contornos agudos. As superfícies dos

grânulos eram predominantemente lisas e planas ou ligeiramente côncavas, sendo observada a presença de raros poros<sup>145,156–158</sup>. As mesmas características morfológicas foram observadas nos grânulos de amido de arroz nativo, não diferindo entre ceroso e regular, o que corrobora com a literatura<sup>107,144,159</sup>. Os grânulos de amidos nativos apresentaram agregação devido a mecanismos de adesão, como ligações de hidrogênio, interações de *van der Waals* e forças eletrostáticas.

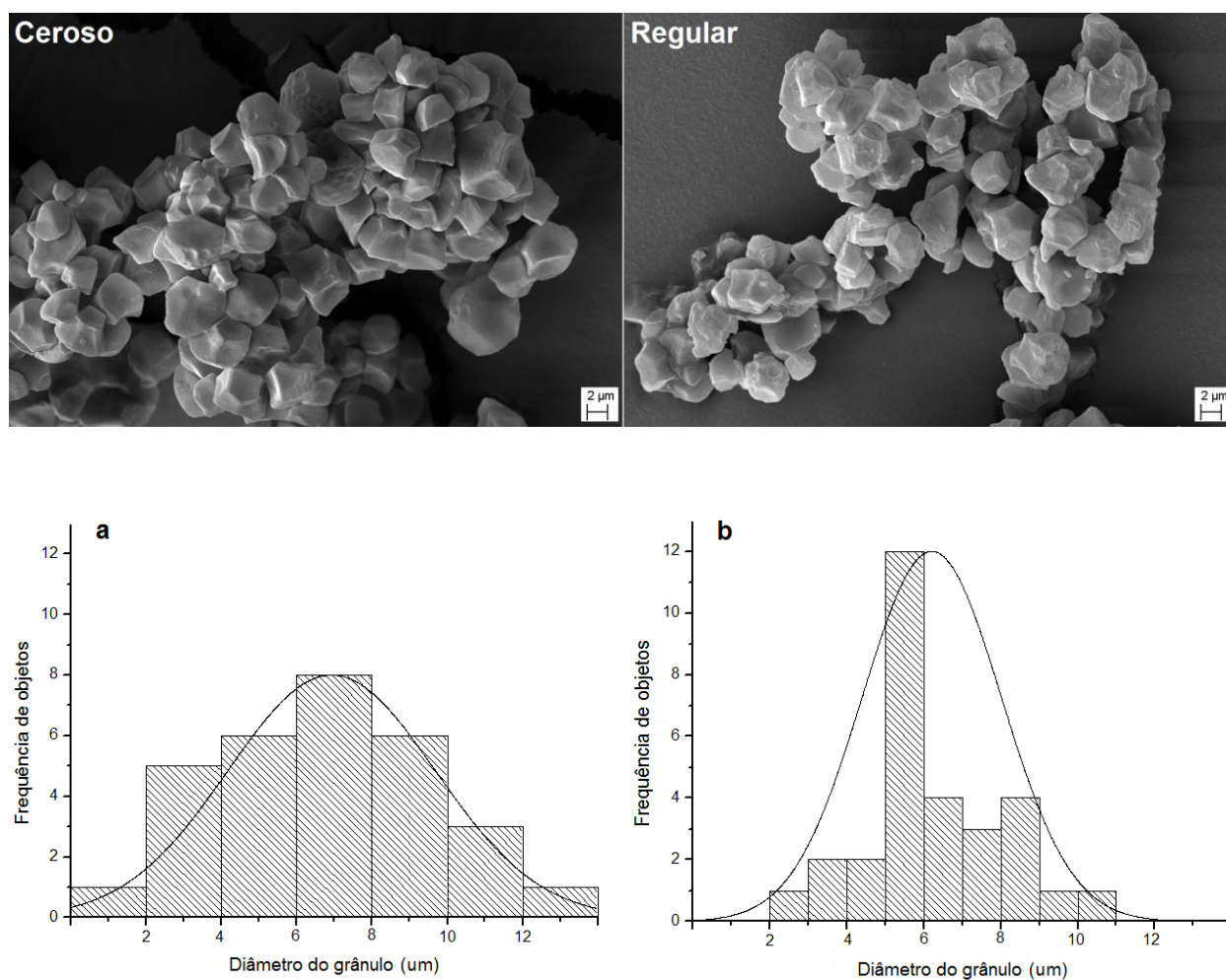


Figura 17: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura e histograma do tamanho dos grânulos dos amidos nativos de arroz Ceroso (a) e Regular (b).

Os histogramas do tamanho dos grânulos obtidos por tratamento das micrografias utilizando o software *Image J* confirmaram os valores indicados na literatura, geralmente diâmetros de 2 a 10 µm<sup>73,160</sup>.

Entretanto o amido Ceroso registrou maior valor médio de tamanho de grânulo (7,67 µm) e maior distribuição granulométrica (entre 1 µm a 13 µm) quando comparado ao amido Regular, concordando com Dhital et al.<sup>106</sup> e Zhu et al.<sup>161</sup>. A polidispersão é caracterizada pelo coeficiente

de variação da distribuição do tamanho de partícula e, portanto, está diretamente relacionada com os valores de uniformidade. Assim, a amostra Regular apresentou uma polidispersão menor quando comparado à amostra Ceroso, conforme histograma.

As diferenças encontradas para os dois amidos nativos de arroz caracterizados podem estar relacionadas à etapa de moagem do cereal. O método e o tipo de moinho irão determinar o tamanho das partículas do amido de arroz e também a quantidade de dano deste amido. O método de moagem empregado também afetará as propriedades funcionais do amido de arroz <sup>162</sup>.

## **5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS POROSOS - PRIMEIRO ESTUDO**

A eficiência da ação enzimática da  $\alpha$ -amilase e/ou amiloglucosidase sobre os grânulos de amido de arroz nativo ceroso foi comprovada através das micrografias obtidas no MEV, Figura 18. Nota-se que a agregação devido a mecanismos de adesão inicialmente observada no amido de arroz nativo ceroso não é mais evidente nos amidos porosos obtidos.

A porosidade produzida foi altamente dependente do tratamento enzimático aplicado, a  $\alpha$ -amilase provocou erosão superficial resultando em grandes cavidades (CAM3 e CAM6) já a amiloglucosidase provocou endocorrosão côncava, cavidades pontuais (CAMG3 e CAMG6). A combinação das duas enzimas (CAM+AMG3 e CAM+AMG6), resultou em poros rasos a profundos com o aumento do tempo de reação, confirmando o efeito sinérgico entre estas duas enzimas <sup>68,96</sup>.

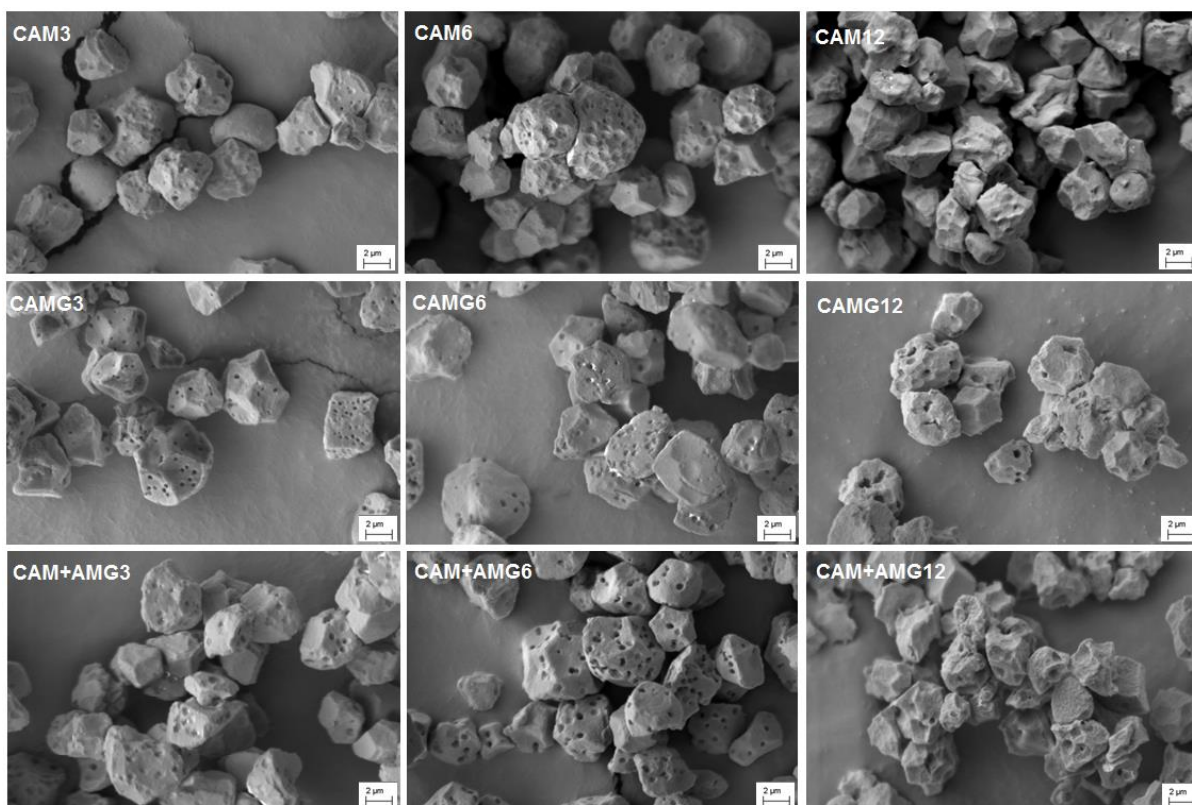


Figura 18: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

O tempo de reação de 12 horas (CAM12, CAMG12 e CAM+AMG12) foi excessivo, pois alterou o formato e diminuiu o tamanho dos grânulos consideravelmente, havendo o colapso do poro formado e o aparecimento de canais internos e até mesmo exocorrosão. Em alguns casos, foi identificado fratura parcial e surgimento de uma superfície rugosa que fragiliza a estrutura do grânulo.

A análise das micrografias utilizando o software *Image J*, Tabela 7, demonstrou que o maior valor de fração volumétrica de área média foi observado para a amostra CAM+AMG6. O uso da combinação de endo e exoenzimas pode ter efeitos sinérgicos que não são observados se apenas uma enzima for usada, nem mesmo em altas doses. Entretanto, os valores do diâmetro de Feret não indicaram diferença significativa entre as condições enzimáticas. Considerando que 1  $\mu\text{m}$  equivale a 1000 nm, o tratamento de imagem revelou diâmetros para os poros, principalmente macroporos, maiores que 50 nm, como descrito anteriormente<sup>29,30,163</sup>.

Tabela 7: Fração volumétrica da área média e diâmetro Feret do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

	Fração volumétrica, %	Diâmetro Feret, $\mu\text{m}$
Ceroso	-	-
CAM3	$3,37 \pm 1,13\text{b}$	$0,28 \pm 0,09\text{a}$
CAM6	$3,49 \pm 0,61\text{b}$	$0,29 \pm 0,08\text{a}$
CAM12	$2,79 \pm 0,66\text{b}$	$0,33 \pm 0,08\text{a}$
CAMG3	$4,84 \pm 1,47\text{ab}$	$0,22 \pm 0,04\text{a}$
CAMG6	$8,61 \pm 1,99\text{ab}$	$0,23 \pm 0,04\text{a}$
CAMG12	$11,85 \pm 1,42\text{a}$	$0,29 \pm 0,10\text{a}$
CAM+AMG3	$7,21 \pm 1,87\text{ab}$	$0,31 \pm 0,05\text{a}$
CAM+AMG6	$12,22 \pm 1,24\text{a}$	$0,34 \pm 0,05\text{a}$
CAM+AMG12	$5,57 \pm 1,29\text{ab}$	$0,45 \pm 0,10\text{a}$

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com estudos prévios<sup>90,98,164</sup>, a análise de porosimetria de nitrogênio confirmou que todas as condições enzimáticas investigadas conferem um efeito crescente na área superficial específica, volume total de poros e tamanho dos poros, Tabela 8. Desconsiderando as três condições enzimáticas aplicadas com tempo de reação de 12 horas, os amidos porosos apresentaram uma área superficial específica de 2,3 a 4,0 vezes e volume total de poros de 8,8 a 21,0 vezes maior quando comparados com a amostra nativa, sendo mais expressivos na amostra CAM + AMG6. O tamanho dos poros indicou uma faixa de distribuição de 45 a 65 Å, sugerindo a predominância de mesoporos com diâmetros entre 2 e 50 nm, como observado por Juszcak et al.<sup>17</sup>, Rouquerol et al.<sup>29</sup> e Ortiz<sup>32</sup>.



Tabela 8: Porosimetria de nitrogênio do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

	Área superficial específica, m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	Volume total do poro, 10 <sup>-3</sup> cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>	Tamanho do poro, Å
Ceroso	0,49 ± 0,02f	0,16 ± 0,01h	12,91 ± 0,03i
CAM3	1,24 ± 0,04e	1,40 ± 0,04g	61,86 ± 0,07f
CAM6	1,81 ± 0,01c	3,01 ± 0,03d	61,89 ± 0,08f
CAM12	2,01 ± 0,05b	3,52 ± 0,07c	68,34 ± 0,03c
CAMG3	1,15 ± 0,01e	1,69 ± 0,02f	58,95 ± 0,04g
CAMG6	1,54 ± 0,02d	2,48 ± 0,02e	64,34 ± 0,04e
CAMG12	2,09 ± 0,03b	3,78 ± 0,06b	72,35 ± 0,04a
CAM+AMG3	1,53 ± 0,04d	2,37 ± 0,04e	45,15 ± 0,03h
CAM+AMG6	1,98 ± 0,02b	3,37 ± 0,03c	65,71 ± 0,06d
CAM+AMG12	2,34 ± 0,01a	4,10 ± 0,03a	69,98 ± 0,06b

Resultados expressos como média ± desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Todos os amidos porosos apresentaram maiores valores de adsorção de corante em relação ao amido de arroz nativo, com maior retenção utilizando violeta de metila para as amostras tratadas com  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase e a combinação destas duas enzimas e azul de metileno para as amostras tratadas com  $\alpha$ -amilase, Tabela 9. As diferenças observadas na capacidade de adsorção do corante pelos amidos porosos podem ser atribuídas ao acesso desses corantes à superfície interna dos grânulos, considerando que o azul de metileno e o violeta de metila apresentam diferentes estruturas e tamanhos moleculares.

Tabela 9: Capacidade de adsorção do amido nativo e dos amidos porosos de arroz aos corantes violeta de metila e azul de metileno, primeiro estudo.

	Violeta de metila, %	Azul de metileno, %
Ceroso	52,0 ± 0,29d	52,7 ± 0,31d
CAM3	89,1 ± 0,88ab	91,7 ± 0,42a
CAM6	89,7 ± 0,74a	92,5 ± 0,57a
CAM12	86,3 ± 0,80bc	90,5 ± 0,55ab
CAMG3	87,0 ± 0,24ab	87,2 ± 0,27c
CAMG6	83,3 ± 0,62c	86,2 ± 0,89c
CAMG12	83,1 ± 0,26c	84,9 ± 0,25c
CAM+AMG3	87,2 ± 0,52ab	87,1 ± 0,74c
CAM+AMG6	87,4 ± 0,48ab	88,1 ± 0,94bc
CAM+AMG12	86,3 ± 0,57bc	85,3 ± 0,46c

Resultados expressos como média ± desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A molécula de azul de metileno ( $C_{16}H_{18}N_3SCl$ ) tem uma geometria retangular (comprimento de 1,6 nm; largura de 0,84 nm e espessura de 0,47 nm), Figura 19. Além disso, tem uma estrutura mais simples e dimensões menores que o violeta de metila ( $C_{24}H_{28}N_3Cl$ ), Figura 20<sup>98,104</sup>. Consequentemente, o favorecimento estérico pode ocorrer, resultando em uma maior capacidade de adsorção do azul de metileno do que o corante violeta de metila. Adicionalmente, a presença de grupos funcionais contendo grupamentos hidroxila na superfície dos amidos porosos pode também contribuir para as diferenças de adsorção dos corantes<sup>165</sup>.

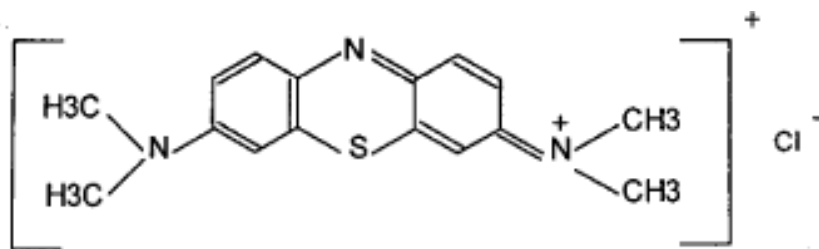


Figura 19: Estrutura química do corante azul de metileno<sup>166</sup>.

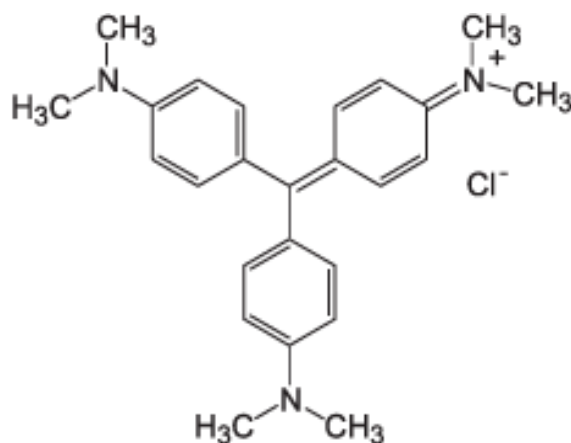


Figura 20: Estrutura química do corante violeta de metila <sup>167</sup>.

Com base nas dimensões do azul de metileno, sugere-se que os poros quantificados sejam, na maioria dos grânulos de amido, compostos de microporos com diâmetros menores que 2 nm <sup>29,30,168</sup>.

Através dos resultados apresentados pela microscopia eletrônica de varredura, porosimetria por nitrogênio e capacidade de adsorção houve evidência que os amidos porosos exibiram uma estrutura porosa em mais de um comprimento de escala, variando de 1,6 a 340 nm. Recentemente, Sujka <sup>169</sup> tratou com ultrassom grânulos de amido de várias origens botânicas, resultando em novos poros com diâmetros variando de 1,7 a 300 nm. Os múltiplos níveis de porosidade geralmente compreendem bimodalidades, tais como micro-meso, meso-macro e micro-macro, ou mesmo trimodalidades <sup>31,170</sup>. No presente trabalho, trimodalidades de tamanhos de poros foram reveladas (micro-meso-macro). A hierarquia de porosidade determina a funcionalidade e desempenho dos materiais porosos <sup>171,172</sup>.

De acordo com a Tabela 10 os dados de distribuição granulométrica obtidos por espectroscopia de difração a laser mostraram que a reação enzimática diminuiu os valores iniciais de D[3,2] e D[4,3], reduzindo a área superficial média de 10,9 para 28,9 % e o volume médio da partícula de amido de arroz nativa de 14,1 para 32,4 %. Os parâmetros  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  foram menores para todos os amidos porosos em comparação com a amostra Ceroso, confirmando que a reação enzimática afeta as dimensões dos grânulos, como observado por Kim et al. <sup>107</sup>.

Tabela 10: Granulometria por difração a laser do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

	D[3,2], $\mu\text{m}$	D[4,3], $\mu\text{m}$	$d_{10}$ , $\mu\text{m}$	$d_{50}$ , $\mu\text{m}$	$d_{90}$ , $\mu\text{m}$	Fator Span, $\mu\text{m}$
Ceroso	6,50 $\pm$ 0,09a	8,05 $\pm$ 0,15a	4,04 $\pm$ 0,05a	7,40 $\pm$ 0,11a	13,02 $\pm$ 0,26a	1,21
CAM3	5,25 $\pm$ 0,09cd	6,00 $\pm$ 0,11cd	3,49 $\pm$ 0,05bc	5,65 $\pm$ 0,10cd	8,98 $\pm$ 0,19cd	0,97
CAM6	5,11 $\pm$ 0,07cde	5,82 $\pm$ 0,09d	3,41 $\pm$ 0,05bc	5,49 $\pm$ 0,08de	8,66 $\pm$ 0,15d	0,96
CAM12	4,96 $\pm$ 0,01de	5,67 $\pm$ 0,01d	3,29 $\pm$ 0,01bcd	5,33 $\pm$ 0,01de	8,50 $\pm$ 0,01d	0,98
CAMG3	5,79 $\pm$ 0,09b	6,92 $\pm$ 0,28b	3,64 $\pm$ 0,03ab	6,40 $\pm$ 0,19b	10,93 $\pm$ 0,73b	1,14
CAMG6	5,54 $\pm$ 0,16bc	6,53 $\pm$ 0,23bc	3,54 $\pm$ 0,08abc	6,06 $\pm$ 0,19bc	10,16 $\pm$ 0,42bc	1,09
CAMG12	4,72 $\pm$ 0,33e	5,44 $\pm$ 0,17d	3,10 $\pm$ 0,39cd	5,08 $\pm$ 0,27e	8,26 $\pm$ 0,20d	1,02
CAM+AMG3	5,13 $\pm$ 0,10cde	5,99 $\pm$ 0,14cd	3,31 $\pm$ 0,05bcd	5,59 $\pm$ 0,11cde	9,23 $\pm$ 0,25cd	1,06
CAM+AMG6	4,88 $\pm$ 0,02de	5,64 $\pm$ 0,12d	3,19 $\pm$ 0,06bcd	5,28 $\pm$ 0,07de	8,60 $\pm$ 0,36d	1,02
CAM+AMG12	4,62 $\pm$ 0,02e	5,73 $\pm$ 0,03d	2,88 $\pm$ 0,01d	5,13 $\pm$ 0,02de	8,49 $\pm$ 0,07d	1,16

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A polidispersibilidade é caracterizada pelo coeficiente de variação da distribuição granulométrica e, quanto mais próximo de zero for o valor do fator de amplitude, mais uniforme é a distribuição de tamanho <sup>173,174</sup>. Neste estudo, os fatores de amplitude dos amidos porosos foram menores que os detectados na amostra de arroz nativo ceroso. Da mesma forma, Hernández-Jaimes et al. <sup>175</sup> relataram que esse efeito é típico de sistemas particulados.

A Figura 21 corresponde aos espectros de FTIR, onde facilmente percebe-se que a reação enzimática não alterou a estrutura molecular do amido de arroz, pois as bandas de absorção características dos grupos funcionais se mantiveram, tais como a banda intensa em 3440  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a absorção característica de O-H, uma banda em 1023  $\text{cm}^{-1}$  produzido pela absorção da vibração de estiramento de álcool secundário e outra banda em 2932  $\text{cm}^{-1}$  devido a absorção das vibrações de estiramento C-H. A banda em 1153  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada a absorção das vibrações de estiramento C-O. As bandas de absorção na região de 1450-1300  $\text{cm}^{-1}$  são contribuições das vibrações de curvatura C-H<sub>2</sub> e C-H, enquanto a região entre 1300-1100  $\text{cm}^{-1}$  está associada com a absorção das vibrações de estiramento C-O e C-C. Abaixo da região de

1100  $\text{cm}^{-1}$ , vibrações de curvatura C-O-H e vibrações de estiramento C-O foram detectadas, como relatado por vários pesquisadores<sup>20,101,116</sup>.

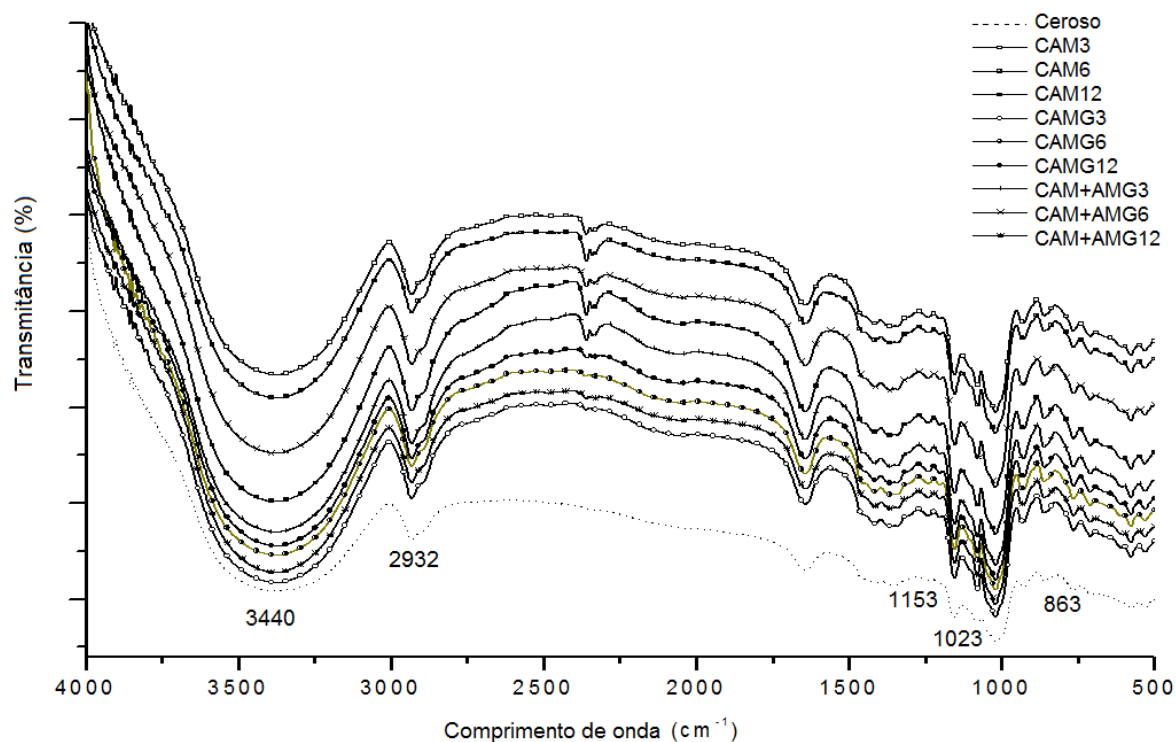


Figura 21: Espectros de FTIR transmitância do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

Mesmo não ocorrendo deslocamento nas bandas ou o aparecimento de novas bandas nos espectros, houve alteração nas intensidades das bandas de absorção devido ao aumento do número de poros e à diminuição da densidade de amido granular. Zhang et al.<sup>104</sup> e Li et al.<sup>105</sup> publicaram resultados semelhantes, usando amidos de diferentes fontes botânicas. As bandas de absorbância a 1047 e 1022  $\text{cm}^{-1}$  são características das estruturas cristalina e amorfa no amido, respectivamente, e a razão (R) de 1047  $\text{cm}^{-1}$  / 1022  $\text{cm}^{-1}$  foi usada para expressar a proporção de domínios cristalinos para domínios amorfos nos amidos<sup>116,145,156</sup>. A Figura 22 revela que todos os amidos porosos apresentam um maior R (1047/1022) do que o amido nativo de arroz ceroso, o que reflete uma maior ordem de curto alcance e domínios mais ordenados. A região amorfa foi mais suscetível à digestão por  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase que as regiões cristalinas no processo de hidrólise enzimática.

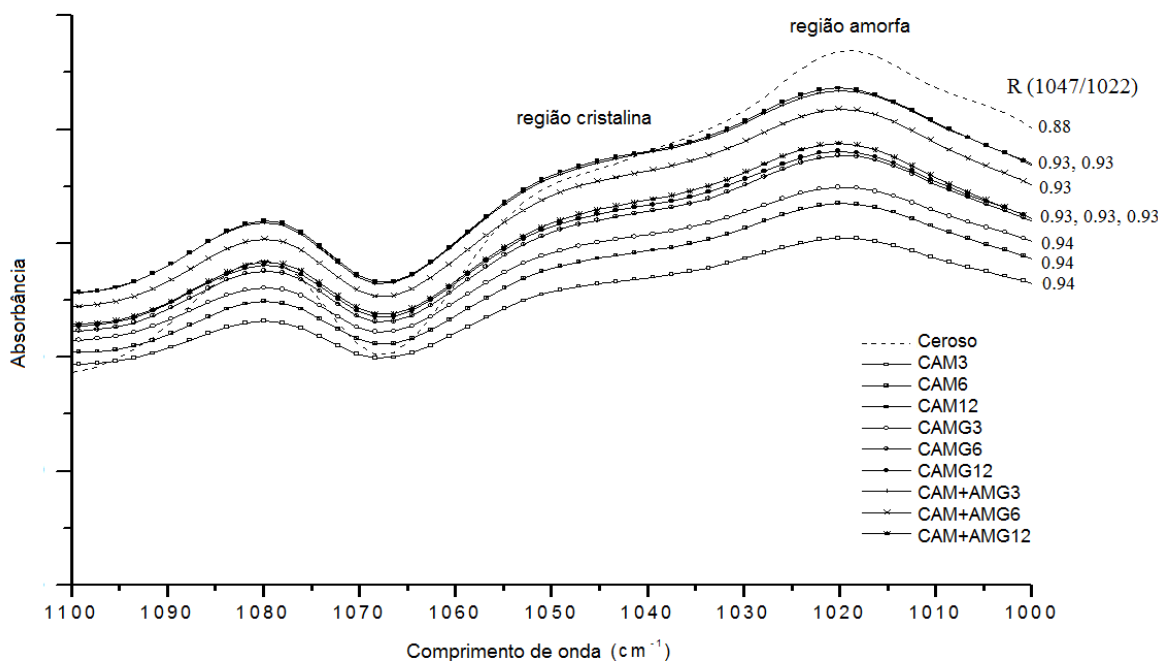


Figura 22: Espectros de FTIR absorbância do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

A técnica de espalhamento de raios X pode ser dividida em espalhamento de raios X a altos ângulos (WAXS, *wide angle X ray scattering*) e espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS, *small angle X ray scattering*). Ambas não apresentam diferenças físicas fundamentais. Entretanto, em experimentos de SAXS, os ângulos de espalhamento acessados são muito menores, o que possibilita a caracterização de materiais em uma escala de comprimento consideravelmente maior.

Os experimentos de SAXS são utilizados para estudar detalhes estruturais de sistemas com comprimentos de correlação na região entre 0,5 e 50 nm, enquanto que experimentos de WAXS revelam basicamente correlação a um nível atômico intramolecular (na ordem de poucos ângstroms) <sup>176,177</sup>.

A elucidação de correlações entre as propriedades texturais dos amidos porosos de arroz preparados foi analisada através das curvas de SAXS, Figura 23, onde é possível investigar a estrutura multi-escala de partículas fractais através do perfil de intensidade de espalhamento de raio X. Um ajuste unificado deve ser utilizado para a interpretação da organização em diferentes escalas de tamanho da estrutura hierárquica. Nesse procedimento de ajuste, a curva de espalhamento é ajustada pela utilização tanto de um, quanto de diversos níveis consecutivos, no caso do estudo dois níveis de organização podem ser identificados. Cada nível é composto por

uma região do tipo Guinier, que permite estimativas do raio de giro ( $R_g$ ), e uma região linear com decaimento seguindo a chamada de Lei de Potências, permitindo a avaliação de detalhes sobre a organização do material ( $\alpha$ ). Pode-se dizer que as amostras analisadas apresentaram o mesmo comportamento nos níveis 1 e 2.

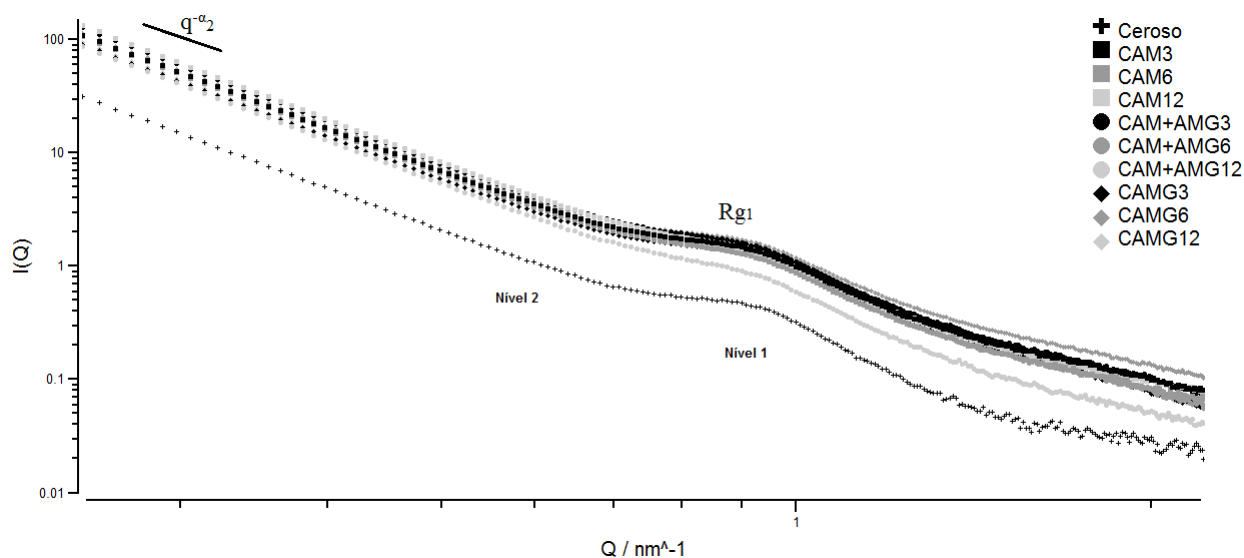


Figura 23: Curvas de espalhamento de raios X do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

Observa-se um aumento da intensidade de espalhamento de raio X a baixos ângulos SAXS, Figura 23, com o processo de reação enzimática, expressando a presença de uma estrutura em rede de larga-escala, ou em outras palavras, um alto grau de agregação intermolecular. Novas interações intermoleculares podem estar presentes nos amidos porosos formados, além do aumento da região cristalina em relação à região amorfa da amostra Ceroso, resultando no fortalecimento da estrutura e organização de rede.

Através do ajuste do nível 1 pode-se determinar o  $R_g$  das partículas primárias. O nível 2 fornece informação sobre a organização dessas partículas. A estrutura do aglomerado de partículas primárias que constituem o nível 2 pode ser obtida através da análise do expoente da lei de potências ( $I \propto q^{-\alpha}$ ) na curva de espalhamento, conforme Tabela 11.

Tabela 11: Raio de giro e expoente da lei de potência das curvas ajustadas de SAXS do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

	Rg <sub>1</sub> , nm	α <sub>2</sub>
Ceroso	6,9 ± 0,2	3,9
CAM3	6,8 ± 0,3	3,6
CAM6	6,8 ± 0,1	3,6
CAM12	6,7 ± 0,2	3,6
CAMG3	6,5 ± 0,4	3,7
CAMG6	6,5 ± 0,2	3,8
CAMG12	6,6 ± 0,2	3,8
CAM+AMG3	6,7 ± 0,2	3,7
CAM+AMG6	6,7 ± 0,2	3,7
CAM+AMG12	6,4 ± 0,2	3,8

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Todos os valores de Rg dos amidos porosos de arroz diminuiram, comprovando a redução de tamanho das partículas primárias. Se o expoente da lei de potências estiver entre 1,0 e 3,0 as partículas secundárias apresentam uma estrutura fractal de massa; quando o expoente estiver entre 3,0 e 4,0 diz-se que as partículas secundárias possuem uma estrutura fractal de superfície; no caso de um expoente igual a 4,0, tem-se partículas secundárias com núcleo denso e superfície uniforme, Figura 24. A reação enzimática é responsável por este aumento na rugosidade do amido de arroz.

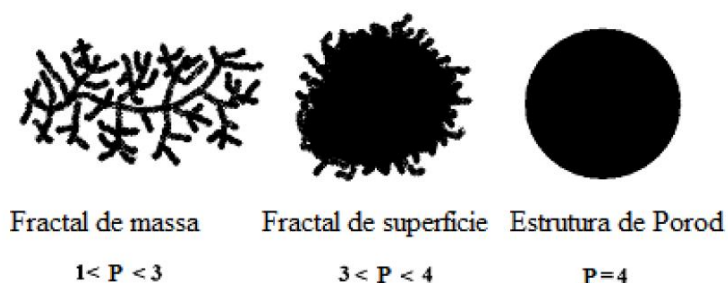


Figura 24: Representações das diferentes morfologias das partículas secundárias de materiais à base de sílica<sup>176</sup>.



A avaliação da estabilidade térmica por DSC, Figura 25, revelou o fenômeno endotérmico da gelatinização, onde uma suspensão de amido é aquecida em excesso de água e uma temperatura específica ( $T_g$ , temperatura de transição vítrea) é atingida, determinadas regiões do grânulo sofrem a transição de fase do estado vítreo para um estado amorfo mais elástico, menos viscoso <sup>178</sup>.

Com o aumento da temperatura, água penetra nos grânulos de amido, o que resulta na quebra das ligações de hidrogênio intermolecular e intramoleculares, intumescendo o grânulo. As moléculas de água podem entrar livremente na região amorfa do amido, considerando que a região cristalina não permite a entrada de água de uma maneira geral. No entanto, sob os efeitos de temperatura a água consegue penetrar, a região cristalina é difundida e as cadeias de amido são separadas da forma amorfa, o que leva a diminuição do número e tamanho da região cristalina e a região amorfa aumenta no processo de gelatinização. Até a região cristalina desaparecer e a água entrar completamente no interior do amido, o tempo do processo é longo <sup>104,175</sup>. A diminuição nos valores de  $\Delta H$ , principalmente com amostras tratadas com amiloglucosidase, poderia refletir a perda de duplas hélices e alguns cristalitos. Além disso, o derretimento de cristais imperfeitos à base de amilopectina, com potenciais contribuições das entalpias de empacotamento de cristal e de dupla hélice, são relatados por Xiao et al. <sup>93</sup>.

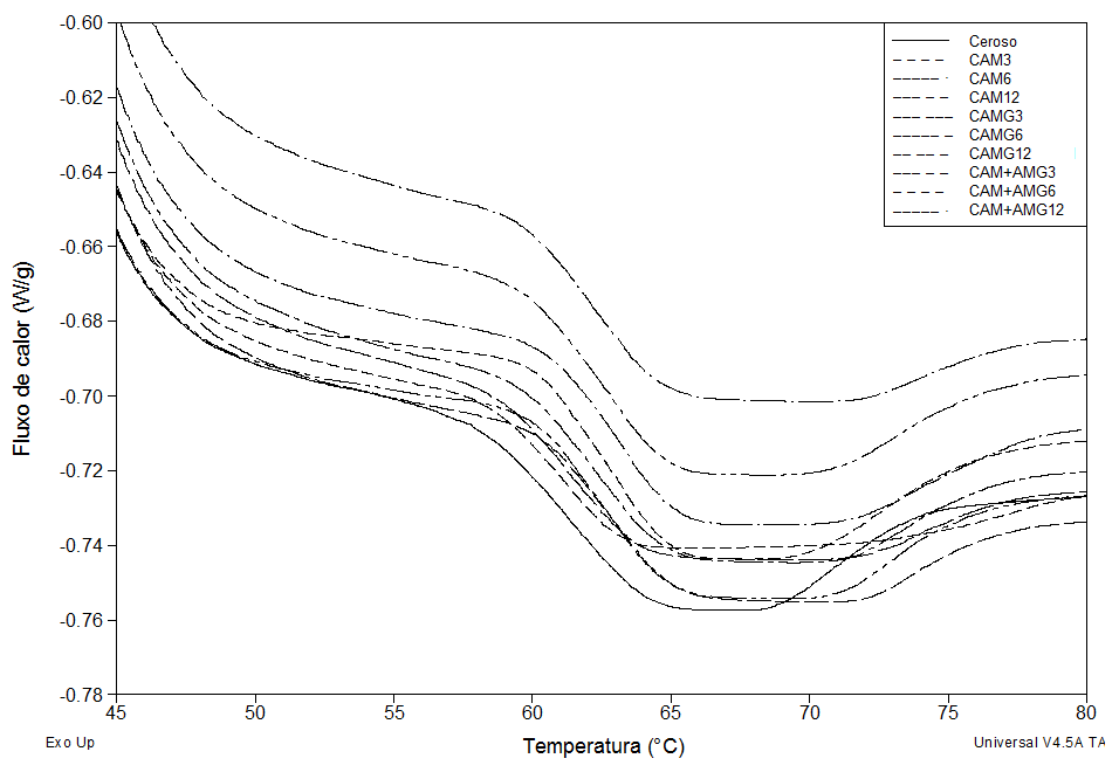


Figura 25: Termogramas de DSC do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

A estabilidade térmica ( $T_o$ ,  $T_p$  e  $T_c$ ) e entalpia de gelatinização ( $\Delta H$ ) de transição de fase para os amidos nativo e porosos de arroz ceroso estão resumidas na Tabela 12. Todos os amidos porosos apresentaram temperaturas de transição térmica mais alta que a amostra Ceroso, em concordância com observações anteriores de Malucelli et al. <sup>102</sup> e Li et al. <sup>105</sup>. Em contraste, Dura et al. <sup>96</sup> observaram comportamento térmico específico de acordo com a enzima utilizada, com menores temperaturas de gelatinização para aqueles tratados com amilase e maiores temperaturas de gelatinização para amidos digeridos com amiloglucosidase, enquanto Benavent-Gil & Rosell <sup>91</sup> encontraram baixas temperaturas de gelatinização usando amilose e amiloglucosidase. O aumento da cristalinidade está diretamente associado à hidrólise enzimática, pois esse processo remove regiões amorfas do grânulo de amido, concentrando a fração da região cristalina <sup>98,103,145</sup>. Uma maior porcentagem de cristalinidade leva a um maior empacotamento nos grânulos. Esta embalagem mais densa impede a transferência de calor e massa, o que resulta em uma temperatura de fusão mais alta <sup>101</sup>. Temperaturas de gelatinização elevadas indicam grânulos de amido com maior estabilidade e resistência <sup>98</sup>.

Tabela 12: Temperaturas e entalpia de gelatinização do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

	$T_o$ , °C	$T_p$ , °C	$T_c$ , °C	$\Delta H$ , J/g
Ceroso	57,84 ± 0,02e	65,83 ± 0,04d	83,24 ± 0,25d	4,21 ± 0,01a
CAM3	59,92 ± 0,01c	66,26 ± 0,03c	86,14 ± 0,01b	4,24 ± 0,01a
CAM6	60,41 ± 0,01b	66,48 ± 0,01b	85,13 ± 0,01c	3,98 ± 0,01cd
CAM12	60,75 ± 0,15a	66,68 ± 0,02a	87,24 ± 0,03a	4,02 ± 0,02bc
CAMG3	58,67 ± 0,03d	66,07 ± 0,02c	85,28 ± 0,01c	3,95 ± 0,03cde
CAMG6	59,86 ± 0,03c	66,26 ± 0,01c	86,35 ± 0,13b	3,89 ± 0,03de
CAMG12	60,25 ± 0,04b	66,64 ± 0,01a	84,89 ± 0,04c	3,85 ± 0,02e
CAM+AMG3	58,74 ± 0,08d	66,31 ± 0,01c	85,08 ± 0,02c	4,18 ± 0,03a
CAM+AMG6	59,61 ± 0,04c	66,55 ± 0,03ab	85,09 ± 0,01c	4,13 ± 0,02ab
CAM+AMG12	60,29 ± 0,01b	66,64 ± 0,04a	86,00 ± 0,01b	3,84 ± 0,02e

Resultados expressos como média ± desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os valores de  $\Delta H$  refletem majoritariamente a perda das ligações duplas hélices <sup>100</sup>. Maiores temperaturas de gelatinização resultam em maiores valores de entalpia de gelatinização, o que não foi observado neste trabalho. Este fato pode ser relacionado com o baixo teor de amilose presente na amostra Ceroso <sup>179</sup>.

O estudo do potencial de superfície foi realizado através da determinação do potencial zeta, que representa o potencial elétrico no plano de cisalhamento quando a partícula está em movimento sob ação de um campo elétrico. Geralmente, quando todas as partículas têm alto potencial zeta, positivo ou negativo (onde a positividade e negatividade é maior ou menor do que +20 mV e -20 mV), elas repelem-se mutuamente e a dispersão é estável. Por outro lado, quando as partículas possuem baixos valores em módulo de potencial zeta, não há força para impedir as partículas de se agregarem <sup>146</sup>.

A Figura 26 mostra que, na maioria dos casos, a reação enzimática aumentou a magnitude do potencial zeta, contribuindo para maior estabilidade das suspensões. A amostra Ceroso apresentou um potencial zeta de -14,4 mV e a amostra CAM + AMG6, um potencial zeta de -24,6 mV, uma alteração que garante o equilíbrio eletrostático de suspensões pouco concentradas. Mohammad & Razavi <sup>180</sup> e Sun et al. <sup>181</sup> relataram que dependendo do tipo de amido e das condições de processamento, uma parte das cadeias de polímeros de carboidratos pode sair e certos grupos funcionais podem ser adicionados, causando alterações na superfície dos grânulos de amido, caracterizados por um aumento no potencial zeta absoluto. Silveira et al. <sup>182</sup> relataram que os valores do potencial zeta de  $\pm 30$  mV são uma característica dos sistemas de liberação de fármacos com boa estabilidade em suspensão. Além disso, outros estudos mostraram que material com um potencial zeta negativo é mais acessível para a fixação de grupos funcionais do que superfícies sem carga ou mesmo aquelas com carga elétrica positiva <sup>146,183</sup>.

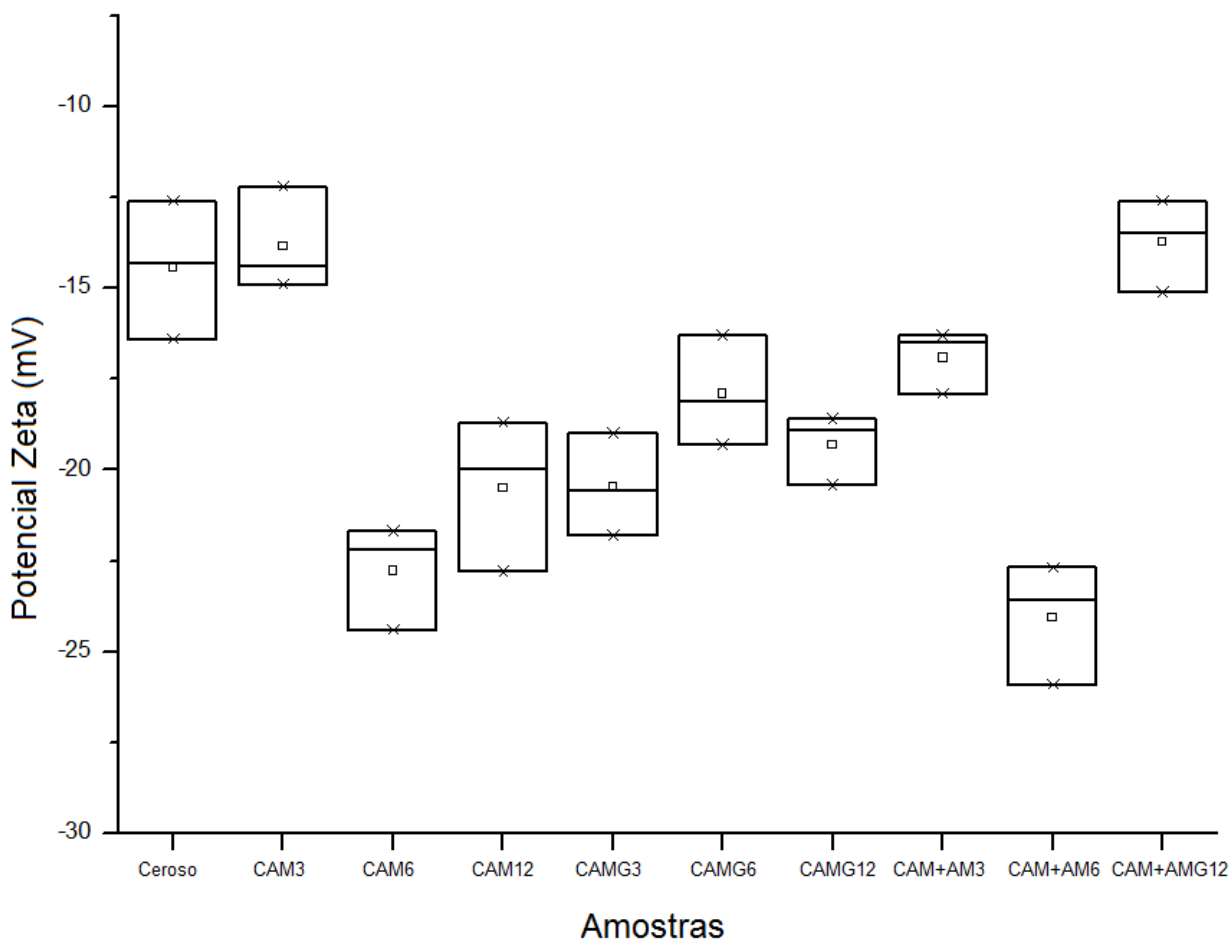


Figura 26: Potencial zeta do amido nativo e dos amidos porosos de arroz, primeiro estudo.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS POROSOS - SEGUNDO ESTUDO

A eficiência da ação da AM, AMG e AM+AMG nos amidos de arroz nativos foi confirmada através das micrografias de todos os amidos porosos, Figura 27. Neste segundo estudo, a porosidade e a distribuição do tamanho dos poros gerados foram altamente dependentes do tratamento enzimático aplicado e do conteúdo de amilose presente nas amostras de amidos. Esta mesma afirmação pode ser encontrada em estudos anteriores <sup>106,108,109,161</sup>. No amido ceroso, como observado no primeiro estudo, a AM criou uma erosão superficial resultando em cavidades largas (Figura 27 CAM3 e CAM6), a AMG causou endocorrosão côncava com cavidades pontuais (Figura 27 CAMG3 e CAMG6) e a combinação das enzimas (Figura 27 CAM+AMG3 e CAM+AMG6) resultou em rasos a profundos poros. O efeito sinérgico entre estas duas enzimas em amido nativo de milho foi reportado por Gao et al. <sup>101</sup> e Malucelli et al. <sup>102</sup>. De um modo geral, a ação enzimática da AM (Figura 27 RAM3 e RAM6) e AMG (Figura 27 RAMG3 e

RAMG6) sobre os grânulos de amido nativo regular provocaram a formação de profundas cavidades em poucos grânulos, enquanto maior ataque superficial foi observado usando AM+AMG (Figura 27 RAM+AMG3 e RAM+AMG6). Quando o amido regular foi tratado com a combinação enzimática, o formato dos grânulos foi alterado consideravelmente. Os grânulos mostraram fratura parcial e uma superfície rugosa, fragilizando a estrutura. Zeng et al.<sup>184</sup> sugeriram que a hidrólise enzimática dos grânulos de amido nativo não é homogênea. Neste estudo, a heterogeneidade foi mais pronunciada no amido nativo regular do que no amido nativo ceroso.

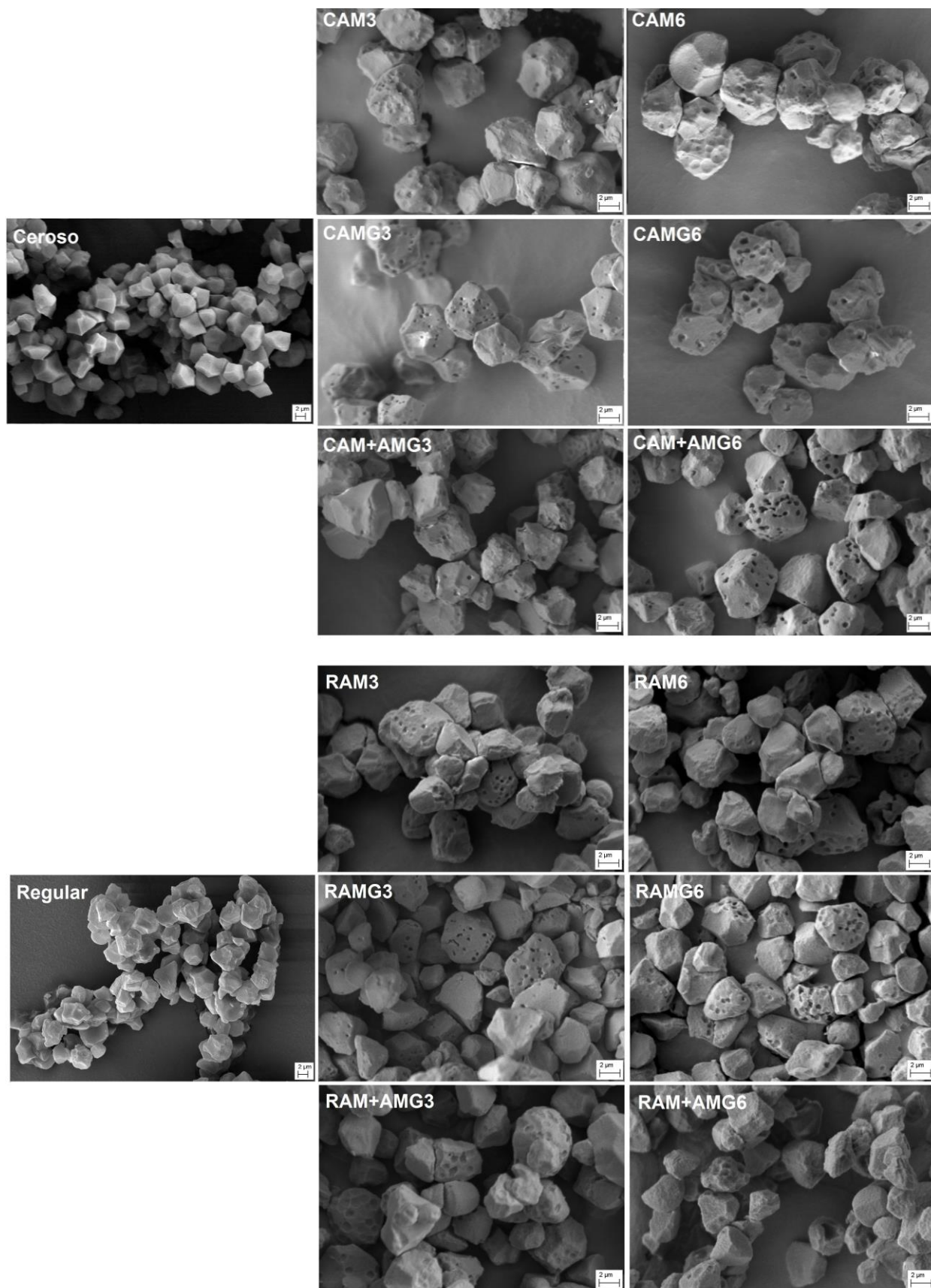


Figura 27: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.

A Tabela 13 mostra que o diâmetro médio dos grânulos foi menor para todos os amidos porosos quando comparados à amostra de amido nativo ceroso, com exceção da amostra CAM3. Isto confirma que a reação enzimática afeta as dimensões do grânulo, como notado por Dhital et al.<sup>106</sup>. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado nos amidos porosos obtidos da amostra de amido nativo regular. O amido nativo regular ofereceu maior resistência ao ataque enzimático do que o amido nativo ceroso, sendo apenas observado diminuição no diâmetro médio dos grânulos das amostras RAM+AMG3 e RAM+AMG6. Kim et al.<sup>107</sup> relataram que amidos cerosos de arroz em processos de hidrólise enzimática acima de 3 horas sofrem drástica redução do tamanho dos grânulos em volume e na distribuição granulométrica dos mesmos, e sutis alterações de dimensão em processos de hidrólise enzimática acima de 9 horas. As análises de correlação indicaram que a variedade do amido de arroz (teor de amilose) afetou significativamente o diâmetro médio dos grânulos,  $p < 0,05$ . Todavia, não há tendência associada ao tipo de enzima e tempo de reação.

O tratamento das imagens não revelou mudanças significativas nos valores de diâmetro Feret entre as amostras, porém o aumento na fração volumétrica porosa na amostra CAM+AMG6 merece destaque. A utilização da combinação de endo e exoenzimas afetou consideravelmente o amido nativo ceroso, visivelmente observados através das micrografias. O valor P indicou que a fração volumétrica porosa bem com o diâmetro Feret foram significativamente afetados pelo tipo de enzima ( $p < 0,05$ ), enquanto nenhuma correlação foi detectada pela classe de amilose do amido de arroz e tempo de reação, Tabela 13.

Tabela 13: Diâmetro médio, fração volumétrica e diâmetro Feret dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.

	Diâmetro médio, µm	Fração volumétrica, %	Diâmetro Feret, µm
Ceroso	7,67 ± 0,17a	-	-
CAM3	7,06 ± 0,19ab	3,43 ± 1,09b	0,23 ± 0,07a
CAM6	6,43 ± 0,18b	3,48 ± 0,72b	0,26 ± 0,08a
CAMG3	6,77 ± 0,13b	4,81 ± 1,39ab	0,23 ± 0,04a
CAMG6	6,49 ± 0,11b	7,59 ± 1,89ab	0,28 ± 0,05a
CAM+AMG3	6,51 ± 0,15b	7,23 ± 1,77ab	0,32 ± 0,05a
CAM+AMG6	6,41 ± 0,18b	12,32 ± 1,34a	0,35 ± 0,04a
Regular	6,27 ± 0,19a	-	-
RAM3	5,98 ± 0,18ab	3,67 ± 1,04a	0,21 ± 0,05a
RAM6	5,95 ± 0,18ab	3,43 ± 1,42a	0,23 ± 0,04a
RAMG3	5,64 ± 0,13ab	4,56 ± 0,97a	0,20 ± 0,07a
RAMG6	5,38 ± 0,16ab	6,92 ± 1,59a	0,26 ± 0,08a
RAM+AMG3	5,28 ± 0,20b	6,85 ± 1,06a	0,35 ± 0,03a
RAM+AMG6	5,26 ± 0,19b	5,65 ± 1,38a	0,31 ± 0,03a
<i>Valor P</i> Classe de amilose	0,0001	0,3701	0,5637
<i>Valor P</i> Tipo de enzima	0,2724	0,0078	0,0009
<i>Valor P</i> Tempo de reação	0,5551	0,3064	0,6376

Resultados expressos como média ± desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Os tratamentos enzimáticos aplicados na obtenção dos amidos porosos sofreram influência do conteúdo de amilose; diferenças significativas foram detectadas entre as amostras de amido nativo de arroz, Tabela 14. Comparado ao amido nativo ceroso, o conteúdo de amilose de seus amidos porosos foi dramaticamente diminuído de 65 % na amostra CAM+AMG3 até 86 % na amostra CAMG6. Entretanto, aplicando a mesma comparação com o amido nativo regular, o conteúdo de amilose de seus amidos porosos teve menor redução, de 23 % a 56 % nas mesmas condições enzimáticas, RAM+AMG3 e RAMG6, respectivamente. Os dados experimentais apontados corroboram com a literatura <sup>106,111</sup>, ou seja, amidos com baixo teor de amilose são tipicamente mais facilmente digeridos enzimaticamente do que amidos com alto conteúdo de amilose. De acordo com Zhu et al. <sup>161</sup>, amido de arroz com teor intermediário de amilose já apresenta conteúdo de amilose suficiente e cadeias longas de amilopectina capazes de formar duplas hélices e cristalitos mais estáveis, aumentando a resistência ao ataque enzimático.

Benavent-Gil & Rosell <sup>97</sup> observaram que AM hidrolisa preferencialmente as cadeias de amilose nos amidos de arroz, fato que resulta na diminuição deste polímero, pois a amilose está localizada nas regiões amorfas. Além disso, quando a mesma amostra foi hidrolisada por AMG o conteúdo de amilose aumentou. Isto sugere que as cadeias de amilopectina do amido de arroz são atacadas devido a amilopectina ter muito mais extremidade redutora da cadeia. Entretanto, neste estudo, amidos hidrolisados com conteúdo de amilose similar não apresentaram o mesmo comportamento, sugerindo que as cadeias de amilose e amilopectina foram simultaneamente degradadas pelas enzimas. Também, a diminuição no conteúdo de amilose foi independente do tratamento enzimático aplicado, em concordância com observações prévias <sup>108,109</sup>.

Tabela 14: Conteúdo de amilose, amido danificado e cristalinidade relativa dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.

	Conteúdo amilose, %	Amido danificado, %	Cristalinidade relativa, %
Ceroso	1,79 ± 0,25a	12,98 ± 0,41a	27,93 ± 0,50bc
CAM3	1,82 ± 0,13a	12,75 ± 0,22a	29,81 ± 0,42ab
CAM6	0,34 ± 0,20b	12,67 ± 0,15a	28,32 ± 0,38abc
CAMG3	0,48 ± 0,23b	12,73 ± 0,38a	28,40 ± 0,32abc
CAMG6	0,25 ± 0,19b	13,32 ± 0,29a	28,42 ± 0,26abc
CAM+AMG3	0,62 ± 0,11b	12,76 ± 0,34a	29,95 ± 0,48ab
CAM+AMG6	0,26 ± 0,20b	12,82 ± 0,24a	30,73 ± 0,59a
Regular	17,61 ± 0,41a	18,06 ± 0,09a	21,09 ± 0,28a
RAM3	17,23 ± 0,14a	9,04 ± 0,22c	21,10 ± 0,37a
RAM6	13,19 ± 0,24b	7,26 ± 0,17d	21,10 ± 0,28a
RAMG3	9,96 ± 0,21c	12,75 ± 0,27b	18,89 ± 0,33bc
RAMG6	7,76 ± 0,42d	7,87 ± 0,19d	17,86 ± 0,17c
RAM+AMG3	13,55 ± 0,25b	7,24 ± 0,14d	20,10 ± 0,42ab
RAM+AMG6	12,79 ± 0,32b	5,46 ± 0,10e	19,23 ± 0,18bc
<i>Valor P</i> Classe de amilose	< 0,0001	0,0011	< 0,0001
<i>Valor P</i> Tipo de enzima	0,4718	0,5740	0,6622
<i>Valor P</i> Tempo de reação	0,7089	0,3441	0,8918

Resultados expressos como média ± desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os valores de amido danificado, Tabela 14, não diferem entre hidrolisado e não hidrolisado amido ceroso de arroz, mas diferem entre hidrolisado e não hidrolisado amido regular de arroz. Comportamento similar foi observado por Benavent-Gil & Rosell<sup>91</sup> e Dura et al.<sup>96</sup> com amidos de milho. Os amidos de cereais geralmente são compostos por grânulos íntegros, contendo pequenas quantidades de vários tipos de grânulos danificados e fragmentos das moléculas poliméricas do amido. O dano mecânico dos grânulos de amido provavelmente ocorre por dois motivos distintos. Primeiro, há formação de fissuras que permitem a passagem de água nos grânulos e moléculas poliméricas do amido e, eventualmente resultam em grânulos fragmentados. Estes fragmentos podem intumescer facilmente com água fria, levando a formação de gel. Em segundo lugar, o dano mecânico despolimeriza as moléculas de amilopectina criando fragmentos solúveis em água de baixo peso molecular<sup>111,151,185</sup>.

A quantidade de amido danificado é geralmente maior que a quantidade de carboidrato solúvel. Este fato demonstra que existe um maior grau de integridade estrutural em grânulos de amido danificados do que baseado na susceptibilidade à erosão pela  $\alpha$ -amilase. Quando os grânulos de amido estão danificados, a clivagem do grânulo facilita a hidratação e o intumescimento. Isso estará associado à fratura progressiva da amilopectina e ao aumento da solubilização, que diminuirá gradativamente o potencial de inchamento, sendo mais suscetível à amilólise<sup>186,187</sup>.

Os difratogramas de raio X dos amidos cerosos e regulares não hidrolisados e hidrolisados por AM, AMG e AM/AMG são visualizados na Figura 28. Tradicionalmente, a maioria dos cereais faz parte do chamado padrão tipo A; alguns tubérculos, raízes, amidos retrogradados e de cereais com alto teor de amilose são classificados como padrão tipo B, já os amidos de leguminosas produzem geralmente o padrão tipo C. Alguns autores definem o padrão de difração do amido do tipo C como uma combinação de polimorfismo do tipo A e B. O amido do tipo A apresenta fortes picos de difração em  $15^\circ$  e  $23^\circ 2\theta$ , e um duplete não resolvido em  $17^\circ$  e  $18^\circ 2\theta$ . O amido do tipo B confere forte pico de difração em  $17^\circ 2\theta$ , alguns pequenos picos em  $15^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $22^\circ$  e  $24^\circ 2\theta$ , e um característico pico em  $5,6^\circ 2\theta$ <sup>73,75,147</sup>. Neste estudo, todas as amostras de amido de arroz, tanto nativos como porosos, possuem o típico padrão de difração do tipo A, consistente com resultados anteriores<sup>113,154,161,188</sup>.

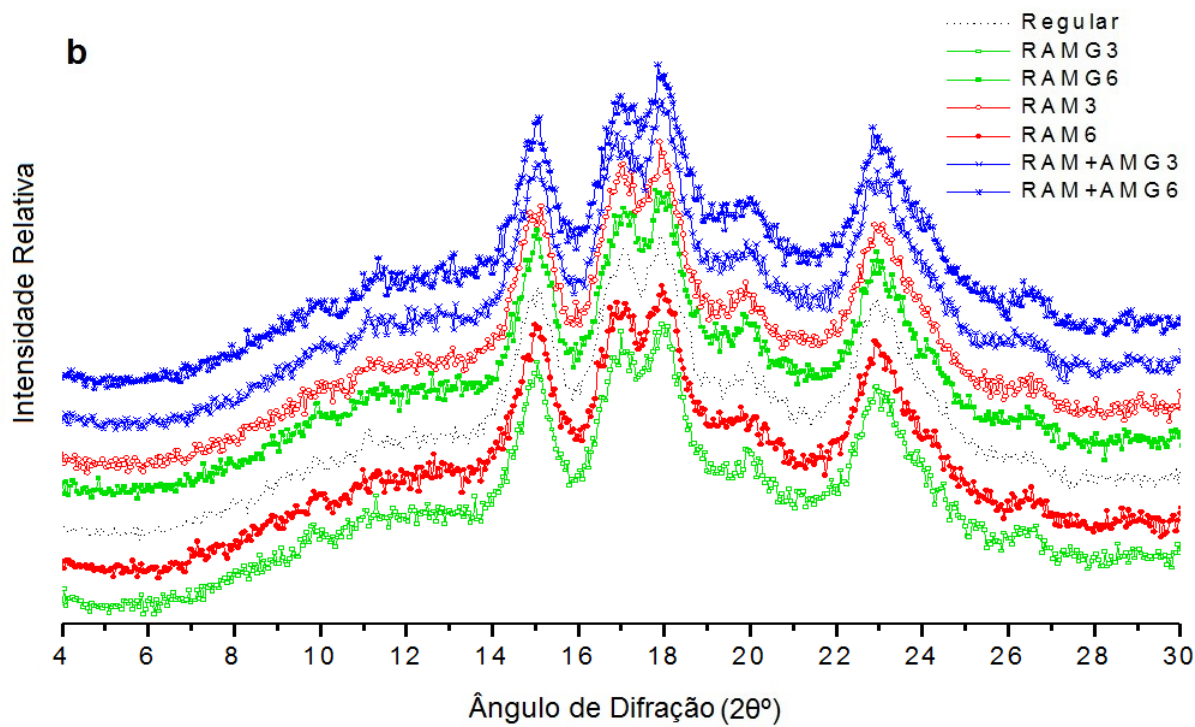
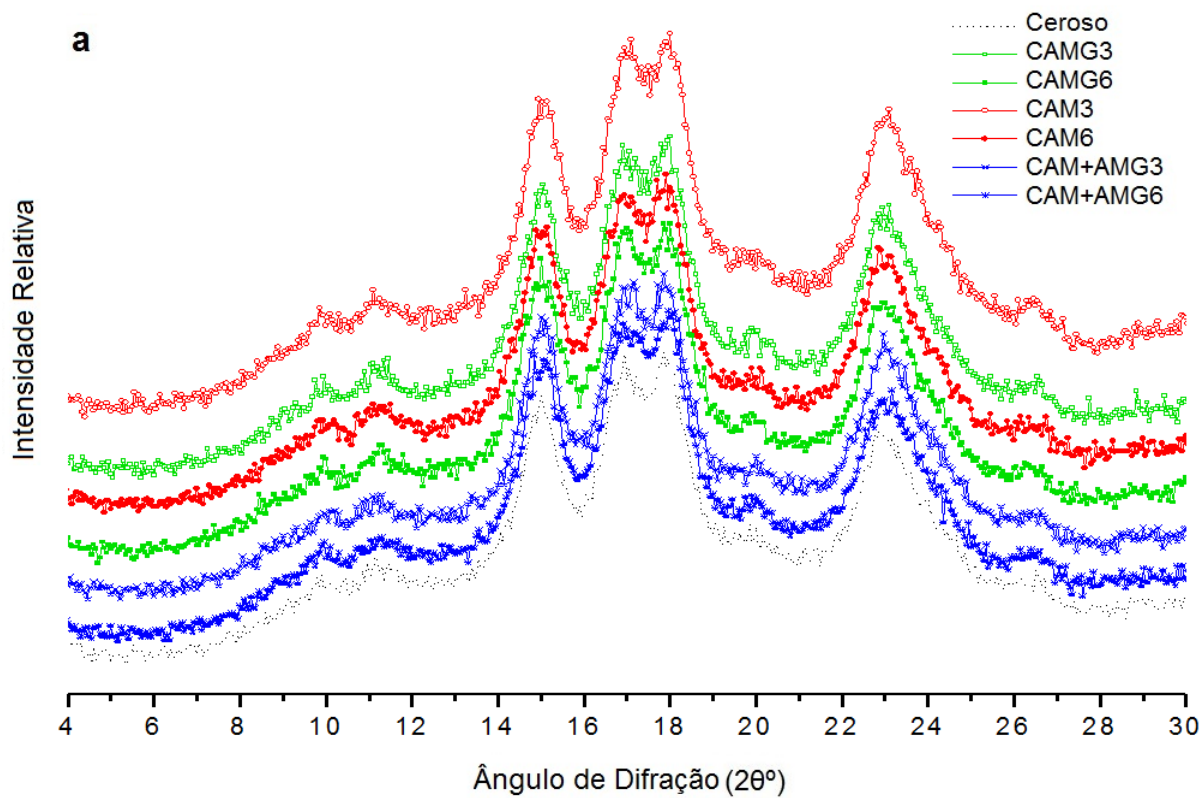


Figura 28: Difratomogramas de raios X dos amidos nativos e porosos de arroz ceroso (a) e regular (b), segundo estudo.

Os difratogramas de raio X foram muito semelhantes entre os amidos nativos e após o tratamento enzimático, embora algumas diferenças nas intensidades de pico tenham sido registradas. Diferenças na intensidade refletem a variação no grau de cristalinidade entre os amidos testados. A cristalinidade relativa aumentou de 27,93 % na amostra Ceroso para 30,73 %, na amostra CAM + AMG6 e diminuiu de 21,09 % na amostra Regular para 17,86 % na amostra RAMG6, Tabela 14. Kim et al. <sup>107</sup> observaram que o padrão de raios X não mudou quando o amido de arroz ceroso nativo foi hidrolisado com  $\alpha$ -amilase por 9 horas, indicando que o ataque enzimático ocorreu principalmente na região amorfa durante o estágio inicial de hidrólise. Um aumento nas cristalinidades relativas foi observado apenas em amido de arroz ceroso submetido a tratamento de recozimento sob um excesso de água (> 40 %) e baixa temperatura (abaixo da temperatura de gelatinização) <sup>110</sup>. Por outro lado, a intensidade do pico e a cristalinidade relativa dos amidos de arroz com alto teor de amilose não hidrolisados e hidrolisados diminuíram gradualmente durante a hidrólise com AMG. Isto demonstra que a estrutura cristalina foi hidrolisada mais rapidamente do que a estrutura amorfa. Utilizando a AM, as cristalinidades relativas dos amidos hidrolisados foram similares às dos amidos não hidrolisados, o que indicou que ambas as estruturas amorfas e cristalinas de amido de arroz com elevado conteúdo de amilose sofreram amilólise simultaneamente <sup>109</sup>.

O valor P revelou que o tratamento enzimático para a obtenção de amidos porosos afetou o conteúdo de amilose, o amido danificado e a cristalinidade relativa, e o efeito foi significativamente dependente da classe de amilose do amido de arroz,  $p < 0,05$ . No entanto, nenhuma correlação significativa foi observada nessas propriedades com o tipo de enzima e o tempo de reação, Tabela 14.

A Figura 29 corresponde aos espectros de absorvância de FTIR de amidos de arroz nativos e porosos, cerosos (a) e regulares (b). Os espectros de FTIR de amidos nativos foram semelhantes para as duas variedades de arroz. Cai et al. <sup>189</sup> e Zeng et al. <sup>110</sup> publicaram observações similares, utilizando amidos de arroz com diferentes teores de amilose. A reação enzimática não modificou a estrutura molecular básica do amido nativo, uma vez que não há mudança na banda máxima ou o aparecimento de novas bandas nos espectros. No entanto, houve mudanças nas intensidades de bandas de absorção, devido ao aumento do número de poros e à diminuição da densidade de amido granular.

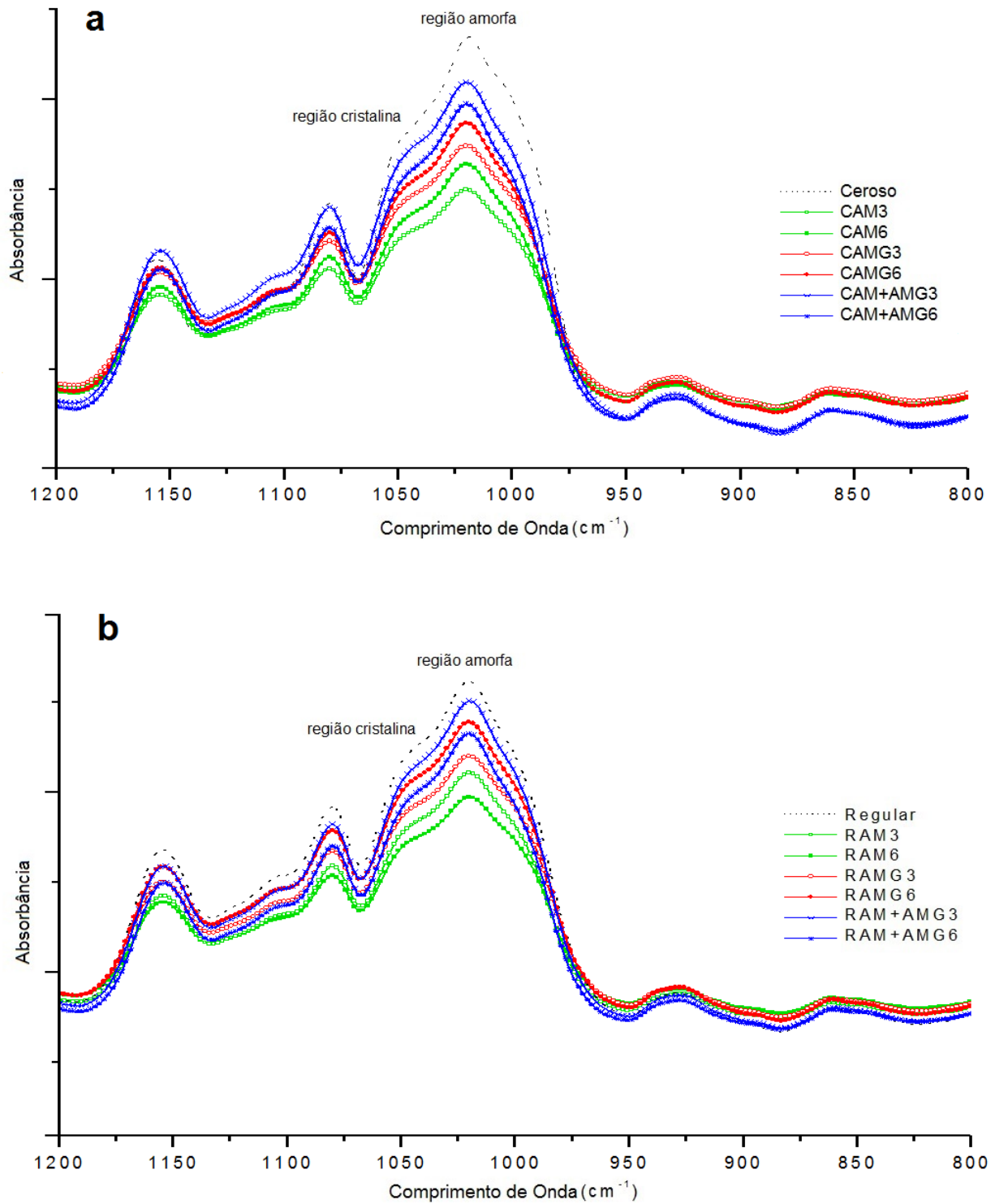


Figura 29: Espectros de FTIR absorbância dos amidos nativos e porosos de arroz, ceroso (a) e regular (b), segundo estudo.

O FTIR é sensível à estrutura ordenada de curto alcance das duplas hélices do amido e, quando combinado com procedimentos para a deconvolução do espectro, fornece oportunidades para o estudo da estrutura presente na região externa de um grânulo de amido. A banda de absorvância em  $1045\text{ cm}^{-1}$  está relacionada às regiões cristalinas do amido, a banda de absorvância em  $1022\text{ cm}^{-1}$  é sensível à região amorfa do amido e a banda de absorvância em  $955\text{ cm}^{-1}$  está associada à ligação em hélices de carboidratos hidratados. Assim, a razão de intensidade de absorvância R (1045/1022) é usada para determinar o grau de ordem da estrutura do grânulo de amido. A razão de intensidade de absorvância R (1022/995) pode ser usada como um índice para a proporção de carboidratos com estruturas amorfas a ordenadas<sup>190,191</sup>. As proporções de R (1045/1022) e R (1022/995) dos amidos nativos e porosos foram mostradas na Figura 30. O amido nativo e amidos porosos de arroz ceroso apresentaram o maior R (1047/1022) e o menor R (1022/995) quando comparado ao amido nativo e amidos porosos de arroz regular. Com o aumento do teor de amilose, a proporção de R (1045/1022) foi significativamente diminuída e R (1022/995) foi significativamente aumentada. A amilopectina denota predominantemente a quantidade de duplas hélices nos amidos de arroz ceroso<sup>113,192,193</sup>.

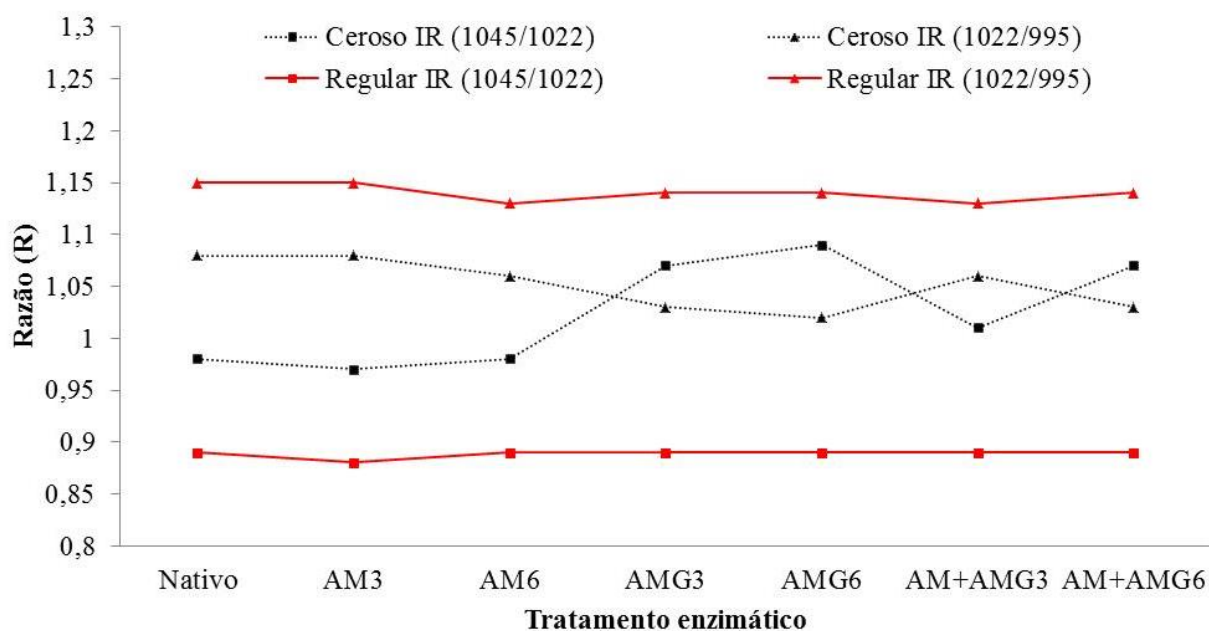


Figura 30: Razão de intensidade de absorvância R(1045/995) e R(1022/995) dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.

Com base no comportamento observado nos espectros de absorvância e nas proporções de R (1045/1022) e R (1022/995), a ordem de curto alcance na região externa do amido de arroz regular hidrolisado por AM, AMG e AM/AMG foi semelhante à do amido nativo de arroz regular. Estes resultados sugerem que a estrutura de dupla hélice ordenada e a estrutura amorfa na região externa do grânulo de amido foram simultaneamente hidrolisadas por AM e AMG<sup>108,109,112</sup>. No entanto, a intensidade da banda de absorvância em 1022 cm<sup>-1</sup> foi ligeiramente reduzida pela hidrólise do amido nativo de arroz ceroso. As razões R (1045/1022) aumentaram e as razões R (1022/995) diminuíram, o que reflete uma maior ordem de curto alcance e domínios mais ordenados após reação enzimática. A região amorfa foi mais suscetível à digestão por AM e AMG do que as regiões cristalinas no processo de hidrólise enzimática<sup>145,194</sup>. A maior fração cristalina presente no amido poroso sugere que a amilólise pode ocorrer principalmente na região amorfa dos grânulos de amido ceroso.

O amido é um grânulo semicristalino contendo alternadas camadas amorfas e semicristalinas denominadas anéis de crescimento. O pico de dispersão principal bem resolvido em torno do vetor de dispersão ( $q_0$ ) deriva da disposição periódica de lamelas alternadas cristalinas e amorfas de amilopectina e corresponde à distância de repetição lamelar ou ao espaçamento de Bragg. A localização do pico depende do tamanho da lamela e pode diferir de acordo com a origem do amido, de 0,06 a 0,09 Å<sup>-1</sup><sup>156,184,195</sup> enquanto a área ou intensidade do pico depende principalmente do grau de ordenação em regiões semicristalinas<sup>196</sup>. O  $q_0$  do amido nativo de arroz ceroso foi de 0,090 Å<sup>-1</sup> e o de amido nativo de arroz regular foi de 0,082 Å<sup>-1</sup>, Figura 31. Sanderson et al.<sup>197</sup> relataram que os amidos de cristais do tipo B têm maiores comprimentos médios de cadeia que os amidos do tipo A e C, com os amidos do tipo A tendo comprimentos médios de cadeia mais curtos do que os amidos do tipo C.

A intensidade do pico de dispersão da amostra Regular foi significativamente menor do que a da amostra Ceroso. Estes resultados estão de acordo com os dados do SAXS de Yuryev et al.<sup>198</sup> onde um aumento no teor de amilose em amidos nativos foi acompanhado por uma diminuição da intensidade de espalhamento de pico sendo atribuído ao acúmulo de cadeias de ligação de amilose com o aumento do conteúdo de amilose nos grânulos. Também foi observado pico lamelar significativamente mais definido e melhor ajuste com a função utilizada da amostra de amido nativo ceroso em comparação com a variedade com maior conteúdo de amilose, corroborando com Blazek & Gilbert (2010)<sup>196</sup> e Shrestha et al.<sup>195</sup>. Devido ao alto teor de amilopectina do amido de arroz ceroso nativo, muitas lamelas cristalinas foram formadas para grânulos de amido nativo, resultando em um pico lamelar estreito e claro<sup>184</sup>.



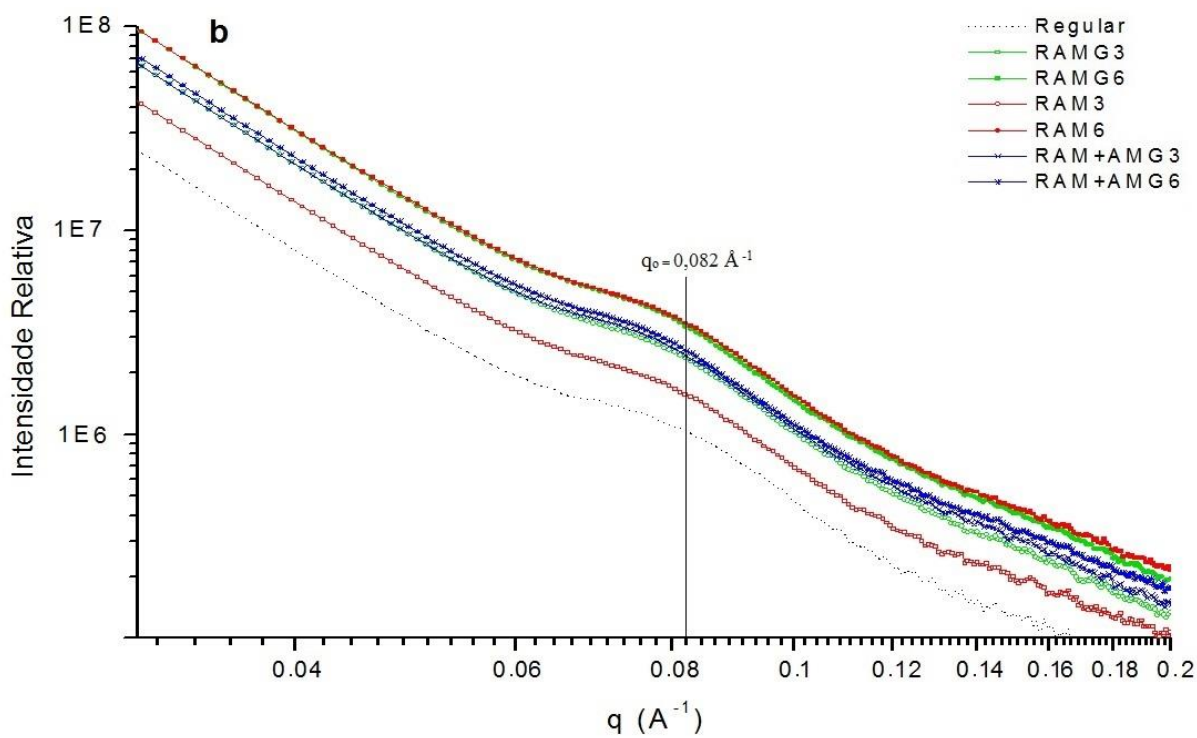
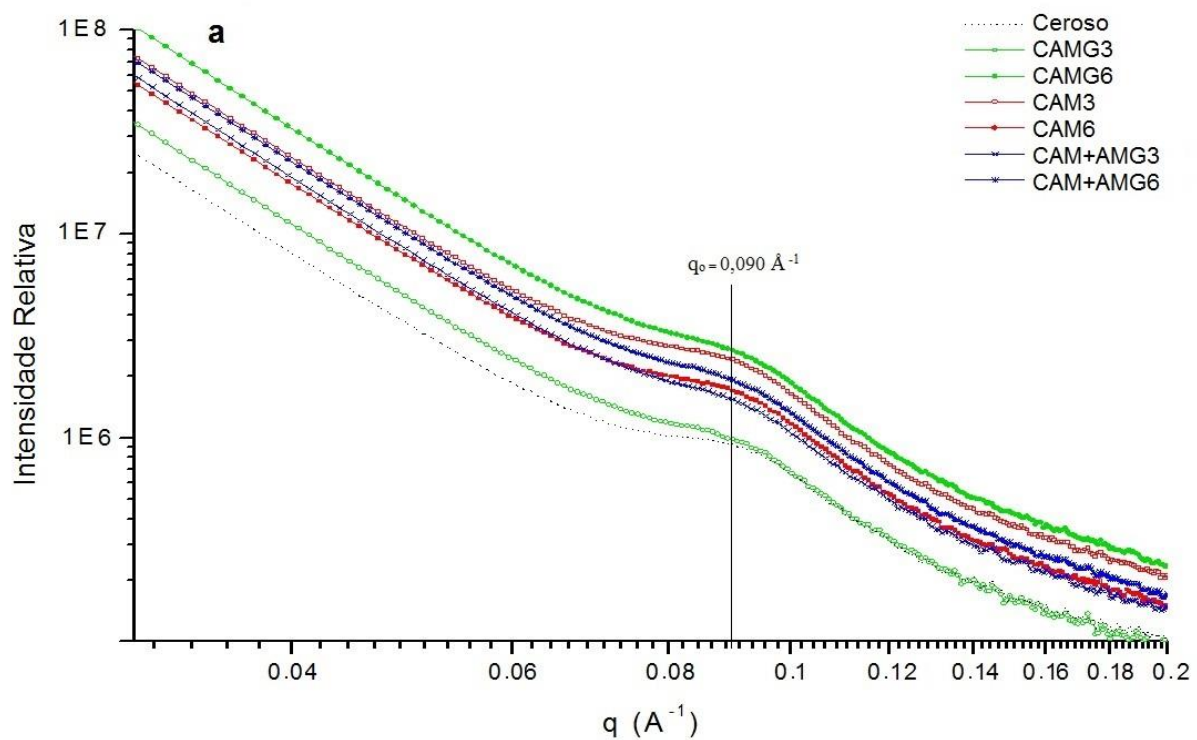


Figura 31: Curvas de espalhamento de raios X dos amidos nativos e porosos de arroz, ceroso (a) e regular (b), segundo estudo.

O tratamento enzimático não alterou significativamente as posições dos picos de dispersão dos amidos porosos obtidos, Figura 31, indicando que não houve alteração na distância de repetição lamelar dos grânulos. Além disso, não foi observada alteração significativa na intensidade do pico de dispersão das amostras de amido poroso regular. Entretanto a hidrólise enzimática ocasionou uma diminuição significativa nas intensidades do pico de dispersão de algumas amostras de amido poroso ceroso. As amostras CAMG3 e CAMG6 não sofreram alteração, porém as amostras CAM3, CAM6, CAM+AMG3 e CAM+AMG6 apresentaram diminuição na intensidade do pico de dispersão.

Dependendo do amido nativo, tipo de enzima e tempo de reação, o tratamento enzimático poderia hidrolisar as lamelas cristalinas, diminuindo a densidade eletrônica entre as lamelas cristalinas e amorfas e, simultaneamente, diminuindo ligeiramente o grau de cristalinidade. Isso é consistente com a reorganização estrutural que ocorre após longos períodos de digestão. A diminuição simultânea observada na intensidade do pico lamelar e aumento no espalhamento de baixa  $q$  é consistente com um modelo no qual ocorre a hidrólise preferencial do amido amorfo a granel dentro dos anéis de crescimento amorfo<sup>196</sup>. Embora a localização exata ou natureza desses anéis de crescimento não seja definida discretamente, eles têm uma baixa concentração de polímero e, portanto, seria mais provável que seja acessível ao ataque de enzima. Um número relativamente pequeno de ações enzimáticas pode ser suficiente para causar a mudança observada na intensidade do pico lamelar<sup>195</sup>.

A estabilidade térmica ( $T_o$ ,  $T_p$ , and  $T_c$ ) e a entalpia de gelatinização ( $\Delta H$ ) da transição de fase para os amidos nativos e porosos de arroz, ceroso e regular estão indicadas na Tabela 15. Todos os amidos porosos apresentaram temperaturas de transição térmica mais elevadas do que o amido nativo ceroso; dados em concordância com observações anteriores<sup>91,96,145</sup>. O aumento da cristalinidade está diretamente associado à hidrólise enzimática, porque esse processo, como já mencionado, remove regiões amorfas do grânulo de amido, concentrando a fração da região cristalina. Uma maior porcentagem de cristalinidade leva a um maior empacotamento nos grânulos. Esta estrutura mais densa evita a transferência de calor e massa, o que resulta em uma temperatura de fusão mais alta<sup>102,106,110</sup>.

Tabela 15: Temperaturas e entalpia de gelatinização e potencial zeta dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.

	$T_o$ , °C	$T_p$ , °C	$T_c$ , °C	$\Delta H$ , J/g	Potencial zeta, mV
Ceroso	57,42 ± 0,02d	68,86 ± 0,04f	83,03 ± 0,25d	5,21 ± 0,01a	-4,38 ± 4,34a
CAM3	60,61 ± 0,01a	69,88 ± 0,01c	85,84 ± 0,01c	2,22 ± 0,01e	-16,07 ± 2,68b
CAM6	60,41 ± 0,01a	71,04 ± 0,03a	87,13 ± 0,01b	3,98 ± 0,01c	-20,21 ± 3,81b
CAMG3	58,57 ± 0,15c	69,66 ± 0,01d	86,95 ± 0,03b	2,36 ± 0,02d	-16,15 ± 2,51b
CAMG6	59,86 ± 0,03b	70,06 ± 0,02b	88,35 ± 0,13a	3,89 ± 0,03c	-13,86 ± 2,11b
CAM+AMG3	58,74 ± 0,08c	69,71 ± 0,01d	87,08 ± 0,02b	4,18 ± 0,03b	-16,02 ± 2,10b
CAM+AMG6	60,27 ± 0,04a	69,44 ± 0,01e	87,42 ± 0,04b	3,94 ± 0,02c	-18,25 ± 1,70b
Regular	55,27 ± 0,03a	64,05 ± 0,03a	80,26 ± 0,25a	5,28 ± 0,02f	- 1,84 ± 1,34a
RAM3	55,18 ± 0,15a	64,06 ± 0,06a	80,14 ± 0,03a	8,43 ± 0,05a	-17,05 ± 2,01b
RAM6	55,21 ± 0,08a	63,98 ± 0,03a	80,25 ± 0,01a	7,28 ± 0,02bc	-22,16 ± 2,17b
RAMG3	55,00 ± 0,18a	63,97 ± 0,22a	80,27 ± 0,09a	7,82 ± 0,31ab	-18,44 ± 1,99b
RAMG6	55,07 ± 0,04a	64,02 ± 0,04a	80,28 ± 0,01a	6,95 ± 0,03cd	-17,51 ± 2,47b
RAM+AMG3	55,02 ± 0,04a	64,03 ± 0,02a	79,95 ± 0,08a	6,34 ± 0,09de	-14,08 ± 3,11b
RAM+AMG6	55,25 ± 0,04a	63,84 ± 0,01a	79,99 ± 0,04a	6,85 ± 0,02cd	-16,26 ± 1,42b
<i>Valor P</i> Classe de amilose	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,5731
<i>Valor P</i> Tipo de enzima	0,6992	0,8960	0,9232	0,9271	0,1069
<i>Valor P</i> Tempo de reação	0,7494	0,9272	0,8161	0,8478	0,2192

Resultados expressos como média ± desvio padrão, médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A diminuição nos valores de  $\Delta H$  podem refletir a perda de duplas hélices, alguns cristalitos e estrutura ordenada de carboidratos. Além disso, a perda de cristais imperfeitos à base de amilopectina, com potenciais contribuições nas entalpias de fusão de estruturas cristalinas e helicoidais, foi relatado por Benavent-Gil & Rosell <sup>91</sup>. Cai et al. <sup>156</sup> sugeriram que as maiores temperaturas de gelatinização e menor entalpia no amido de arroz nativo poderiam ser atribuídas às mudanças estruturais na amilopectina, juntamente com o aumento da proporção de duplas hélices de amilose. Não houve mudanças significativas nas temperaturas de gelatinização para o arroz regular durante a hidrólise, mas o valor da entalpia de gelatinização diminuiu. Neste estudo, os resultados sugeriram a hidrólise simultânea de estruturas amorfas e cristalinas, conforme relatado anteriormente <sup>108,109</sup>. É possível que altas entalpias de gelatinização nesses amidos possam ser devido a sua arquitetura ordenada de curto alcance. É relatado que a entalpia de gelatinização é proporcional à quantidade de ordem de curto alcance <sup>113</sup>. As análises de correlação indicaram que todos os parâmetros de gelatinização dos amidos porosos,  $T_o$ ,  $T_p$ ,  $T_c$  e  $\Delta H$  variaram significativamente com a classe de amilose do amido de arroz ( $p < 0,05$ ), mas não foi encontrada relação com o tipo de enzima e tempo de reação, Tabela 15.

A Tabela 15 mostra que a reação enzimática aumentou a magnitude do potencial zeta, contribuindo para uma maior estabilidade das suspensões. Inicialmente, os amidos de arroz nativos apresentaram baixo potencial zeta, tanto o amido ceroso quanto o regular, ou seja, a força de atração excede a repulsão e as partículas tendem a se agregar. Resultados semelhantes são relatados na literatura <sup>199,200</sup>. Amini & Razavi <sup>180</sup> e Sun et al. <sup>181</sup> afirmaram que, dependendo do tipo de amido e das condições de processamento, uma parte da cadeia polimérica dos carboidratos pode clivar e certos grupos funcionais podem ser adicionados, causando alterações na superfície dos grânulos de amido, caracterizadas por um aumento no potencial zeta absoluto.

Silveira et al. <sup>182</sup> relataram que valores de potencial zeta de  $\pm 30$  mV são uma característica dos sistemas de liberação de fármacos com boa estabilidade em suspensão. Além disso, outros estudos mostraram que o material com um potencial zeta negativo é mais acessível para a fixação de grupos funcionais do que superfícies não carregadas ou mesmo aquelas com uma carga elétrica positiva <sup>146,183</sup>. Não houve correlação significativa entre a classe de amilose do amido de arroz, o tipo de enzima e o tempo de reação e o potencial zeta ( $p > 0,05$ ), mostrando que todos os amidos porosos apresentaram valores similares de potencial zeta independente da condição enzimática aplicada, Tabela 15.

## 5.4 COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO E DETERMINAÇÃO ENTRE AS PROPRIEDADES DOS AMIDOS POROSOS

A maneira mais simples de verificar se duas variáveis estão associadas é verificar se elas variam conjuntamente. O coeficiente de correlação é mais indicado para medir a força da relação linear entre as variáveis e o coeficiente de determinação é mais apropriado para medir a explicação da reta de regressão.

A correlação de Pearson requer dados intervalares para ser uma medida precisa do relacionamento linear entre duas variáveis. Para afirmar que o coeficiente de correlação é significativo, mais suposições são necessárias: para que a estatística seja válida os dados devem ser normalmente distribuídos<sup>201</sup>.

Este coeficiente varia entre -1 e 1, sendo que um valor igual a 1 mostra uma relação linear positiva perfeita entre as duas variáveis. Isto significa que quando uma variável aumenta, a outra aumenta linearmente e que, quando uma variável diminui, a outra diminui linearmente. De modo idêntico, um coeficiente de correlação de Pearson igual a -1 indica uma relação linear negativa perfeita entre as duas variáveis. Entretanto, se o valor for igual a 0, as duas variáveis são não-correlacionadas linearmente, embora possam ter outro tipo de relação<sup>202</sup>. O coeficiente de correlação de Pearson foi classificado em diferentes níveis de correlação: perfeito ( $|r| = 1,0$ ), forte ( $0,80 \leq |r| \leq 1,0$ ), moderado ( $0,50 \leq |r| \leq 0,80$ ), fraco ( $0,10 \leq |r| \leq 0,50$ ) e muito fraco, quase nenhuma correlação ( $|r| \leq 0,10$ ).

A correlação de Pearson entre morfologia, estrutura, cristalinidade e estabilidade térmica e de superfície de amidos porosos é mostrada na Tabela 16. O diâmetro médio dos grânulos foi significativo, positivo e fortemente correlacionado com a cristalinidade relativa e as temperaturas de gelatinização ( $r = 0,909, 0,868, 0,876$  e  $0,849$ , respectivamente,  $p < 0,01$ ), mas significativo, negativo e fortemente correlacionado com a entalpia de gelatinização ( $r = -0,832$ ,  $p < 0,01$ ). Resultados semelhantes foram relatados por Asmeda et al.<sup>185</sup> que indicam que o tamanho médio de partícula de grânulos de amido em uma amostra de farinha desempenha um papel importante na caracterização de seu perfil térmico. Foi identificada uma correlação significativa negativa e moderada entre o diâmetro médio e o conteúdo de amilose ( $r = -0,761$ ,  $p < 0,01$ ) e foi identificada uma correlação positiva e moderada entre o diâmetro médio e o amido danificado ( $r = 0,798$ ,  $p < 0,01$ ).

Tabela 16: Coeficientes de correlação de Pearson para morfologia, estrutura, cristalinidade, propriedades térmicas e potencial zeta dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.

	Fração volumétrica	Diâmetro Feret	Conteúdo amilose	Amido danificado	Cristalinidade relativa	$T_o$	$T_p$	$T_c$	$\Delta H$	Potencial zeta
Diâmetro médio	-0,024	-0,120	-0,761**	0,798**	0,909**	0,868**	0,876**	0,849**	-0,832**	0,027
Fração volumétrica		0,497	-0,365	0,184	0,296	0,268	0,222	0,356	-0,203	0,336
Diâmetro Feret			-0,173	-0,169	0,230	0,231	0,172	0,149	-0,251	0,227
Conteúdo amilose				-0,170	-0,865**	-0,904**	-0,933**	-0,942**	0,894**	-0,133
Amido danificado					0,782**	0,784**	0,814**	0,823**	-0,677*	0,091
Cristalinidade relativa						0,955**	0,959**	0,958**	-0,891**	0,137
$T_o$							0,975**	0,954**	-0,901**	0,113
$T_p$								0,982**	-0,915**	0,143
$T_c$									-0,890**	0,185
$\Delta H$										-0,275

\* e \*\* indicam diferença significativa para  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

O conteúdo de amilose foi significativo, forte e negativamente correlacionado com a cristalinidade relativa e as temperaturas de gelatinização ( $r = -0,865, -0,904, -0,933$  e  $-0,942$ , respectivamente,  $p < 0,01$ ), mas mostrou uma significativa, forte e positiva correlação com a entalpia de gelatinização ( $r = 0,894$ ,  $p < 0,01$ ). As correlações observadas acima foram consistentes com estudos anteriores<sup>189,193</sup>. No entanto, o conteúdo de amilose não mostrou correlação com o amido danificado. Esses dados contradizem parcialmente estudos recentes. Benavent-Gil & Rosell<sup>97</sup> relataram que o conteúdo de amilose apresentou correlação significativa e moderada com o amido danificado, principalmente atribuído à ação da AMG. Os coeficientes de correlação de Pearson mostraram uma correlação significativa, forte e positiva do amido danificado com as temperaturas de pico e conclusão ( $r = 0,814$  e  $0,823$ , respectivamente,  $p < 0,01$ ), uma correlação significativa, moderada e positiva com o diâmetro médio, a cristalinidade relativa e a temperatura inicial ( $r = 0,798, 0,782$  e  $0,784$ , respectivamente,  $p < 0,01$ ) e correlação significativa, moderada e negativa com a entalpia de gelatinização ( $r = -0,677$ ,  $p < 0,05$ ).

A cristalinidade relativa foi significativa, forte e positivamente correlacionada com o diâmetro médio e as temperaturas de gelatinização ( $r = 0,909, 0,955, 0,959$  e  $0,958$ , respectivamente,  $p < 0,01$ ) e teve uma correlação significativa, forte e negativa com o conteúdo de amilose e a entalpia de gelatinização. ( $r = -0,865$  e  $-0,891$ , respectivamente,  $p < 0,01$ ). Estas observações estão de acordo com as correlações relatadas por Singh et al.<sup>144</sup>. Além disso, a fração volumétrica de poros, o diâmetro de Feret e o potencial zeta apresentaram correlação significativa fraca ou muito fraca, evidenciando pouco efeito com qualquer uma das propriedades empregadas neste estudo.

A interação entre os fatores estudados também foi investigada através dos coeficientes de determinação, que mede a qualidade do ajustamento da reta aos pontos. Representa a proporção da variação de  $y$  explicada pela regressão, ou seja, pela relação linear. O  $R^2$  é sempre um número positivo dentro do intervalo (0; 1)<sup>203</sup>. Se  $R^2=0$ , não existe qualquer relação linear entre  $x$  e  $y$  e o ajustamento é totalmente inadequado; se  $R^2=1$ , existe uma relação linear exata entre  $x$  e  $y$  e o ajustamento é perfeito<sup>204,205</sup>. Portanto, quanto melhor o ajustamento, mais elevado é o valor de  $R^2$ .

Os valores de  $R^2$  são apresentados na Tabela 17. Para interpretar o coeficiente de determinação, é melhor transformá-lo em porcentagem, multiplicando o resultado obtido em seu cálculo por 100<sup>206</sup>. Assim, é possível afirmar que 91,31 %, 92,00 %, 91,82 % e 79,43 % da variação encontrada para a temperatura inicial, de pico, de conclusão e a energia de entalpia, respectivamente, está associada à variação da cristalinidade relativa. Também nota-se

considerável interação da cristalinidade relativa com o diâmetro médio (82,56 %), o conteúdo de amilose (74,78 %) e o amido danificado (61,19 %). Apenas 8,80 % da variação encontrada para a fração volumétrica, 5,30 % para o diâmetro Feret e 1,87 % para o potencial zeta está associada à variação da cristalinidade relativa.



Tabela 17: Coeficientes de determinação,  $R^2$ , para morfologia, estrutura, cristalinidade, propriedades térmicas e potencial zeta dos amidos nativos e porosos de arroz, segundo estudo.

	Fração volumétrica	Diâmetro Feret	Conteúdo amilose	Amido danificado	Cristalinidade relativa	$T_o$	$T_p$	$T_c$	$\Delta H$	Potencial zeta
Diâmetro médio	0,0006	0,0145	0,5786	0,6377	0,8256	0,7539	0,7668	0,7219	0,6920	0,0007
Fração volumétrica		0,2475	0,1334	0,0340	0,0880	0,0718	0,0496	0,1273	0,0412	0,1128
Diâmetro Feret			0,0298	0,0288	0,0530	0,0533	0,0298	0,0225	0,0632	0,0514
Conteúdo amilose				0,6559	0,7478	0,8166	0,8705	0,8868	0,7985	0,0176
Amido danificado					0,6119	0,6149	0,6630	0,6776	0,4581	0,0083
Cristalinidade relativa						0,9131	0,9200	0,9182	0,7943	0,0187
$T_o$							0,9500	0,9101	0,8121	0,0128
$T_p$								0,9652	0,8383	0,0204
$T_c$									0,7931	0,0344
$\Delta H$										0,0757

## 6 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que a hidrólise enzimática do amido de arroz nativo ceroso por  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase e a mistura  $\alpha$ -amilase/amiloglucosidase a 50 °C, aplicando tempos de reação de 3, 6 e 12 horas resultou em diferentes modificações nos grânulos, oferecendo uma alternativa promissora para a obtenção de grânulos de amido porosos.

Todas as condições enzimáticas testadas no primeiro estudo originaram em aumento da área superficial específica (2,3 a 4,8 vezes) e do volume total do poro (8,8 a 25,6 vezes) quando comparados ao amido de arroz nativo ceroso. Entretanto, através da espectroscopia de difração a laser, FTIR e SAXS observa-se simultaneamente a redução na superfície média da partícula do amido nativo de arroz após o tratamento enzimático.

O corante azul de metileno ofereceu estrutura mais simples e dimensões menores quando comparadas ao violeta de metila. Consequentemente, pode ter ocorrido favorecimento estérico resultando em maior capacidade de adsorção do corante azul de metileno.

As temperaturas de gelatinização indicaram que os grânulos de amido poroso poderiam tolerar uma temperatura operacional mais alta do que os grânulos de amido nativo. Um adsorvente termoresistente, o que também é consistente com as observações do FTIR. Além disso, os valores maiores do módulo de potencial zeta asseguraram uma estabilização eletrostática melhorada das suspensões de amido poroso.

As técnicas utilizadas na caracterização dos amidos porosos do primeiro estudo mostraram uma distribuição de porosidade para todas as amostras, sendo possível identificar a presença de macroporos (MEV), mesoporos (porosimetria de nitrogênio) e microporos (capacidade de adsorção). A adição de AM sugeriu a formação de uma maior fração de microporos, enquanto a mistura AM + AMG contribuiu para mais frações de mesoporos e macroporos.

O grau e tipo de porosidade podem ser controlados usando condições de reação adequadas. O tempo de reação de 12 horas foi excessivo, alterou o formato e diminuiu o tamanho dos grânulos consideravelmente, ocorrendo o colapso do poro formado, o aparecimento de canais internos e até mesmo exocorrosão. Em alguns casos, foi identificado fratura parcial e surgimento de uma superfície rugosa que fragiliza a estrutura do grânulo. Este aumento na rugosidade superficial do grânulo também foi identificado por SAXS.

Assim, 6 horas foi considerado adequado para os três tratamentos enzimáticos estudados, otimizando o tempo de reação enzimática usual. A adição da enzima  $\alpha$ -amilase provocou erosão

superficial resultando em grandes cavidades (CAM3 e CAM6) já a enzima amiloglucosidase provocou endocorrosão côncava (CAMG3 e CAMG6). A condição de reação enzimática mais apropriada, resultando em adequada porosidade, maior capacidade de adsorção, resistência térmica e estabilidade eletrostática, além de, aumento da área superficial específica, do volume total e do tamanho de poro, foi obtida em CAM+AMG6 (0,463 mL Fungamyl 800L + 1,233 mL AMG 300L e tempo de reação de 6h).

As duas amostras de amido nativo de arroz caracterizadas apresentaram morfologia, granulometria e composição centesimal e físico-química similares aos valores encontrados na literatura. Através da determinação do conteúdo de amilose foi possível classificá-las como: amido ceroso e amido regular com baixo conteúdo de amilose.

Com a utilização de duas amostras distintas de amido nativo de arroz no segundo estudo desta tese, foi possível constatar que fatores extrínsecos e intrínsecos da hidrólise enzimática têm um impacto substancial nas propriedades funcionais dos amidos porosos obtidos. A fração volumétrica dos poros e o diâmetro de Feret foram dependentes do tipo de enzima, enquanto o diâmetro médio, o conteúdo de amilose, o amido danificado, a cristalinidade relativa, as temperaturas de gelatinização e a entalpia foram dependentes da classe de amilose do amido de arroz. Todas as propriedades foram independentes no tempo de reação enzimática.

A análise de correlação de Pearson revelou correlação forte e positiva entre o diâmetro médio e a cristalinidade relativa e as temperaturas de gelatinização; entre o conteúdo de amilose e a entalpia gelatinização; entre o amido danificado e as temperaturas de pico e de conclusão; entre a cristalinidade relativa e as temperaturas de gelatinização. Uma forte e negativa correlação foi identificada entre o diâmetro médio e a entalpia de gelatinização; entre o conteúdo de amilose e a cristalinidade relativa e as temperaturas de gelatinização; entre a cristalinidade relativa e a entalpia de gelatinização. Confirmando as correlações de Pearson indicadas, os maiores coeficientes de determinação foram observados entre o diâmetro médio, o conteúdo de amilose, o amido danificado, a cristalinidade relativa e as propriedades térmicas e os menores coeficientes de determinação foram observados entre a fração volumétrica, o diâmetro Feret e o potencial zeta.

Por fim, ao selecionar a classe de amilose do amido de arroz e o tipo de enzima utilizada na hidrólise enzimática, pode-se modular as propriedades funcionais de acordo com a aplicação desejada na indústria alimentícia.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aranovich, G. & Donohue, M. Analysis of adsorption isotherms: Lattice theory predictions, classification of isotherms for gas-solid equilibria, and similarities in gas and liquid adsorption behavior. *J. Colloid Interface Sci.* **200**, 273–290 (1998).
2. Sangwichien, C., Aranovich, G. L. & Donohue, M. D. Density functional theory predictions of adsorption isotherms with hysteresis loops. **206**, 313–320 (2002).
3. Demirbas, E., Kobya, M. & Sulak, M. T. Adsorption kinetics of a basic dye from aqueous solutions onto apricot stone activated carbon. *Bioresour. Technol.* **99**, 5368–5373 (2008).
4. Kavitha, D. & Namasivayam, C. Capacity of activated carbon in the removal of acid brilliant blue: Determination of equilibrium and kinetic model parameters. *Chem. Eng. J.* **139**, 453–461 (2008).
5. Rouquerol, J., Rouquerol, F., S. K. . *Adsorption by powders and porous solids – Principles, Methodology and Applications.* (1999).
6. Ruthven, D. . *Principles of Adsorption and Adsorption Processes.* (1984).
7. Suzuki, M. *Adsorption Engineering.* (1990).
8. McCabe, W. L., Smith, J. C., Harriot, P. *Unit Operations of Chemical Engineering.* (1985).
9. Tan, I. A. W., Ahmad, A. L. & Hameed, B. H. Adsorption of basic dye on high-surface-area activated carbon prepared from coconut husk: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *J. Hazard. Mater.* **154**, 337–346 (2008).
10. Crini, G. & Ndongo Peindy, H. Adsorption of C.I. Basic Blue 9 on cyclodextrin-based material containing carboxylic groups. *Dye. Pigment.* **70**, 204–211 (2006).
11. Di Bernardo, L., Dantas, A. D. B. *Métodos e Técnicas de Tratamento de Água.* (2005).
12. Oscik, J. *Adsorption.* (1982).
13. Gregg, S. J.; Sing, K. S. & W. *Adsorption, Surface area and Porosity.* (1982).
14. Berthod, A. Silica: backbone material of liquid chromatographic column packings. *J. Chromatogr. A* **549**, 1–28 (1991).
15. Guansajonz, H., Guiochon, G. A., Davis, E., Gulakowski, K. & Smith, D. Study of the physico-chemical properties of some packing materialsIII. Pore size and surface area distribution. *J. Chromatogr. A* **773**, 33–51 (1997).
16. Zhuravlev, L. T. The surface chemistry of amorphous silica. *Colloids Surfaces A* **173**, 1 (2000).
17. Juszczak, L., Fortuna, T. & Wodnicka, K. Characteristics of cereal starch granules surface using nitrogen adsorption. *J. Food Eng.* **54**, 103–110 (2002).

18. Dąbrowski, A. Adsorption - From theory to practice. *Adv. Colloid Interface Sci.* **93**, 135–224 (2001).
19. Demirbas, A. Agricultural based activated carbons for the removal of dyes from aqueous solutions: A review. *J. Hazard. Mater.* **167**, 1–9 (2009).
20. Guo, L., Zhu, Y. & Du, X. The effect of modified starches on the adsorption of cigarette mainstream smoke composition. *Starch/Staerke* **64**, 552–562 (2012).
21. John White. Literature Review on Adsorption Cooling Systems. *Lat. Am. Caribb. J. Eng. Educ.* (2013).
22. San, J. Y. & Lin, W. M. Comparison among three adsorption pairs for using as the working substances in a multi-bed adsorption heat pump. *Appl. Therm. Eng.* **28**, 988–997 (2008).
23. Liu, Y. & Leong, K. C. The effect of operating conditions on the performance of zeolite/water adsorption cooling systems. *Appl. Therm. Eng.* **25**, 1403–1418 (2005).
24. Menard, D., Py, X. & Mazet, N. Activated carbon monolith of high thermal conductivity for adsorption processes improvement: Part A: Adsorption step. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **44**, 1029–1038 (2005).
25. Saha, B. B., El-Sharkawy, I. I., Chakraborty, A. & Koyama, S. Study on an activated carbon fiber-ethanol adsorption chiller: Part I - system description and modelling. *Int. J. Refrig.* **30**, 86–95 (2007).
26. Rahman, M. S., Potluri, P. L. . Shrinkage and density of squid flesh during air drying. *J. Food Eng.* **12**, 133–143 (1990).
27. Datta, A. K., Sahin, S., Sumnu, G., Keskin, S. O. . Porous media characterization of breads baked using novel heating modes. *J. Food Eng.* **79**, 106–116 (2006).
28. Juszczak, L., Fortuna, T. & Wodnicka, K. Characteristics of cereal starch granules surface using nitrogen adsorption. *J. Food Eng.* **54**, 103–110 (2002).
29. Rouquerol, J., Avnir, D., Fairbridge, C. W., Everett D. H., Haynes, J. M., Pernicone, N., Ramsay, J. D. F., Sing, K. S. W., Unger, K. K. . Recommendations for the characterization of porous solids. *Pure Appl. Chem.* **66**, 1739–1758 (1994).
30. Ortiz, N. Estudo da utilização de magnetita, Pb<sup>2+</sup> como material adsorvente dos metais Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> e Cd<sup>2+</sup> em solução. (2000).
31. Sun, M. H. *et al.* Applications of hierarchically structured porous materials from energy storage and conversion, catalysis, photocatalysis, adsorption, separation, and sensing to biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 3479–3563 (2016).
32. Yang, X.-Y., Léonard, A., Lemaire, A., Tian, G. & Su, B.-L. Self-formation phenomenon to hierarchically structured porous materials: design, synthesis, formation mechanism and applications. *Chem. Commun.* **47**, 2763 (2011).
33. Serrano, D. P., Escola, J. M. & Pizarro, P. Synthesis strategies in the search for

- hierarchical zeolites. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4004–4035 (2013).
34. Mohanty, A.K., Misra, M., Hinrichsen, G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. *Macromol. Mater. Eng.* **276–277**, 1–24 (2000).
  35. Avérous, L.; Boquillon, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydr. Polym.* **52**, 111–122 (2004).
  36. Stevens, E. S. *Green Plastics, An Introduction to the New Science of Biodegradable Plastics*. (2002).
  37. Vilaplana, F.; Strömberg, E. . & Karlsson, S. Environmental and resource aspects of sustainable biocomposites. *Polym. Degrad. Stab.* **95**, 2147–2161 (2010).
  38. Grumezescu M. A.; Holban A. M. *Biopolymers for Food Design*. (Academic Press, 2018).
  39. Manzini, E. *The material of invention & design*. (1989).
  40. Telis, V. R. N. *Biopolymer Engineering in Food Processing*. (2012).
  41. Leistriz, F. L.; Hodur, N. M.; SenechalE, D. M.; Stowers, M. D.; Mccalla, D.; Saffron, C. M. *Biorefineries Using Agricultural Residue Feedstock in the Great Plains*. (2007).
  42. Fernando, S.; Adhikari, S.; Chandrapal, C.; Murali, N. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy & Fuels* **20**, 1727–1737 (2006).
  43. Anastas, P. T.; Warner, J. . *Green Chemistry: Theory and Practice*. (Oxford University Press: Oxford, 1998).
  44. Leite, P. R. Desafios da Logística Reversa de pós-consumo no Brasil. *Rev. Tecnol.* 64–67 (2014).
  45. Brondani, G.; VEY, I. H.; Madruga, S. R.; Trindade, L. L.; Venturini, J. C. Diferenciais de Custos em Culturas de Arroz: A Experiência do Rio Grande do Sul. *Rev. Universo Contábil* **2**, 61–74 (2006).
  46. S. D. Sharma. *Rice: Origin, Antiquity and History*. (2010).
  47. CONAB. *Acompanhamento da safra brasileira*. (2018).
  48. FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rice Market Monitor (FAO, RMM), Vol. XXI, Issue No.1, April 2018. XXI*, (2018).
  49. MAPA. *Projeções de Longo Prazo*. (2018).
  50. Storck, C. R. Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos. (Universidade Federal de Santa Maria- UFSM., 2004).
  51. Dexter, P. B. *Rice fortification for developing countries*. (1998).
  52. Castro, E. M.; Vieira, N. R. A.; Rabelo, R. R.; Silva, S. A. *Qualidade de grãos em arroz*. (1999).

53. Nitzke, J. A.; Biedrzycki, A. *Terra de arroz*. (2007).
54. BRASIL. *Instrução Normativa N° 6, de 16 de fevereiro de 2009. Regulamento técnico que aprova o Regulamento Técnico do Arroz, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a mar.* (2009).
55. Spadaro, J.J.; Mattheus, J.; Wadsworth, J. I. Milling. in *Rice: production and utilization*. (ed. AVI Publishing) 360–402 (1980).
56. Wadsworth, J.I.; Mattheus, J. Milling yields and moisture distribution in rough rice. *Trans. ASAE* **28**, 1346–1352 (1985).
57. L. R. Apolônio; J. L. Donzele; R. F. M. de Oliveira; A. V. C. de Souza; F. C. O. Silva; S. Bünzen. Digestibilidade ideal de aminoácidos de alguns alimentos, determinada pela técnica de cânula T simples com suínos. *Rev. Bras. Zootec.* **32**, 605–614 (2003).
58. Zhou, Z., Robards, K., Helliwel, S., Blanchard, C. Composition and functional properties of rice. *International Journal Food Science and Technology. Int. J. Food Sci. Technol.* **37**, 849–868 (2002).
59. Silva, R. F.; Ascheri, J. L. R.; Pereira, R. G. F. A. Composição química de farinhas pré-cozidas por extrusão elaboradas com arroz e café torrado. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* **26**, 52–58 (2008).
60. Puchongkavarin, H.; Varavinit, S.; Bergthaller, W. Comparative study of pilot scale rice starch production by an alkaline and an enzymatic process. *Starch/Stärke* **57**, 134–144 (2005).
61. Cardoso, M. B., Putaux, J. L., Samios, D., Silveira, N. P. . Influence of alkali concentration on the deproteinization and/of gelatinization of rice starch. *Carbohydr. Polym.* **70**, 160–165 (2007).
62. Beneo-Remy. Matching today's expectations. Specialty rice ingredients for better nutrition. [http://www.beneo.com/Ingredients/Human\\_Nutrition/Specialty\\_Rice\\_Ingredients](http://www.beneo.com/Ingredients/Human_Nutrition/Specialty_Rice_Ingredients) (2013).
63. Lundubwong, N.; Seib, P. A. Rice starch isolation by alkaline protease digestive of wet-milled rice flour. *J. Cereal Sci.* **31**, 63–74 (2000).
64. Wang, L., Wang, Y. J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *J. Cereal Sci.* **39**, 291–296 (2004).
65. Hull, P. *Glucose Syrups Technology and Applications*. (Wiley Blackwell, 2010).
66. Vandeputte, G. E. & Delcour, J. A. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: A focus on rice starch. *Carbohydr. Polym.* **58**, 245–266 (2004).
67. Moad, G. Progress in Polymer Science Chemical modification of starch by reactive extrusion. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 218–237 (2011).
68. Corre, D. L., Bras, J., Dufresne, A. Starch nanoparticles: A review. *Biomacromolecules*

- 11**, 1139–1153 (2010).
69. Du, X., MacNaughtan, B., Mitchell, J. R. Quantification of amorphous content in starch granules. *Food Chem.* **127**, 188–191 (2011).
  70. Coultate, T. P. *Alimentos: a química de seus componentes*. (2004).
  71. Lobo, A. R., Silva, G. M. L. . Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. *Rev. Nutr* **16**, 219–226 (2003).
  72. Araújo, E. S., Souza, S. R., Fernandes, M. S. . Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. *Pesqui. Agropecuária Bras.* **38**, 1281–1288 (2003).
  73. Pérez, S. & Bertoft, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Staerke* **62**, 389–420 (2010).
  74. Juliano, B. O. Rice in human nutrition. *www.fao.org* (1993).
  75. BeMiller, J. & Whistler, R. *Starch: Chemistry and Technology*. (2009).
  76. Champagne, E. T. *RICE: Chemistry and Technology*. (2004).
  77. Denardin, C. C., Silva, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural.* **39**, 945–954 (2009).
  78. Cameron, R. E. & Donald, A. D. A small-angle X-ray scattering study of the annealing and gelatinization of starch. *Polymer (Guildf)*. **33**, 2628–2635 (1992).
  79. Vaclavik, V. A. & Christian, E. W. *Essentials of Foods Science*. (Springer, 2014).
  80. Akoh, C., Chang, S., Lee, G., Shaw, J. Biocatalysis for the Production of Industrial Products and Functional Foods from Rice and Other Agricultural Produce. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10445–10451 (2008).
  81. Singh, J., Kaur, L., McCarthy, O. J. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocoll.* **21**, 1–22 (2007).
  82. BeMiller, J. N. & Huber, K. C. Physical Modification of Food Starch Functionalities. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **6**, 19–69 (2015).
  83. Chen, Q. *et al.* Recent progress in chemical modification of starch and its applications. *RSC Adv.* **5**, 67459–67474 (2015).
  84. Guarás M. P. , Ludueña L. N., A. V. A. Chapter 4 - Development of Biodegradable Products from Modified Starches. in *Starch-Based Materials in Food Packaging Processing, Characterization and Applications* 77–124 (2017).
  85. Dey, A. & Sit, N. Modification of foxtail millet starch by combining physical, chemical and enzymatic methods. *Int. J. Biol. Macromol.* **95**, 314–320 (2017).



86. Lan, C. *et al.* Design, preparation and characterization of self-reinforced starch films through chemical modification. *Macromol. Mater. Eng.* **295**, 1025–1030 (2010).
87. Halley, P. J. & Averous, L. *Starch Polymers From Genetic Engineering to Green Application*. (Elsivier, 2014).
88. Uthumporn, U., Zaidul, I. S. M. & Karim, A. A. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amyolytic enzymes. *Food Bioprod. Process.* **88**, 47–54 (2010).
89. Qian, J., Chen, X., Ying, X., Lv, B. Optimisation of porous starch preparation by ultrasonic pretreatment followed by enzymatic hydrolysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**, 179–185 (2011).
90. Chen, G., Zhang, B. Hydrolysis of granular corn starch with controlled pore size. *J. Cereal Sci.* 1–12 (2012).
91. Benavent-Gil, Y. & Rosell, C. M. Morphological and physicochemical characterization of porous starches obtained from different botanical sources and amyolytic enzymes. *Int. J. Biol. Macromol.* **103**, 587–595 (2017).
92. Tahir, R., Ellis, P. R., Bogracheva, T. Y., Meares-Taylor, C. & Butterworth, P. J. Study of the structure and properties of native and hydrothermally processed wild-type, lam and r variant pea starches that affect amyolysis of these starches. *Biomacromolecules* **12**, 123–133 (2011).
93. Xiao, H., Lin, Q. & Liu, G. Q. Effect of cross-linking and enzymatic hydrolysis composite modification on the properties of rice starches. *Molecules* **17**, 8136–8146 (2012).
94. Sujka, M., Jamroz, J. Starch granule porosity and its changes by means of amyolysis. *Int. Agrophysics* **21**, 107–113 (2007).
95. Wang, X., Yuan, Y. & Yue, T. The application of starch-based ingredients in flavor encapsulation. *Starch/Staerke* **67**, 225–236 (2015).
96. Dura, A., Błaszczak, W. & Rosell, C. M. Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. *Carbohydr. Polym.* **101**, 837–845 (2014).
97. Benavent-Gil, Y. & Rosell, C. M. Comparison of porous starches obtained from different enzyme types and levels. *Carbohydr. Polym.* **157**, 533–540 (2017).
98. Guo, L., Liu, R., Li, X., Sun, Y. & Du, X. The physical and adsorption properties of different modified corn starches. *Starch/Staerke* **67**, 237–246 (2015).
99. Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C. & Ariff, A. Bin. Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Res.* **2012**, (2012).
100. Chen, Y., Huang, S., Tang, Z., Chen, X. & Zhang, Z. Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase. *Carbohydr. Polym.* **85**, 272–275 (2011).
101. Gao, F., Li, D., Bi, C., Mao, Z. & Adhikari, B. Preparation and characterization of starch

- crosslinked with sodium trimetaphosphate and hydrolyzed by enzymes. *Carbohydr. Polym.* **103**, 310–318 (2014).
102. Malucelli, L. C. *et al.* Porous waxy maize starch: Thermal, structural and viscographic properties of modified granules obtained by enzyme treatment. *J. Therm. Anal. Calorim.* **120**, 528–532 (2015).
  103. Shariffa, Y. N., Uthumporn, U., Karim, A. A. & Zaibunnisa, A. H. Hydrolysis of native and cross-linked corn, tapioca, and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Starch* **24**, 1925–1933 (2013).
  104. Zhang, B. *et al.* Corn porous starch: Preparation, characterization and adsorption property. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 250–256 (2012).
  105. Li, H., Liu, Y., Gao, X. & Li, X. Preparation and characterization of cassava starch-based adsorbents for separating of azeotropic ethanol-water in biofuels ethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **91**, 977–984 (2016).
  106. Dhital, S., Butardo, V. M., Jobling, S. A. & Gidley, M. J. Rice starch granule amylolysis - Differentiating effects of particle size, morphology, thermal properties and crystalline polymorph. *Carbohydr. Polym.* **115**, 305–316 (2014).
  107. Kim, J. Y., Park, D. J. & Lim, S. T. Fragmentation of waxy rice starch granules by enzymatic hydrolysis. *Cereal Chem.* **85**, 182–187 (2008).
  108. Man, J. *et al.* Morphology and structural properties of high-amylose rice starch residues hydrolysed by amyloglucosidase. *Food Chem.* **138**, 2089–2098 (2013).
  109. Man, J. *et al.* Morphology and structural characterization of high-amylose rice starch residues hydrolyzed by porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Food Hydrocoll.* **31**, 195–203 (2013).
  110. Zeng, F., Ma, F., Kong, F., Gao, Q. & Yu, S. Physicochemical properties and digestibility of hydrothermally treated waxy rice starch. *Food Chem.* **172**, 92–98 (2015).
  111. Horstmann, S., Belz, M., Heitmann, M., Zannini, E. & Arendt, E. Fundamental Study on the Impact of Gluten-Free Starches on the Quality of Gluten-Free Model Breads. *Foods* **5**, 30 (2016).
  112. Huang, J. *et al.* In vitro digestion properties of heterogeneous starch granules from high-amylose rice. *Food Hydrocoll.* **54**, 10–22 (2016).
  113. Huynh, T. D., Shrestha, A. K. & Arcot, J. Physicochemical properties and digestibility of eleven Vietnamese rice starches with varying amylose contents. *Food Funct.* **7**, 3599–3608 (2016).
  114. Belingheri, C., Giussani, B., Rodriguez-Estrada, M. T., Ferrillo, A. & Vittadini, E. Oxidative stability of high-oleic sunflower oil in a porous starch carrier. *Food Chem.* **166**, 346–351 (2015).
  115. Xing, Y. *et al.* Effect of porous starch concentrations on the microbiological characteristics of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. *Food Funct.* **5**, 972

- (2014).
116. Wang, H. *et al.* Preparation and characterization of porous corn starch and its adsorption toward grape seed proanthocyanidins. *Starch/Staerke* **68**, 1254–1263 (2016).
  117. Ma, X., Liu, X., Anderson, D. P. & Chang, P. R. Modification of porous starch for the adsorption of heavy metal ions from aqueous solution. *Food Chem.* **181**, 133–139 (2015).
  118. Liu, X. & Wei, Q. Removal of methylene blue from aqueous solution using porous starch-poly(acrylic acid) superadsorbents. *RSC Adv.* **6**, 79853–79858 (2016).
  119. Lecorre, D., Vahanian, E., Dufresne, A. & Bras, J. Enzymatic pretreatment for preparing starch nanocrystals. *Biomacromolecules* **13**, 132–137 (2012).
  120. Wang, H. *et al.* Preparation of porous carbon spheres from porous starch. *Solid State Ionics* **180**, 1429–1432 (2009).
  121. Haroon, M. *et al.* Chemical modification of starch and its application as an adsorbent material. *RSC Adv.* **6**, 78264–78285 (2016).
  122. Kim, H. C. *et al.* Renewable smart materials. *Smart Mater. Struct.* **25**, 1–14 (2016).
  123. Zeller, B.L., Saleeb, F.Z., Ludescher, R. D. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation. *Trends Food Sci. Technol.* **9**, 389–394 (1999).
  124. Guo, L., Li, G., Liu, J., Meng, Y., Tang, Y. . Adsorptive decolorization of methylene blue by crosslinked porous starch. *Carbohydr. Polym.* **93**, 374–379 (2013).
  125. Lionetti, E. & Catassi, C. The Role of Environmental Factors in the Development of Celiac Disease: What Is New? *Diseases* **3**, 282–293 (2015).
  126. Domian, E., Cenker, J. Flowability and Homogeneity of Food Powders with Plated Oil Ingredient. *J. Food Process Eng.* **36**, 626–633 (2013).
  127. Petit, B. C., Escher, F., Nuesslin, J. Structural features of starch-flavor complexation in food model systems. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 227–235 (2006).
  128. Belingheri, C., Curti, E., Ferrillo, A., Vittadini, E. Evaluation of porous starch as a flavour carrier. *Food Funct.* **3**, 255–261 (2012).
  129. Buttery, R. G., Glenn, G. M., Stern, D. J. Sorption of volatile flavor compounds by microcellular cereal starch. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 5206–5208 (1999).
  130. Weirong, Y. & Huiyuan, Y. Adsorbent characteristics of porous starch. *Starch/Staerke* **54**, 260–263 (2002).
  131. Embuscado, M. E. *Functionalizing Carbohydrates for Food Applications*. (DESTech Publications, 2014).
  132. Eliasson, A. C. *Starch in Food: Structure, Function and Applications*. (Elsevier, 2004).

133. Dzedzic, S. Z. & Kearsley, M. W. *Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives*. (Springer Science & Business, 1995).
134. Turchiuli, C.; Fuchs, M.; Bohin, M.; Cuvelier, M.E.; Ordonnaud, C. . & Peyrat-Maillard, M.N.; Dumoulin, E. Oil encapsulation by spray drying and fluidized bed agglomeration. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **6**, 29–35 (2005).
135. AOAC. *Official methods of analysis of AOAC international, Vol. 2*. (1997).
136. Severo, M. G., Moraes, K., Ruiz, W. A. Modificação enzimática da farinha de arroz visando a produção de amido resistente. *Quim. Nov.* **33**, 345–350 (2010).
137. Zavareze, E. R., Halal, S. L. M., Pereira, J. M., Randünz, A. L., Elias, M. C., Dias, A. R. G. Caracterização química e rendimento de extração de amido de arroz com diferentes teores de amilose. *Braz. J. Food Technol.* 24–30 (2009).
138. Boyaci, I. H., Williams, P. C. & Köksel, H. A rapid method for the estimation of damaged starch in wheat flours. *J. Cereal Sci.* **39**, 139–145 (2004).
139. Filho, A. M. R., Gardusi, F., Carvalho, G. R. L., Luz, P. H. M., Reis, A. S., Barrozo, M. A. S. . Estudo de técnicas para monitoramento da distribuição do diâmetro de bolhas na flotação. in *XIX Jornada em Engenharia Química* (2014).
140. Marcomini, R. F., de Souza, D. M. P. F. Caracterização microestrutural de materiais cerâmicos utilizando o programa de processamento digital de imagens Image J. *Cerâmica* **57**, 100–105 (2011).
141. Sgura, R., Reis, M. C., Andreetta, M. R. B., Hernandez, A. C., Medeiros, I. S. Sintering dental porcelain with CO<sub>2</sub> laser: porosity and mechanical characterization. *Brazilian Dent. Sci.* **16**, 46 – 52 (2013).
142. Wei, C. *et al.* Granule structure and distribution of allomorphs in C-type high-amylose rice starch granule modified by antisense RNA inhibition of starch branching enzyme. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 11946–11954 (2010).
143. Kohlbrecher, J. SASfit: A program for fitting simple structural models to small angle scattering data. <http://kur.web.psi.ch/sans1/SANSSoft/sasfit.html> (2011).
144. Singh, N., Kaur, L., Sandhu, K. S., Kaur, J. & Nishinari, K. Relationships between physicochemical, morphological, thermal, rheological properties of rice starches. *Food Hydrocoll.* **20**, 532–542 (2006).
145. Li, H. *et al.* Porous starch extracted from Chinese rice wine vinasse: Characterization and adsorption properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **61**, 156–159 (2013).
146. Wongsagonsup, R., Shobsngob, S., Oonkhanond, B. & Varavinit, S. Zeta potential (??) and pasting properties of phosphorylated or crosslinked rice starches. *Starch/Stärke* **57**, 32–37 (2005).
147. Tester, R. F., Karkalas, J. & Qi, X. Starch - Composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.* **39**, 151–165 (2004).

148. Vandeputte, G. E., Vermeulen, R., Geeroms, J. & Delcour, J. A. Rice starches. I. Structural aspects provide insight into crystallinity characteristics and gelatinisation behaviour of granular starch. *J. Cereal Sci.* **38**, 43–52 (2003).
149. Tong, T. L. Soaking time of rice in semidry flour m...rtened by increasing the grains cracks. *J. Cereal Sci.* **74**, 121–126 (2017).
150. Mok, C., Dick, J. W. Moisture absorption of damaged wheat starch. *Cereal Chem.* **68**, 405–409 (1991).
151. Tester, R. F. Properties of damaged starch granules: Composition and swelling properties of maize, rice, pea and potato starch fractions in water at various temperatures. *Food Hydrocoll.* **11**, 293–301 (1997).
152. Morrison, W. R., Tester, R. F., Gidley, M. J. Properties of damaged starch granules II. crystallinity, molecular order and gelatinization of ball-milled starches. *Journal Cereal Sci.* **19**, 209–217 (1994).
153. Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L. & O'Mahony, J. A. Chemistry, structure, functionality and applications of rice starch. *J. Cereal Sci.* **70**, 291–300 (2016).
154. Tao, H. *et al.* Effect of multiple freezing/thawing cycles on the structural and functional properties of waxy rice starch. *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
155. Singh, N., Kaur, L. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem.* **81**, 219–231 (2003).
156. Cai, J. *et al.* Structural and functional properties of alkali-treated high-amylose rice starch. *Food Chem.* **145**, 245–253 (2014).
157. Sujka, M. & Jamroz, J. Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging , and functional behaviour. *Food Hydrocoll.* **31**, 413–419 (2013).
158. Mohan, B. H., Gopal, A., Malleshi, N. G., Tharanathan, R. N. Characteristics of native and enzymatically hydrolyzed ragi (*Eleusine coracana*) and rice (*Oryza sativa*) starches. *Carbohydr Polym* **59**, 43–50 (2005).
159. Chen, J. J., Lii, C. Y. & Lu, S. Physicochemical and morphological analyses on damaged rice starches. *J. Food Drug Anal.* **11**, 283–289 (2003).
160. Lindeboom, N., Chang, P. R. & Tyler, R. T. Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch - Stärke* **56**, 89–99 (2004).
161. Zhu, L. J., Liu, Q. Q., Wilson, J. D., Gu, M. H. & Shi, Y. C. Digestibility and physicochemical properties of rice (*Oryza sativa* L.) flours and starches differing in amylose content. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1751–1759 (2011).
162. Yeh, A. I. Preparation and applications of rice flour. in *Rice: Chemistry and Technology* (ed. Chemists, T. A. A. of C.) 495–539 (2004).
163. Barrera, G. N. *et al.* Evaluation of the mechanical damage on wheat starch granules by

- SEM, ESEM, AFM and texture image analysis. *Carbohydr. Polym.* **98**, 1449–1457 (2013).
164. Sujka, M. & Jamroz, J. Characteristics of pores in native and hydrolyzed starch granules. *Starch/Staerke* **62**, 229–235 (2010).
165. Gonçalves, G. C., Mattjie, A. C., Cupertini, D. A., Veit, M. T. Adsorção dos corantes azul de metileno e violeta cristal usando carvão ativado descartado da purificação doméstica de água potável. in *Resumo no 49º Congresso Brasileiro de Química* (2009).
166. Ardizzone, S., Gabrielli, G., Lazzari, P. Adsorption of Methylene Blue at solid/liquid and water/air interfaces. *Physicochem. Eng. Asp.* **76**, 149–157 (1993).
167. Nidheesh, P. V., Gandhimathi, R. Ramesh, T. S., Singh, T. S. A. Adsorption and desorption characteristics of crystal violet in bottom ash column. *J. Urban Environ. Eng.* **6**, 18–29 (2012).
168. Wang, S., Zhu, Z. H., Coomes, A., Haghseresht, F., Lu, G. Q. The physical and surface chemical characteristics of activated carbons and the adsorption of methylene blue from wastewater. *J Colloid Interface Sci* **284**, 440–446 (2005).
169. Sujka, M. Ultrasonic modification of starch – Impact on granules porosity. *Ultrason. Sonochem.* **37**, 424–429 (2017).
170. Bae, W. G. *et al.* 25th anniversary article: Scalable multiscale patterned structures inspired by nature: The role of hierarchy. *Adv. Mater.* **26**, 675–699 (2014).
171. Lima, T. A. R. M., Ilavsky, J., Hammons, J., Sarmiento, V. H. V., Rey, J. F.Q., Valerio, M. E. G. Synthesis and synchrotron characterisation of novel dual-template of hydroxyapatite scaffolds with controlled size porous distribution. *Mater Lett* **190**, 107–110 (2017).
172. Yang, X.-Y., Chen, L.-H., Li, Y., Rooke, J. C., Sanchez, C., Su, B.-L. Hierarchically porous materials: synthesis strategies and structure design. *Chem Soc Rev* **46**, 481–559 (2017).
173. Feng, T. *et al.* Structural characterization and bioavailability of ternary nanoparticles consisting of amylose,  $\alpha$ -linoleic acid and  $\beta$ -lactoglobulin complexed with naringin. *Int. J. Biol. Macromol.* **99**, 365–374 (2017).
174. Sarrate, R. *et al.* Modification of the morphology and particle size of pharmaceutical excipients by spray drying technique. *Powder Technol.* **270**, 244–255 (2015).
175. Hernández-Jaimes, C. *et al.* Corn starch acid hydrolysis at the onset gelatinization temperature: Morphology, crystallinity, viscoelasticity, and thermal properties. *Starch/Staerke* **66**, 636–644 (2014).
176. Balzaretto, N. M. *Tópicos em nanociência e nanotecnologia.* (2014).
177. Stribeck, N. *X-Ray Scattering of Soft Matter.* (2007).
178. Fennema O. R. *Food Chemistry.* (1996).

179. Sodhi N. S.; Singh N. Morphological, thermal and rheological properties of starches separated from rice cultivars grown in India. *Food Chem.* **80**, 99–108 (2003).
180. Mohammad Amini, A. & Razavi, S. M. A. A fast and efficient approach to prepare starch nanocrystals from normal corn starch. *Food Hydrocoll.* **57**, 132–138 (2016).
181. Sun, N. xia, Liang, Y., Yu, B., Tan, C. ping & Cui, B. Interaction of starch and casein. *Food Hydrocoll.* **60**, 572–579 (2016).
182. Silveira, N. *et al.* Synthesis and characterization of the antitubercular phenazine lapazine and development of PLGA and PCL nanoparticles for its entrapment. *Mater. Sci. Eng. C* **58**, 458–466 (2016).
183. Doostmohammadi, A. *et al.* Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. *Ceram. Int.* **37**, 2311–2316 (2011).
184. Zeng, F., Zhu, S., Chen, F., Gao, Q. & Yu, S. Effect of different drying methods on the structure and digestibility of short chain amylose crystals. *Food Hydrocoll.* **52**, 721–731 (2016).
185. Asmeda, R., Noorlaila, A. & Norziah, M. H. Relationships of damaged starch granules and particle size distribution with pasting and thermal profiles of milled MR263 rice flour. *Food Chem.* **191**, 45–51 (2016).
186. Mahadevamma, S. & Tharanathan, R. N. Processed rice starch characteristics and morphology. *Eur. Food Res. Technol.* **225**, 603–612 (2007).
187. Hasjim, J., Li, E. & Dhital, S. Milling of rice grains: Effects of starch/flour structures on gelatinization and pasting properties. *Carbohydr. Polym.* **92**, 682–690 (2013).
188. Zhu, J. *et al.* Structural features and thermal property of propionylated starches with different amylose/amylopectin ratio. *Int. J. Biol. Macromol.* **97**, 123–130 (2017).
189. Cai, J. *et al.* Relationship between structure and functional properties of normal rice starches with different amylose contents. *Carbohydr. Polym.* **125**, 35–44 (2015).
190. Sevenou, O., Hill, S. E., Farhat, I. A. & Mitchell, J. R. Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* **31**, 79–85 (2002).
191. Warren, F. J., Gidley, M. J. & Flanagan, B. M. Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure - A joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydr. Polym.* **139**, 35–42 (2016).
192. Zhu, D. *et al.* Effects of nitrogen level on structure and physicochemical properties of rice starch. *Food Hydrocoll.* **63**, 525–532 (2017).
193. Zhu, D. *et al.* Physicochemical properties of indica-japonica hybrid rice starch from Chinese varieties. *Food Hydrocoll.* **63**, 356–363 (2017).
194. Lacerda, L. D., Leite, D. C., Soares, R. M. D. & Silveira, N. P. Effects of  $\alpha$ -Amylase, Amyloglucosidase, and Their Mixture on Hierarchical Porosity of Rice Starch. *Starch* -

*Stärke* 1–7 (2018). doi:10.1002/star.201800008

195. Shrestha, A. K. *et al.* Molecular, mesoscopic and microscopic structure evolution during amylase digestion of maize starch granules. *Carbohydr. Polym.* **90**, 23–33 (2012).
196. Blazek; J., G. E. P. Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. *Carbohydr. Polym.* **85**, 281–293 (2011).
197. Sanderson, J. S.; Daniels, R. D.; Donald, A. M.; Blennow, A.; Engelsens, S. B. Exploratory SAXS and HPAEC-PAD studies of starches from diverse plant genotypes. *Carbohydr. Polym.* **64**, 433–443 (2006).
198. Yuryev, V. P.; Krivandin, A. V.; Kiseleva, V. I.; Wasserman, L. A.; Genkina N. K.; Fornal, J.; Blaszcak, W.; Schiraldi, A. Structural parameters of amylopectin clusters and semi-crystalline growth rings in wheat starches with different amylose content. *Carbohydr. Res.* **339**, 2683–2691 (2004).
199. Jeong, O. & Shin, M. Preparation and stability of resistant starch nanoparticles , using acid hydrolysis and cross-linking of waxy rice starch. *Food Chem.* **256**, 77–84 (2018).
200. Jiang, S. *et al.* LWT - Food Science and Technology Adsorption of procyanidins onto chitosan-modified porous rice starch. *LWT - Food Sci. Technol.* **84**, 10–17 (2017).
201. Andy Field. *Descobrimo a Estatística usando o SPSS.* (2009).
202. Lopes; P. A. *Probabilidades & Estatística.* (2000).
203. Lapponi; Carlos, J. *Estatística usando Excel.* (2013).
204. Kiemele M. J.; Schmidt S. R.; Berdine R. J.; *Basic Statistics, Tools for Continuous Improvement.* (2000).
205. Adelaide Figueiredo. *Estatística Descritiva e Probabilidades.* (2009).
206. Sonia Vieira. *Introdução a Bioestatística.* (Elsivier Brasil, 2011).