

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANDRIELLE DALILA VAILATTI

**HIDRÓLISE ÁCIDA E CAMPO ELÉTRICO APLICADOS PARA A MODIFICAÇÃO
DE AMIDO DE MILHO**

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANDRIELLE DALILA VAILATTI

**HIDRÓLISE ÁCIDA E CAMPO ELÉTRICO APLICADOS PARA A MODIFICAÇÃO
DE AMIDO DE MILHO**

Trabalho de conclusão apresentado junto à
atividade de ensino “Trabalho de Conclusão
de Curso – QUI” do Curso de Química, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Química

Profa. Dra. Nádyá Pesce da Silveira
Orientadora

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, pelo apoio nas minhas decisões e pelo amparo para que eu pudesse alcançar minhas metas. Principalmente à minha mãe e minha irmã, que nunca mediram esforços para me apoiar e por todo cuidado que sempre tiveram comigo.

À minha orientadora, Dra. Nádyá, pela oportunidade, ensinamentos e confiança em mim e no meu potencial, sendo sempre muito compreensiva e solícita.

À Dra. Daiani pela paciência e disponibilidade em ensinar, sempre me ajudando.

Aos meus amigos, Félix, Daniel e Felipe, que estiveram presentes durante grande parte da minha graduação, me apoiando e ajudando, independente das situações, me incentivando a manter o foco e a continuar nos momentos de incerteza.

Aos colegas de laboratório, principalmente à Roberta, pela amizade, companheirismo e ajuda nos experimentos.

A todos os meus amigos, pelo incentivo, momentos e risadas que tornaram minha caminhada mais leve.

RESUMO

Três tipos de amido de milho (ceroso, regular e com alto teor de amilose) foram utilizados, os quais possuem proporções desiguais de porção amorfa e cristalina, representadas, respectivamente, pela amilose e amilopectina. Cada espécie foi preparada numa concentração 5% (m/v), e mantida em soluções contendo diferentes concentrações de ácido clorídrico (HCl) — 0,1 mol/L; 1 mol/L; e 2 mol/L — por tempos distintos (24h, 96h, 168h). Com a intenção de aumentar a cristalinidade do amido de milho e otimizar o tempo de hidrólise, o amido regular (18% amilose), que melhor respondeu aos testes preliminares, foi submetido a uma voltagem fixa, variando o tempo de aplicação do campo elétrico e o número de ciclos. As amostras foram investigadas por microscopia óptica (MO) e eletrônica (MEV), difração de raios-X (DRX) e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Os resultados mostram que a hidrólise ácida com campo elétrico acoplado permite uma redução significativa no tempo de tratamento e melhores valores de cristalinidade, devido à orientação dos eletrólitos em solução. Efeitos superficiais também foram observados nos grânulos de amido hidrolisados.

Palavras-chave: Amido. Hidrólise ácida. Cristalinidade. Campo elétrico. SAXS

ABSTRACT

Three kinds of corn starch (waxy, regular and high amylose) were chosen, they have uneven crystalline and amorphous portions, represented, respectively, by amylose and amylopectin. Each of the species were prepared in a 5% concentration (m/v) and were kept in solutions containing different concentrations of hydrochloric acid (HCl) – $0,1\text{mol.L}^{-1}$, 1mol.L^{-1} and 2mol.L^{-1} – for different times (24h, 96h, 168h). Intending to increase crystallinity and optimize hydrolysis time, regular starch (18% amylose), which better stood against the preliminar tests, was subjected to a fixed voltage, varying the electric field application time and number of cycles. The samples were investigated by optical (OM) and scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and small-angle X-ray scattering (SAXS). The results showed that the acid hydrolysis coupled with an external electric field allows a significant reduction in treatment time and better crystallinity values, due to the orientation of the electrolytes in solution. Surface effects were also observed on hydrolyzed starch granules.

Keywords: Starch. Acid hydrolysis. Crystallinity. Electric field. SAXS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da amilose.	9
Figura 2 - Estrutura molecular da amilopectina.	10
Figura 3 - Montagem experimental para a aplicação de campo elétrico nas soluções ácidas de amido.	12
Figura 4 - Difusão iônica simplificada na hidrólise livre (HL) e na hidrólise orientada (HO).	17
Figura 5 - Amido de milho ceroso (esquerda), regular (meio) e com alto teor de amilose (direita) <i>in natura</i> . Todas as imagens tem escala de 2 μm	17
Figura 6 - Amido de milho ceroso sob a ação de hidrólise ácida por 24h (1ª linha), 96h (2ª linha) e 168h (3ª linha), nas concentrações de 0,1 mol.L ⁻¹ (1ª coluna), 1 mol.L ⁻¹ (2ª coluna) e 2 mol.L ⁻¹ (3ª coluna). Todas as imagens tem escala de 2 μm	18
Figura 7 - Amido de milho regular sob a ação de hidrólise ácida por 24h (1ª linha), 96h (2ª linha) e 168h (3ª linha), nas concentrações de 0,1 mol.L ⁻¹ (1ª coluna), 1 mol.L ⁻¹ (2ª coluna) e 2 mol.L ⁻¹ (3ª coluna). Todas as imagens tem escala de 2 μm	19
Figura 8 - Amido de milho com alto teor de amilose sob a ação de hidrólise ácida por 24h (1ª linha), 96h (2ª linha) e 168h (3ª linha), nas concentrações de 0,1 mol.L ⁻¹ (1ª coluna), 1 mol.L ⁻¹ (2ª coluna) e 2 mol.L ⁻¹ (3ª coluna). Todas as imagens tem escala de 2 μm	20
Figura 9 - Micrografias das amostras HO1 (a), HO2 (b), HO3 (c), HO4 (d), HO5 (e) e HO6 (f). Todas as imagens tem escala de 2 μm	21
Figura 10 - Difractogramas dos diferentes tipos de amido de milho testados.	22
Figura 11 - Difractogramas para amostras de amido de milho regular.	24
Figura 12 - Micrografias do amido de milho regular <i>in natura</i> observado sem (esquerda) e com luz polarizada (direita). A escala corresponde a 20 μm	26
Figura 13 - Curvas de SAXS das amostras em todos os valores de q medidos.	28
Figura 14 - Ajuste das curvas de SAXS usando o modelo Lorentziano. As amostras seguem a mesma legenda da Figura 13.	29
Figura 15 - Ajuste das curvas de SAXS usando o modelo Gaussiano. As amostras seguem a mesma legenda da Figura 13.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições utilizadas para a aplicação de campo elétrico na HO.....	13
Tabela 2 - Grau de cristalinidade obtido para as amostras tratadas com HL.....	23
Tabela 3 - Valores de cristalinidade obtidos para as amostras realizadas sob influência de campo elétrico.....	25
Tabela 4 - Gelatinização para o amido de milho regular após HL.....	26
Tabela 5 - Gelatinização do amido de milho preparado através de HO.....	27
Tabela 6 - Dados obtidos a partir dos ajustes dos dados de SAXS.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Materiais utilizados.....	12
2.1.1 Amido de milho	12
2.1.2 Dispositivo para aplicação de campo elétrico	12
2.2 Preparação das amostras	13
2.2.1 Hidrólise Livre (HL)	13
2.2.2 Hidrólise Orientada (HO)	13
2.3 Caracterização	14
2.3.1 Microscopia Óptica (MO)	14
2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	14
2.3.3 Difração de Raios-X (DRX)	14
2.3.4 Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS).....	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	17
3.1 Morfologia	17
3.2 Cristalinidade	21
3.3 Gelatinização	25
3.4 Organização Estrutural	28
4 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

O amido é um polissacarídeo, encontrado em abundância na natureza, principalmente em tubérculos e cereais, normalmente na forma de grânulos. É usado extensivamente no ramo alimentício, mas também tem outras aplicações industriais como estabilizante coloidal, adesivo, espessante, em fármacos e até no tratamento de resíduos.

É constituído de dois componentes principais: a amilose e a amilopectina, formando uma superestrutura semicristalina. A amilose é responsável pela porção amorfa do grânulo, enquanto a amilopectina pela parte cristalina. Os valores de cristalinidade e percentuais de amilose dependem da sua fonte botânica.

A amilose, composta por fragmentos de α -D-glucopiranosose (forma cíclica da glicose), é um polímero linear com ligações glicosídicas α -1,4. Já a amilopectina, que é um dos polímeros de ocorrência natural com maior peso molecular, é composta por fragmentos de α -D-glucopiranosose, com ligações α -1,4, assim como a amilose, entretanto ocorrem ligações α -1,6 que ramificam a estrutura. Essas diferenças estruturais podem ser observadas pelas Figura 1 e Figura 2. A amilopectina tem 5% de pontos de ramificação, mas isso já é suficiente para que as propriedades físicas sejam diferentes (BULÉON *et al.*, 1998; RATNAYAKE; HOOVER; WARKENTIN, 2002).

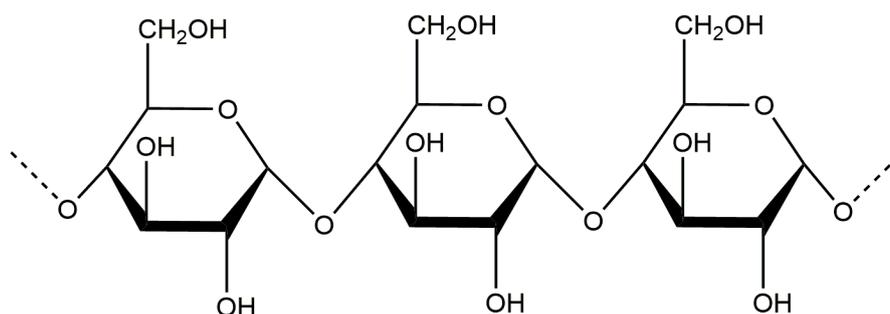


Figura 1 - Estrutura da amilose.

A hidrólise, que é a ruptura das ligações de hidrogênio das estruturas, ocorre preferencialmente na porção amorfa dos grânulos, pois as ligações de hidrogênio da amilose são mais facilmente acessíveis que a da amilopectina, a cristalinidade relativa dos grânulos aumenta com o tratamento (OATES, 1997). Outro fator que pode influenciar em um maior ataque da amilose pelo ácido é que grande parte

desse componente se encontra na parte periférica dos grânulos, como sugere Jane *et al.* (1994).

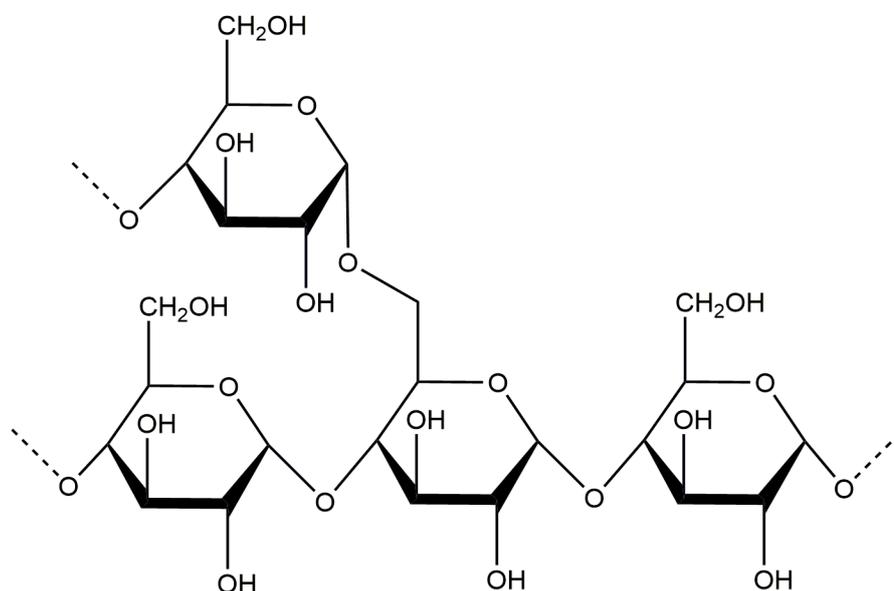


Figura 2 - Estrutura molecular da amilopectina.

Modificando a superestrutura do amido de milho, e aumentando os valores de cristalinidade, mudanças estruturais, como uma maior desorganização lamelar são observadas, isso leva a alterações também na faixa de temperatura de gelatinização dos grânulos, o empacotamento dos grânulos e na formação de géis (JAYAKODY; HOOVER, 2002; ROCHA; CARNEIRO; FRANCO, 2010).

Alguns estudos revelam como se comporta o amido e os efeitos causados pelo campo elétrico pulsado (HAN *et al.*, 2009a, 2009b; LI *et al.*, 2019) e também pelo campo elétrico induzido (LI *et al.*, 2016, 2017), entretanto, esses tratamentos levam muitas vezes a ruptura dos grânulos e a uma consequente, perda de cristalinidade. Nesse trabalho, as condições aplicadas são condizentes com o método de campo elétrico moderado com valores abaixo de 1000 V.m^{-1} (ZHU, 2018), que tende a ser uma técnica não-térmica e que mantém a integridade dos grânulos.

Com isso, o objetivo do trabalho é investigar o comportamento de variedades de amido de milho, com diferentes porcentagens de amilose, perante a hidrólise ácida, verificando também quais as melhores condições de tratamento para modificar os grânulos quanto a sua cristalinidade, faixa de temperatura de gelatinização e organização estrutural, mantendo, entretanto, a integridade dos grânulos. A otimização do processo, em questão de tempo e eficiência, também foi

estudada, com o acoplamento de campo elétrico externo ao sistema (DA SILVEIRA *et al.*, 2019).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais utilizados

2.1.1 Amido de milho

Três variedades de amido de milho, com diferentes teores de amilose nos grânulos, foram utilizadas para o preparo das amostras: ceroso, regular e com alto teor de amilose, contendo 4%, 18% e 52% de amilose, respectivamente. Os grânulos foram secos em estufa a 40 °C por 48 horas antes do uso.

Todo o amido de milho utilizado foi uma doação da empresa Ingredion (Jundiaí, São Paulo, Brasil).

2.1.2 Dispositivo para aplicação de campo elétrico

Para a aplicação de campo elétrico nas amostras, exclusividade do método de hidrólise orientada, foi utilizado um capacitor composto por duas placas semicirculares de ouro, separadas por 4 mm. Os eletrodos de ouro são fixados em um suporte de politetrafluoretileno (PTFE) que, para o tratamento das amostras permaneceu dentro de porta amostras de quartzo.

O sistema montado foi ligado a uma fonte de alimentação elétrica (HF-3003S, Hikari, China), conforme mostra Figura 3, e permaneceu sob agitação constante durante todo o tratamento.

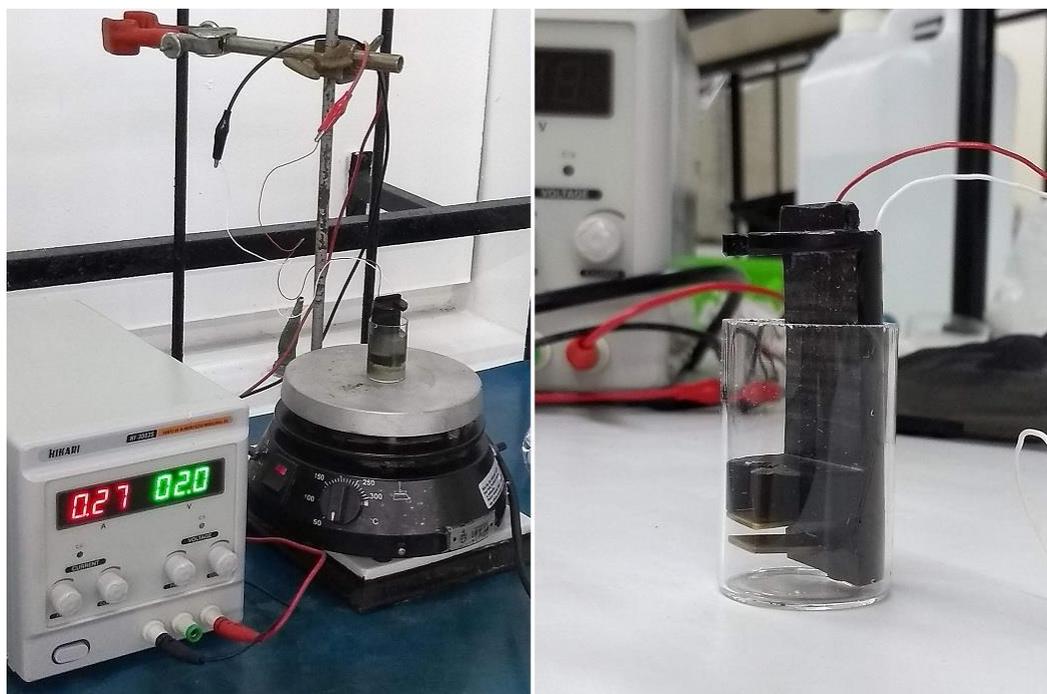


Figura 3 - Montagem experimental para a aplicação de campo elétrico nas soluções ácidas de amido.

2.2 Preparação das amostras

2.2.1 Hidrólise Livre (HL)

As três variedades do amido de milho (ceroso, regular e de alto teor de amilose) foram expostos à solução de ácido clorídrico (NEON, São Paulo, Brasil, 37%) em três concentrações diferentes: $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, 1 mol.L^{-1} e 2 mol.L^{-1} , sempre numa concentração de grânulos de amido fixa de 5% (m/v).

As amostras ficaram sob o efeito do tratamento durante 24, 96 e 168 horas, sendo agitadas mecanicamente, em agitador vórtex (AP-56, Phoenix, Brasil), a cada 24 horas. Depois de passado o tempo determinado, as amostras foram centrifugadas, lavadas com água destilada até a neutralização da solução sobrenadante, secas a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa e maceradas mecanicamente.

2.2.2 Hidrólise Orientada (HO)

Após análise dos dados obtidos com as amostras realizadas utilizando a Hidrólise Livre e buscando melhorias no tratamento das amostras, um novo método de preparação foi testado.

Foi preparada uma solução ácida do amido regular (18% amilose) em solução de ácido clorídrico 1 mol.L^{-1} , mantendo a concentração de grânulos de amido de 5% (m/v). Essa solução foi submetida à aplicação de um campo elétrico de 500 V.m^{-1} com voltagem fixa de 2 V. Cada porção teve o tempo de exposição ao campo elétrico e o número de ciclos aplicados variante, como mostra a Tabela 1. Todo o processo ocorreu sob agitação magnética constante e o intervalo entre os ciclos foi de 10 s.

Tabela 1 - Condições utilizadas para a aplicação de campo elétrico na HO.

Amostra	Número de ciclos	Tempo de cada ciclo (s)	Tempo total (s)
HO1	1	10	10
HO2	2	10	20
HO3	5	10	50
HO4	2	25	50
HO5	3	20	60
HO6	10	10	100

2.3 Caracterização

2.3.1 Microscopia Óptica (MO)

Para a determinação da temperatura inicial de gelatinização dos grânulos de amido e da faixa em que ocorre o processo de intumescimento dos grânulos até o rompimento da sua superestrutura, as amostras de amido de milho foram dispersas em água destilada (0,025 g.mL⁻¹).

As análises foram realizadas em microscópio óptico sob luz polarizada (BX41, Olympus, digital camera DPT3, EUA), acoplado a um forno (FP82HT, Mettler Toledo, EUA) para controle da temperatura. O aquecimento das amostras foi realizado em uma taxa de 10 °C.min⁻¹, partindo de 50 °C.

Todas as imagens foram realizadas sob uma magnificação da objetiva de 20 vezes.

2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram dispostas em fita de carbono, que foram fixadas em *stubs* (porta amostras para MEV). Após, foram metalizadas com uma fina camada de ouro.

O microscópio eletrônico (EVO MA10, Zeiss, Alemanha), localizado no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS, foi utilizado para observar a morfologia de todas as amostras.

2.3.3 Difração de Raios-X (DRX)

Para a determinação da cristalinidade das amostras foram realizadas análises das amostras sólidas em um difratômetro (D-500, Siemens, Alemanha) operando a 40 kV e 17,5 mA com 2θ de 3° a 40° e utilizando fonte monocromática de Cu-K_α.

Os difratogramas obtidos foram tratados com o software OriginPro 2019.

Através do método descrito por Hulleman *et al.* (1999) foi possível estimar o grau de cristalinidade (X_C):

$$X_C = \frac{H_C}{(H_C + H_A)} \quad (1)$$

sendo H_C a intensidade dos picos cristalinos e H_A a intensidade dos picos referentes a porção amorfa. Os picos analisados foram referentes à região onde 2θ é igual a 15° - 30°.

2.3.4 Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS)

As medidas foram realizadas na linha D01B/SAXS localizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Brasil).

A distância entre a amostra e o detector foi de 3000 mm, cobrindo uma faixa de vetor de espalhamento q de $0,04 - 1,5 \text{ nm}^{-1}$. O tempo de exposição de cada amostra foi de 10 minutos e o comprimento de onda (λ) dos raios-X monocromáticos incidentes foi $1,605 \text{ \AA}$.

O amido de milho seco foi colocado no porta amostras e $15 \mu\text{L}$ de água destilada foram adicionados, e selado com fita adesiva própria para as medidas. O porta amostras contendo apenas água foi utilizado como branco e sua intensidade foi subtraída dos resultados da leitura de todas as amostras.

Os valores do vetor de espalhamento q e a distância lamelar característica L podem ser calculados pelas equações 2 e 3 (SCHNABLEGGER; SINGH, 2013):

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta)}{\lambda} \quad (2)$$

$$L = \frac{2\pi}{q} \quad (3)$$

sendo λ o comprimento de onda e θ metade do ângulo entre o feixe espalhado e o feixe incidente.

Os dados obtidos foram ajustados, através do software OriginPro 2019, a leis de potências conforme as equações 4 e 5 (STRIBECK, 2007), correspondentes a um pico Lorentziano (YANG *et al.*, 2016) ou uma Gaussiana, respectivamente.

$$I(q) = I_0 + \frac{2A}{\pi} \left(\frac{w}{4(q - q_0)^2 + w^2} \right) \quad (4)$$

$$I(q) = I_0 + \frac{Ae^{\left(\frac{-4\ln(2)(q-q_0)^2}{w^2}\right)}}{w\sqrt{\frac{\pi}{4\ln(2)}}} \quad (5)$$

onde $I(q)$ é a intensidade espalhada, I_0 é a intensidade de fundo, A é a área do pico, w (nm^{-1}) é a largura total à meia altura do pico e q_0 (nm^{-1}) é a posição central do pico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Aplicando hidrólise ácida acoplada de campo elétrico externo, a migração de íons na solução é orientada e o tempo de tratamento é diminuído. Esse comportamento é retratado na Figura 4, onde as setas mostram a direção do campo elétrico.

Na HL, fatores como o tamanho dos íons, a concentração e a temperatura são as condições que ditam como transcorrerá o ataque do ácido aos grânulos. Já quando é realizada a hidrólise orientada, o ataque dos íons H^+ é favorecido, aumentando o ataque às ligações de hidrogênio da amilose (porção amorfa do grânulo) quando comparada com a hidrólise livre, pois o campo elétrico induz esse ataque.

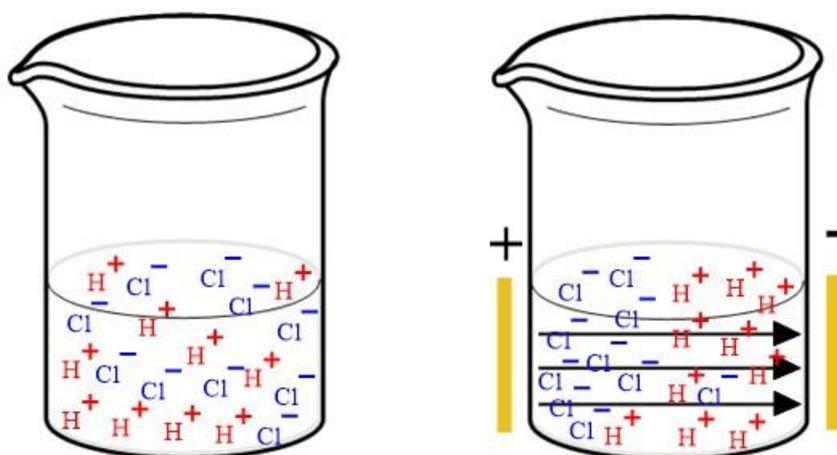


Figura 4 - Difusão iônica simplificada na hidrólise livre (HL) e na hidrólise orientada (HO).

3.1 Morfologia

Os três tipos de amido de milho testados, por terem diferentes quantidades de amilose entre si, apresentam morfologias e formatos levemente diferentes (Figura 5).

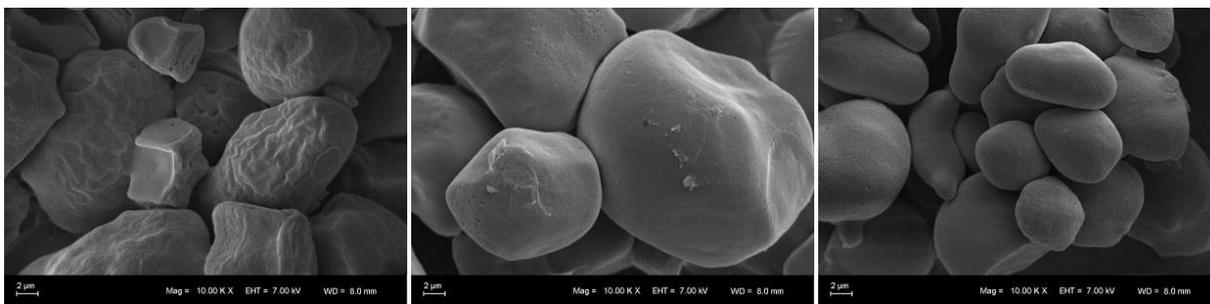


Figura 5 - Amido de milho ceroso (esquerda), regular (meio) e com alto teor de amilose (direita) *in natura*. Imagens de MEV (escala de 2 μ m).

Quanto mais rico em amilopectina (porção ramificada do grânulo) é o tipo de amido de milho, mais angular e de formato poliedral são os grânulos. Entretanto, quando o teor de amilose é maior, a superfície é mais lisa e uniforme. (CHEN *et al.*, 2006).

As micrografias de MEV, realizadas nas amostras após o tratamento ácido, mostram como a área superficial dos grânulos se comporta frente ao ataque da solução ácida. Significativas mudanças foram observadas para os amidos com menor quantidade de amilose na sua composição (ceroso e regular). Os grânulos, que antes do tratamento não apresentavam defeitos aparentes, passaram a apresentar cavidades pequenas e, de certa forma, ordenadas.

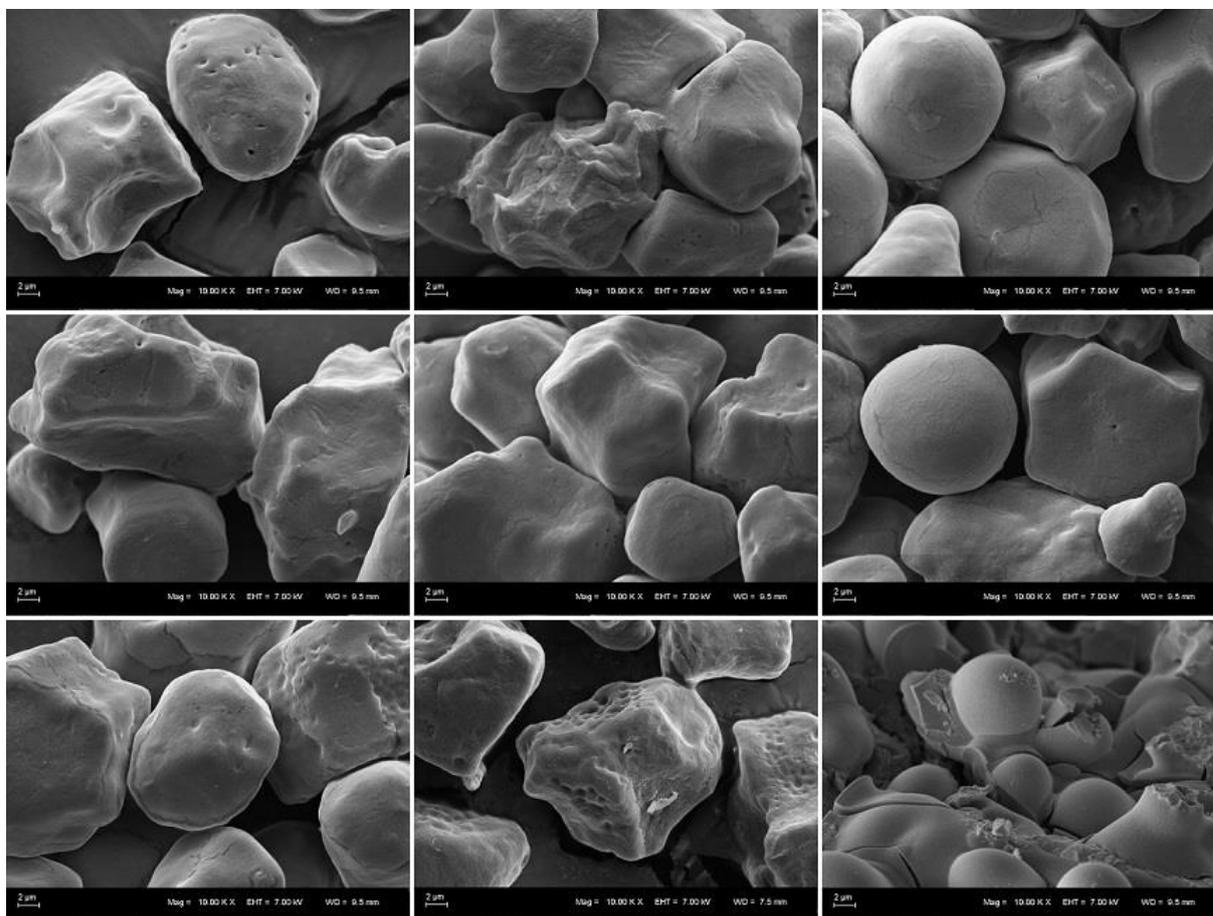


Figura 6 - Amido de milho ceroso sob a ação de hidrólise ácida por 24h (1ª linha), 96h (2ª linha) e 168h (3ª linha), nas concentrações de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (1ª coluna), 1 mol.L^{-1} (2ª coluna) e 2 mol.L^{-1} (3ª coluna). Imagens de MEV (escala de $2 \mu\text{m}$).

Nos grânulos do tipo ceroso, com o aumento do tempo de tratamento, é visível o início de uma degradação, pois é observada a formação de agregados, bem

como a ruptura e a junção de alguns grânulos, como na amostra que permaneceu por 168h em solução de HCl 2 mol.L⁻¹.

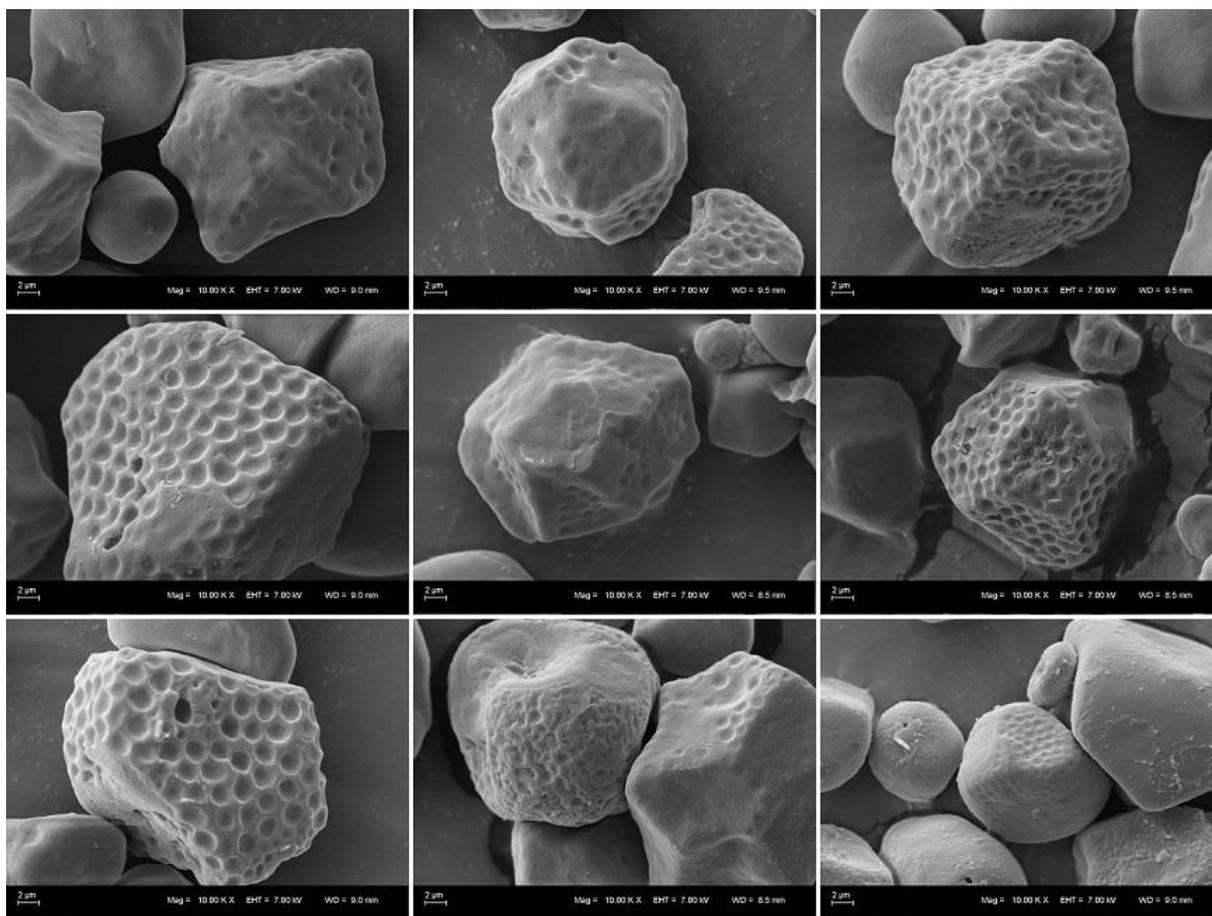


Figura 7 - Amido de milho regular sob a ação de hidrólise ácida por 24h (1ª linha), 96h (2ª linha) e 168h (3ª linha), nas concentrações de 0,1 mol.L⁻¹ (1ª coluna), 1 mol.L⁻¹ (2ª coluna) e 2 mol.L⁻¹ (3ª coluna). Imagens de MEV (escala de 2 μm).

O amido de milho regular foi o mais suscetível ao tratamento, sendo aparentes algumas mudanças superficiais desde as mais brandas condições de tratamento ácido.

Esses efeitos superficiais são esperados, como já relatado na literatura por Wang; Copeland (2012), pois a hidrólise em seu estado inicial ataca a superfície do amido, antes de interferir no seu interior.

Já para o amido com alto teor de amilose, não foram observadas mudanças significativas em seu exterior. A área superficial que aparentava ser lisa e sem grandes defeitos visíveis, permaneceu sem modificações (Figura 8). Devido ao fato dos grânulos com essa porcentagem de amilose (52%) serem mais esféricos, o

ataque ácido pode ter sido dificultado devido a um menor contato, por existir uma menor área superficial.

Dessa forma, e analisando os dados obtidos para cristalinidade por DRX, optou-se por utilizar o amido de milho regular para o preparo das amostras com auxílio de campo elétrico externo.

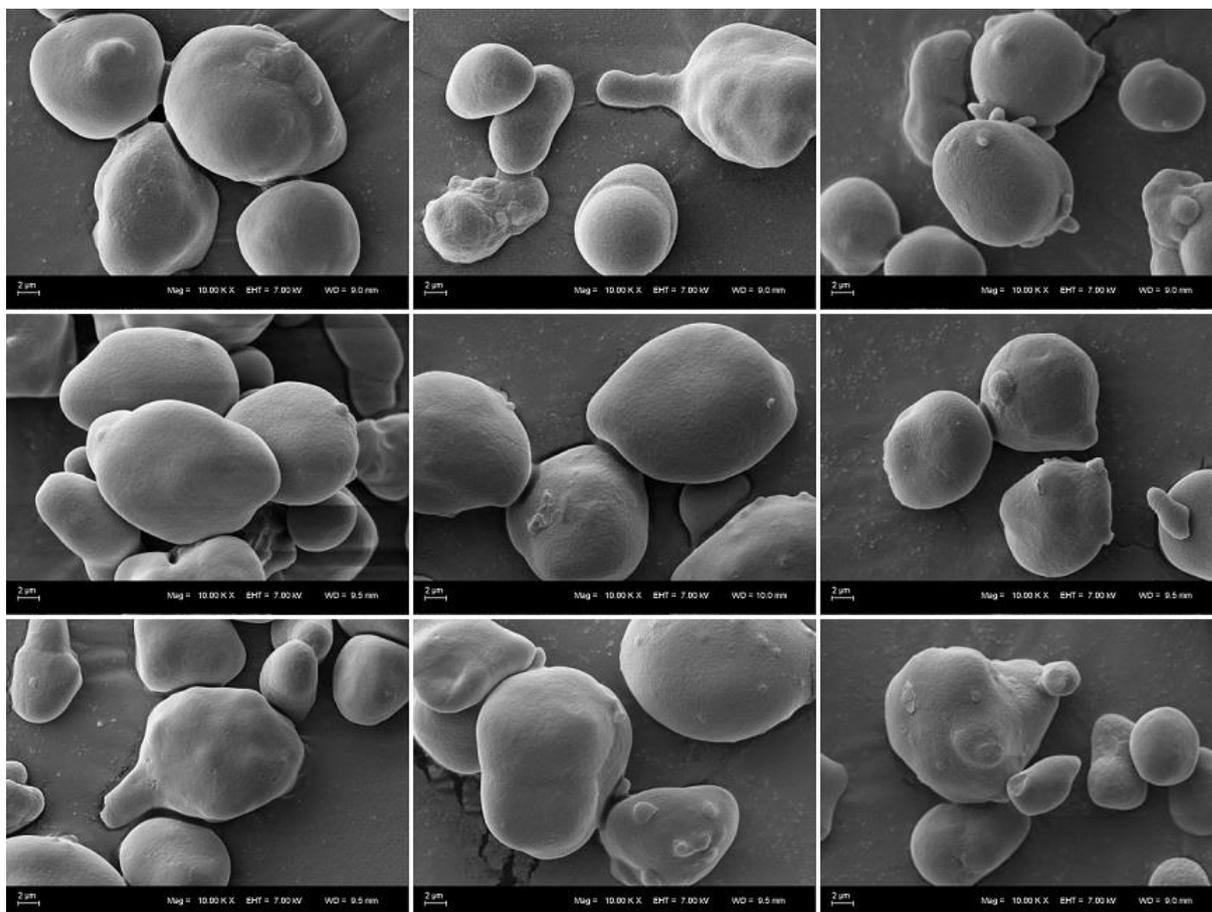


Figura 8 - Amido de milho com alto teor de amilose sob a ação de hidrólise ácida por 24h (1ª linha), 96h (2ª linha) e 168h (3ª linha), nas concentrações de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (1ª coluna), 1 mol.L^{-1} (2ª coluna) e 2 mol.L^{-1} (3ª coluna). Imagens de MEV (escala de $2 \mu\text{m}$).

As amostras de amido de milho regular realizadas com a hidrólise orientada apresentaram os mesmos efeitos na sua superfície, exibindo pequenas reentrâncias e irregularidades. Entretanto, essa condição passa a se manifestar em tempos de tratamento ácido muito menores do que os utilizados para realizar a HL.

Para atingir a formação das cavidades de forma uniforme, como para a amostra de amido de milho regular exposto por 24h em solução de HCl 1 mol.L^{-1} (Figura 7) levou-se apenas 10 segundos (amostra HO1) quando utilizada a hidrólise orientada, como aparece na Figura 9.

Conforme o número de ciclos realizados e/ou o tempo de cada ciclo, as irregularidades superficiais se tornaram mais evidentes, mas ainda assim, os grânulos de amido de milho não sofrem rupturas.

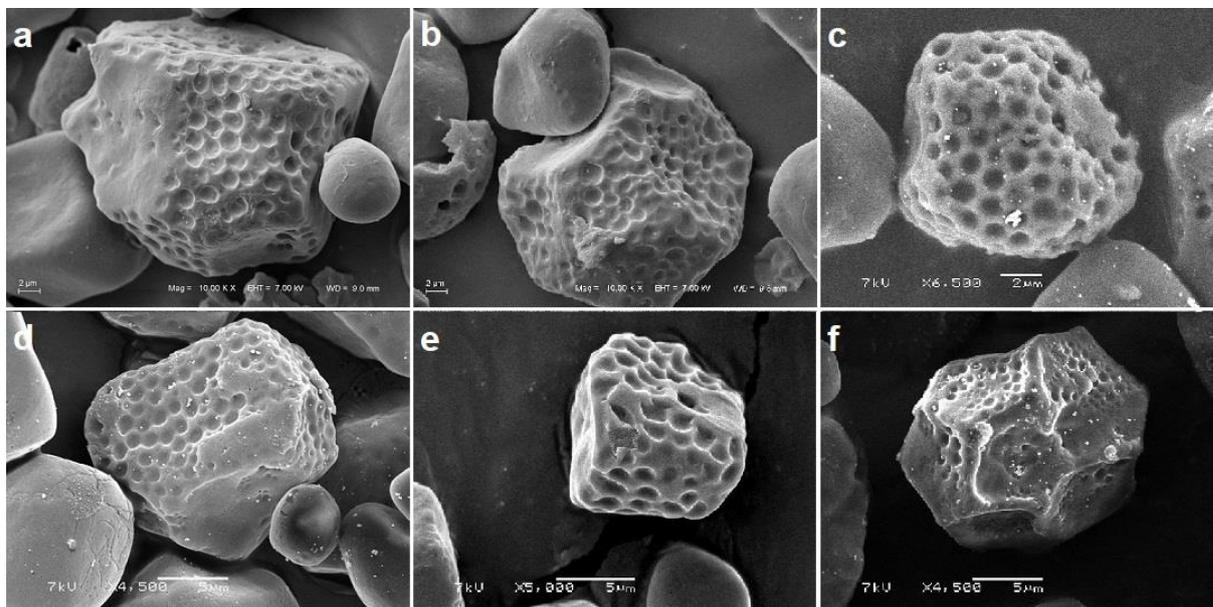


Figura 9 - Micrografias das amostras HO1 (a), HO2 (b), HO3 (c), HO4 (d), HO5 (e) e HO6 (f). Imagens de MEV (escala de 2 µm).

3.2 Cristalinidade

Os difratogramas obtidos para os amidos *in natura* foram característicos do tipo A para as variedades ceroso e regular (cristalinidade padrão para amidos oriundos de cereais). Já para o amido com alto teor de amilose, obteve-se um difratograma com o padrão do tipo B (que caracteriza amidos de tubérculos e amidos com grande quantidade de amilose em sua composição) (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

A Figura 10 mostra que os amidos ceroso e regular apresentam picos de intensidade em 2θ entre 15° e 23° e um grande dubleto não-resolvido em $2\theta = 17^\circ$. O amido de milho com alto teor de amilose mostrou seu pico de difração mais intenso quando 2θ é de 17° e alguns picos menos intensos em 15° , 20° e 23° ; um pico adicional também é observado em $2\theta = 6^\circ$, característica de amidos do tipo B como o de batata (CHEETHAM; TAO, 1998; CHEN *et al.*, 2006).

A área cristalina dos difratogramas, representada pelos picos, é maior nos grânulos ricos em amilopectina (ceroso) do que nos grânulos ricos em amilose (alto

teor de amilose), o que é esperado, pois a amilopectina é a parte da composição responsável pela cristalinidade.

A cristalinidade, calculada pelo método relatado por Hulleman *et al.* (1999), para as três variedades de amido de milho testadas para a hidrólise livre – ceroso, regular e com alto teor de amilose – foram de 47,4%, 33,4% e 13,3%, respectivamente.

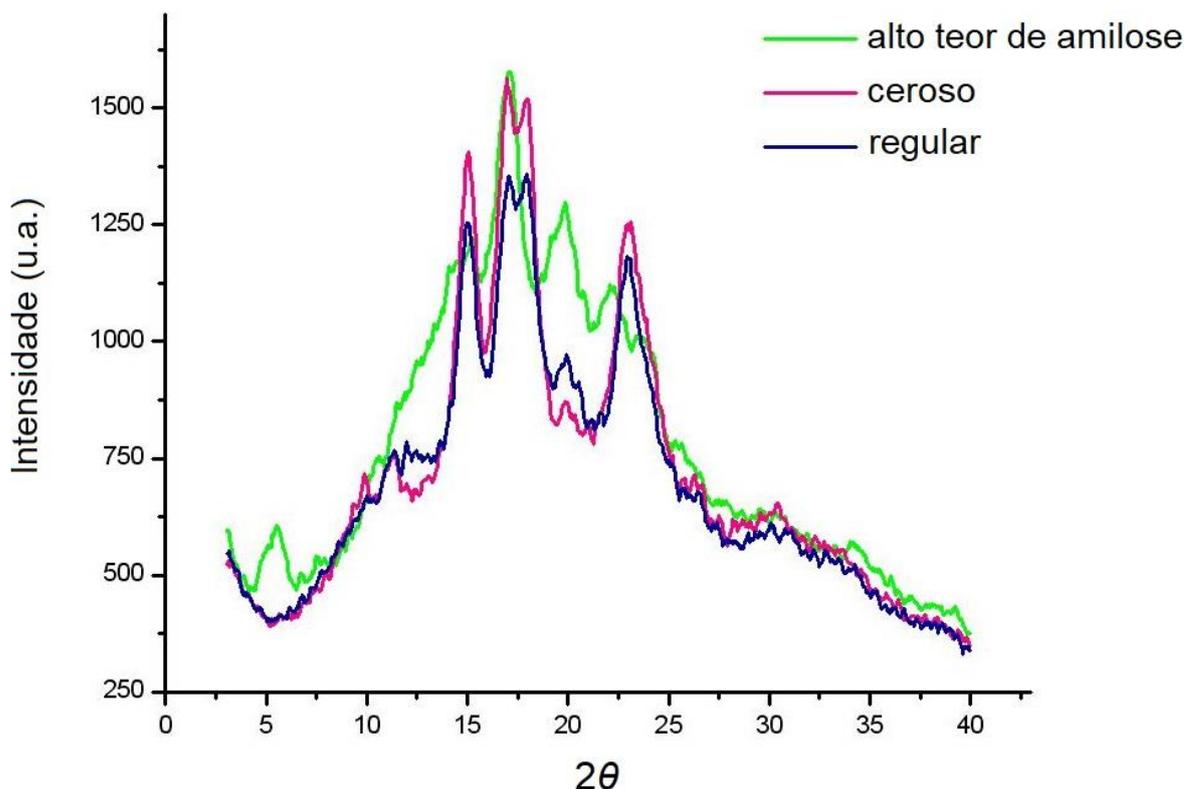


Figura 10 - Difratogramas dos diferentes tipos de amido de milho testados.

Os valores de cristalinidade obtidos para as amostras realizadas em hidrólise livre se encontram na Tabela 2.

Os difratogramas para amidos ceroso e regular sob HL, quando comparados quanto à molaridade das soluções ácidas e durante o mesmo tempo de exposição, revelaram que o ácido exerce uma maior ação sobre a superestrutura granular conforme aumenta a concentração de ácido. Entretanto, a partir de 96 horas, a força do ácido não é mais tão significativa na modificação estrutural causada, pois os valores de cristalinidade se mantêm praticamente os mesmos quando são confrontadas as cristalinidades obtidas para 96 e 168 horas.

A amostra que se mostrou mais cristalina foi o amido de milho ceroso tratado com solução de ácido clorídrico por 168 horas, entretanto pelas imagens de MEV (Figura 6) é visto que os grânulos se romperam e formaram agregados, portanto se concluiu que o tratamento foi muito agressivo e esse resultado não correspondeu ao desejado.

Amostras de amido ceroso e regular quando permaneceram durante 24h em meio mais ácido apresentaram resultados semelhantes ao de amostras hidrolisadas em menor acidez durante 168h.

Tabela 2 - Grau de cristalinidade obtido para as amostras tratadas com HL.

Concentração (mol.L ⁻¹)	Tempo de hidrólise (h)	Grau de cristalinidade (%)		
		Ceroso	Regular	Alto teor de amilose
0,1	24	47,7	34,4	13,7
	96	48,1	44,5	17,1
	168	48,1	44,3	14,6
1,0	24	47,9	39,7	23,9
	96	48,2	48,5	14,2
	168	48,8	35,0	16,8
2,0	24	48,6	40,8	18,9
	96	47,9	42,0	17,9
	168	50,4	41,6	23,8

Os grânulos com alto teor de amilose se mostraram mais resistentes à hidrólise ácida, mostrando mudanças significativas nos graus de cristalinidade apenas quando expostos ao tratamento por 168 horas.

O amido de milho regular foi o que melhor respondeu ao tratamento ácido, considerando que foi o que mais variou em grau de cristalinidade, em geral. Os efeitos superficiais, observados através do MEV, também corroboram com isso. Portanto, ele foi o utilizado para preparar as amostras hidrolisadas com campo elétrico externo acoplado. Como mudanças significativas já foram relatadas quando utilizado o tratamento ácido com a solução de 1 mol.L⁻¹ durante 24h, tomou-se essas condições como padrão para comparação das amostras com HO.

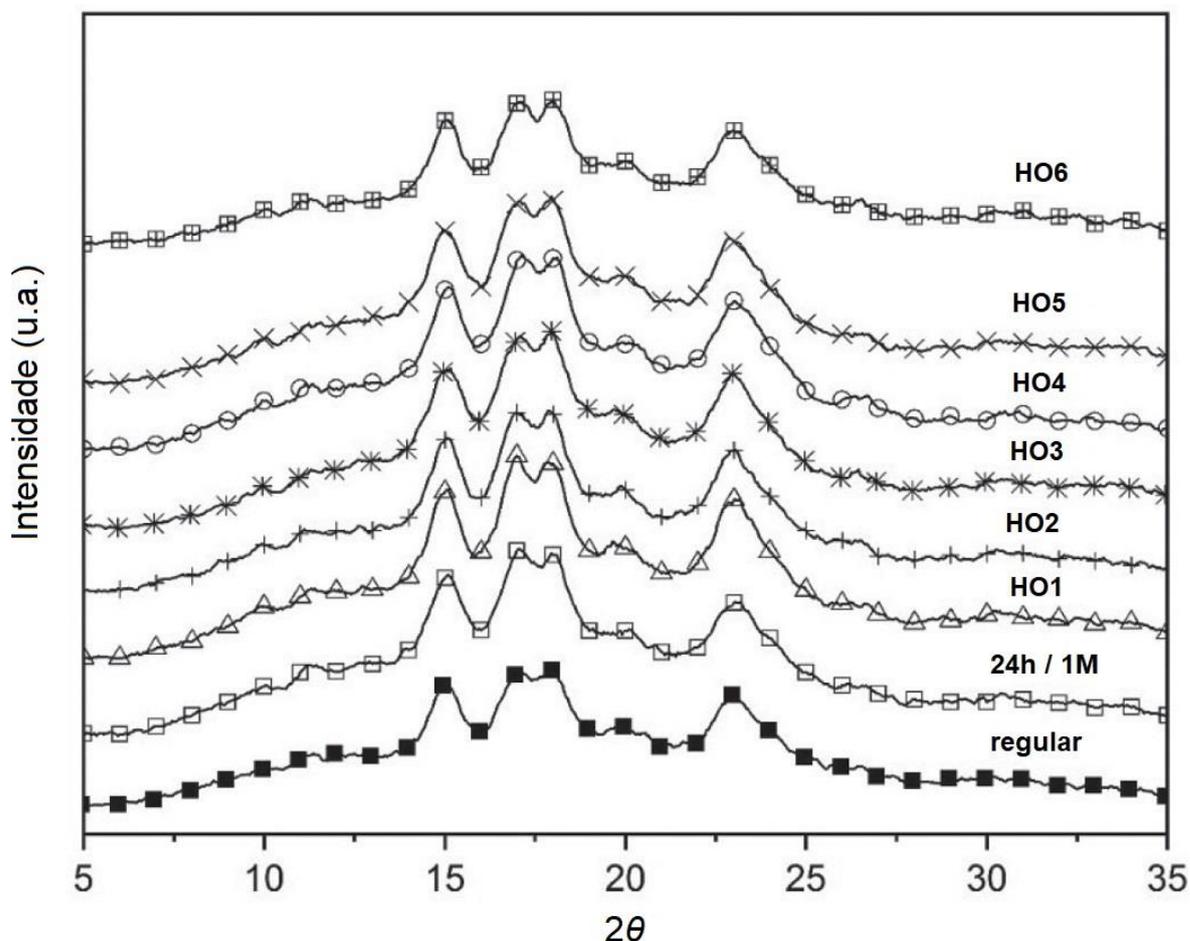


Figura 11 - Difratogramas para amostras de amido de milho regular.

As amostras com hidrólise orientada permaneceram todas com os mesmos picos relativos ao amido de milho regular (do tipo A), já descritos nesse trabalho, alterando apenas a intensidade deles, devido à variação da cristalinidade.

O tempo total de exposição ao campo tem menor importância do que o número de vezes em que ele é aplicado aos grânulos (ciclos), para efeitos de aumento do grau de cristalinidade, como se pode observar comparando as amostras HO3 e HO4, onde o tempo total de exposição foi o mesmo para ambas as amostras - 50 segundos - contudo, o número de ciclos foi 5 para a HO3 e 2 para a HO4.

Os valores de cristalinidade das amostras hidrolisadas aumentaram em torno de 35% quando comparadas com o amido de milho regular *in natura* e cerca de 10% quando comparadas com a amostra de HL 1 mol.L⁻¹ tratada por 24h.

Tabela 3 - Valores de cristalinidade obtidos para as amostras realizadas sob influência de campo elétrico.

Amostras	Grau de cristalinidade (%)
HO1	52,8
HO2	49,3
HO3	54,2
HO4	51,4
HO5	51,6
HO6	48,6

3.3 Gelatinização

Através das imagens de microscopia óptica foi observado que os grânulos mantiveram sua integridade tanto após a utilização da hidrólise livre como método de tratamento, quanto após a hidrólise orientada.

A manutenção da integridade dos grânulos é confirmada pelo fato de que quando as micrografias são realizadas sob luz polarizada, como mostra a Figura 12, observa-se a cruz de Malta, que ocorre devido à capacidade dos grânulos de refletir duplamente a luz polarizada (birrefringência), característica da maioria das variedades de amido, por possuírem certo grau de organização cristalina, como o grânulo de amido de milho que é semicristalino.

A cruz de Malta, centrada no hilum dos grânulos, levou-os a serem considerados esferocristais distorcidos (BULÉON *et al.*, 1998). E a birrefringência, teoricamente, indica que a orientação das cadeias poliméricas é, em sua maioria, radial. Contudo, não ocorre uma diferença quanto à birrefringência em partes distintas do grânulo como nas regiões polares em comparação com as regiões equatoriais, indicando que os grãos cristalinos são extremamente pequenos e possuem orientações diversas. (GALLANT *et al.*, 1992; PÉREZ; BERTOFT, 2010).

Caso o tratamento ácido tivesse destruído a superestrutura do material, rompendo os grânulos, a cruz de Malta não seria mais observada, pois toda a organização cristalina dos grânulos seria perdida e a birrefringência não seria mais detectada. (SINGH *et al.*, 2003).

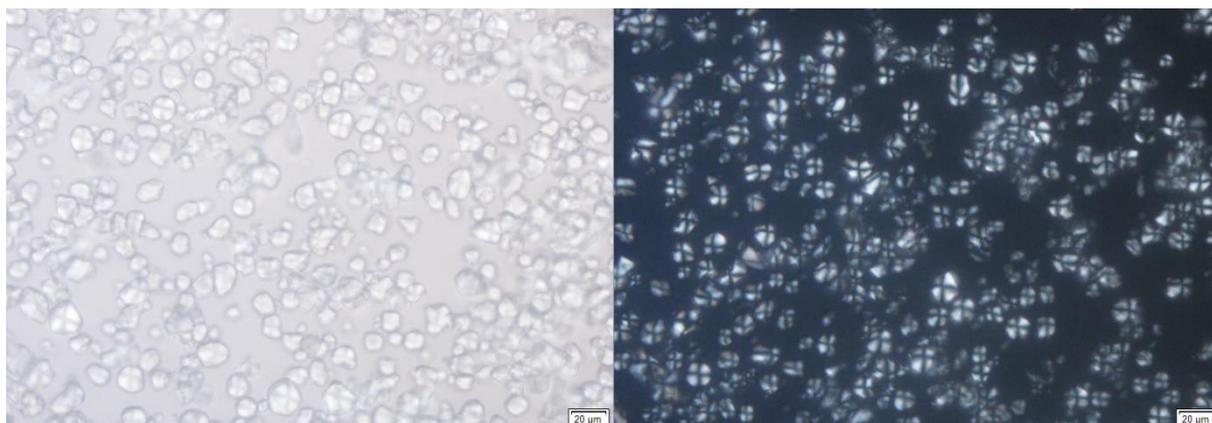


Figura 12 - Micrografias do amido de milho regular *in natura* observado sem (esquerda) e com luz polarizada (direita). A escala corresponde a 20 µm.

Utilizando um forno acoplado ao microscópio óptico, foi verificada a temperatura de gelatinização dos grânulos *in natura* e após os dois métodos de tratamento ácido, HL e HO, serem aplicados.

Para o amido de milho regular a faixa de temperatura de gelatinização foi de 4,2 °C, iniciando em 68,8 °C e finalizando em 73,0 °C.

Tabela 4 - Gelatinização para o amido de milho regular após HL.

Concentração (mol.L ⁻¹)	Tempo de hidrólise (h)	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Faixa de temperatura (°C)
0,1	24	66,1	71,0	4,9
	96	57,5	71,6	14,1
	168	58,0	72,4	14,4
1,0	24	56,8	69,5	12,7
	96	57,0	71,9	14,9
	168	63,8	73,6	9,8
2,0	24	65,6	70,0	4,4
	96	61,8	73,5	11,7
	168	63,6	72,5	8,9

A gelatinização, uma das propriedades físico-químicas mais relevantes do amido devido às suas aplicações na indústria, é a perda da organização estrutural dos grânulos devido ao rompimento das ligações de hidrogênio causada pelo

intumescimento irreversível quando a solução aquosa contendo amido é aquecida (JENKINS; DONALD, 1998).

Normalmente, as altas temperaturas estão associadas a altos valores de cristalinidade, pois quanto mais cristalinos os grânulos, mais estáveis estruturalmente eles são e, conseqüentemente, mais resistentes à gelatinização (KRUEGER *et al.*, 1987).

Como a hidrólise ácida diminui a porção de amilose no amido e aumenta seu grau de cristalinidade, quanto mais suscetíveis ao tratamento forem os grânulos, maior será a temperatura de gelatinização observada (LAWAL, 2004).

Como publicado por Wang; Copeland (2015), outras interpretações para o aumento da faixa de temperatura de gelatinização são retratadas. A hidrólise, por ocorrer preferencialmente nas zonas amorfas, pode atenuar o efeito de desestabilização que ocorre devido ao intumescimento dessas porções nos grânulos quando a fusão dos grãos cristalinos acontece devido ao aquecimento.

Tabela 5 - Gelatinização do amido de milho preparado através de HO.

Amostra	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Faixa de temperatura (°C)
HO1	65,7	73,0	7,3
HO2	68,0	74,0	6,0
HO3	64,5	75,5	11,0
HO4	65,0	75,0	10,0
HO5	63,8	73,0	9,2
HO6	64,4	69,5	5,1

Fazendo um paralelo entre as amostras de HL e de HO, é perceptível uma diminuição da faixa de temperatura de gelatinização, indicando que a hidrólise orientada leva a uma maior homogeneidade do ataque ácido e, conseqüentemente, dos efeitos provocados nos grânulos.

O aumento do número de ciclos aplicados, mantendo o tempo total de tratamento, reduziu a faixa de temperatura de gelatinização (comparação entre as amostras HO1 e HO2), e esse efeito fica ainda mais proeminente quando apenas o tempo de cada ciclo é aumentado (HO4).

A amostra HO3 foi a que proveu resultados mais satisfatórios quanto a aumento do grau de cristalinidade juntamente com uma maior faixa de temperatura de gelatinização.

3.4 Organização Estrutural

As medidas de SAXS foram efetuadas apenas para o amido de milho regular sem modificações, para as amostras tratadas com HO e para a amostra de HL, utilizada como comparação, hidrolisadas por 24h em solução 1 mol.L⁻¹. Os espectros, sem nenhum ajuste, se encontram na Figura 13.

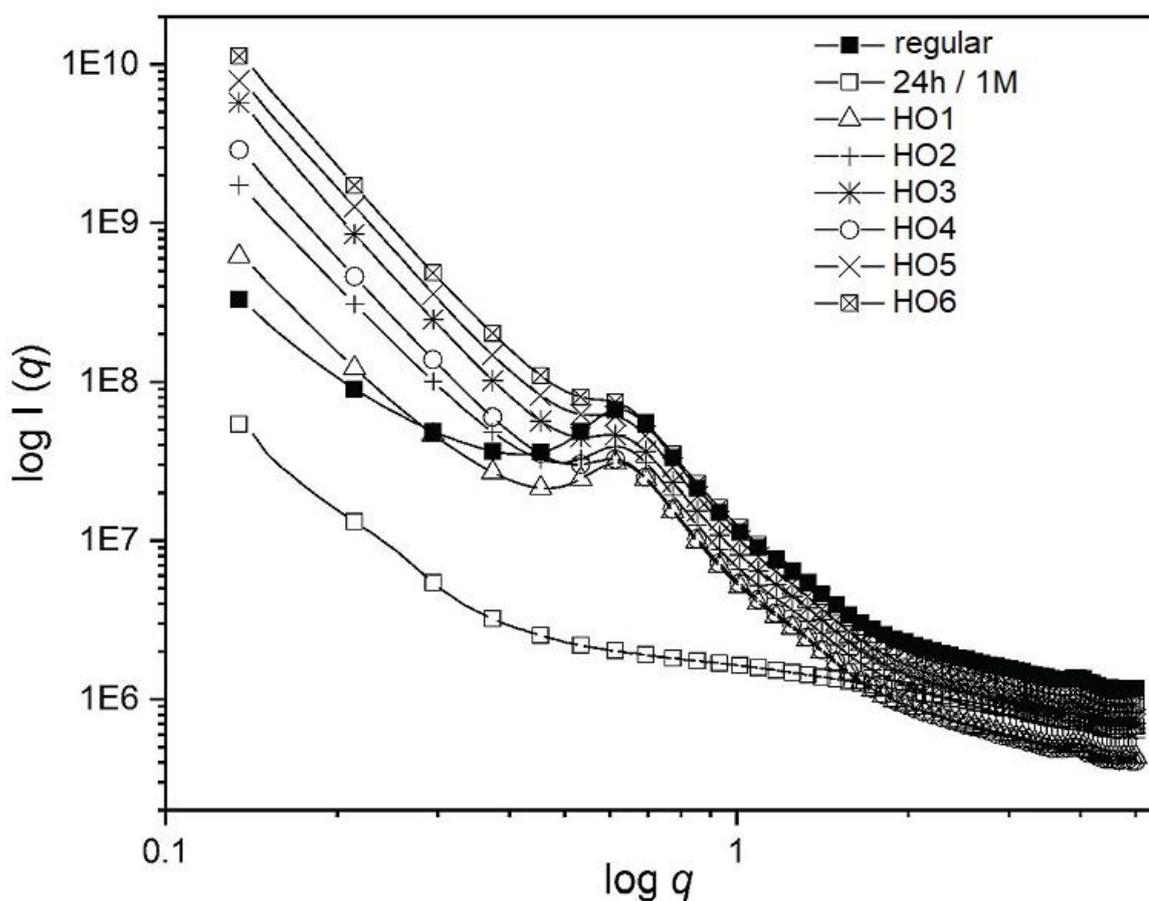


Figura 13 - Curvas de SAXS das amostras em todos os valores de q medidos.

Todos os perfis de SAXS apresentam um grande espalhamento em valores baixos de q e um pico de espalhamento característico do amido de milho quando q assume valores entre 0,6 - 0,7 nm⁻¹ (BLAZEK; GILBERT, 2010; CARDOSO; WESTFAHL, 2010; VERMEYLEN *et al.*, 2004), com exceção do amido de milho tratado sob HL.

A ausência desse espalhamento característico em $q \approx 0,6 \text{ nm}^{-1}$ para a amostra de HL utilizada como comparação (24h / 1M) pode ser atribuída à perda de organização estrutural dos grânulos. Esse pico de espalhamento é associado com a forma periódica como se organizam as regiões cristalinas e amorfas nos grânulos. Como visto na Figura 13, ocorre variação da intensidade desse pico dependendo das condições aplicadas no tratamento das amostras. Essa diminuição pode ser atribuída à mudança na densidade eletrônica da fração amorfa como resultado da hidrólise que ocorre preferencialmente nessas porções (JENKINS; DONALD, 1997).

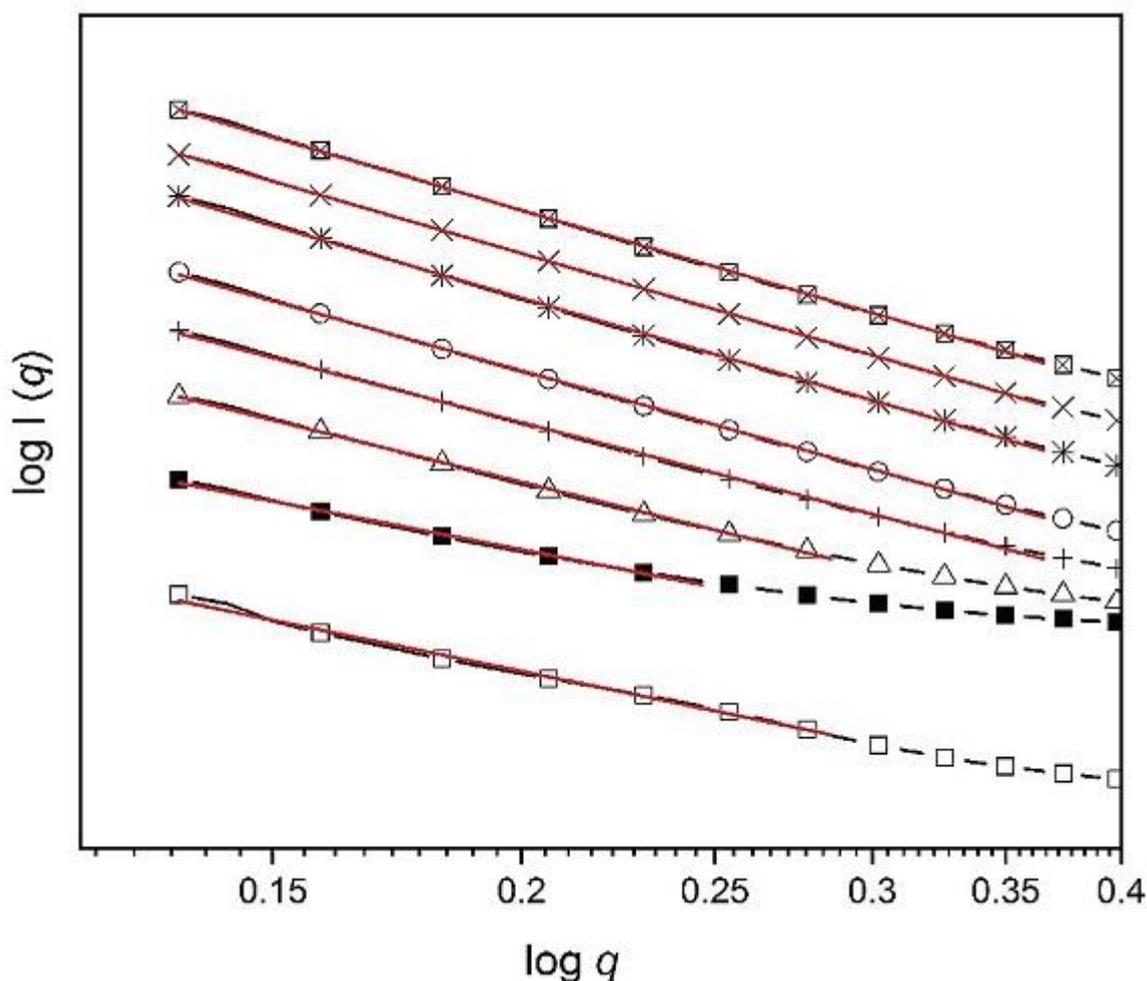


Figura 14 - Ajuste das curvas de SAXS usando o modelo Lorentziano. As amostras seguem a mesma legenda da Figura 13.

Os dados diminuem em intensidade relativa e passam a ficar mais dispersos quando q assume valores em torno de 10 nm^{-1} , quando comparados com o amido *in natura*, indicando que as lamelas cristalinas, compostas, majoritariamente por amilopectina, passam a ter uma maior diversidade de espessura, devido às

pequenas porções de amilose que poderiam estar nessas estruturas e deixaram o grânulo em consequência da hidrólise ácida. Com isso, as lamelas cristalinas ficam mais empacotadas e com valores de larguras mais diversos.

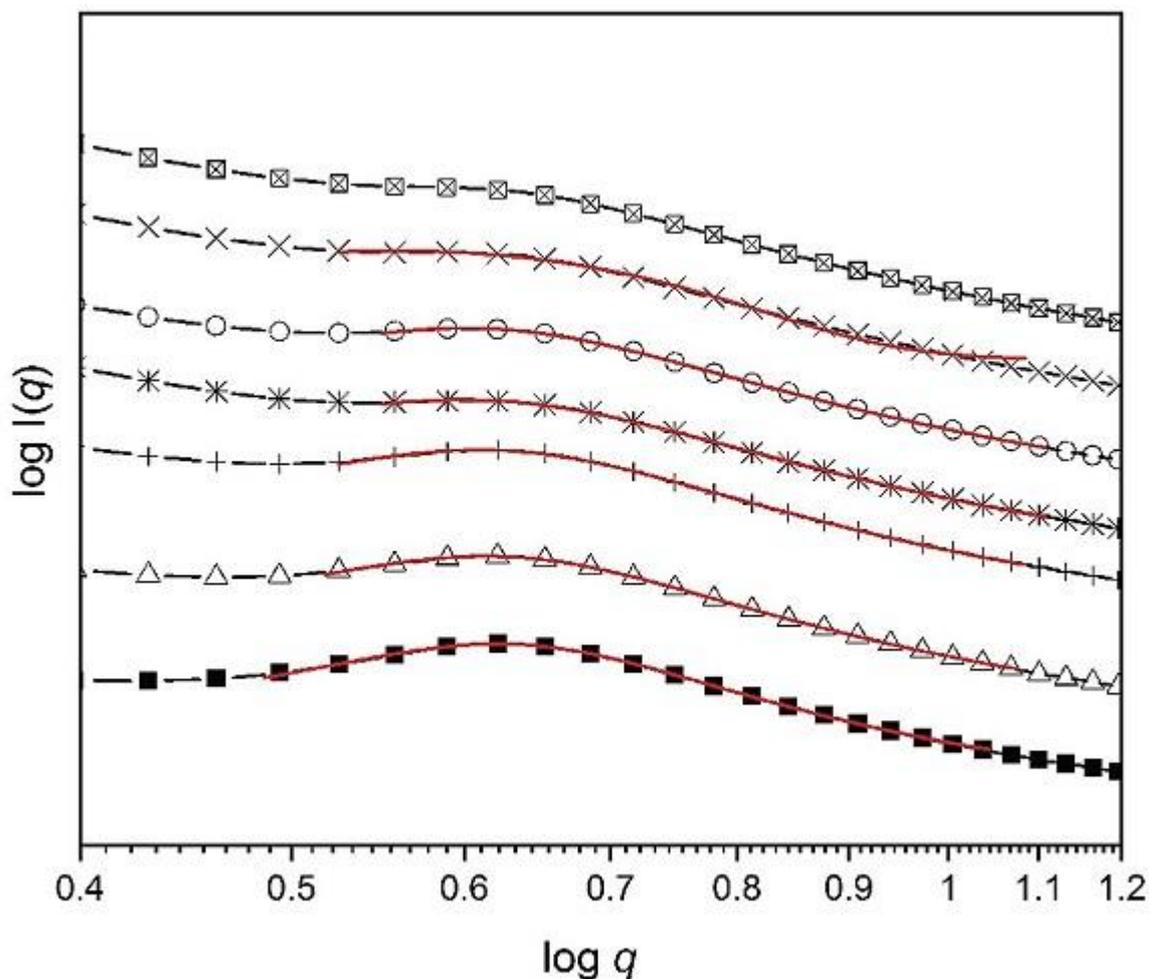


Figura 15 - Ajuste das curvas de SAXS usando o modelo Gaussiano. As amostras seguem a mesma legenda da Figura 13.

Os dois modelos de distribuição utilizados cobrem valores faixas distintas de valores do vetor de espalhamento q , sendo que as amostras HO1, HO2, HO3, HO4 e o amido regular sem tratamento puderam ser ajustados usando a função de Lorentz, enquanto a amostras HO5 só pode ser ajustada utilizando o modelo Gaussiano. A HO6 não se adaptou em nenhum dos dois ajustes.

Por meio dos ajustes, foi determinado o centro do pico característico (q_0) para todas as amostras através da equação 3, e a distância de repetição da estrutura lamelar (L).

Os valores obtidos para L foram coerentes (BLAZEK; GILBERT, 2010) e apresentaram um leve aumento conforme é aumentado o tempo total das amostras

sob hidrólise orientada. Esse comportamento já era esperado, pois ocorre um aumento relativo da distância lamelar por causa do tratamento ácido, aumentando a predominância da amilopectina nos grânulos de amido de milho.

Tabela 6 - Dados obtidos a partir dos ajustes dos dados de SAXS.

Amostra	q_0 (nm ⁻¹)	L (nm)
Regular <i>in natura</i>	0,62	10,1
HL 24h / 1M	pico ausente	-
HO1	0,61	10,3
HO2	0,61	10,3
HO3	0,60	10,5
HO4	0,60	10,5
HO5	0,59	10,6
HO6	0,59	10,6

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para os três tipos de amido de milho testados (ceroso, regular e com alto teor de amilose), quanto ao grau de cristalinidade, demonstram que a variedade mais suscetível a modificações foi o amido de milho regular.

A morfologia dos grânulos em ambos os tratamentos foi alterada, com o aparecimento de irregularidades e pequenas cavidades.

Através da difração de raios-X, valores de cristalinidade puderam ser obtidos para todas as amostras, mostrando que a hidrólise ácida, por atacar primeiramente às ligações de hidrogênio da amilose, porção amorfa dos grânulos, faz com que a cristalinidade seja aumentada após os tratamentos.

Os resultados para a HO são melhores que com a HL, mostrando melhores resultados para a cristalinidade e mudanças morfológicas mais evidentes.

Quando utilizado o tratamento ácido acoplado a campo elétrico externo, a faixa de temperatura de gelatinização dos grânulos diminuiu consideravelmente, principalmente com o aumento do número de ciclos em uma quantidade reduzida de tempo total. Nessas condições, maiores temperaturas de gelatinização são alcançadas, bem como maiores valores de cristalinidade.

Com o SAXS, se observou um decréscimo na intensidade do pico característico q_0 , indicando uma maior desorganização da superestrutura dos grânulos com o aumento do tempo total do tratamento com hidrólise orientada. Um aumento sutil dos valores da distância de repetição lamelar também foi observado devido à saída de amilose e aumento relativo da porção cristalina do amido.

Esses resultados sugerem que o amido de milho tratado através da hidrólise ácida, por serem compostos de menos amilose, poderiam ser interessantes para a indústria alimentícia, devido a uma diminuição da tendência do amido de milho retrogradar durante o resfriamento, consequência do aumento da cristalinidade. E através da associação com o campo elétrico externo esse comportamento seria fácil e rapidamente atingido.

REFERÊNCIAS

- BLAZEK, J.; GILBERT, E. P. Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3275–3289, 2010.
- BULÉON, A. *et al.* Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85–112, 1998.
- CARDOSO, M. B.; WESTFAHL, H. On the lamellar width distributions of starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 1, p. 21–28, 2010.
- CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: An X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 4, p. 277–284, 1998.
- CHEN, P. *et al.* Morphology and microstructure of maize starches with different amylose/amylopectin content. **Starch/Stärke**, v. 58, n. 12, p. 611–615, 2006.
- DA SILVEIRA, N. *et al.* Acid Hydrolysis of Regular Corn Starch under External Electric Field. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2567–2574, 2019.
- GALLANT, D. J. *et al.* Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, n. SUPPL. 2, 1992.
- HAN, Z. *et al.* Effects of pulsed electric fields (PEF) treatment on physicochemical properties of potato starch. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 4, p. 481–485, 2009. a.
- HAN, Z. *et al.* Effects of pulsed electric fields (PEF) treatment on the properties of corn starch. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 3, p. 318–323, 2009. b.
- HULLEMAN, S. H. D. *et al.* Origins of B-type crystallinity in glycerol-plasticized, compression-moulded potato starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, n. 4, p. 351–360, 1999.
- JANE, J. *et al.* Anthology of Starch Granule Morphology by Scanning Electron Microscopy. **Starch - Stärke**, v. 46, n. 4, p. 121–129, 1994.
- JAYAKODY, L.; HOOVER, R. The effect of lintnerization on cereal starch granules. **Food Research International**, v. 35, n. 7, p. 665–680, 2002.
- JENKINS, P. J.; DONALD, A. M. The effect of acid hydrolysis on native starch granule structure. **Starch/Stärke**, v. 49, n. 7–8, p. 262–267, 1997.
- JENKINS, P. J.; DONALD, A. M. Gelatinisation of starch: A combined

- SAXS/WAXS/DSC and SANS study. **Carbohydrate Research**, v. 308, n. 1–2, p. 133–147, 1998.
- KRUEGER, B. R. *et al.* A Differential Scanning Calorimetry Study on the Effect of Annealing on Gelatinization Behavior of Corn Starch. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 3, p. 715–718, 1987.
- LAWAL, O. S. Composition, physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidised, acetylated and acid-thinned new cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) starch. **Food Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 205–218, 2004.
- LI, D. *et al.* Changes in crystal structure and physicochemical properties of potato starch treated by induced electric field. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 535–541, 2016.
- LI, D. *et al.* Characterization of acid hydrolysis of granular potato starch under induced electric field. **Food Hydrocolloids**, v. 71, p. 198–206, 2017.
- LI, Q. *et al.* Effect of pulsed electric field on structural properties and digestibility of starches with different crystalline type in solid state. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 362–370, 2019.
- OATES, C. G. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 11, p. 375–382, 1997.
- PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch/Staerke**, v. 62, n. 8, p. 389–420, 2010.
- RATNAYAKE, W. S.; HOOVER, R.; WARKENTIN, T. Pea starch: Composition, structure and properties - A review. **Starch/Staerke**, v. 54, n. 6, p. 217–234, 2002.
- ROCHA, T. S.; CARNEIRO, A. P. A.; FRANCO, C. M. L. Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of root and tuber granular starches. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 544–551, 2010.
- SCHNABLEGGER, H.; SINGH, Y. **The SAXS Guide**.
- SINGH, N. *et al.* Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.
- STRIBECK, N. **X-Ray Scattering of Soft Matter**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.

- VERMEYLEN, R. *et al.* Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1775–1786, 2004.
- WANG, S.; COPELAND, L. Nature of thermal transitions of native and acid-hydrolysed pea starch: Does gelatinization really happen? **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1507–1514, 2012.
- WANG, S.; COPELAND, L. Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 1079–1095, 2015.
- YANG, Z. *et al.* Effect of high hydrostatic pressure on the supramolecular structure of corn starch with different amylose contents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 604–614, 2016.
- ZHU, F. Modifications of starch by electric field based techniques. **Trends in Food Science and Technology**, v. 75, p. 158–169, 2018.