

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESTRUTURA DO GRANULO DE AMIDO  
DE MILHO: TRATAMENTO TERMICO, HIDROLISE ENZIMATICA  
Parceira E PERMEAÇÃO EM GEL.

*Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Célia Maria Landi Franco e aprovada*

*da pela comissão julgadora em* CELIA MARIA LANDI FRANCO  
Eng. de alimentos

*13.08.93.*

*Cesar F. Ciacco*

Prof. Dr. CESAR F. CIACCO  
orientador

Prof. Dra. DEBORA G. TAVARES  
co-orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas - SP

1993

BANCA EXAMINADORA

*César F. Ciacco*

Prof. Dr. César F. Ciacco  
(orientador)

*Maria Victória Grossmann*

Profa. Dra. Maria Victória Grossmann  
(membro)

*Marney Pascoli Gereda*

Profa. Dra. Marney Pascoli Gereda  
(membro)

*Gelina R. O. Camargo*

Profa. Dra. Gelina R. O. Camargo  
(membro)

*Hélia Harumi Sato*

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
(membro)

*Suplente*

Prof. Dr. Paulo Anna Bobbio  
(membro)

*Suplente*

Prof. Dr. Yoon Kil Chang  
(membro)

Campinas, 13 de agosto de 1993.

A meus pais, Alice e Manoel

A meu esposo, Roberto

A nossa filha, Manuela

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores César F. Ciacco e Débora Q. Tavares pela colaboração, orientação, apoio, incentivo e amizade.

Ao Departamento de Química e Geociências da UNESP - SJRP, na pessoa do Prof. Carlos Roberto Ceron por permitir a realização das análises cromatográficas dos amidos.

Ao Prof. Carlos Grosso pelo auxílio nas análises cromatográficas e incentivo durante o trabalho.

Ao Prof. Johnny do Departamento de Física da UNESP - SJRP, pela colaboração nas análises cristalográficas.

Aos técnicos do laboratório de cereais do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA pela amizade e colaboração.

Aos técnicos do Departamento de Eng. e Tecnologia de Alimentos da UNESP - SJRP pela amizade e colaboração.

A Yara, técnica do laboratório de microscopia do DEPAN - FEA pelo auxílio e atenção.

A CAPES/PICD pelo auxílio financeiro.

A Associação Brasileira de Indústrias de Alimentação (ABIA) pelo fornecimento das cópias desta tese.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

# INDICE

	Pag
Indice de tabelas.....	vi
Indice de figuras.....	vii
Resumo.....	xi
Summary.....	xiii
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>II REVISAO BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. O grânulo de amido.....	3
2.1.1. Organização molecular.....	3
2.1.2. Padrões de cristalinidade.....	7
2.1.3. Características microscópicas.....	13
2.1.4. Estrutura fina da amilopectina.....	17
2.2. Elucidação da estrutura do amido através da ação de en- zimas amilolíticas .....	32
2.2.1. Ação da $\alpha$ -amilase.....	32
2.2.2. Ação da amiloglucosidase.....	36
2.2.3. Ação da $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase.....	40
2.3. Influência do tratamento térmico com baixa umidade so- bre o grânulo de amido.....	42
<b>III. MATERIAIS E METODOS.....</b>	<b>48</b>
3.1. Materiais.....	48
3.1.1. Matérias primas.....	48
3.1.2. Reagentes químicos.....	48

3.1.3. Aparelhos e equipamentos.....	48
3.2. Métodos.....	49
3.2.1. Extração do amido de milho de diferentes variedades.....	49
3.2.2. Características das matérias primas.....	50
3.2.2.1. Umidade.....	50
3.2.2.2. Proteína.....	50
3.2.2.3. Gordura.....	51
3.2.2.4. Cinzas.....	51
3.2.2.5. Fibra.....	51
3.2.2.6. Propriedades de pasta.....	51
3.2.3. Tratamento físico dos amidos de milho.....	52
3.2.3.1. Condicionamento das amostras nas diferentes umidades para posterior tratamento térmico.....	52
3.2.3.2. Tratamento térmico a 100°C/16horas com baixa umidade.....	53
3.2.4. Atividade das enzimas amilolíticas utilizadas na digestão dos amidos.....	53
3.2.4.1. Atividade da $\alpha$ -amilase bacteriana....	53
3.2.4.2. Atividade da amiloglicosidase fúngica.	54
3.2.5. Hidrólise enzimática dos amidos de milho naturais e tratados termicamente com baixa umidade.	55
3.2.6. Características dos amidos tratados termicamente e dos resíduos da hidrólise enzimática.....	56
3.2.6.1. Propriedades de pasta.....	56
3.2.6.2. Índice de absorção de água (IAA).....	56
3.2.6.3. Determinação da cristalinidade por	

raios X.....	56
3.2.6.4. Análises microscópicas.....	57
3.2.6.4.1. Microscopia óptica.....	57
3.2.6.4.2. Microscopia eletrônica de varredura	57
3.2.6.5. Análise da estrutura dos amidos através da hi- drólise enzimática com pululanase e $\beta$ -amilase e cromatografia de permeação em gel Sephadex G-50.....	58
3.2.6.5.1. Purificação da amilopectina a partir do amido de milho ceroso, para uti- lização como padrão.....	58
3.2.6.5.2. Hidrólise enzimática dos amidos na- turais e daqueles previamente subme- tidos a tratamento térmico e diges- tão com $\alpha$ -amilase e amiloglucosi- dase.....	59
3.2.6.5.2.1. Desramificação com pu- lulanase ( $P_1$ ).....	59
3.2.6.5.2.2. Preparo das $\beta$ -limite dextrinas ( $\beta_1$ ).....	60
3.2.6.5.2.3. Desramificação da $\beta$ -li- mite dextrina ( $\beta_1P_1$ )....	60
3.2.6.5.2.4. Ação da $\beta$ -amilase sobre $\beta$ -limite dextrina des- ramificada ( $\beta_1P_1\beta_2$ )....	60
3.2.6.5.2.5. Ação da $\beta$ -amilase sobre a amostra de amido des- ramificada ( $P_1\beta_1$ ).....	61



3.2.6.5.3. Análises cromatográficas.....	61
--	----

<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSOES.....</b>	<b>64</b>
---	-----------

4.1. Extração dos amidos de diferentes variedades de milho..	64
--	----

4.2. Características das matérias primas.....	64
---	----

4.2.1. Composição centesimal.....	64
-----------------------------------	----

4.2.2. Propriedades de pasta.....	66
-----------------------------------	----

4.3. Tratamento físico dos amidos de milho.....	69
---	----

4.3.1. Tratamento térmico (100°C/16 horas) com baixa umidade.....	69
--	----

4.3.1.1. Propriedades de pasta dos amidos tra- tados termicamente com baixa umidade...	70
---	----

4.3.1.2. Índice de absorção de água (IAA) dos amidos de milho tratados termicamente com baixa umidade.....	74
--	----

4.3.2. Hidrólise enzimática dos amidos de milho trata- dos termicamente com baixa umidade.....	76
---	----

4.3.2.1. Suscetibilidade dos amidos de milho tratados a 100°C/16 horas com baixa umi- dade à ação da $\alpha$ -amilase bacteriana..	76
---	----

4.3.2.2. Suscetibilidade dos amidos de milho tratados a 100°C/16 horas com baixa umi- dade à ação da $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica.....	81
--	----

4.3.2.3. Obtenção dos resíduos da hidrólise.....	81
--	----

4.3.3. Análise dos resíduos da hidrólise enzimática....	85
---	----

4.3.3.1. Análises cristalográficas.....	85
---	----

4.3.3.2. Análises microscópicas.....	93
--------------------------------------	----

4.3.3.2.1. Microscopia óptica.....	93
4.3.3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	97
4.3.3.3. Análises cromatográficas em gel Sepha- dex G-50.....	101
4.3.3.3.1. Permeação em gel dos amidos de milho ceroso e normal natural e tratados termicamente à 27% de umidade e sub- metidos à ação da $\alpha$ -amilase e amilo- glucosidase .....	101
4.3.3.3.2. Permeação em gel dos amidos de milho ceroso e normal natural e tratados ter- micamente à 27% de umidade e submetidos à ação da $\alpha$ -amilase e amiloglucosi- dase após ação da pululanase e ação consecutiva da pululanase e $\beta$ -amilase.	108
4.3.3.3.3. Permeação em gel dos amidos de milho ceroso e normal natural e tratados ter- micamente à 27% de umidade e submetidos à ação da $\alpha$ -amilase e amiloglucosida- se após ação da $\beta$ -amilase, $\beta$ -amilase e pululanase, e $\beta$ -amilase, pululanase e $\beta$ -amilase.....	113
<b>V. CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>124</b>

## INDICE DE TABELAS

	pag
1. Composição centesimal dos amidos de milho.....	65
2. Parâmetros viscoamilográficos dos amidos de milho.....	67
3. Porcentagem de hidrólise dos amidos de milho normal e ceroso tratados a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade e incubados com 21 SKB de $\alpha$ -amilase bacteriana/g de amido e 10 unidades de amiloglucosidase fúngica/g de amido a 37,0°C durante 24 horas.....	86
4. Intensidade medida em CPS, dos picos mostrados nos difractogramas de raios X obtidos dos amidos de milho normal e ceroso naturais e submetidos à ação da $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase	88
5. Intensidade medida em CPS, dos picos mostrados nos difractogramas de raios X obtidos dos amidos de milho normal e ceroso tratados a 100°C/16horas a diferentes níveis de umidade submetidos ou não à ação da $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase...	92

## INDICE DE FIGURAS

	pag
1. Representação esquemática do arranjo da molécula de amilopectina no anel de crescimento.....	6
2. Arranjos das células unitárias e empacotamento em duplas hélices nas amiloses A e B.....	11
3. Modelo "cluster" para a amilopectina.....	20
4. Modelo "cluster" da amilopectina proposto por HIZUKURI.....	24
5. Método enzimático utilizado para o estudo da estrutura da $\alpha$ -glucana.....	63
6. Amilogramas dos amidos de milho.....	68
7. Amilogramas do amido de milho mole tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade.....	71
8. Amilogramas do amido de milho duro tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade.....	72
9. Amilogramas do amido de milho ceroso tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade.....	73
10. Índice de absorção de água (IAA) dos amidos de milho tratados a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade.....	75
11. Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho mole tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado à 37,0°C com $\alpha$ -amilase bacteriana.....	77
12. Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho duro tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado à 37,0°C com $\alpha$ -amilase bacteriana.....	78

13. Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho ceroso tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado à 37,0°C com $\alpha$ -amilase bacteriana.....	79
14. Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho mole tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado à 37,0°C com $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica.....	82
15. Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho duro tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado à 37,0°C com $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica.....	83
16. Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho ceroso tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado à 37,0°C com $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica.....	84
17. Difractogramas de raios X obtidos dos amidos de milho normal e ceroso naturais e submetidos à ação enzimática.....	87
18. Difractogramas de raios X obtidos do amido de milho normal tratado a 100°C/16 horas a níveis de 18 e 27% de umidade submetidos ou não à ação enzimática.....	90
19. Difractogramas de raios X obtidos do amido de milho ceroso tratado a 100°C/16 horas a níveis de 18 e 27% de umidade submetidos ou não à ação enzimática.....	91
20. Micrografias dos amidos de milho normal tratados termicamente à diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação enzimática, observados em microscópio óptico comum.....	94
21. Micrografias dos amidos de milho ceroso tratados termicamente	

à diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação en- zimática, observados em microscópio óptico comum.....	96
22. Micrografias dos amidos de milho normal tratados termicamente à diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação en- zimática, observados em microscópio óptico sob luz polarizada	98
23. Micrografias dos amidos de milho normal tratados termicamente à diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação en- zimática, observados em microscópio eletrônico de varredura...	99
24. Micrografias dos amidos de milho ceroso tratados termicamente à diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação en- zimática, observados em microscópio eletrônico de varredura..	100
25. Micrografias do amido de milho normal tratado enzimaticamen- te com $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase, observados em microscó- pio eletrônico de varredura em vários aumentos.....	102
26. Padrão de eluição da amostra de milho ceroso natural em gel Sephadex G-50.....	104
27. Padrão de eluição das amostras de amido de milho ceroso antes de qualquer ação da pululanase ou $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50.....	105
28. Padrão de eluição das amostras de amido de milho normal antes de qualquer ação da pululanase ou $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50.....	107
29. Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de amido de milho ceroso tratadas enzimaticamente após ação da pululanase e/ou $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50.....	109
30. Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de amido de milho ceroso tratadas térmica e enzimaticamente após ação da pululanase e/ou $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50..	111

31. Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de amido de milho normal tratadas enzimaticamente após ação da pululanase e/ou  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50..... 112
32. Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de amido de milho normal tratadas térmica e enzimaticamente após ação da pululanase e/ou  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50. 114
33. Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de amido de milho ceroso tratadas enzimaticamente após ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50..... 115
34. Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de amido de milho ceroso tratadas térmica e enzimaticamente após ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50..... 117
35. Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de amido de milho normal tratadas enzimaticamente após ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase, e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50..... 118
36. Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de amido de milho normal tratadas térmica e enzimaticamente após ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase, e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50..... 119

## RESUMO

No presente trabalho foi estudado o tratamento térmico sob baixa umidade e sua influência na suscetibilidade enzimática de amidos de milho normal e ceroso, visando obter maiores informações a respeito da estrutura dos diferentes grânulos de amido.

Amidos de milho normal e de milho ceroso foram extraídos e submetidos a tratamento térmico (100°C/16 horas) em diferentes teores de umidade e posteriormente submetidos à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase. Índice de absorção de água e propriedades de pasta destes amidos foram determinadas e os resíduos da hidrólise foram analisados cristalográfica, microscópica e cromatograficamente.

Os resultados obtidos com os amidos de milho normal e ceroso tratados a 18% de umidade mostraram que o tratamento térmico provocou aumento da cristalinidade sugerindo rearranjo das moléculas de amido com fortalecimento das ligações internas dos grânulos e maior grau de associação das cadeias de amido. Este fato ocasionou queda drástica na suscetibilidade enzimática destes amidos. Por outro lado, para os amidos tratados a 27% de umidade, o tratamento térmico pareceu ter provocado rompimento seguido de rearranjo das ligações internas dos grânulos induzindo a alguma degradação do amido e aumentando marcadamente a área acessível à amilólise.

O tratamento térmico não provocou mudanças no tamanho ou forma dos grânulos de amido, mas tanto o tratamento térmico como o enzimático resultaram em alterações nas zonas amorfas dos grânulos de amido. Através de microscopia eletrônica de varredura, observou-se que os grânulos de amido natural possuem estrutura porosa e o



ataque enzimático provocou extensa corrosão através de canais radiais. A hidrólise enzimática sobre ambos amidos, normal e ceroso, tratados termicamente a 27% de umidade, além da corrosão através de canais radiais, provocou maior quebra dos grânulos como se a estrutura restante se rompesse com maior facilidade. A conhecida estrutura disposta em camadas concêntricas alternadamente claras e escuras foi observada para ambos amidos tratados enzimaticamente.

Cromatografia em gel Sephadex G-50 das  $\alpha$ -glucanas dos amidos de milho normal e ceroso submetidos ou não ao tratamento térmico a 27% de umidade foi realizada diretamente e após sucessivas digestões enzimáticas com pululanase e  $\beta$ -amilase. Os resultados mostraram que existem diferenças nos resíduos dos amidos de milho ceroso e normal tratados com  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase. No resíduo do amido de milho ceroso os perfis de eluição mostraram duas frações a 290 e 350 ml (picos II e III) respectivamente, muito pequenas que não eram suscetíveis ao ataque da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, indicando que estas frações faziam parte das zonas cristalinas do amido. Estas frações também faziam parte das áreas cristalinas no amido normal. No entanto, a presença do pico V a 390 ml na  $\alpha$ -glucana do amido de milho normal sugeriu que além das duas frações não suscetíveis à hidrólise, existia outra que também participava das zonas cristalinas deste amido. A presença deste pico a 390 ml sugeriu o arranjo cristalino distinto entre o amido de milho ceroso e normal. Por outro lado, o tratamento térmico a 27% de umidade não foi capaz de romper totalmente suas ligações e esta fração continuou presente após tratamento térmico e enzimático como regiões não suscetíveis à hidrólise formando, conseqüentemente, rede cristalina fortemente associada.

## SUMMARY

In order to obtain more information on the structure of corn starch, it was studied the heat-moisture treatment of normal and waxy corn starches and its influence on the enzymatic susceptibility of these starches.

Normal and waxy corn starches were isolated and adjusted to different levels of moisture and heated at 100°C for 16 h. Afterwards, all starches were hydrolysed with  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase. Water-binding capacities and pasting properties were determined and the starch granule residues of the hydrolysis were studied by X-ray diffraction, optical and scanning electron microscopy and gel-permeation chromatography.

The results showed that the heat-moisture treatment produced an increase in the degree of cristallinity of normal and waxy corn starches adjusted to 18% moisture before being heated, indicating a rearrangement of the starch molecules with strengthening of the linkages within granules of starch and consequently, an increase in the degree of association of the starch chains. This fact resulted in significant decrease in the enzymatic susceptibility of the starches. On the other hand, the heat-moisture treatment provided a rupture, with further rearrangement, of the linkages within granules of starches and even a certain degree of starch degradation occurred, when starches were adjusted to 27% moisture before being heated. This fact increased significantly the accessible regions of the granule to amylolysis. The heat-moisture treatment did not alter the appearance of the starch granules. No obvious changes in size and shape nor any fissures or distortions

were found. The heat-moisture treatment as well as the enzymatic one occurred in the amorphous regions of the starch granules.

Observations of the granules with scanning electron microscope showed that natural starch granules have a porous surface and the enzymatic attack provided an extensive corrosion of granule surface by formation of radial channels. In addition, the enzymatic hydrolysis on the normal and waxy corn starches adjusted to 27% moisture before heating, produced major break of the granules as if parts of the structure ruptured more easily. The known structure formed by several concentric layers alternatively light and dark was observed for all starches treated with enzymes.

Sephadex G-50 gel-permeation chromatography of the  $\alpha$ -glucan of normal and waxy corn starches submitted or not to heat treatment with 27% moisture was performed directly and after successive enzymatic digests with pullulanase and  $\beta$ -amylase. The results showed differences in the residues of the waxy and normal corn starches treated with  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase. The elution patterns of the waxy corn starch residue showed two small fractions at 290 and 350 ml (peak II and III) respectively, which were not susceptible to the  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase attack indicating that these fractions took part in the waxy starch crystalline areas. These fractions also took part in normal starch crystalline areas. However, in addition to two chains not susceptible to hydrolysis, the presence of the peak V at 390 ml on the  $\alpha$ -glucan of the normal corn starch suggested the existence of another fraction that also took part in normal corn starch crystalline areas. The presence of this peak at 390 ml suggested the distinct crystalline arrangement between the waxy and normal corn

starches. On the other hand, the heat-moisture treatment at 27% moisture was not capable of rupturing all linkages and this fraction was still present after thermic and enzymatic treatment as regions not susceptible to hydrolysis, consequently forming tightly associated cristalline network.

## I. INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática do grânulo de amido tem sido utilizada como técnica que possibilita o entendimento da estrutura física e química do grânulo e de seus componentes (EVERS & McDERMOTT, 1970; GALLANT et al, 1972, 1973; FRANCO & CIACCO, 1987).

Progressos substanciais na investigação da estrutura fina da amilopectina foram possíveis pelo uso de enzimas amilolíticas altamente purificadas. A descoberta de enzimas que hidrolisam especificamente as ligações glicosídicas  $\alpha(1-6)$ , associado à métodos cromatográficos de separação dos produtos da hidrólise tem propiciado grandes avanços na exploração da organização das cadeias das  $\alpha$ -D glucanas ramificadas e da amilopectina em particular (ROBIN et al, 1974, 1975; ATWELL et al, 1980; BILIADERIS et al, 1981; HIZUKURI, 1986)

A taxa de hidrólise dos grânulos de amido depende fortemente da origem botânica (GALLANT et al, 1972; IKAWA & FUWA, 1980; CONE & WOLTERS, 1990), e do sistema enzimático utilizado (FRANCO & CIACCO, 1987). Amidos que naturalmente apresentam superfície porosa, como o de milho, são degradados com maior facilidade que aqueles cuja superfície é lisa, como por ex., a fécula da mandioca (FRANCO et al, 1988).

GALLANT et al (1972), YAMAGUCHI et al (1979), DUPRAT et al (1980), entre outros autores, acreditam que as diferenças na suscetibilidade amilolítica dos amidos se devem, principalmente, a uma estrutura de camadas internas e externas que apresentam diferentes graus de resistência à penetração das enzimas, sendo as zonas cristalinas responsáveis pela maior resistência à amilólise.

A molécula de amilopectina é a responsável pela cristalinidade dos grânulos de amido, com as cadeias ramificadas curtas dando origem às áreas mais organizadas (FRENCH, 1984). Os modelos de "cluster", propostos para a amilopectina (ROBIN et al, 1974; MANNERS & MATHERSON, 1981; BERTOFT, 1989) reforçam esta hipótese..

Estudos enzimáticos extensivos sugerem que as cadeias ramificadas têm comprimentos variando entre 9 e 20 resíduos de glicose (ROBIN et al, 1974; 1975; HOOD & MERCIER, 1978; BILIADERIS et al, 1981).

Estudos de difração de raios X (FRENCH, 1984; ZOBEL, 1988a) e microscopia eletrônica (KASSEMBECK, 1978; YAMAGUCHI et al, 1979, OOSTERGETEL & van BRUGGEN, 1989) revelam uma periodicidade na estrutura do grânulo de amido que é explicada pelos finos feixes de lamelas cristalinas, como proposto no modelo "cluster" da amilopectina.

Modificações químicas e físicas do grânulo de amido afetam a suscetibilidade enzimática e por sua vez, as mudanças ocasionadas nos grânulos também refletem-se nas suas propriedades físico-químicas (HOOD & MERCIER, 1978; SILJESTROM et al, 1989; FRANCO & CIACCO, 1992). O tratamento térmico aliado à baixa umidade para evitar sua gelatinização pode provocar mudanças na estrutura cristalina dos grânulos de amido (KULP & LORENS, 1981; LORENS & KULP, 1982).

Este trabalho teve como objetivo relacionar tratamentos enzimáticos dos grânulos de amido de milho normal e ceroso ao tratamento térmico (100°C/16 horas) sob baixa umidade, visando obter maiores informações a respeito da estrutura dos diferentes grânulos de amido.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O GRÂNULO DE AMIDO

#### 2.1.1. ORGANIZAÇÃO MOLECULAR

Amido, o carboidrato de reserva da maioria dos vegetais superiores ocorre como grânulos insolúveis em água, cujo tamanho e forma variam de acordo com a espécie e maturidade da planta.

Os dois principais componentes do amido, amilopectina e amilose são polímeros polidispersos de alto peso molecular. A maioria dos amidos de diferentes fontes botânicas contém de 15 à 30% de amilose. Em certas variedades de milho, sorgo, cevada e arroz referidas como "waxy" ou "ceroso", o amido consiste quase que inteiramente de amilopectina. Por outro lado, diversos amidos com alto teor de amilose (> 50%) são conhecidos, tais como o amilomilho (LINEBACK, 1984; GIDLEY & BOCIEK, 1985):

Amilopectina compreende macromoléculas com peso molecular da ordem de  $10^7$  Da onde cadeias lineares contendo em média 20 - 25 unidades de D-glicose ligadas em  $\alpha(1 - 4)$ , estão interligadas através de ligações  $\alpha(1 - 6)$  para formar uma estrutura multiramificada. As propriedades físicas e biológicas da amilopectina são profundamente afetadas pela presença de 4 a 5% de ligações inter-cadeias (MANNERS, 1989).

Amilose, formada por cadeias mais lineares, contém em média diversas centenas de resíduos de D-glicose ligados em  $\alpha(1 - 4)$ .

A maioria das cadeias estão interligadas do mesmo modo que a amilopectina para formar uma estrutura levemente ramificada. O pequeno grau de ramificação da amilose não é suficiente para afetar as propriedades físicas deste polímero (MANNERS, 1989)

Um terceiro componente (material intermediário) tem sido obtido de diversos amidos. A quantidade desse material varia dependendo da fonte botânica, mas é da ordem de 5 a 10% na maioria dos amidos de cereais, porém sua estrutura ainda não está bem definida (LINEBACK, 1984).

Segundo BILIADERIS (1991), esse material intermediário consiste de cadeias lineares com grau de polimerização (DP) variando de 50 a 200 e moléculas levemente ramificadas de baixo peso molecular ( $< 10^6$ ) e com comprimento de cadeia maior que o comprimento da amilopectina normal.

O grânulo de amido é birrefringente e sob luz polarizada apresenta uma típica "cruz de malta" que pode ser cêntrica ou excêntrica. No entanto, birrefringência e cristalinidade não estão necessariamente relacionadas. Assim, a birrefringência implica apenas em que existe um alto grau de organização molecular no grânulo sem que isso se refira a qualquer forma cristalina (LINEBACK, 1984; ZOBEL, 1988b).

Existem fortes evidências de que a amilopectina é a responsável pela cristalinidade do grânulo de amido (FRENCH, 1984; LINEBACK, 1984; GIDLEY & BOCIEK, 1985).



FRENCH (1984), observou através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), anéis de crescimento bem definidos que representam camadas concêntricas alternadas de alto e baixo índice de refração, densidade, cristalinidade e resistência ou suscetibilidade ao ataque químico e enzimático, com uma pronunciada periodicidade radial de 60 - 70 Å. Esses períodos correspondem ao espaço médio de "clusters" no modelo "cluster" da amilopectina (ROBIN et al, 1974), reforçando a hipótese de que a amilopectina possui uma grande orientação radial (YAMAGUCHI et al, 1979).

FRENCH (1984), sugere que o grânulo de amido é composto por zonas alternadas, cristalinas e amorfas, sendo que a parte cristalina corresponde à 50 Å de espessura e a parte amorfa à 20 Å. O comprimento da molécula de amilopectina corresponde à espessura do anel de crescimento, variando de 1200 - 4000 Å sendo que as regiões cristalinas apresentam-se em duplas hélices (Figura 1).

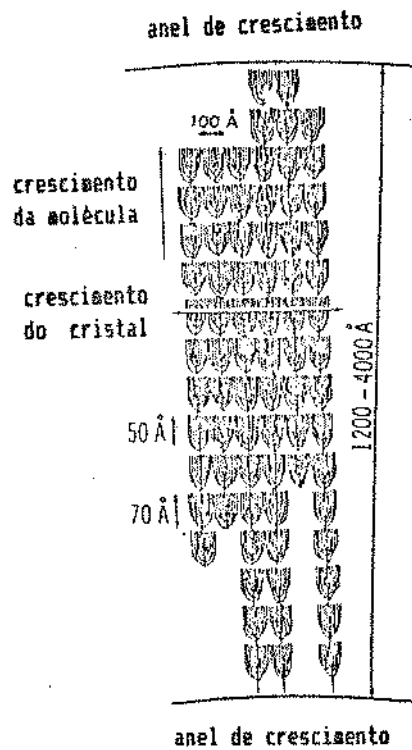


Figura 1: Representação esquemática do arranjo da molécula de amilopectina no anel de crescimento

O comprimento da molécula de amilopectina corresponde à espessura do anel de crescimento (1200 - 4000 Å) e as regiões cristalinas (50 Å) apresentam-se em duplas hélices

Fonte: FRENCH (1984)

### 2.1.2. PADRÕES DE CRISTALINIDADE

Os padrões de difração de raios X podem, em certos casos, ser suficientes para diferenciar amidos naturais ou detectar mudanças na ordem cristalina do grânulo ocorridas por tratamentos físicos e químicos do amido natural (ZOBEL, 1964).

Nos padrões de difração de raios X, uma estimativa quantitativa das intensidades relativas das linhas de difração é dada pelas alturas dos picos nos gráficos. O ângulo de difracção  $2\theta$ , do qual o espaço interplanar ( $d$ ) é calculado, também pode ser prontamente obtido dos difractogramas (ZOBEL, 1964).

Amidos de cereais fornecem padrões de difração de raios X tipo A, exceto para as variedades com teores de amilose superior à 50% (amilomilho). Os amidos de tubérculos e raízes fornecem padrões tipo B ou C (ZOBEL, 1964; LINEBACK, 1984; FRENCH, 1984).

O padrão tipo C, intermediário entre os tipos A e B é observado em amidos de ervilha e vários tipos de feijão sendo, provavelmente, uma mistura desses tipos em um mesmo grânulo (FRENCH, 1984; BILLIADERIS, 1991).

Um quarto padrão V, é fornecido devido à complexos formados pela amilose com uma variedade de moléculas orgânicas polares (ZOBEL, 1964, 1988a).

De acordo com DUPRAT et al (1980), o aparecimenmto de estruturas A ou B depende sobretudo da temperatura e da atividade de água no meio em que ocorreu a síntese do amido. Assim, estrutura A provém de meios quentes e secos, enquanto estrutura B provém de meios frios e úmidos.

O padrão A fornece 3 picos fortes nos espaços interplanares (d) 5,8; 5,2 e 3,8 Å. O padrão B fornece um pico a 15,8 - 16,0, um com menor intensidade e mais largo a 5,9; um outro a 5,2 e um par de intensidade média a forte a 4,0 e 3,7 Å. O padrão C é semelhante ao A, exceto pelo aparecimento de um pico de intensidade média a forte a 16,0 Å. A presença deste último pico no padrão C depende do teor de umidade do grânulo e pode estar ausente em amostras secas ou parcialmente secas. Para o padrão V hidratado, os picos aparecem a 12,0; 6,8 e 4,4 Å, sendo que o pico a 4,4 Å frequentemente aparece como a primeira indicação de que o complexo V está sendo formado (ZOBEL, 1988a).

Para GALLANT et al (1982), os difractogramas do tipo A apresentam dois picos entre 8 e 9°  $\theta$  e um pico nas proximidades de 12°  $\theta$ , enquanto os de tipo B apresentam um pico à 8,30°  $\theta$ , dois a 11,30 e 12°  $\theta$  e um pico a 2,52°  $\theta$ .

Segundo ZOBEL (1988a), o padrão C é uma estrutura distinta e não uma mistura de A e B. No entanto, GERNAT et al (1990), estudando os padrões de difração de raios X tipo C, característico de amidos de legumes e comparando-os com padrões puros tipo A e B mostraram que o padrão C é uma mistura de A e B. Assim, eles apresenta-

ram as proporções de cada um nas partes cristalinas dos amidos tipo C calculadas por um método de regressão linear. O amido de ervilha é composto de 38,6% de padrão tipo B e 61,4% de padrão tipo A, enquanto o amido de feijão é composto de 17,0% de tipo B e 83,0% de tipo A.

Alguns amidos naturais mostram padrões misturados A+V, B+V ou C+V. Segundo ZOBEL (1988a) através de tratamentos térmicos com baixa umidade é possível introduzir a estrutura V em amidos que contenham amilose. Esses tratamentos podem utilizar as seguintes condições: níveis de umidade de 18 a 45%; temperaturas de 90 a 130°C; durante 1 a 16 horas. Para esse autor, a amilose no milho, está separada da amilopectina, provavelmente como uma entidade amorfa associada em alguma extensão aos lipídios. Isso explica a facilidade com que a estrutura V é formada quando grânulos de amidos de milho são submetidos à esses tratamentos. As bem conhecidas transformações de padrões B para A e B para C de amidos de batata também ocorrem quando essas condições são usadas.

KAINUMA & FRENCH (1972), citados por LINEBACK (1984), estudaram o papel da água na estrutura do grânulo de amido usando dextrinas Nageli tipo B. Este material foi obtido do amido tipo B pelo tratamento dos grânulos de amido natural à temperatura ambiente com 15% de ácido sulfúrico. Após 3 meses, as regiões amorfas do grânulo foram erodidas sobrando um resíduo altamente cristalino que reteve a forma microscópica característica, a birrefringência óptica e o padrão de difração de raios X do amido original. Com medidas de difração de raios X, esses autores concluíram que a água não é um

constituente essencial de cristais de amido tipo B. Considerando alternativas que conduziram ao denso empacotamento das cadeias de amido, eles sugeriram modelos de dupla hélice para amidos, mais tarde suportados pela teoria da B-amilose.

WU & SARKO (1978 a e b), através de estudos de difração de raios X, examinaram fibras orientadas de amilose nas formas A e B. Observaram que as estruturas de cristais A e B estavam arranjadas em duplas hélices de fios paralelos. As duplas hélices individuais, nessas duas estruturas, eram muito semelhantes. As cadeias de glicose formavam duplas hélices de fios paralelos voltados para a direita que se compactavam antiparalelamente num arranjo hexagonal. A diferença mais importante entre as estruturas A e B é que a estrutura B era mais aberta devido a "falta" de uma dupla hélice central (Figura 2). O espaço vazio na estrutura B era preenchido com 36 moléculas de água na célula unitária, enquanto a estrutura A continha apenas 8 moléculas de água na célula unitária. A célula unitária é a menor porção do cristal, que por meio de repetição continuada, fornece toda a estrutura.

Segundo ZOBEL (1988a), a transição de B para A poderia ocorrer pela simples substituição de hélices após a remoção de água. A transição de A para B é menos favorável energeticamente e apenas após a estrutura A ser fundida a um estado amorfo, sua cristalização em B poderia ser observada.

Os diagramas de raio-X para as fibras de amilose A e B são idênticos aos diagramas de difração correspondente aos amidos A

e B (WU & SARKO, 1978 b, ZOBEL, 1978). A Figura 2 mostra os arranjos estruturais para amilose A e B proposto por WU & SARKO.

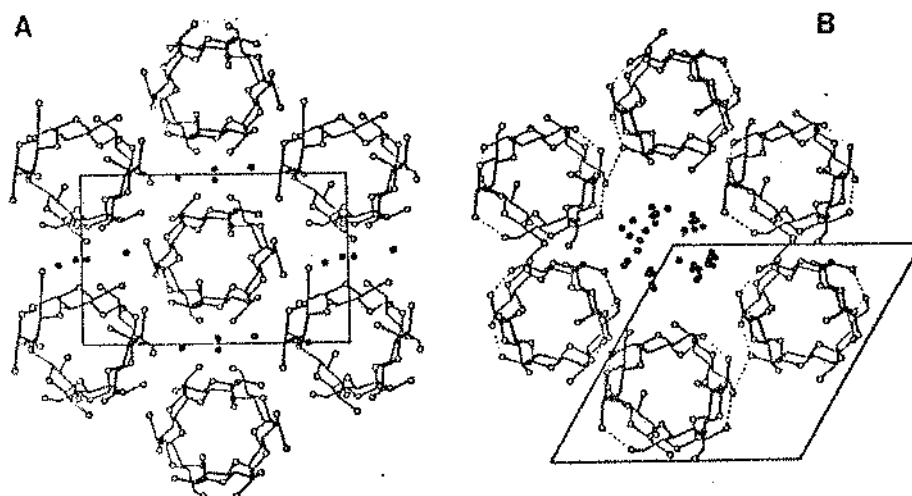


Figura 2: Arranjos das células unitárias e empacotamento em duplas hélices nas amiloses A e B.

. moléculas de água

--- pontes de hidrogênio

Os anéis consistem das hélices vistas de cima e os eixos das células unitárias também estão indicados.

Fonte: WU & SARKO (1978b)

Segundo FRENCH (1984), quando a biossíntese do grânulo de amido é levada em consideração, parece mais natural esperar um empacotamento paralelo das duplas hélices e não antiparalelo como proposto anteriormente por WU & SARKO. Assim, WILD & BLANSHARD (1986) questionaram os resultados de WU & SARKO, e de acordo com suas análises eles observaram que os valores das intensidades de raios X eram muito afetados pela posição das moléculas de água na célula unitária, porém não foi possível determinar as reais posições das mesmas.

Estes autores observaram também dois importantes detalhes do empacotamento das duplas hélices: os valores das intensidades de raios X não podem discriminar o arranjo antiparalelo originalmente proposto em relação ao empacotamento paralelo, e o mesmo se aplica aos movimentos de translação das duplas hélices em relação às hélices adjacentes ao longo do eixo C.

IMBERTY et al (1991) revisando os modelos tridimensionais de zonas cristalinas e de zonas amorfas dos grânulos de amido, observaram que nos cristais de ambos amidos A e B, as duplas hélices são formadas em pares, e todas as cadeias são empacotadas em arranjos paralelos. Os pares de duplas hélices são idênticos em ambos polimorfos e correspondem à interação entre as duplas hélices que tem menor energia. As diferenças entre os amidos A e B estão no teor de água e na maneira como esses pares de duplas hélices estão empacotados nos respectivos cristais. As duplas hélices são conectadas através de uma rede de pontes de hidrogênio, que deixam um canal no centro do arranjo hexagonal de 6 duplas hélices. As moléculas de água estão localizadas em posições fixas dentro deste canal; metade tem hidrogênios ligados às cadeias de amilose e a outra metade à outras moléculas de água. Não existe sinais de desordem dessas moléculas. Além disso, eles observaram que os pontos de ramificação da amilopectina ligados em 1 - 6 ocorrem nas zonas amorfas, mas eventualmente promovem a formação de duplas hélices ordenadas.

Segundo GIDLEY (1985), o comprimento médio das cadeias de D(1-4) glucanas externas da amilopectina influenciam o padrão de cristalização dos amidos. Amilopectinas com comprimento médio de ca-



deias (<20 e > 22) fornecem padrões de cristalinidade tipo A e B respectivamente. Já para HIZUKURI et al (1983), cadeias pequenas (26), longas (30) e intermediárias (28) fornecem padrões A, B e C respectivamente.

A amilopectina é responsável pelas longas faixas ordenadas observadas através do empacotamento regular das duplas hélices formadas pelas ramificações adjacentes, porém sem envolver os pontos de ramificação. Para um eixo molecular, a distância padrão para um feixe individual de uma dupla hélice é de 21 Å ou 6 unidades de D-gluco-piranosil, e o comprimento médio das cadeias externas da amilopectina é de aproximadamente 14 unidades de resíduos D-gluco-piranosil. Assim, a extensão cristalina calculada ao longo do eixo molecular é de aproximadamente 50 Å, conforme Figura 1 (FRENCH, 1984).

### 2.1.3. Características microscópicas

De acordo com SCHOCH & MAYWALD (1956), a posição do "hilum" no grânulo de amido, se centrado ou excêntrico, é importante na identificação do material vegetal de origem.

Em grânulos grandes (batata, cana), segundo FRENCH (1973), são visíveis, ao redor do "hilum", uma série de camadas concêntricas (aneis de crescimento). Os grânulos mais maduros geralmente possuem uma fissura caracteristicamente assimétrica. As quebras e fissuras, frequentemente revelam uma estrutura de camadas interiores ou um arranjo cristalino radial. A região do "hilum" é usualmente menos or-

ganizada que o resto do grânulo.

Sob luz polarizada, os grânulos de amido natural aparecem como esferocristais, com uma típica cruz escura (cruz de malta). Os braços escuros da cruz de polarização ocorrem ao longo dos eixos médios dos índices refrativos ópticos elipsóides e interseptam-se no "hilum" (FRENCH, 1984).

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) tem sido amplamente utilizada em estudos morfológicos de amidos naturais.

A observação dos grânulos de amido naturais em microscópio eletrônico de varredura mostra uma superfície relativamente lisa e livre de poros e fissuras (FRENCH, 1984). Esta imagem seria mais fiel à aparência superficial do grânulo.

Através da ação de enzimas sobre grânulos de amido e observações em SEM, é possível verificar o modo de ação das diversas amilases cujo padrão vai depender da origem botânica do amido e da enzima utilizada (EVERS & McDERMOTT, 1970; GALLANT et al, 1972, 1973; RAMADAS et al, 1983; FRANCO et al, 1988).

Após tratamentos químicos ou enzimáticos, a observação dos grânulos de amido através de microscópio eletrônico de varredura mostra uma estrutura disposta em camadas concêntricas, com alternância de camadas claras e escuras (GALLANT et al, 1972, 1973; FRANCO et al, 1988), que indicam uma susceptibilidade diferencial à hidrólise por parte de cada camada (EVERS & McDERMOTT, 1970; FRENCH, 1984).

Segundo FRENCH (1984), a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é um instrumento de grande utilidade, já que fornece uma ponte entre a visão geral proporcionada pela microscopia óptica e eletrônica de varredura (SEM) e os detalhes de alcance molecular mais sofisticados como os revelados na difração de raios X e análises estruturais químicas e bioquímicas.

NIKUNI (1978), à partir de resultados de microscopia eletrônica e dados obtidos de difração de raios X, propôs como modelo para o amido, uma micela esférica onde coexistem cadeias regulares, ramificações e extremidades de cadeias dentro da micela. Cadeias de amido poderiam estar entrando e saindo da micela para formar a fase amorfa do grânulo.

KASSEMBECK (1978) utilizando TEM, observou em finos cortes de grânulos de amido, anéis de crescimento bem definidos com alta e baixa densidade eletrônica que se estendiam em direção tangencial. Os anéis de crescimento tinham periodicidade radial de  $60 \text{ \AA}$  para o amido de trigo e  $70 \text{ \AA}$  para o amido de milho. Essas dimensões corresponderiam aos espaços médios dos "clusters" no modelo "cluster" da amilopectina (ilustrado na p. 20 deste trabalho) proposto por ROBIN et al (1974), constituindo evidência de sua orientação radial. Este autor sugeriu 3 tipos de organização molecular para o grânulo de amido: a) um arranjo fibrilar radialmente alinhado de amilose nas regiões ordenadas; b) amilose num arranjo amorfo; c) um arranjo de amilopectina nas regiões cristalinas onde as moléculas aparecem periodicamente arranjadas na secção radial, com os cristais nas lamelas tangenciais.

YAMAGUCHI et al (1979) examinaram amido de milho ceroso através de TEM para estabelecer detalhes da estrutura das moléculas e sua organização nos grânulos de amido. Após dispersão em DMSO (dimetil-sulfoxido), os grânulos de amido de milho ceroso mostraram partículas irregulares alongadas (moléculas e agregados) com aproximadamente  $100 \text{ \AA}$  de diâmetro e  $1200 - 4000 \text{ \AA}$  de comprimento. Os grânulos moídos e misturados em água retinham a organização granular, incluindo anéis de crescimento, e após coloração negativa mostraram estruturas fibrosas onduladas, sendo que as ondulações tinham cerca de  $70 \text{ \AA}$ , semelhantes àquelas observadas por KASSEMBECK (1978). Secções finas ( $500 \text{ \AA}$ ) de grânulos naturais não mostraram qualquer detalhe interpretável, mas após rigoroso tratamento ácido, os anéis de crescimento tornaram-se muito nítidos e eram compostos de lamelas de  $50 \text{ \AA}$ , orientadas de maneira irregular mais ou menos tangencial aos anéis de crescimento. Amilodextrinas Nageli de amido de milho ceroso recristalizadas também mostraram lamelas com aproximadamente  $55 \text{ \AA}$ . As ondulações de  $70 \text{ \AA}$  nos fragmentos dos grânulos de amido foram interpretadas como alternações entre as regiões cristalinas e amorfas. As regiões cristalinas foram interpretadas como "clusters" paralelos das cadeias de amido associados lado a lado. Durante o tratamento ácido, a fase mais amorfa do grânulo foi erodida gradualmente; as zonas "intercluster" foram hidrolizadas e as cadeias mais regulares formaram a lamela cristalina. A espessura de uma lamela era igual ao comprimento médio de uma cadeia molecular com 12 - 15 unidades de glicose, que tem cerca de  $50 \text{ \AA}$ . Os outros  $20 \text{ \AA}$  (ligações "interclusters") foram removidos pelo tratamento ácido, deixando a porção de aproximadamente  $50 \text{ \AA}$ , mais cristalina e resistente ao ácido, relativamente intacta (LINEBACK, 1984)

Do mesmo modo, OOSTERGETEL & van BRUGGEN (1989) obtiveram micrografias eletrônicas de fragmentos de grânulos de amido com uma estrutura ondulada, sendo as ondas equidistantes em 10 nm. Os resultados foram interpretados como alternações de regiões cristalinas com zonas amorfas onde ocorriam os pontos de ramificação  $\alpha(1-6)$ .

#### 2.1.4. Estrutura fina da amilopectina

A estrutura fina da amilopectina tem sido extensivamente estudada nos últimos anos. Diversos modelos de estrutura foram postulados com relação ao modo como as cadeias estão arranjadas para formar uma estrutura altamente ramificada.

A descoberta e utilização de enzimas desramificantes altamente purificadas, que hidrolizam especificamente as ligações glicosídicas  $\alpha(1-6)$ , em combinação com métodos cromatográficos de separação dos produtos da digestão enzimática tem possibilitado a exploração da organização das cadeias de  $\alpha$ -D-glucanas ramificadas e da amilopectina em particular (MERCIER, 1973; ROBIN et al, 1974, 1975; BILIADERIS et al, 1981).

Segundo MANNERS (1989), durante o período de 1970 - 1979, três diferentes estruturas moleculares foram propostas para a amilopectina. Uma dessas estruturas, o modelo "cluster" tem emergido como a estrutura mais provável, apesar de existirem variações deste modelo e ainda não estar claro se ele se aplica a todas as amilopectinas, independente da fonte botânica do amido.

MERCIER (1973), usando um método enzimático que permite o exame direto dos constituintes da cadeia, estudou a estrutura fina de amidos de milho com várias porcentagens de amilose: ceroso, normal e amilomilho. Esta autora encontrou que a fração amilopectina do amilomilho apresenta características diferentes das apresentadas pelas frações correspondentes do amido de milho normal e ceroso. Através da  $\beta$ -amilólise e desramificação com pululanase e fracionamento posterior em coluna Sephadex G-50, foi observado que os perfis de eluição das  $\beta$ -dextrinas limites dos amidos desramificados normal e ceroso mostraram uma distribuição idêntica das cadeias unitárias, indicando uma estrutura semelhante para a fração amilopectina. Por outro lado, a heterogeneidade da  $\beta$ -dextrina limite do amilomilho e o estudo das duas frações de cadeias mais resistentes à hidrólise mostraram diferenças na estrutura da amilopectina do amilomilho em comparação às do amido de milho normal e ceroso. Ficou evidenciado que a amilopectina do amilomilho (64% de amilose) tem a sua própria estrutura com cadeias internas mais longas (DP > 60) do que aquelas de estrutura similar da amilopectina do amido de milho normal e ceroso (DP  $\sim$ 30). Segundo MERCIER, a amilopectina do amilomilho é menos ramificada que a dos amidos normal e ceroso.

ROBIN et al (1974) sobressairam-se propondo um modelo para a amilopectina a partir de estudos de amido de batata lintnerizado obtido pela hidrólise do amido de batata com HCl à 35° C por períodos variados de tempo até 40 dias. Foi realizada a filtração das amostras do amido natural e hidrolisado, em gel Sephadex G-50 após sucessivos tratamentos enzimáticos com pululanase e  $\beta$ -amilase. Com a crescente hidrólise ácida, os padrões de eluição mostraram o apa-

recimento progressivo de dois picos II e III que representaram distribuições de frações com grau de polimerização (DP) de 25 e 15 respectivamente, independente da hidrólise.

Tratamentos enzimáticos subsequentes mostraram que a fração II apresentou DP = 25 e foi identificada como sendo uniramificada, enquanto a fração III apresentou DP = 15 e era formada por cadeias lineares, como parte cristalina do grânulo, mais resistente à hidrólise. Essas frações foram progressivamente produzidas à partir de amilose e amilopectina presentes no pico I e de sua fração associada.

O estudo de difração de raios X mostrou claramente que a hidrólise ácida ocorreu preferencialmente nas zonas amorfas do amido e progressivamente produziu maior exposição do material cristalino representado pelas frações II e III. O tamanho molecular constante dessas frações foi explicado pela ausência de degradação dentro dos microcristais, durante a lincnerização, sugerindo que a água e/ou o ion  $H_3O^+$  não poderiam penetrar na rede cristalina. Uma hidrólise muito lenta poderia ocorrer através da erosão progressiva da superfície externa dos microcristais explicando a baixa taxa de hidrólise nos últimos dias de tratamento do amido com ácido. ROBIN et al sugeriram que os cristais de amido consistiam de cadeias bem compactas de aproximadamente 15 unidades de glicose. A distância entre as unidades de glicose na hélice de amilose completamente estendida é de 4 Å. Dessa forma, a dimensão calculada de um microcristal de amido, consistindo de uma associação compacta de cadeias de DP = 15 estaria próxima à 60 Å ao longo do eixo da cadeia. Todas essas observações levaram estes autores à propor o modelo "cluster" para a amilopectina mostrado na Figura 3. Nesse modelo cristalino para a estrutura da

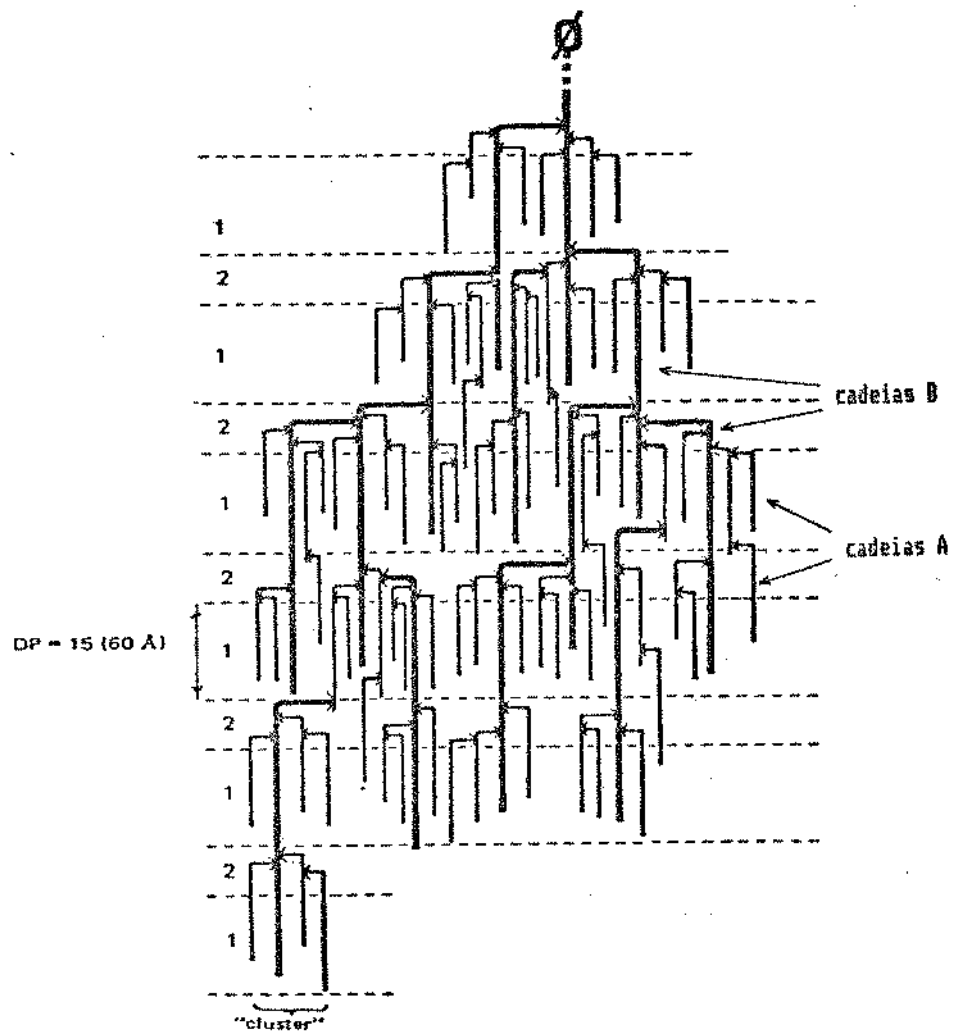


Figura 3: Modelo "cluster" para a amilopectina

1: Áreas cristalinas; 2: Áreas amorfas;  $\phi$ : extremidade re-  
dutora; DP: grau de polimerização

Fonte: ROBIN et al (1974)



amilopectina aceita-se que os "clusters" associados de cadeias A de 60 Å de comprimento, passam a constituir uma camada cristalina com 60 Å de espessura na direção do eixo da cadeia. Tais "clusters" associados constituiriam a fração dos grânulos de amido, resistente ao ácido. As áreas intercristalinas entre os sucessivos "clusters" ou camadas cristalinas conteriam a maior parte das ligações  $\alpha(1-6)$  bem mais suscetíveis ao ácido.

O modelo proposto por ROBIN et al (1974) é diferente do modelo clássico de MEYER & BERNFELD (1940) e daquele proposto por GUNJA-SMITH et al (1970). No atual, as cadeias A de DP = 15 e B de DP = 45 não são inteiramente comparáveis com as cadeias A externas e com as cadeias B internas do modelo de MEYER. Nesse modelo, as cadeias A representam as cadeias A externas e qualquer cadeia B interna de DP = 15 do modelo de MEYER. As cadeias B representam apenas as cadeias B internas de DP = 45.

ROBIN et al (1975) realizaram os mesmos estudos com amido de milho ceroso, normal e amido de trigo. Eles observaram que esses amidos também apresentaram as frações II e III e que estas estavam associadas às partes mais organizadas dos grânulos de amido representando os elementos de base dos cristais de amido. Os resultados permitiram observar :

- a) a presença de 2 frações principais de cadeias A de DP = 15-20 e B de DP = 45 observados após desramificação do amido natural.
- b) a relação A/B próximo à 9, em termos de número de cadeias.
- c) a presença de 3 frações de (DP = 35; DP = 10-12; DP = 3) obtidas após desramificação das  $\beta$ -dextrinas limites do amido natural.

d) a presença das frações II de DP = 25 e III de DP = 13 após hidrólise ácida.

e) a presença de cadeias uniramificadas na fração II dos resíduos da hidrólise ácida, onde a ligação  $\alpha(1-6)$  estava situada, principalmente, próxima à sua extremidade redutora.

f) a possibilidade de formação das  $\beta$ -dextrinas limites resistentes à desramificação a partir de resíduos da hidrólise ácida.

Esses resultados forneceram dados para formular a hipótese de que existe em média 2 "clusters" elementares de cadeias A para uma cadeia B, sendo que cada "cluster" seria constituído de 4 ou 5 cadeias A. As cadeias A poderiam estar intimamente associadas 2 a 2 e seriam de fato a origem das cadeias uniramificadas observadas após hidrólise ácida. A associação das cadeias 2 a 2 poderia ser feita sob a forma de dupla hélice. Os autores consideram que as cadeias A e B como também os "clusters" elementares situados ao mesmo nível são, dentro do domínio organizado, associados muito fortemente entre si pelas ligações de hidrogênio e que seus conjuntos podem então constituir as zonas ou camadas cristalinas mais densas e mais resistentes ao ácido. Essas camadas seriam originárias das frações II e III que apareceram após hidrólise ácida das zonas amorfas, menos resistentes ao ácido e que concentram a maior proporção das ligações de ramificação  $\alpha(1-6)$ . Comparando com o modelo da amilopectina de batata, os autores sugeriram que existe um paralelismo entre o tipo cristalino inicial do amido natural (tipo A para os amidos de cereais e B para o amido de batata) e a estrutura da macromolécula da cadeia de amilopectina, em particular seu grau de ramificação que foi estimado à partir da relação A/B de 5 e 6% respectivamente para amilopectinas de batata e milho ceroso. Assim o valor do grau de ra-

mificação da cadeia de amilopectina poderia ser um dos fatores passíveis de influenciar a cristalização tipo A ou B no momento da biossíntese do amido.

Um detalhe mais elaborado da estrutura de "cluster" foi proposto por HIZUKURI (1986), baseado na distribuição polimodal do perfil das cadeias A e B. A fração A representa as cadeias A, enquanto as frações B1-B4 representam as várias cadeias B. Este autor propõe que "clusters" únicos são compostos de frações A e B1; que as cadeias na fração B2 estendem-se em 2 "clusters"; aquelas na fração B3 em 3 "clusters" e 1% das cadeias na fração B4 poderiam estender-se em 4 "clusters" (Figura 4). O comprimento médio de cadeia (CL) das frações B1, B2 e B3 seria 20-24, 42-48 e 69-75 resíduos de glicose respectivamente, em 4 diferentes amilopectinas, com os comprimentos relativos sendo 1:2:3. As cadeias A conteriam 12-16 resíduos de glicose. A soma das cadeias nas frações A e B1 seria cerca de 80-90% do total, e constituiriam "clusters" únicos. Os restantes 10-20% das cadeias estariam envolvidas principalmente nas conexões inter-"cluster". O tamanho total de um "cluster" simples seria semelhante àquele obtido por análises de difração de raios X dos domínios cristalinos dos grânulos de amido.

LII & LINEBACK (1977), extraíram amidos de diversos cereais e procederam ao estudo dos mesmos. Quando frações de amilopectina isoladas de cada amido foram desramificadas com isoamilase e sujeitas a filtração em gel BIO-GEL P10, duas frações de cadeias foram obtidas com DP de  $\pm 11 - 25$  e  $52 - 60$ . O comprimento médio da cadeia das amilopectinas variaram de 15 para o triticali a 26 para o cen-

teio. A razão de cadeias A/B determinadas enzimaticamente variaram de 1,21 a 2,11. Como as cadeias A não são ramificadas e as cadeias B são aquelas onde existe um ou mais pontos de ramificação, o aumento da razão da cadeia A/B indica múltipla ramificação.

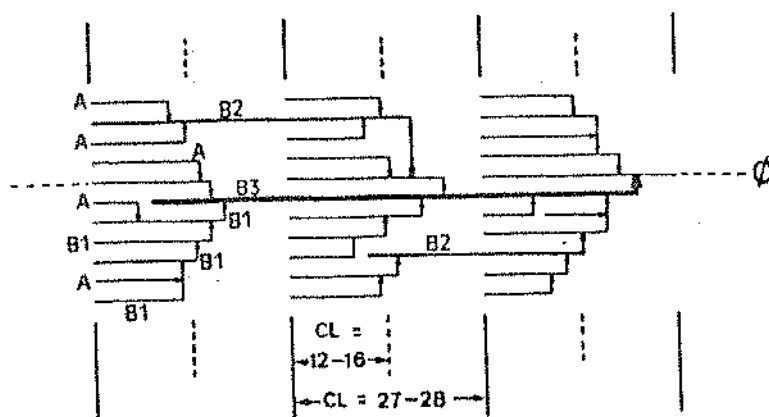


Figura 4: Modelo "cluster" da amilopectina proposto por HIZUKURI

Ø: extremidade redutora; CL: comprimento de cadeia.

Fonte: HIZUKURI (1986)

Segundo BRUNN & HENRIKSNAS (1977), a distribuição do tamanho molecular de amidos naturais e oxidados foi investigado através de filtração em gel agarose (Sephacrose CL 4B). Esses autores observaram que a curva de distribuição molecular do amido natural de trigo mostrou um grande pico com  $PM > 2 \times 10^6$  excluído pelo gel, compreendendo cerca de 58% da amostra, e uma parte fracionada pelo gel, com  $1 \times 10^4 < PM < 2 \times 10^6$ . Análises comparativas com amidos de milho, mandioca e batata mostraram alguma semelhança entre os perfis

de amido de trigo e milho. As féculas de mandioca e especialmente batata tinham uma porcentagem menor de moléculas na parte fracionada pelo gel que o amido de trigo.

HOOD & MERCIER (1978) estudaram a estrutura fina da fécula de mandioca natural e modificada quimicamente (O - 2 - hidroxipropil diamido fosfato) através de sucessivas hidrólises com pululanase,  $\beta$ -amilase e/ou amiloglucosidase, seguida de fracionamento em Sephadex G-50. Estes autores encontraram que a estrutura molecular da amilopectina da fécula natural de mandioca possuía muitas semelhanças àquelas encontradas para amilopectina dos amidos de batata, milho, milho ceroso, trigo e arroz, encontradas por outros pesquisadores. As cadeias lineares geradas pela desramificação com pululanase apresentaram-se em 2 frações discretas de DP = 15 e de DP = 45. A razão de 7,5 cadeias de DP = 15 para cada cadeia de DP = 45 foi maior que para o amido de batata (5,4) encontrado por ROBIN et al (1974), porém menor que para os amidos de cereais(9) (ROBIN et al, 1975). A desramificação da  $\beta$ -dextrina limite produziu frações de DP = 2-10 e 30-35. Isto indicou que as cadeias exteriores mais distantes dos pontos de ramificação tinham DP = 15. O valor DP = 2-10 da  $\beta$ -limite-dextrina desramificada ( $\beta_1P_1$ ) sugeriu que as cadeias mais internas variavam de DP = 4-10. As frações de DP = 2-3 originou-se dos resíduos de maltose e maltotriose remanescentes nos pontos de ramificação  $\alpha(1-6)$  após  $\beta$ -amilólise.  $\beta$ -amilólise das  $\beta$ -dextrinas limites desramificadas, e a falta de qualquer produto de hidrólise além de maltose e maltotriose confirmaram que os polímeros desramificados eram totalmente lineares. Segundo esses autores, cerca de 50% das cadeias de DP = 15 das amilopectinas modificadas química-

mente não estavam modificadas. Com o modelo de "cluster" proposto por ROBIN et al (1974), onde resíduos de aproximadamente 15 unidades de glicose podem formar cristais de amido, os autores sugeriram que essas regiões cristalinas poderiam ser impenetráveis aos reagentes utilizados nas reações de modificação e conseqüentemente menores modificações químicas ocorreriam nas regiões cristalinas. É provável que durante a modificação química do amido, os reagentes penetrem mais prontamente nas áreas amorfas. Como cada "cluster" com DP = 15 e DP = 45 tem aproximadamente 160 resíduos de glicose, 1/3 seria modificado dando aproximadamente 16 grupos modificados por "cluster". A maioria deles estaria localizada nas regiões amorfas ricas em ligações  $\alpha(1-6)$ . Como cerca de 50% das cadeias de DP = 15 não continham qualquer modificação, essas cadeias não modificadas poderiam estar localizadas nas regiões mais internas da molécula, onde a cristalinidade seria maior.

Segundo DUPRAT et al (1980), as diferenças de estrutura fina entre as amilopectinas de diferentes fontes botânicas está essencialmente na taxa de ramificação da macromolécula. Assim, de modo geral, amilopectinas de espectro cristalino tipo B estariam menos ramificadas (razão A/B = 5-6) que aquelas de amidos de espectro cristalino tipo A (razão A/B = 9-10).

ATWELL et al (1980) estudaram a desramificação da amilopectina de trigo com pululanase e isoamilase e posterior  $\beta$ -amilólise acompanhados de estudos cromatográficos. Segundo esses autores, a distribuição bimodal das cadeias obtidas da desramificação da amilopectina de trigo provavelmente resultaram de uma fração normal uni-

ramificada de moléculas de amilopectina.  $\beta$ -dextrinas limites da amilopectina forneceram uma distribuição normal quando eluidas em coluna Sepharose CL 4B. Quando aliquotas do material intermediário desta distribuição normal foram desramificadas com pululanase e submetidas ao Bio-Gel P10, a distribuição bimodal da amilopectina foi preservada. Um terceiro pico, composto de maltose e maltotriose derivado das cadeias A hidrolisadas com  $\beta$ -amilase foi também observado. Além disso, a comparação dos perfis das cadeias de amilopectina natural e  $\beta$ -dextrina limite mostraram que o pico correspondente ao material de menor comprimento de cadeia (amilopectina) era hidrolisado mais que o pico correspondente ao material de maior comprimento de cadeia ( $\beta$ -dextrina limite). O modo de ataque da pululanase e isoamilase sobre a amilopectina também diferiu. Pululanase forneceu uma distribuição bimodal de cadeias através da degradação da amilopectina, enquanto a isoamilase reduziu rapidamente o polímero à frações intermediárias. Segundo esses autores, a pululanase aparentemente ataca ao acaso com relação às diferentes moléculas de amilopectina e apresenta um ataque ordenado em relação às diferentes ligações dentro dessas moléculas. Já a isoamilase ataca mais ao acaso que a pululanase tendo dificuldade à certas ligações. Assim, a molécula grande de amilopectina é rapidamente convertida à fragmentos parcial ou totalmente desramificados, mas o pico intermediário ramificado é lentamente degradado pela enzima. Essa diferença, talvez esteja relacionada à proximidade dos pontos de ramificação e ao comprimento das cadeias envolvidas.

MANNERS & MATHERSON (1981) realizaram um estudo crítico de um método enzimático para determinação da razão de cadeias A e B

na amilopectina e encontraram um valor de aproximadamente 1:1. A desramificação parcial com pululanase forneceu resultados consistentes de que as cadeias A eram predominantemente e seletivamente removidas. Segundo os autores, uma molécula típica de amilopectina pode conter cerca de 10.000 cadeias constituintes e pode ser que nem todas as cadeias externas sejam degradadas totalmente durante a preparação das limite-dextrinas. Existe também a possibilidade de algumas cadeias terminarem no interior da molécula e serem relativamente inacessíveis às amilases que agem de maneira "exo". Assim, esses fatos colaboram para aumentar as dificuldades de se ter um método de determinação da estrutura fina da amilopectina que seja realmente eficiente.

BILIADERIS et al (1981) fracionaram amidos de sementes de leguminosas e estudaram a estrutura fina dos componentes isolados e suas  $\beta$ -dextrinas limites através de enzimas hidrolíticas em conjunto com técnicas de cromatografia de filtração em gel (Biogel P10). Os perfis de cadeias unitárias das amilopectinas desramificadas eram caracterizadas pela distribuição bimodal com graus médios de polimerização de 45-55 e 14-18. O comprimento médio das cadeias para a maioria das amilopectinas variou de 20-26. A  $\beta$ -amilólise incompleta das amiloses de sementes de leguminosas (78,4-89,4%) evidenciou um número relativamente pequeno de ligações  $\alpha$ (1-6) na molécula.

MacGREGOR & MORGAN (1984), através de estudos de hidrólise enzimática e cromatografia de permeação em gel, mostraram que as amilopectinas de grânulos grandes e pequenos de amidos de cevada



normal e ceroso, após desramificação com isoamilase apresentaram uma distribuição trimodal de cadeias unitárias possuindo aproximadamente graus de polimerização de 45-50, 18-20 e 10-12. A permeação em gel (Biogel P4) separou os grupos de 18-20 e 10-12 em cadeias unitárias individuais mostrando que ambas eram heterogêneas. Maltohexaose foi a menor unidade encontrada nas amilopectinas estudadas. Durante a  $\beta$ -amilólise, o material de DP = 45-50 foi degradado e o comprimento de cadeia predominante foi reduzido à aproximadamente 38 resíduos de glicose. As outras frações presentes nos outros dois picos foram extensivamente degradadas originando um material com um DP de 10-12, que apresentou-se em um pico heterogêneo. Uma nova fração, composta de maltose e maltotriose foi detectada nas  $\beta$ -limite dextrinas. Amilopectinas dos diferentes tipos de grânulos de amido estudados pareciam ter estruturas idênticas. Os autores concluíram que os perfis de cadeias unitárias das amilopectinas de diferentes tipos de amido de cevada são semelhantes uns aos outros e aos perfis reportados por outros pesquisadores para amilopectinas de outros grãos de cereais. Contudo, parece haver três grupos distintos de cadeias unitárias, e não dois como tem sido reportado. Dois desses grupos são hidrolisados extensivamente pela  $\beta$ -amilase e presumivelmente são compostos principalmente de cadeias A. É possível que esses grupos possam representar as cadeias A internas e externas discutidas por ROBIN et al (1975). O grupo com alto DP é menos extensivamente hidrolisado pela  $\beta$ -amilase e deve conter uma maior proporção de cadeias B. Esses resultados concordam com o modelo tipo "cluster" para a amilopectina proposto por ROBIN et al (1974, 1975) e MANNERS & MATHERSON (1981).

BERTOFT & KULP (1986) estudaram a ação da  $\alpha$ -amilase de cevada sobre os grânulos grandes e pequenos de amido de cevada e submeteram os hidrolisados à cromatografia de permeação de gel em Sepharose CL 4B e Sephadex G-50. Os grânulos grandes de amido foram hidrolisados diretamente em dextrinas menores completamente incluídas em gel Sepharose CL 4B. Essas dextrinas foram separadas em Sephadex G-50. Após 3 horas de hidrólise existia uma pequena fração com um grau de polimerização DP de 6-8. Após mais de 3 horas de incubação, dextrinas com um DP > 8 foram também produzidas. Dextrinas menores que maltohexaose dificilmente eram detectáveis. No caso dos grânulos pequenos uma quantidade comparativamente grande de dextrinas menores foram formadas. Mais de 50% do teor de carboidratos totais constituíam-se de dextrinas com PM < 20.000 após 3 horas de hidrólise. Nos estágios iniciais de hidrólise dos grânulos pequenos existia também dextrinas com PM = 30.000. Este produto intermediário não foi obtido a partir dos grânulos grandes. Entre os produtos de baixo peso molecular, as dextrinas com DP 6-8 eram predominantes já nos estágios iniciais de hidrólise. Somente após um tempo de incubação prolongado (+3horas) as dextrinas com menos de 6 resíduos de glicose eram formadas. Esses autores concluíram que à nível molecular, pequenas diferenças foram obtidas na composição dos hidrolisados dos grânulos de amido. O produto intermediário de PM = 30.000 foi produzido apenas pelos grânulos pequenos, e dextrinas menores com DP maior que 8 foram produzidas mais pelos grânulos grandes que pelos pequenos. O principal produto contudo, de DP = 6-8 foi obtido para ambos tamanhos de grânulos. Os autores sugeriram que esses oligossacarídeos de DP = 6-8 provavelmente seriam resultantes das cadeias externas nas moléculas de amilopectina ou dos componentes da

amilose em vez de dextrinas limites ramificadas.

TAKEDA et al (1988) isolaram amilose e amilopectina de amidos de milho obtidos de diferentes condições de maceração (água à temperaturas altas e baixas, e em soluções de sulfito e soluções alcalinas) e investigaram suas estruturas moleculares. Esses pesquisadores mostraram que todas as amiloses e amilopectinas que foram isoladas de milho macerado sob várias condições de maceração tinham estruturas moleculares comuns. As moléculas de amilose eram pequenas (DP = 930-990) compreendendo aproximadamente igual número de moléculas ramificadas e não ramificadas. As moléculas de amilopectina tinham o número mínimo de cadeias por molécula (5,3 cadeias em média).

A hidrólise da amilopectina de amido de milho ceroso e sua  $\beta$ -dextrina limite pela  $\alpha$ -amilase foi seguida pela filtração em gel Sepharose CL 6B. A mistura de  $\alpha$ -dextrinas foi também tratada com  $\beta$ -amilase. O DP dessas  $\beta$ -dextrina limite foi semelhante àquele dos produtos obtidos quando a  $\beta$ -dextrina limite da amilopectina era substrato. BERTOFT (1989) sugeriu que a amilopectina e sua  $\beta$ -dextrina limite são hidrolisadas pela  $\alpha$ -amilase por fissão das cadeias internas mais longas entre as unidades de "clusters". Maltose foi produzida da amilopectina, mas não da sua  $\beta$ -dextrina limite e concluiu-se que a  $\beta$ -dextrina limite da amilopectina é produzida somente das cadeias externas.

## 2.2. Elucidação da estrutura do amido através da ação de enzimas amilolíticas

### 2.2.1. Ação da $\alpha$ -amilase

FRENCH (1975) demonstrou que a ação da  $\alpha$ -amilase caracteriza-se por um ataque múltiplo na amilose e/ou amilopectina. A enzima inicialmente encontra o substrato numa posição qualquer e forma um complexo substrato-enzima com uma conformação adequada para catálise. O fragmento da direita, mais fracamente ligado à enzima que o fragmento da esquerda, prontamente se dissocia deixando o lugar da ligação da direita desocupado. O fragmento da esquerda se rearranja numa associação com a enzima para ocupar todo o lugar da ligação, produzindo um complexo substrato-enzima com geometria adequada para catálises posteriores. As ligações ramificadas não são quebradas pela  $\alpha$ -amilase e, conseqüentemente, a hidrólise da amilopectina é limitada, produzindo  $\alpha$ -dextrinas limites ou oligossacarídeos que contêm ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$  e  $\alpha(1-6)$ . O tamanho mínimo do substrato linear para uma rápida ação da enzima é de 8 ou 9 unidades de glucose sendo a malto-heptaose levemente atacada, enquanto oligossacarídeos menores são praticamente inertes à ação enzimática. A  $\alpha$ -amilase bacteriana hidrolisa a amilose produzindo 2 tipos de produtos: oligossacarídeos de maior peso molecular  $G_6$ ,  $G_7$  ou  $G_8$  e componentes menores, principalmente maltose e maltotriose. Com a amilopectina, a especificidade dupla da enzima é mais pronunciada.

Segundo MANNERS (1989), existem evidências de que a  $\alpha$ -amilase requer um segmento linear de no mínimo 5 resíduos de glucose

para uma rápida hidrólise. Além disso,  $\alpha$ -amilases de diferentes fontes biológicas mostram alguma variação na especificidade quanto as ligações  $\alpha(1-4)$  adjacentes aos pontos de ramificação como mostrado pelas diferentes estruturas das menores  $\alpha$ -dextrinas que podem ser isoladas.

LEACH & SCHOCH (1961) estudando a ação de várias amilases sobre amidos granulares em microscópio óptico e sob luz polarizada, observaram 2 tipos diferentes de ataque enzimático: grande erosão e fragmentação dos grânulos de amidos de milho e sorgo, e digestão seletiva dos grânulos de féculas de mandioca, sagu, araruta e batata. Para o amido de milho, a enzima parece atacar primeiro o "hilum", com perda da birrefringência nesta região. Os autores sugeriram que o amido de milho não possui membrana periférica e as frações de amilose e amilopectina são distribuídas uniformemente através dos grânulos. A enzima não penetra livremente dentro da rede molecular do grânulo, sendo limitadas à certas regiões ou superfícies acessíveis ao mesmo.

SANDSTED et al (1962), estudando a digestão de vários amidos naturais com  $\alpha$ -amilase bacteriana observaram grandes variações nas suscetibilidades ao ataque enzimático para os amidos de milho de diferentes variedades e perceberam que a digestibilidade não estava diretamente relacionada ao teor de amilose. As diferenças nas suscetibilidades à ação enzimática seriam decorrentes da estrutura dos grânulos de amido.

THARANATHAN et al (1980) sugeriram que a diferença na suscetibilidade amilolítica de amidos de diferentes fontes botânicas pode estar relacionada com as diferenças na composição do amido, particularmente no teor de amilose e comprimento de cadeia.

CONE & WOLTERS (1990) procederam ao isolamento de uma série de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas e ao tratamento enzimático desses grânulos com  $\alpha$ -amilase. Eles observaram que os grânulos isolados que apresentavam menor quantidade de amilose degradavam-se mais rapidamente que aqueles com maiores quantidades de amilose.

Em estudos realizados com microscópio eletrônico de varredura GALLANT et al (1972,1973) observaram grânulos de amido de diversas fontes botânicas tratados com  $\alpha$ -amilase bacteriana e suco pancreático e constataram a existência de camadas alternativamente claras e escuras no grânulo de amido, sugerindo que as camadas escuras eram menos organizadas e mais reativas que as claras. Observando a fécula de batata, verificaram que a parte externa do grânulo permanecia intacta após hidrólise. Para o amido de trigo, a hidrólise fornecia um padrão tipo "dente de serra", sendo mais extensiva na parte intermediária do grânulo, sugerindo também ser mais forte nas zonas mais escuras. Quanto ao amido de milho, ficou evidenciado que as camadas mais fortemente digeridas correspondiam às zonas escuras, e o grânulo era atacado através de canais corroídos, provavelmente através de algumas fissuras existentes nos grânulos naturais. Os grânulos observados apresentaram à altura dos canais de corrosão, camadas sobrepostas recortadas do tipo "dente de serra". A degrada-

ção ocorria pela formação de poros, primeiro na forma de funil e depois na forma de escavações cilíndricas. A hidrólise da fécula de mandioca foi caracterizada por uma marcante exocorrosão, deixando a superfície do grânulo totalmente rugosa e com pequenas depressões. A endocorrosão que acompanhou a erosão superficial não atingiu todos os grânulos ao mesmo tempo. Certos grânulos foram totalmente hidrolisados após 4 horas de tratamento, enquanto outros não foram sequer atacados.

De acordo com FRENCH (1973), as amilases, de maneira geral agem na superfície do grânulo, inicialmente talvez numa fissura ou outra imperfeição estrutural, confirmando resultados de GALLANT et al (1972,1973), e então estendem-se lateralmente formando cavidades cônicas. A ação contínua da  $\alpha$ -amilase causa erosão nos grânulos, que são, eventualmente, dissolvidos completamente.

HASKA & OHTA (1991,1992) isolaram *Penicillium brunneum* de planta de sagu usando-o como fonte de enzimas amilolíticas. Observaram que as enzimas eram efetivas em hidrolisar amidos de cereais, porém não o eram para féculas de raízes e tubérculos. Tratamento do amido de sagu por aquecimento à temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização e a menores valores de pH resultou num aumento da habilidade da enzima em digerir os grânulos. Observações em microscópio eletrônico de varredura mostraram que a estrutura do grânulo de amido tratado à 60,0°C, pH 2,0 por 2 horas não mudava, e sob luz polarizada a birrefringência era preservada. Após incubação com a enzima, grânulos de amido não tratados se tornaram corroídos e diversas cavidades eram observadas na superfície dos grânulos. A ação

enzimática sobre os grânulos tratados resultou em degradação muito mais intensa e as cavidades penetravam para o interior dos grânulos.

### 2.2.2. Ação da amiloglucosidase

Segundo FRENCH (1975), a amiloglucosidase age apenas nas extremidades não redutoras da cadeia do substrato, com hidrólise das ligações  $\alpha(1-4)$  e a liberação de  $\beta$ -glucose. Ligações  $\alpha(1-6)$  também são quebradas, mas muito mais lentamente. A princípio, a ação da amiloglucosidase poderia causar completa degradação da amilose e amilopectina. Contudo, com a enzima rigorosamente purificada e livre de  $\alpha$ -amilase, normalmente ocorre hidrólise incompleta do substrato, presumivelmente devido à irregularidades estruturais. Com oligossacarídeos ramificados resultantes da ação da  $\alpha$ -amilase sobre a amilopectina, a ação da amiloglucosidase quebra as unidades mais acessíveis de glucose da extremidade não redutora da cadeia.

EVERS et al (1971) tratando amido de trigo granular com amiloglucosidase fúngica observaram, através de microscópio eletrônico, que as superfícies dos grânulos atacados eram cobertas de cavidades circulares. Estas cavidades diminuíam rapidamente de diâmetro à medida que o ataque se prolongava para o interior do grânulo, contrariamente ao que ocorria com o ataque da  $\alpha$ -amilase, onde o diâmetro das cavidades aumentava com a maior profundidade do ataque (EVERS & McDERMOTT, 1970). Esses autores observaram também que, ao contrário da  $\alpha$ -amilase, a amiloglucosidase atacava de forma muito mais uniforme, preferencialmente na região equatorial do grânulo.



Nesta região, o ataque tendia a ser mais extenso na direção tangencial, e ao mesmo tempo mais superficial que aquele produzido pela  $\alpha$ -amilase. Comparando a ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase, os autores relataram que quando a primeira tinha acesso ao interior da região do grânulo, esta era capaz de digerir o amido no centro com menor dificuldade do que na periferia. A diferença no ataque das duas enzimas, segundo estes autores, seria devido a habilidade da amiloglucosidase em hidrolisar todas as ligações da molécula de amido, partindo das extremidades não redutoras. Esta ação permitiria um ataque relativamente uniforme sobre a superfície do amido granular. Por outro lado, o ataque da  $\alpha$ -amilase, restrito às ligações  $\alpha(1-4)$  e ao acaso, seria limitado a poucas áreas sobre a superfície onde existissem arranjos moleculares mais adequados.

SHETTY et al (1974) trataram amido de trigo granular com uma amiloglucosidase comercial e uma amiloglucosidase cristalina de *R. niveus*, e observaram que ambas enzimas digeriam extensivamente o amido, indicando que a amiloglucosidase pura pode atacar o amido natural. Estudos dos amidos residuais mostraram diferentes modos de ataque pelas duas enzimas. A medida que o tempo de hidrólise avançava, a amiloglucosidase cristalina atacava principalmente a superfície dos grânulos maiores, dando a seu exterior uma aparência esponjosa, que era ocasionalmente transpassada por uma cavidade cilíndrica e pequena. Por outro lado, a enzima comercial parecia estar menos confinada à superfície dos grânulos que a enzima pura. Seu ataque era caracterizado por penetrações maiores e mais profundas para dentro do grânulo, criando depressões em forma de concha na superfície. A ação desta enzima também provocou o aparecimento de túneis que co-

meçavam, principalmente, na ranhura equatorial e alargavam do exterior para o interior do grânulo. Estes resultados sugeriram que tais túneis, e o maior grau de digestão ocasionada pela enzima comercial era devido à presença de  $\alpha$ -amilase nesta preparação enzimática.

UEDA et al (1974), UEDA & KANO (1975) e MIAH & UEDA (1977) investigando as amiloglicosidases de diferentes microrganismos, encontraram duas isoenzimas. Uma das frações, referida como glucoamilase I possuía uma forte atividade desramificante e era altamente ativa na digestão do amido de milho granular. Por outro lado, a outra fração denominada glucoamilase II possuía uma baixa atividade desramificante e era levemente ativa na digestão do amido de milho cru. UEDA et al (1974) e UEDA & KANO (1975) sugeriram também que altos teores de amilose inibiam a ação da glucoamilase.

IKAWA et al (1982) estudaram os amidos de milho normal e de milho opaco doce ( $Su_2O_2$ ) tratados com amiloglicosidase de *R. amazakicus*, amiloglicosidase cristalina de *R. niveus* e amiloglicosidase cristalina de *Endomyces*. Cromatografia em gel Sephadex, dos produtos da hidrólise não revelou material de baixo peso molecular ou diferenças na proporção de amilose/amilopectina em amido de milho normal após digestão com as enzimas. Para os amidos de milho  $Su_2O_2$ , a hidrólise com amiloglicosidase não purificada provocou a formação de material de baixo peso molecular e rápida diminuição no teor de amilopectina. O teor de amilose, por outro lado, diminuiu muito lentamente. A ação da amiloglicosidase cristalina, entretanto, provocou um aumento no teor de amilose e uma diminuição não tão extensa como a provocada pela enzima não purificada, no teor de amilo-

pectina. Estes resultados sugeriram que a amiloglucosidase não purificada atacou preferencialmente a amilopectina nos grânulos de amido de milho Su<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De acordo com estes autores, a hidrólise dos produtos de baixo peso molecular resultantes do ataque da  $\alpha$ -amilase, presente na preparação enzimática não purificada, pela amiloglucosidase deveria ser limitada por uma adaptação desta enzima ao substrato. Após esta adaptação, a ação da amiloglucosidase resultaria na produção de glucose. Por outro lado, a ação da enzima cristalina deveria ser restrita às extremidades não redutoras das áreas cristalinas, que são mais resistentes ao ataque, resultando na formação de pouco material de baixo peso molecular. Estudos complementares de difração de raios X mostraram que o amido de milho Su<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possuía padrão tipo A que ia se transformando em padrão tipo B à medida que a hidrólise aumentava. Estes resultados sugeriram que as áreas cristalinas do amido Su<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eram uma mistura de padrões A e B, sendo que aquelas correspondentes ao padrão A eram mais suscetíveis à hidrólise que as de padrão B. Esta transformação de A para B, era assim decorrente do decréscimo na porção cristalina correspondente ao padrão A.

THARANATHAN & BHAT (1988) trataram amidos de feijão preto com amiloglucosidase e observaram em microscopia eletrônica de varredura que o ataque era propagado quando a maioria dos grânulos, antes lisos tinham distintamente se tornado enrugados na superfície.

NODA et al (1992) ainda confirmam que a suscetibilidade enzimática pela amiloglucosidase não está relacionada apenas com a origem botânica de amido, mas também com a fonte de enzimas.

Segundo GREENWELL et al, citado por WILLIAMSON et al, 1992, a ação da glucoamilase I sobre grânulos de amido de trigo é dependente da superfície proteica. Na presença de proteínas na superfície dos grânulos, a glucoamilase I formava galerias sobre a superfície do grânulo. Na ausência das proteínas superficiais, contudo, a glucoamilase I hidrolisava apenas a superfície do grânulo, resultando em estruturas maiores, porém intactas e sem galerias esféricas.

### 2.2.3. Ação da $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase

UEDA et al (1974) tratando amido de milho granular com glucoamilase I e/ou  $\alpha$ -amilase salivar propuseram que a ação de apenas glucoamilase I não era extensiva. Porém, com a adição de  $\alpha$ -amilase à glucoamilase I, a digestão do amido tornava-se muito mais efetiva. Misturas contendo  $\alpha$ -amilase e glucoamilase foram mais efetivas quanto à hidrólise do amido que aquelas contendo isoamilase e glucoamilase. Baseado nestes resultados, os autores sugeriram que a existência de amilose no amido pode impedir a digestão do grânulo pela glucoamilase sozinha, enquanto a presença de  $\alpha$ -amilase propicia a hidrólise deste componente evitando a inibição da glucoamilase.

UEDA & KANO (1975) estudaram o efeito sinérgico entre  $\alpha$ -amilase e glucoamilase I e II na hidrólise do amido granular de milho ceroso. A  $\alpha$ -amilase proporcionou uma hidrólise extensiva do grânulo tanto na presença de glucoamilase I, como de glucoamilase

II, confirmando trabalho de UEDA et al (1974).

Segundo UEDA et al (1974), UEDA & KANO (1975) e UEDA & OHBA (1976), a variação na extensão da hidrólise dos diferentes amidos granulares de milho pela glucoamilase é devida a inibição da enzima pela amilose.

FRANCO & CIACCO (1987) e FRANCO et al (1988) trataram amido de milho e fécula de mandioca com  $\alpha$ -amilase e/ou amiloglicosidase e observaram um grande efeito sinérgico na hidrólise desses amidos quando as enzimas eram utilizadas em conjunto. FRANCO et al (1988) observaram, através de microscopia eletrônica de varredura, que a ação das duas enzimas sobre os grânulos de fécula de mandioca frequentemente exibia uma exocorrosão produzindo poucos canais de corrosão radiais em direção ao interior do grânulo. Por outro lado, para o amido de milho, os canais cilíndricos profundos eram tão numerosos que eles se aparentavam a um "queijo suíço". Os grânulos quebrados apresentavam a estrutura lamelar paralela típica. Estes autores admitem que possa haver maior complexidade na organização dos planos cristalinos.

Segundo ABE et al (1988), a amiloglicosidase desempenha o principal papel na hidrólise do amido cru e a  $\alpha$ -amilase tem um grande efeito sinérgico quando associadas. Assim, quando se estuda o modo de ação da enzima, deve-se levar em consideração a pureza da mesma, porque a contaminação com uma pequena quantidade de  $\alpha$ -amilase pode mascarar os resultados obtidos.

FRANCO & CIACCO (1992), em estudo sobre a relação existente entre a suscetibilidade enzimática e o tamanho dos grânulos de amido de milho e fécula de mandioca, trataram os grânulos de diversos tamanhos com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase. Os autores observaram uma diferença básica no modo de ação das enzimas sobre os grânulos grandes e pequenos. O ataque enzimático sobre os grânulos grandes foi caracterizado por uma considerável corrosão, principalmente no sentido radial. Para os grânulos pequenos, a ação das enzimas ocorreu na superfície dos grânulos e foi caracterizada por uma erosão com solubilização dos mesmos.

### 2.3. Influência do tratamento térmico com baixa umidade sobre o grânulo de amido

Segundo OSMANN (1967), o aquecimento do amido em baixa umidade para evitar sua gelatinização, resulta em mudanças marcantes nas propriedades dos mesmos, principalmente para aqueles obtidos de raízes e tubérculos.

SAIR & FETZER, citados por FRENCH, 1984, mostraram que o tratamento térmico com baixa umidade em amidos altera diversas propriedades, especialmente temperatura de gelatinização, capacidade de sorção e características de pasta, e no caso da fécula de batata, o padrão de difração de raios X muda de B para A.

Segundo FRENCH (1984), o tratamento provavelmente causa um rearranjo ou "annealing" e maior grau de associação das cadeias de

amido. A conversão do padrão de difração de raios X de B para A, na fécula de batata indica que os cristais se fundiram e recristalizaram ou, no mínimo, sofreram significativa reorientação. Parece que o processo de "annealing" à 50,0°C permite um realinhamento das cadeias na fase amorfa e alguma cristalização adicional do amido. No tratamento térmico com baixa umidade, os cristais se fundem, pelo menos em parte, e durante o resfriamento assumem uma forma mais estável e mais altamente associada que no grânulo natural.

KULP & LORENZ (1981) trataram amostras de amidos de trigo e batata, ajustando suas umidades para 18, 21, 24 e 27%, respectivamente, e aquecendo-as à 100,0°C por 16 horas. Após tratamento, todas as amostras foram secas até níveis de umidade constante, próximas a 7,5%, e suas propriedades físico-químicas foram estudadas. Os autores encontraram que para ambos amidos tratados, a faixa de temperatura de gelatinização foi superior àquela dos amidos não tratados. A capacidade de absorção de água e a suscetibilidade enzimática dos amidos tratados aumentou. O poder de inchamento diminuiu, principalmente para os amidos com 27% de umidade. A solubilidade do amido de trigo aumentou, mas o de batata diminuiu. Em geral, as propriedades das féculas de tubérculos aproximaram-se daquelas do amido de trigo. Para ambos os materiais, quanto maior o nível de umidade das amostras, tornavam-se mais suscetíveis à ação de amilases, mas a fécula de batata ainda era mais resistente quando comparada ao amido de trigo. Segundo os autores, estes resultados e a redução no poder de inchamento sugeriram que o tratamento térmico ocasionou alterações que provavelmente ocorreram nas regiões amorfas dos grânulos, mais acessíveis à amilólise. O tratamento não alterou a aparên-

cia dos grânulos de amido. Nenhuma mudança no tamanho ou forma e nenhuma fissura ou distorção foi observada no microscópio eletrônico de varredura, e os grânulos pareciam perfeitamente normais. Estes resultados indicaram que ocorreram mudanças na ordem física e na estrutura cristalina dentro dos grânulos de amido, e que certo grau de degradação do amido aconteceu quando os níveis de umidade das amostras aumentavam.

LORENZ & KULP (1982) submeteram os amidos de cevada, triticale, painço, araruta e mandioca ao tratamento térmico com baixa umidade. Eles relataram que o tratamento produziu restrições nos poderes de inchamento de todos os amidos testados; as solubilidades dos amidos de cereais aumentaram, enquanto as solubilidades das féculas de tubérculos diminuíram a 90,0°C, indicando diferentes tipos de reorganização dos amidos de cereais e féculas de tubérculos. Segundo os autores, as diferenças de solubilidade entre os amidos de cereais e de féculas de raízes e tubérculos devem-se às diferenças no estado físico da amilose, que nos amidos de cereais se encontra complexada com os lipídeos e apresenta a conformação helicoidal. As féculas de raízes e tubérculos, com teores de lipídeos muito baixos, a amilose encontra-se no estado amorfo, sendo convertida à conformação helicoidal menos solúvel, pelo aquecimento.

Ainda segundo LORENZ & KULP (1982), a suscetibilidade enzimática e a capacidade de absorção de água foram aumentadas pelo tratamento térmico. Estudos de difração de raios X mostraram diminuição no grau de cristalinidade dos amidos de cereais e mudanças nos padrões C para A de féculas de tubérculos após tratamento. O au-



mento nas suscetibilidades enzimáticas indicava formação de áreas acessíveis às enzimas, e reorientação dos polímeros de amido nos grânulos, além de certo grau de degradação dos mesmos, que os tornavam mais suscetíveis à amilólise.

ZOBEL (1988a) sugeriu que tratamentos térmicos com baixa umidade podem introduzir a estrutura V em amidos granulares de cereais. O padrão de difração de raios X tipo V é tipicamente mostrado pela fração de amilose como resultado da formação de complexos. Segundo o autor, para os amidos de trigo, milho e arroz, os ácidos graxos e fosfolipídeos podem complexar com a fração amilose favorecendo, sob tratamento, a formação da estrutura V.

ZOBEL et al (1988) submeteu fécula de batata e amido de milho ao tratamento térmico com baixa umidade e observaram que houve mudanças no padrão de difração de raios X de B para C e B para A para a fécula de batata, sendo que a transformação de B para A ocorria a maiores níveis de umidade. Para o amido de milho normal houve mudança do padrão de A para A+V, e para o amido de milho ceroso não houve mudança no padrão. Nesses experimentos as amostras aquecidas mostraram alguma perda da intensidade nos picos de definição, e os autores acreditam que as temperaturas e umidades utilizadas (125-148°C) e (15-22% de umidade) para fécula de batata, (175°C) e (10-16% de umidade) para o amido de milho, não foram capazes de fundir qualquer das amostras, concluindo que a mudança de estrutura da fécula de batata, de B para A ou de B para C ocorreu mais devido ao estado sólido do que devido ao processo de fusão e recristalização dos grânulos de amido. Os padrões de difração de raios X observados

para o amido de milho normal (A+V) levaram os autores a concluir que como os grânulos permaneceram intactos, as condições eram providenciais para ocorrer a formação da estrutura V.

THEANDE & WESTERLUND (1987) tratando amido de farinha de trigo de baixa extração em forno elétrico à 180,0°C durante 1, 2 e 4 horas encontraram que com este tratamento, 1-6 anidrossacarídeos eram formados do amido, principalmente sob condições de baixa umidade. Os compostos 1-6 anidro são reativos e formam com o amido e seus produtos de fragmentação, novas glucanas ramificadas que conferem resistência parcial às enzimas amilolíticas.

SILJESTROM et al (1989) submeteram o amido de trigo ao tratamento térmico em forno elétrico (180,0°C), com baixa umidade, durante 4 horas. As amostras de amido de trigo eram aquecidas com e sem adição de levoglucosana (1,6 anidro- $\beta$ -D-glucopiranosose), um composto altamente ativo em reações de transglicosidação. Os autores observaram que as modificações induzidas pelo tratamento térmico reduziram significativamente a digestibilidade do amido "in vitro". Através de caracterização química por espectroscopia por RMN-H e análises de metilação, os autores confirmaram a formação de novas ligações não amiláceas principalmente  $\beta$ (1-4) e  $\beta$ (1-6), além da formação de 1-6 anidrossacarídeos. Segundo os autores, é provável que a introdução dessas novas ligações reduza o acesso enzimático nas diversas ligações  $\alpha$ -glucosídicas adjacentes.

STUTE (1992) mostrou as principais diferenças entre o tratamento térmico com baixa umidade e o processo de "annealing" utili-

zando para isso, a fécula de batata. Eles observaram que ambos tratamentos causam uma modificação física dos amidos sem qualquer gelatinização ou qualquer outra danificação dos grânulos de amido em relação ao tamanho, forma ou birrefringência. Com relação as propriedades de gelatinização e viscosidade, modificações quase idênticas podiam ser obtidas com ambos tratamentos. No entanto, ambos tratamentos causavam alterações completamente diferentes da estrutura interna dos grânulos. Da interpretação das viscosidade Brabender, isotermas de sorção, curvas de DSC e diagramas de raios X, pode ser confirmado que o tratamento térmico com baixa umidade sempre provoca, para o amido de batata, uma alteração de estrutura de um tipo B em direção a um tipo A, enquanto no processo de "annealing" as alterações são explicadas pela modificação das forças ligantes entre os cristais e a matrix amorfa.

### III. MATERIAIS E METODOS

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. Matérias primas

As matérias primas utilizadas nas diferentes experiências deste trabalho foram as sementes de milho duro IAC1 amarelo; milho mole B670 híbrido duplo branco, e milho ceroso amarelo, fornecidos pelo Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), Meirelles Insumos Agropecuários Ltda e Refinações de Milho Brasil, respectivamente.

As enzimas puras utilizadas foram  $\alpha$ -amilase bacteriana (A6380), Amiloglucosidase fúngica (A7420),  $\beta$ -amilase de batata doce (A7005) e Pululanase de *Enterobacter aerogenes* (P5420). Todas as enzimas foram fornecidas pela SIGMA CHEMICAL COMPANY (St. Louis, USA).

##### 3.1.2. Reagentes químicos

Todos os reagentes químicos utilizados no presente estudo foram de qualidade p.a. (para análise) e de diferentes procedências: Merck, Sigma, Baker, Ecibra e outros.

##### 3.1.3. Aparelhos e equipamentos

Além do material e utensílios comumente utilizados em laboratório como pipetas, béquers, erlenmeyers, balanças, estufas, geladeiras e outros, foram utilizados, para desenvolvimento deste trabalho, os seguintes equipamentos:

- . Autoclave vertical - mod. 103 - Fabbe Ltda
- . Extrator de gordura "Soxhlet"
- . Conjunto para determinação de proteínas tipo Kjeldahl mod. TE036E - valvulado - Tecnal
- . Mufla com controle de temperatura - Farlabo Ltda
- . Viscoamilógrafo - mod.801300 - Brabender
- . Banho maria tipo Dubnoff - mod. TE- 093 - Tecnal
- . Potenciômetro - mod. E512 - Metrohm Herisan
- . Centrífuga Eccelsa 3 - mod. 204 - NR, Fanem Ltda
- . Centrífuga refrigerada - mod.FR22 - Fanem
- . Espectrofotômetro digital - mod. B34211 - Micronal
- . Difractômetro de raio-X com unidade SHIMADZU - mod XD3A
- . Fotomicroscópio óptico - mod. Jenaval - Jena
- . Microcópico eletrônico de varredura - mod. TS 30 - Jeol
- . Bomba peristáltica - mod. BP - 100 - Incibrás
- . Coletor de frações - mod. Fracsil 100 - Incibrás

### 3.2. METODOS

#### 3.2.1. Extração do amido de milho de diferentes variedades

O amido de milho foi extraído segundo a metodologia descrita por WATSON (1964) com algumas modificações, conforme descrição a seguir.

Uma amostra de 300g de milho em casca foi colocada para macerar em aproximadamente 750ml de uma solução aquosa de bissulfito de sódio 0,16% (p/v), à 50,0°C durante 48 horas, sem agitação.

Após este período, a água de maceração foi drenada e o milho foi misturado com água destilada, na proporção 1:1, e moído em um liquidificador, durante 3 minutos. O material moído foi passado através de peneira 80 mesh e o resíduo lavado com água destilada até estar livre de amido. A dispersão amido-glúten que passou através da peneira 80 mesh foi então centrifugado à 4500 rpm por 10 min. e o sobrenadante descartado. O glúten depositado na superfície do amido foi raspado e o amido suspenso em solução aquosa de NaOH 0,1% (p/v) e novamente centrifugado. O glúten depositado na superfície do amido foi novamente raspado. O amido restante sofreu diversas lavagens com água destilada até voltar a seu pH normal (~6,0). Após a última centrifugação, o amido foi colocado em estufa com circulação de ar à 45,0°C por 24 horas. O amido seco foi pulverizado em almofariz e passado através de peneira 170 mesh.

### 3.2.2. Características das matérias primas

#### 3.2.2.1. Umidade

As determinações de umidade dos amidos de diversas variedades de milho foram realizadas segundo o método N° 44-15A dos Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (1976).

#### 3.2.2.2. Proteína

O conteúdo de proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl N° 46-20 dos Approved Methods of the AACC, (1976). O fa-

tor 6,25 foi utilizado para a conversão do nitrogênio em proteína bruta.

#### 3.2.2.3. Gordura

O teor de gordura foi determinado após extração em Soxhlet com metanol, P.E. 64,6°C, e de acordo com o método Nº 30-20 dos Approved Methods of the AACC, (1976).

#### 3.2.2.4. Cinzas

O conteúdo de cinzas foi determinado após calcinação em mufla por 4 horas à 540,0°C, segundo o método Nº 8-17 dos Approved Methods of the AACC, (1976).

#### 3.2.2.5. Fibra

O teor de fibras foi determinado pelo método de VAN DE KAMMER e VAN GINKEL (1952).

#### 3.2.2.6. Propriedades de pasta

As propriedades de pasta foram determinadas com viscoamirógrafo Brabender, com cabeçote regulado para sensibilidade de 700 cm.g.f. Uma quantidade de 35 g (b.s.) de amido de milho mole ou duro foi misturada à 450 ml de água destilada. Para o amido de milho ceroso, 25 g (b.s.) foi misturada à 450 ml de água. A seguir, a suspensão foi aquecida a uma taxa de 1,5°C/min à partir de 25,0°C até

temperatura de 95,0°C, sendo, posteriormente mantida nesta temperatura durante 20 minutos. Em seguida, a pasta foi resfriada gradativamente (1,5°C/min) até a temperatura de 50,0°C. Durante todo o procedimento a pasta foi agitada a 75 rpm. Dos amilogramas obtidos foram determinados os seguintes valores:

.TEMPERATURA DE PASTA: temperatura em °C na qual a viscosidade da pasta aumenta de 0 a 10 unidades amilográficas (U.A.)

.VISCOSIDADE MÁXIMA: valor máximo da viscosidade da pasta em U.A. na etapa de aquecimento.

.TEMPERATURA DE VISCOSIDADE MÁXIMA: temperatura em °C correspondente ao ponto mais alto da curva do amilograma.

.VISCOSIDADE INICIAL A 95,0°C: valor da viscosidade da pasta em U.A., ao se atingir 95,0°C.

.VISCOSIDADE FINAL A 95,0°C: valor da viscosidade da pasta em U.A., após 20 minutos à temperatura de 95,0°C..

.VISCOSIDADE A 50,0°C : valor da viscosidade da pasta em U.A. no final do período de resfriamento.

### 3.2.3. Tratamento físico dos amidos de milho

#### 3.2.3.1. Condicionamento das amostras nas diferentes umidades para posterior tratamento térmico

Para condicionamento das amostras nas umidades de 18, 21, 24 e 27%, as umidades dos amidos foram determinadas como descrito em 3.2.2.1. Para 300 g de amido calculou-se a quantidade de água necessária para atingir a umidade desejada através da seguinte fórmula:



$$\text{H}_2\text{O a ser adicionada (ml)} = \left[ \frac{100 - \text{umidade da amostra}}{100 - \text{umidade desejada}} - 1 \right] \times \text{qt. amost.}$$

A quantidade de água calculada foi adicionada aos poucos à amostra de amido e misturada em misturador Brabender com velocidade de 100 rpm durante 15 minutos. Após a mistura, o amido foi colocado em sacos plásticos e deixado descansar por 24 horas para melhor uniformização da umidade desejada.

### 3.2.3.2. Tratamento térmico a 100°C/16 horas com baixa umidade

Usou-se para tal tratamento o método de KULP e LORENZ (1981). Amostras de amido de milho foram condicionadas à 18, 21, 24 e 27% de umidade conforme descrito em 2.4.1. e seladas em latas. As latas foram aquecidas em estufa à 100°C por 16 horas. Após este período, as latas foram retiradas da estufa, abertas e os amidos secos em estufa com circulação de ar à 45,0°C até umidade constante.

### 3.2.4. Atividade das enzimas amilolíticas utilizadas na digestão dos amidos

#### 3.2.4.1. Atividade da $\alpha$ -amilase bacteriana

A determinação da atividade da alfa-amilase foi baseada na medida do tempo requerido para hidrolisar o amido a um tamanho definido de dextrina. Este tamanho foi indicado pela cor do complexo dextrina-iodo, em relação a cor de uma solução padrão constituída de 25,00 g de cloreto de cobalto hexaidratado, 3,84 g de dicromato de potássio em 100 ml de ácido clorídrico 0,01N (SANDSTED et al, 1939).

Uma alíquota de 1 ml de solução aquosa da enzima foi adicionada a 20 ml de uma solução de amido solúvel à 2% (p/v) em tampão acetato 0,1 M e pH 6,0. O volume foi completado à 30 ml com água destilada e a solução deixada em banho-maria à 30,0°C. Periodicamente, uma alíquota de 1 ml da solução foi retirada e adicionada à 5 ml de uma solução diluída de iodo-KI (11 g de KI e 5,5 g de I<sub>2</sub> em 500 ml de água). Este procedimento foi repetido até obtenção de uma coloração igual à cor da solução padrão de CoCl<sub>2</sub> e K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> em HCl 0,01 N. A atividade da alfa-amilase em SKB foi calculada pela fórmula desenvolvida por SANDSTED et al, (1939).

$$\text{UNIDADES SKB} = \frac{m \cdot t}{g \cdot t_c} \quad \text{onde:}$$

m: peso do amido em gramas

t: 60 minutos

g: gramas de enzima/ ml

t<sub>c</sub>: tempo de incubação em minutos

#### 3.2.4.2. Atividade da amiloglucosidase fúngica

A atividade da amiloglucosidase fúngica foi determinada segundo UEDA et al (1980), com modificações.

A 2,5 ml de solução de amido solúvel fervido 1%(p/v), adicionou-se 0,5 ml de tampão acetato 0,05M pH 4,5; 0,5 ml de água deionizada e 0,5 ml de solução de enzima que resultou em um volume final de 4,0 ml. A solução foi incubada à 55,0°C durante 10 minutos. Após este período, 1 ml da solução foi retirada e os açúcares redutores produzidos determinados pelo método do DNS (3,5-ácido dinitro-

salicilico), como proposto por MILLER (1959).

Uma unidade de atividade da amiloglucosidase foi definida como aquela quantidade de enzima que produziu 1 mg de glicose/ ml da mistura de reação sob as condições descritas.

### 3.2.5. Hidrólise enzimática dos amidos de milho naturais e tratados termicamente com baixa umidade

A digestão dos amidos naturais e tratados termicamente com baixa umidade foi efetuada segundo o método de LEACH e SCHOCH (1961) com modificações

Amidos de milho (4% p/v) foram suspensos em solução 0,05M tampão fosfato, pH 6,0 contendo 21 unidades SKB/g de amido de  $\alpha$ -amilase bacteriana e 10 unidades de amiloglucosidase fúngica/g de amido. Timerosol, na concentração de 1:10000 (p/v) e algumas gotas de tolueno foram adicionadas para evitar crescimento microbiano. As dispersões foram incubadas em banho maria com agitação por 24 horas à 37,0°C. A extensão da hidrólise foi expressa em porcentagem de hidrólise e em quantidade de açúcares redutores presentes no sobrenadante. Amostras do sobrenadante foram retiradas após 2,30; 5,00; 7,30; 10,00 e 24,00 horas de incubação para determinação dos açúcares redutores. Decorridos as 24 horas, as suspensões foram retiradas do banho maria, acidificadas à pH 3,0 com HCl 0,1N e agitadas por 15 minutos para inativação das enzimas, neutralizadas com NaOH 0,1N e centrifugadas à 2000 rpm por 10 minutos. O teor de açúcares redutores foi calculado segundo o método do DNS de MILLER (1959), tendo a glucose como padrão. Os resíduos obtidos após centrifugação foram lavados com água destilada, filtrados em funil de Buchner com papel

de filtro Watman nº 1 e secos em estufa com circulação de ar a 40,0°C. Após secagem, o peso e o teor de umidade dos resíduos foram determinados e a porcentagem de hidrólise foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de Hidrólise} = \frac{\text{Peso do amido inicial (g)} - \text{Peso do amido após hidrólise (g)}}{\text{Peso do amido inicial (g)}} \times 100$$

### 3.2.6. Características dos amidos tratados termicamente e dos resíduos da hidrólise enzimática

#### 3.2.6.1. Propriedades de pasta

As propriedades de pasta dos amidos de milho tratados termicamente foram determinadas como descrito em 3.2.2.6.

#### 3.2.6.2. Índice de absorção de água (IAA)

O índice de absorção de água foi determinado segundo o método descrito por LINKO et al (1980).

#### 3.2.6.3. Determinação da cristalinidade por raios X

Amostras de amido natural e tratadas termica e enzimaticamente foram utilizadas para determinação da cristalinidade por raios X. A umidade dos amidos foi de  $12\% \pm 0.3$ . Os difractogramas de raios X foram feitos usando radiação de Cu linha K,  $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$  (monocroma-

dor de LiF), sendo a velocidade de varredura de 2<sup>o</sup> por minuto, em condições de trabalho de 40Kv e 20mA.

#### 3.2.6.4. Análises microscópicas

##### 3.2.6.4.1. Microscopia óptica

As amostras de amido observadas ao fotomicroscópio óptico (marca Jena), sob luz transmitida ou polarizada, foram montadas individualmente sobre lâminas histológicas de acordo com o método de MACMASTER (1964). Para obter melhor espalhamento e minimizar efeitos de difração nas bordas dos grânulos, colocou-se pequena quantidade de amido sobre uma gota de solução água e glicerina (1:1) e recobriu-se cada amostra com laminula. Fotografias foram feitas nos melhores campos e em diversos aumentos usando-se filme preto e branco KODAK (tipo PX135). Os filmes foram revelados e copiados segundo processos de rotina.

##### 3.2.6.4.2. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de amido, após desidratação à vácuo, foram montadas sobre suporte metálico. Pequena quantidade de amido de cada amostra foi aspergida sobre fita adesiva de dupla face e colada sobre os citados suportes. Para conferir condutividade ao amido, as amostras foram recobertas com ouro em metalizador à vácuo. Quando determinadas amostras deslocavam-se excessivamente sob o feixe de eletrons durante a observação refaziam-se as amostras, submetendo os grânulos de amido, envoltos em envelopes de papel, à secagem em pon-

to crítico de CO<sub>2</sub>, após o que, novamente pulverizados sobre a fita adesiva, colocada sobre suporte e metalizadas em ouro. As observações ao microscópio eletrônico de varredura foram efetuadas em aumentos de 100 à 14.000 vezes e fotografias foram feitas nos melhores campos, usando-se filme branco e preto Kodak (tipo VP<sub>20</sub>). Os filmes foram revelados e copiados segundo processos de rotina.

### 3.2.6.5. Análise da estrutura dos amidos através da hidrólise enzimática com pululanase e $\beta$ -amilase e cromatografia de permeação em gel Sephadex G-50

#### 3.2.6.5.1. Purificação da amilopectina à partir do amido de milho ceroso, para utilização como padrão

A purificação da amilopectina foi realizada segundo metodologia descrita por SCHOCH (1957).

Em um frasco de gargalo triplo foram colocados 50 g de amido de milho ceroso, 2 litros de água e 100 ml de ciclohexanol. O sistema foi tamponado a pH 6,1 a 6,3 pela adição de 1,64 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,72 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. A mistura fria foi agitada por 5 a 10 minutos para suspender o amido e dissolver o ciclohexanol. Encaixou-se um condensador de refluxo em um dos gargalos e um agitador de hélice de alta velocidade em outro. Uma vedação adequada foi providenciada. O frasco foi então colocado em um banho de água fervente com agitação durante o período de aquecimento. A mistura aquecida ao ponto de ebulição foi levemente refluxada durante 1,5 hora. A solução quente foi centrifugada à 3.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, tratado com igual volume de metanol, e a mistura refrige-

rada por uma noite. A massa precipitada pelo metanol foi desidratada, moída por 2 a 3 minutos em liquidificador com nova quantidade de metanol, filtrada em funil de Buchner e seca à 45,0°C em estufa com circulação de ar. A amostra de amilopectina purificada foi utilizada como padrão para as análises de cromatografia de permeação em gel descritas no item 3.2.6.5.3.

#### 3.2.6.5.2. Hidrólise enzimática dos amidos naturais e daqueles previamente submetidos a tratamento térmico e digestão com $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase

Determinou-se a quantidade de enzima a ser utilizada pela atividade registrada nos rótulos dos frascos das enzimas. Assim, diluições adequadas em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,2 foram preparadas de modo que cada ml da solução de pululanase correspondesse a 1 unidade da enzima. Para a  $\beta$ -amilase, cada ml da solução de enzima correspondia à 110 unidades da enzima. Para a diluição da  $\beta$ -amilase utilizou-se ainda soroalbumina bovina e cloridrato de cisteína para estabilização da enzima.

##### 3.2.6.5.2.1. Desramificação com pululanase ( $P_1$ )

A 10 ml de uma solução 2% de amido em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,2, foram adicionados 4 unidades de pululanase e 6 ml de tampão. A mistura de reação foi incubada à 30,0°C. A digestão encerrou-se, quando o teor de açúcares redutores, determinados através do método de SOMOGY-NELSON (1945), tendo glucose como padrão, tornou-se constante (24 horas). A mistura de reação foi aquecida à

ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.

#### 3.2.6.5.2.2. Preparo das $\beta$ -limite dextrinas ( $\beta_1$ )

A 20 ml de uma solução 2% de amido em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,2, foram adicionados 440 unidades de  $\beta$ -amilase e 16 ml de tampão. A mistura de reação foi incubada à 30,0°C e a digestão encerrou-se quando o teor de açúcares redutores tornou-se constante (24 horas). A mistura de reação foi aquecida à ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.

#### 3.2.6.5.2.3. Desramificação da $\beta$ -limite dextrina ( $\beta_1P_1$ )

A 20 ml da solução de  $\beta$ -limite dextrina preparada em 3.2.6.5.2.2. adicionou-se 4 unidades de pululanase e 1ml de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,2. A mistura de reação foi incubada à 30,0°C até que o teor de açúcares redutores tornou-se constante (24 horas). A mistura de reação foi aquecida à ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.

#### 3.2.6.5.2.4. Ação da $\beta$ -amilase sobre $\beta$ -limite dextrina desramificada ( $\beta_1P_1\beta_2$ )

A 10 ml da solução de  $\beta$ -limite dextrina desramificada preparada em 3.2.6.5.2.3., adicionou-se 110 unidades de  $\beta$ -amilase. A mistura de reação foi incubada à 30,0°C até que o teor de açúcares redutores tornou-se constante (24 horas). A mistura de reação foi aquecida à ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.



### 3.2.6.5.2.5. Ação da $\beta$ -amilase sobre a amostra de amido desramificada ( $P_{1\beta_1}$ )

A 10 ml de amostra de amido desramificada preparada em 3.2.6.5.2.1., adicionou-se 110 unidades de  $\beta$ -amilase. A mistura de reação foi incubada à 30,0°C até que o teor de açúcares redutores tornou-se constante (24 horas). A mistura de reação foi aquecida à ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.

### 3.2.6.5.3. Análises cromatográficas

As análises cromatográficas em permeação de gel foram realizadas segundo metodologia descrita por ROBIN et al (1974) com algumas modificações.

Soluções dos amidos naturais e tratados termicamente com baixa umidade ao nível de 27% submetidas anteriormente à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase foram cromatografadas antes e após ações enzimáticas com pululanase e/ou  $\beta$ -amilase em coluna de gel Sephadex G-50 (2,5 x 100 cm) à temperatura ambiente como ilustrado na FIG 5. A eluição foi realizada em fluxo descendente usando tampão fosfato 10mM, pH 7,0, contendo 0,02% de azida de sódio para prevenir crescimento microbiano. A coluna foi calibrada com amilopectina de milho ceroso, purificada segundo metodologia descrita em 3.2.6.5.1. e desramificada com pululanase como em 3.2.6.5.2.1., para obtenção do grau de polimerização (DP) que foi calculado como sendo razão de carboidratos totais/carboidratos redutores, das frações à vários volumes de eluição.

Para cromatografia das soluções de amostras antes de qualquer ação enzimática ser realizada, alíquotas de 4 ml de solução de polissacarídeo (contendo cerca de 10 mg) foram introduzidas na parte superior da coluna e coletadas na parte de baixo com a utilização de uma bomba peristáltica que permitiu um fluxo constante de 5 ml a cada 15 minutos.

Para cromatografia das amostras submetidas à ação da pululanase e/ou  $\beta$ -amilase, alíquotas de 4 ml de polissacarídeo (contendo cerca de 40 mg) foram introduzidas na coluna e as frações coletadas como descrito acima.

Nas frações coletadas, determinou-se o teor de açúcares totais através do método de fenol-sulfúrico de DUBOIS et al (1956) e os padrões de eluição obtidos representaram o peso de polissacarídeo expresso como mg de glicose por 100 mg de polissacarídeo recuperado versus volume de eluição. Assim, esses padrões puderam ser comparáveis, já que cada um correspondeu à 100 mg de polissacarídeo.

Para obtenção de medidas mais precisas do poder redutor nas cadeias mais longas da amilopectina desramificada, a quantidade de amilopectina desramificada aplicada à coluna foi aumentada para 80 mg.



## IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Extração dos amidos de diferentes variedades de milho

Os amidos de diferentes variedades de milho obtidos neste experimento apresentaram granulometria menor que 80  $\mu\text{m}$ , coloração branca e odor característico.

### 4.2. Características das matérias primas

#### 4.2.1. Composição centesimal

A composição centesimal dos diferentes amidos de milho é mostrada na Tabela 1. Os amidos apresentaram elevado grau de pureza, comparáveis aos encontrados na literatura, porém o amido de milho ceroso apresentou elevada porcentagem de gordura. De acordo com SWINKELS (1985), os amidos de cereais comuns (milho, trigo, arroz, sorgo) contém alta porcentagem de substâncias graxas (0,6 - 1,0%). Nos amidos de milho normal e ceroso estas substâncias são predominantemente ácidos graxos livres. Esses amidos contém também considerável quantidade de proteínas (0,25 - 0,50%). A quantidade de proteínas foi calculada como  $N \times 6,25$  e inclui proteínas de fato, peptídeos, aminoácidos, enzimas e ácidos nucleicos. O teor de cinzas, calculado como resíduo após ignição do amido à temperatura específica, é composto basicamente de cálcio, potássio, magnésio e sódio e varia de 0,05 - 0,1% para os amidos de milho. MITCHELL (1990) encontrou para os amidos de milho normal e ceroso, respectivamente, os seguintes valores em porcentagens: proteínas: 0,35, 0,25; gordura:

TABELA 1: Composição centesimal dos amidos de milho(a)

COMPONENTE	AMIDO MILHO MOLE <sup>b</sup>	AMIDO MILHO DURO <sup>b</sup>	AMIDO MILHO CEROSO <sup>b</sup>
PROTEINAS	0,31	0,30	0,19
GORDURAS	0,50	0,47	0,48
CARBOIDRATOS <sup>c</sup>	99,12	99,17	99,27
CINZAS	0,07	0,06	0,06
FIBRAS	0,06	0,04	0,06

a) resultados expressos em base seca

b) média de pelo menos duas determinações

c) calculado por diferença

0,55, 0,05; cinzas: 0,10, 0,10; e amido calculado por diferença: 99,0, 99,6.

#### 4.2.2. Propriedades de pasta

Os valores dos parâmetros definidos através das curvas amilográficas dos diferentes amidos naturais estão mostrados na Tabela 2. O viscoamilograma dos 3 amidos apresentados (Figura 6) foi típico aos encontrados na literatura (RASPER, 1980; SWINKELS, 1985).

A temperatura de pasta dos amidos de milho normal (mole e duro) foi superior àquela encontrada para o amido ceroso, enquanto o pico de viscosidade dos dois primeiros foi menor que o terceiro, mesmo com concentrações maiores de amido.

O aumento de viscosidade, em função da temperatura foi mais abrupto para a pasta de amido ceroso que para as de amido duro e mole. Este resultado indica que as forças que mantêm os grânulos de amido ceroso são mais homogêneas que aquelas que mantêm os outros amidos estudados. Por outro lado, a viscosidade final à 95,0<sup>o</sup> C foi menor para o amido ceroso, mesmo com maior viscosidade máxima, indicando que pastas com os grânulos desse amido são mais suscetíveis à ação mecânica.

Para SCHOCH & MAYWALD (1968), a viscosidade de pasta à quente depende do grau de inchamento dos grânulos e da resistência que os mesmos apresentam à fragmentação pelo atrito mecânico ou à dissolução pelo calor. Os grânulos de amido de milho ceroso tornaram-se bastante inchados, quando aquecidos, com conseqüente enfraquecimento das forças associativas, tornando-se frágeis perante o atrito mecânico. Este amido apresentou pico de viscosidade máxima

TABELA 2: Parâmetros viscoamilográficos dos amidos de milho

AMIDOS MILHO	TEMPER. PASTA (°C)	TEMPER. VIS.MAX. (°C)	VISCOS. MAX. (U.A.)	VISC.95 <sup>0</sup> IN-FINAL (U.A.)	VISCOS. 50°C
MOLE	69,5	86,5	680	570-520	>1000
DURO	71,0	85,0	640	560-560	>1000
CEROSO	67,0	74,5	780	390-260	280

a) concentração da dispersão de amido:duro e mole:7,78% (p/v)  
ceroso: 5,55% (p/v)

U.A.: Unidades Amilográficas

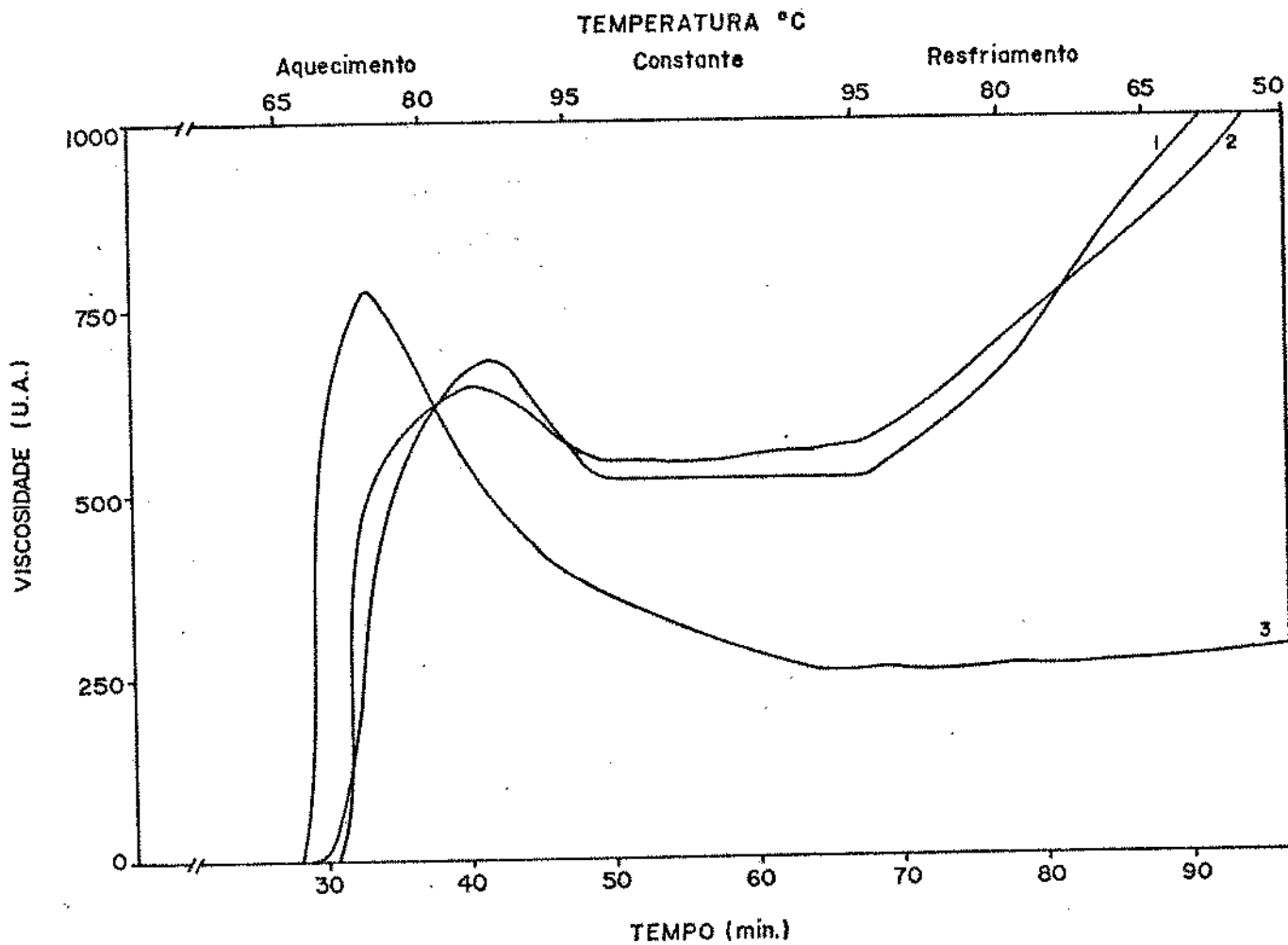


Figura 6: Amilogramas dos amidos de milho  
 1. amido de milho mole (7,78% p/v)  
 2. amido de milho duro (7,78% p/v)  
 3. amido de milho ceroso (5,55% p/v)



elevado, seguido de drástica queda durante o cozimento. Já, para os amidos de milho normal (mole e duro), o pico de viscosidade máxima foi menor ocorrendo ligeira queda durante o cozimento. Para ZOBEL(1984), a formação do complexo entre parte da amilose e os lipídios presentes no amido de milho normal é responsável pelo menor inchamento dos grânulos e o fortalecimento das forças de associação, o que se reflete na estabilidade de pasta desses amidos durante o cozimento.

No período de resfriamento, os amidos de milho normal retrogradaram-se mais facilmente que o amido de milho ceroso. SWINKELS (1985), relatou que a maior retrogradação dos amidos de cereais normais pode ser causada pelo alto teor de amilose e pelo seu tamanho molecular relativamente baixo. Este comportamento é largamente determinado pela afinidade de grupos hidroxil em uma molécula de amilose por outros de outra molécula. As moléculas de amilose sendo orientadas casualmente podem orientar-se de modo paralelo facilitando essa afinidade dos grupos hidroxil e formando agregados de baixa solubilidade que aumentam a viscosidade da pasta à frio (LEELAVATHI & INDRANI, 1987).

#### 4.3. Tratamento físico dos amidos de milho

##### 4.3.1. Tratamento térmico (100°C/16 horas) com baixa umidade

Os diferentes amidos de milho tratados segundo o método de KULP & LORENZ (1981), apresentaram-se com aparência normal, sendo que os que foram tratados com níveis maiores de umidade (24 e 27%) ficaram levemente empedrados. De acordo com CAESAR (1950), dependendo

da temperatura e do período de aquecimento empregado no tratamento uma série de produtos podem ser formados. Alguns, num extremo, pouco diferem do amido natural; no outro extremo, ficam aqueles de coloração muito escura e cheiro de açúcar caramelizado.

#### 4.3.1.1. Propriedades de pasta dos amidos tratados termicamente com baixa umidade

As figuras 7, 8 e 9 mostram os amilogramas dos diferentes amidos de milho submetidos ao tratamento térmico a diferentes níveis de umidade. O tratamento afetou os três tipos de amidos sendo que os amidos de milho normal sofreram mudanças mais pronunciadas que o amido ceroso. Além disso, à medida que o nível de umidade a que foram submetidos os amidos antes do tratamento térmico aumentava, mais drásticas eram as mudanças ocorridas nos amilogramas. Assim, houve um aumento significativo da temperatura de pasta para todos os amidos, à medida que o nível de umidade aumentou, da mesma maneira que aumentou também a temperatura de viscosidade máxima. A viscosidade máxima diminuiu bastante, principalmente para os amidos normais (mole e duro), e a viscosidade à 50,0°C apresentou leve decréscimo.

A taxa de decréscimo da viscosidade máxima em função da umidade foi bem maior para os amidos normais que para o amido ceroso mostrando que os amidos normais foram mais suscetíveis ao tratamento.

Os amidos de milho normal (principalmente o amido duro) tratados termicamente em níveis de umidade de 24 e 27%, foram bastante resistentes ao inchamento. O tratamento parece ter provocado um rearranjo das forças internas reduzindo marcadamente o in-

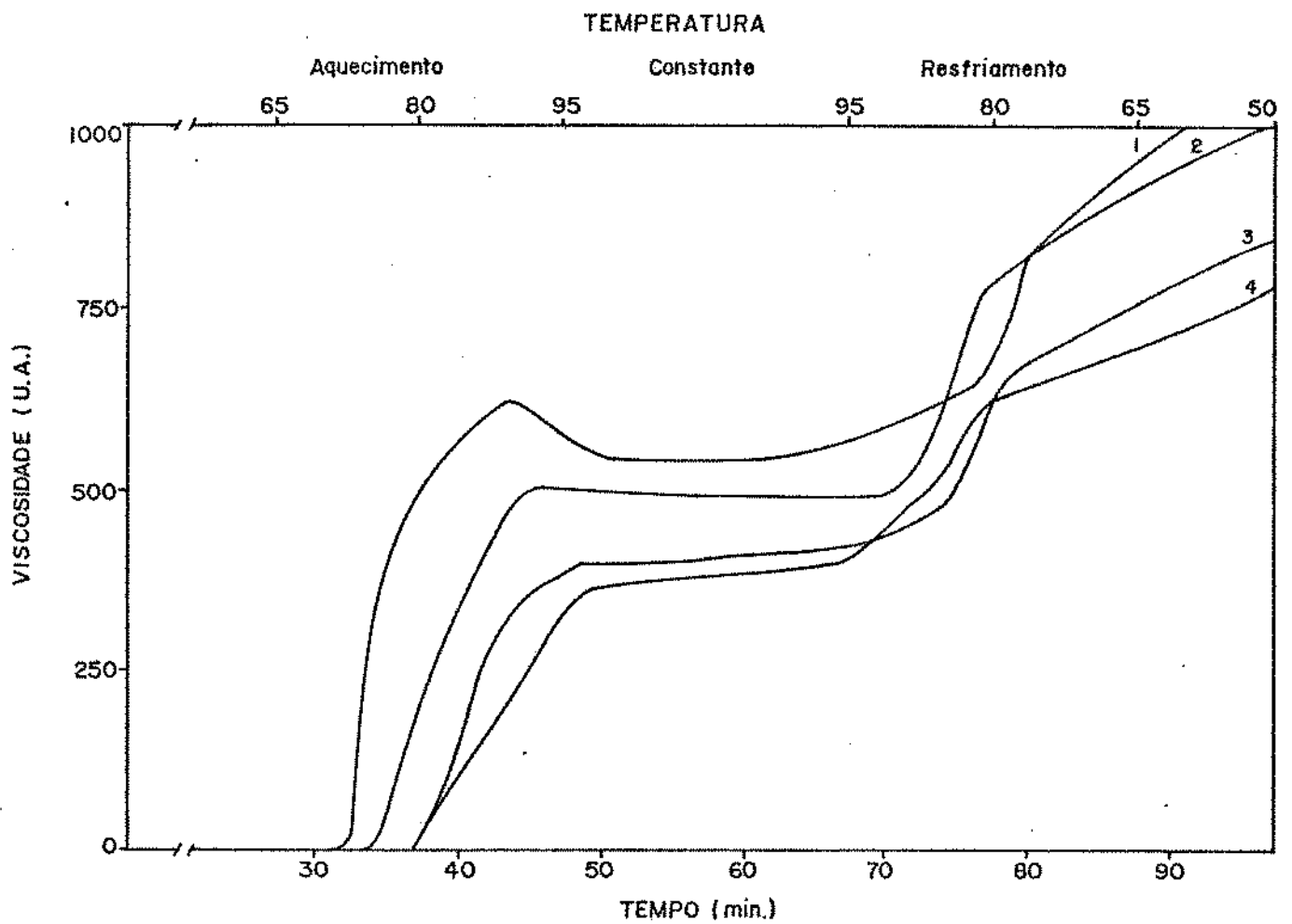


Figura 7: Amilogramas do amido de milho mole tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade

1. 18% de umidade
2. 21% de umidade
3. 24% de umidade
4. 27% de umidade

concentração das amostras: 7,78% p/v

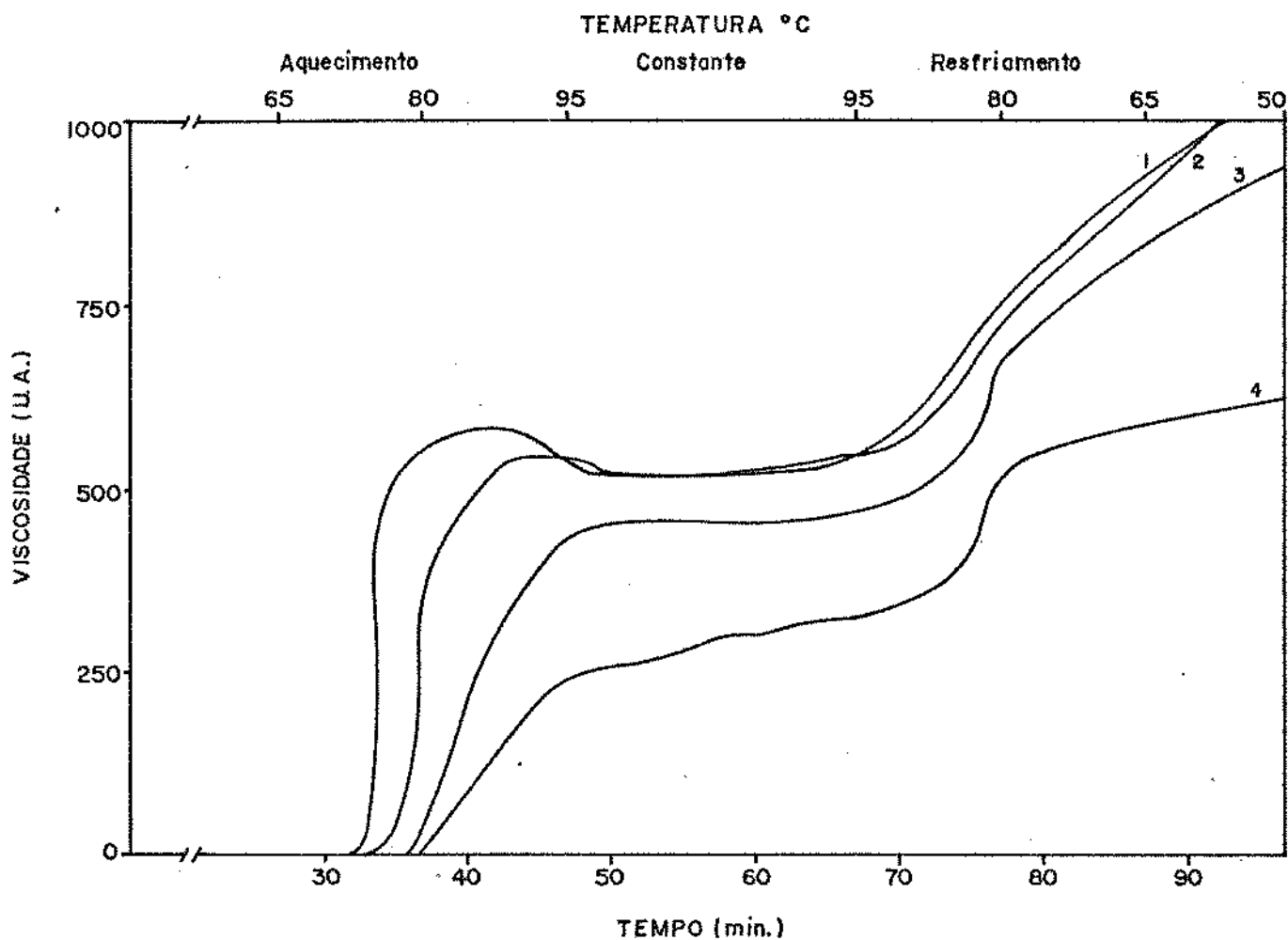


Figura 8: Amilogramas do amido de milho duro tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade

1. 18% de umidade
2. 21% de umidade
3. 24% de umidade
4. 27% de umidade

concentração das amostras: 7,78% p/v

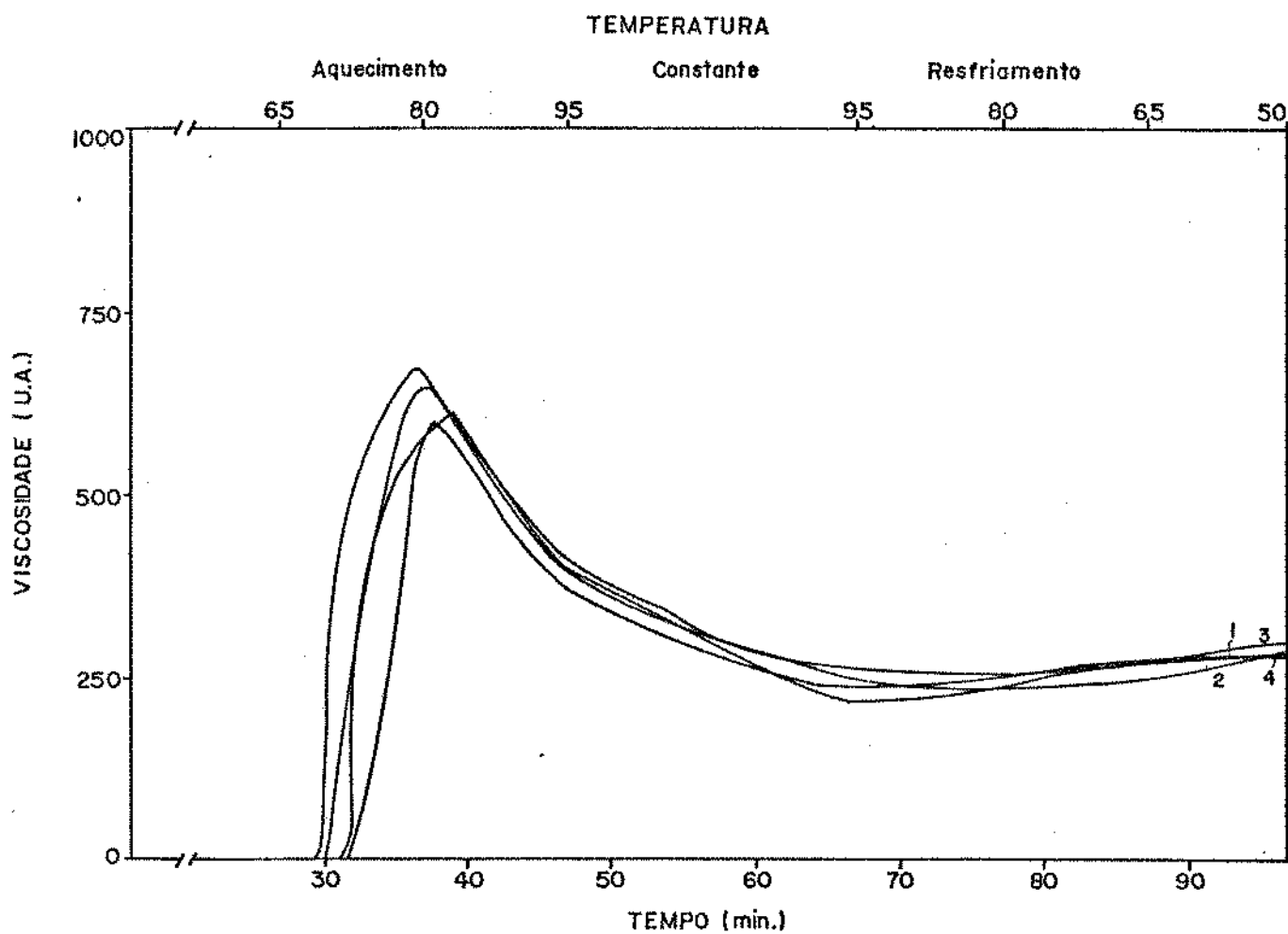


Figura 9: Amilogramas do amido de milho ceroso tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade

1. 18% de umidade
2. 21% de umidade
3. 24% de umidade
4. 27% de umidade

concentração das amostras: 5,55% p/v

chamento e estabilizando os grânulos já inchados contra a fragmentação mecânica, fazendo com que a viscosidade aumentasse levemente durante o cozimento. Os resultados concordam com os de KULP & LORENZ (1981, 1982) que observaram, tanto para o amido de trigo como de batata, que a consistência das pastas à quente era reduzida, enquanto sua estabilidade durante o aquecimento adicional era aumentada. Estes autores sugeriram que o tratamento térmico altera as forças associativas deixando os grânulos mais intimamente associados, e provocando alguma degradação nos amidos.

FRANCO & CIACCO (em fase de elaboração), constataram a completa degradação da fécula de mandioca comercial submetida ao tratamento térmico com baixa umidade, quando esta foi condicionada a 27% de umidade. A diferença encontrada para a fécula de mandioca e o amido de milho seria devido ao primeiro possuir ligações moleculares mais fracas e assim estar mais sujeito à rupturas que o amido de milho.

#### 4.3.1.2. Índice de absorção de água (IAA) dos amidos de milho tratados termicamente com baixa umidade

A Figura 10 mostra os (IAA) dos amidos de milho tratados termicamente com baixa umidade. Para os amidos de milho mole e duro, houve um decréscimo no IAA para as amostras condicionadas a 18% de umidade, em relação ao amido natural. Para as amostras condicionadas a 21, 24 e 27% de umidade, houve um aumento crescente do IAA. Esses resultados encontram apoio nos anteriormente obtidos por LORENZ & KULP (1982).

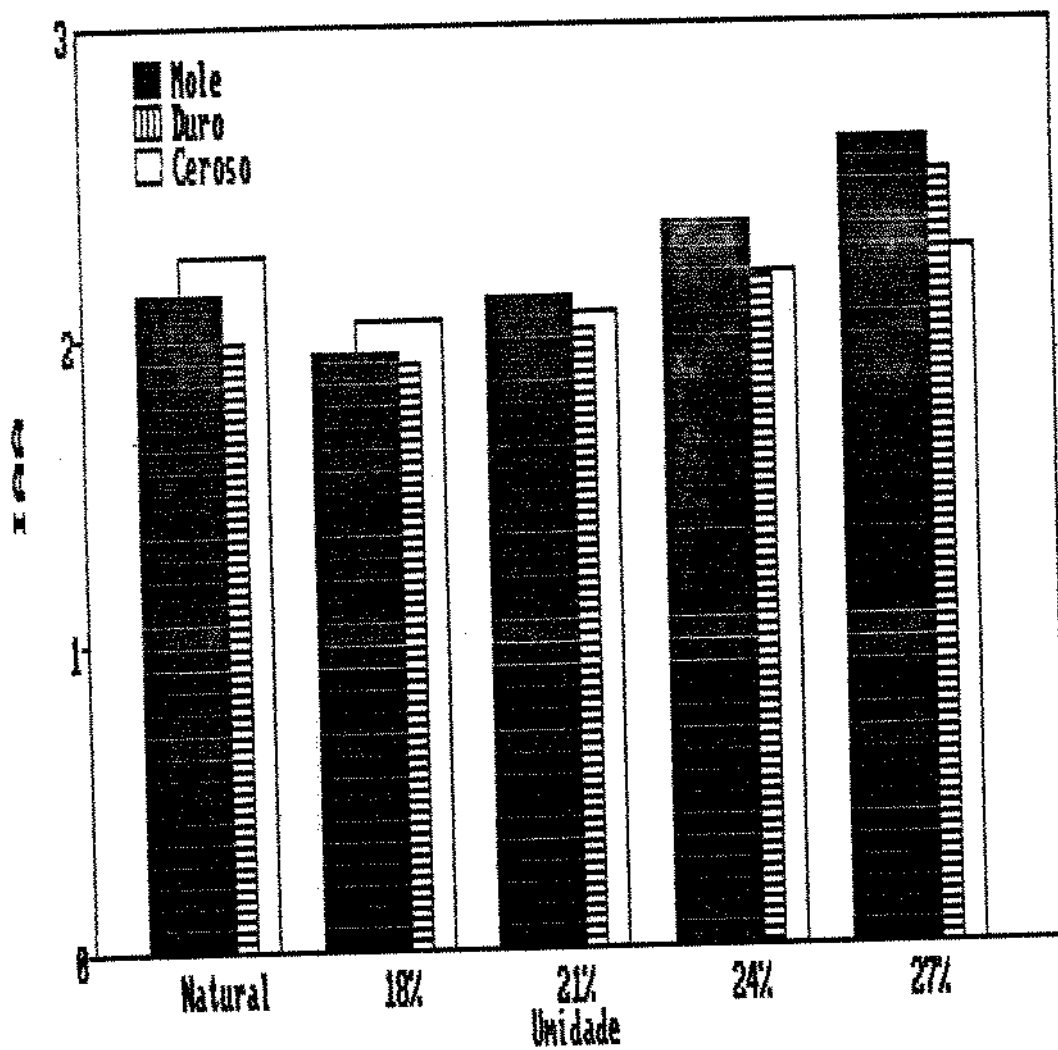


Figura 10: Índice de absorção de água (IAA) das amostras de amido de milho tratadas a 100°C/16 horas a diferentes níveis de unidade

Para o amido de milho ceroso houve um decréscimo do IAA nas amostras condicionadas a 18, 21 e 24% de umidade em relação ao amido natural. No entanto, para a amostra tratada a 27% de umidade, o IAA aumentou levemente.

Esses resultados sugerem que o tratamento térmico com baixa umidade deve provocar um rearranjo nas moléculas de amido. Para os amidos de milho normal condicionados a 18% de umidade esse rearranjo diminuiria a suscetibilidade do grânulo à penetração de água, devido a um fortalecimento de suas ligações internas e consequente aumento da cristalinidade. Acima de 18% de umidade, a estrutura dos grânulos de amido começariam a se romper, aumentando a absorção de água pelos grânulos. Para o amido de milho ceroso esse rompimento começaria a acontecer a 27% de umidade.

#### 4.3.2. Hidrólise enzimática dos amidos de milho tratados termicamente com baixa umidade

##### 4.3.2.1. Susceptibilidade dos amidos de milho tratados a 100°C/16 horas com baixa umidade à ação da $\alpha$ -amilase bacteriana

As Figuras 11, 12 e 13 mostram as porcentagens de açúcares redutores em função do tempo, dos amidos tratados termicamente a diferentes níveis de umidade, incubados a 37,0°C, com 21 SKB de  $\alpha$ -amilase bacteriana/g de amido.

A susceptibilidade enzimática à  $\alpha$ -amilase bacteriana foi levemente superior para o amido de milho ceroso natural que para os amidos de milho mole e duro naturais. Para os amidos tratados termicamente, houve uma redução nas susceptibilidades enzimáticas das



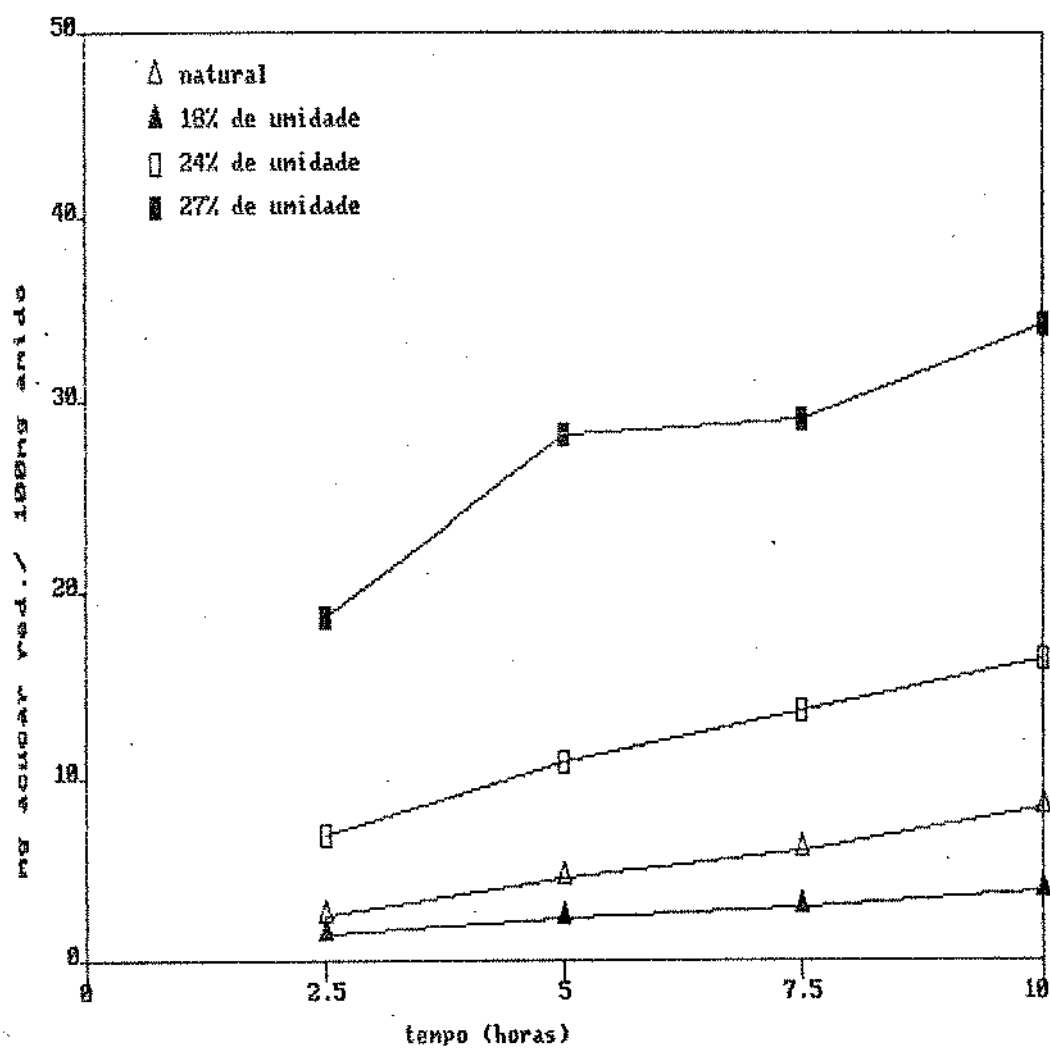


Figura 11: Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho mole tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado a 37,0°C, com  $\alpha$ -amilase bacteriana

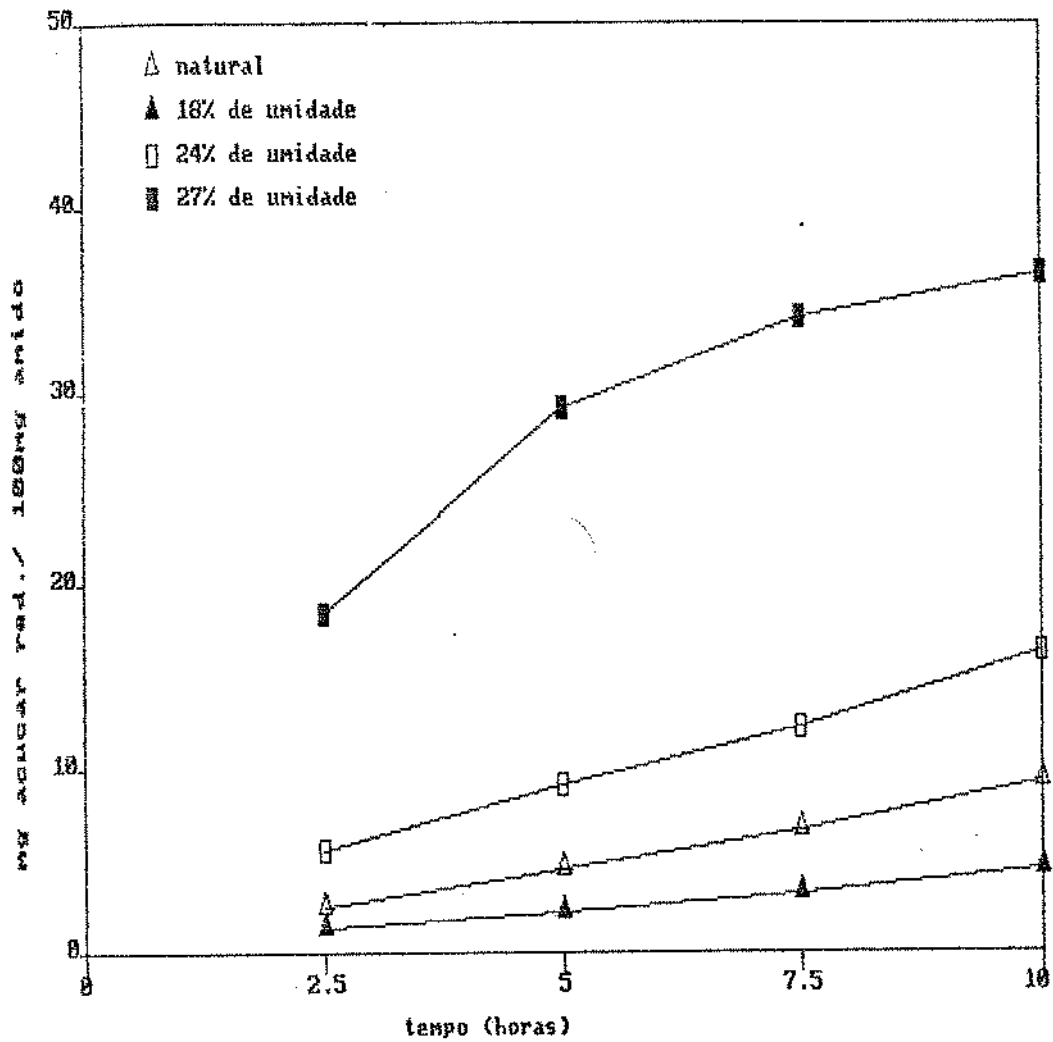


Figura 12: Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho duro tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado a 37,0°C, com  $\alpha$ -amilase bacteriana

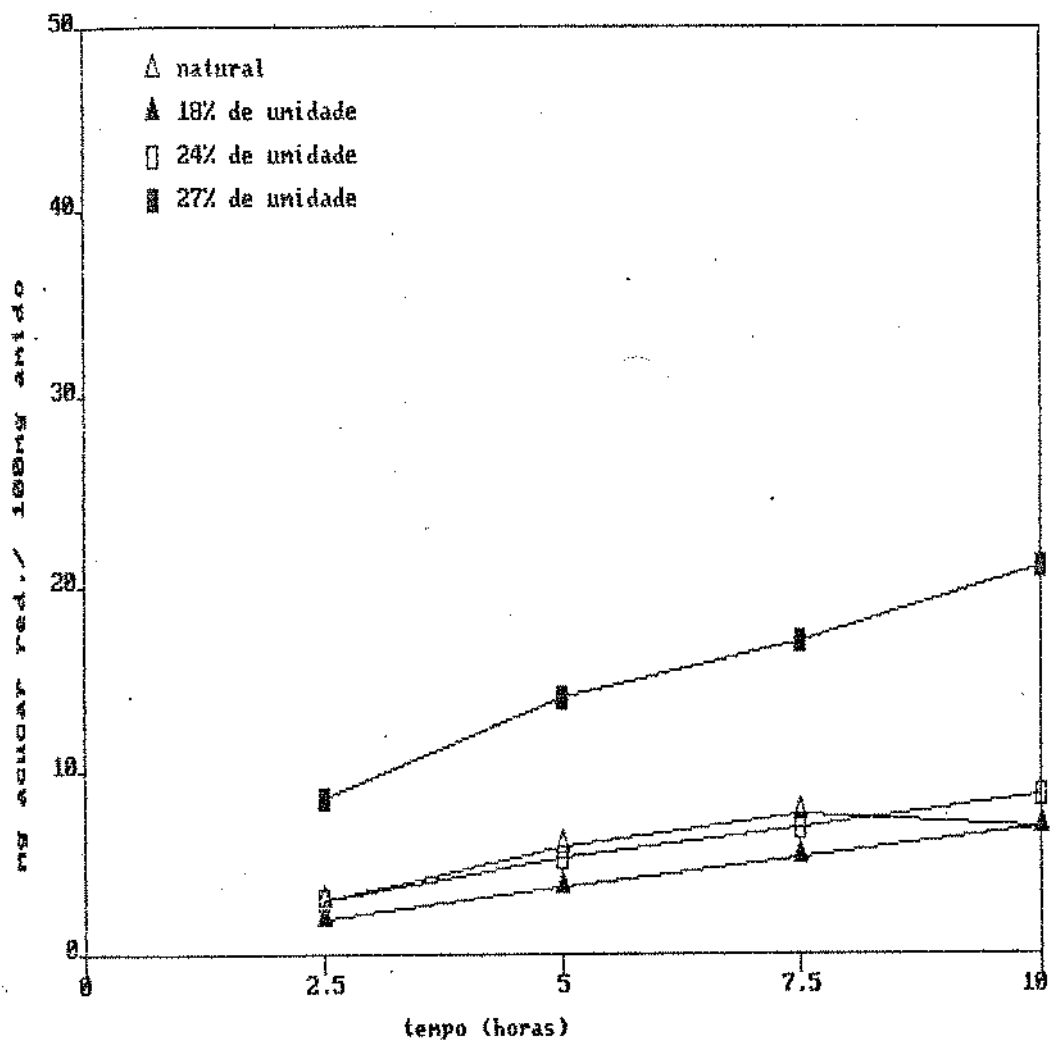


Figura 13: Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho ceroso tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado a 37,0°C, com  $\alpha$ -amilase bacteriana

amostras condicionadas a 18% de umidade, para todos os amidos, sendo que essa redução foi mais drástica para os amidos de milho normais (mole e duro). Para estes amidos condicionados a níveis maiores de umidade (24 e 27%), a susceptibilidade enzimática aumentou muito. No amido de milho ceroso, este aumento só foi observado a 27% de umidade e a uma taxa bem menor que aquela observada para os amidos de milho normal.

Esses resultados sugerem que o tratamento térmico a níveis menores de umidade causa um rearranjo das moléculas de amido, provocando o fortalecimento das ligações internas e tornando-o mais impermeável, como já foi observado com os resultados de IAA. Por outro lado, a maior taxa de hidrólise observada para os amidos de milho normal submetidos ao tratamento térmico com maiores níveis de umidade sugere que para estes níveis de umidade ocorre um rompimento das ligações internas dos grânulos aumentando a área acessível à hidrólise enzimática. Este rompimento começou a ocorrer a 27% de umidade para o amido de milho ceroso; como já observado nos resultados obtidos para IAA, e explica a menor taxa de hidrólise observada para este amido em relação aos amidos de milho normais, neste nível de umidade. Além disso, estes dados também sugerem que o tratamento atua preferencialmente nas zonas amorfas dos grânulos de amido de milho normal, concordando com LORENZ & KULP (1982) que relataram que o tratamento térmico provavelmente provoca alterações nas regiões mais amorfas dos grânulos e portanto mais acessíveis à amilólise.

#### 4.3.2.2. Susceptibilidades dos amidos de milho tratados a 100°C/16 horas com baixa umidade à ação da $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica

As Figuras 14, 15 e 16 mostram as porcentagens de açúcares redutores em função do tempo, obtidas dos amidos de milho tratados termicamente à diferentes níveis de umidade, incubados a 37,0°C, com 21 SKB de  $\alpha$ -amilase bacteriana/g de amido e 10 unidades de amiloglucosidase fúngica/g de amido. Observou-se um efeito sinérgico da ação das enzimas para todos os amidos naturais, como mostrado por FRANCO & CIACCO (1987) e para os amidos tratados termicamente até 24% de umidade. Este efeito sinérgico foi muito mais pronunciado para o amido de milho ceroso que para os amidos de milho normal (mole e duro). Segundo UEDA (1974) e UEDA & KANO (1975), a amilose do amido de milho normal pode impedir a digestão pela amiloglucosidase. No entanto, para os amidos de milho normal (mole e duro) tratados termicamente com níveis de umidade de 27%, as porcentagens de açúcares redutores foram menores que aquelas obtidas com a  $\alpha$ -amilase sozinha.

#### 4.3.2.3. Obtenção dos resíduos da hidrólise

Como todos os dados obtidos até o momento, para os amidos de milho mole e duro, foram muito semelhantes, resolveu-se, a partir destes experimentos, trabalhar apenas com os amidos de milho duro e ceroso. O amido de milho duro, a partir de então, passou a ser denominado apenas como amido de milho normal.

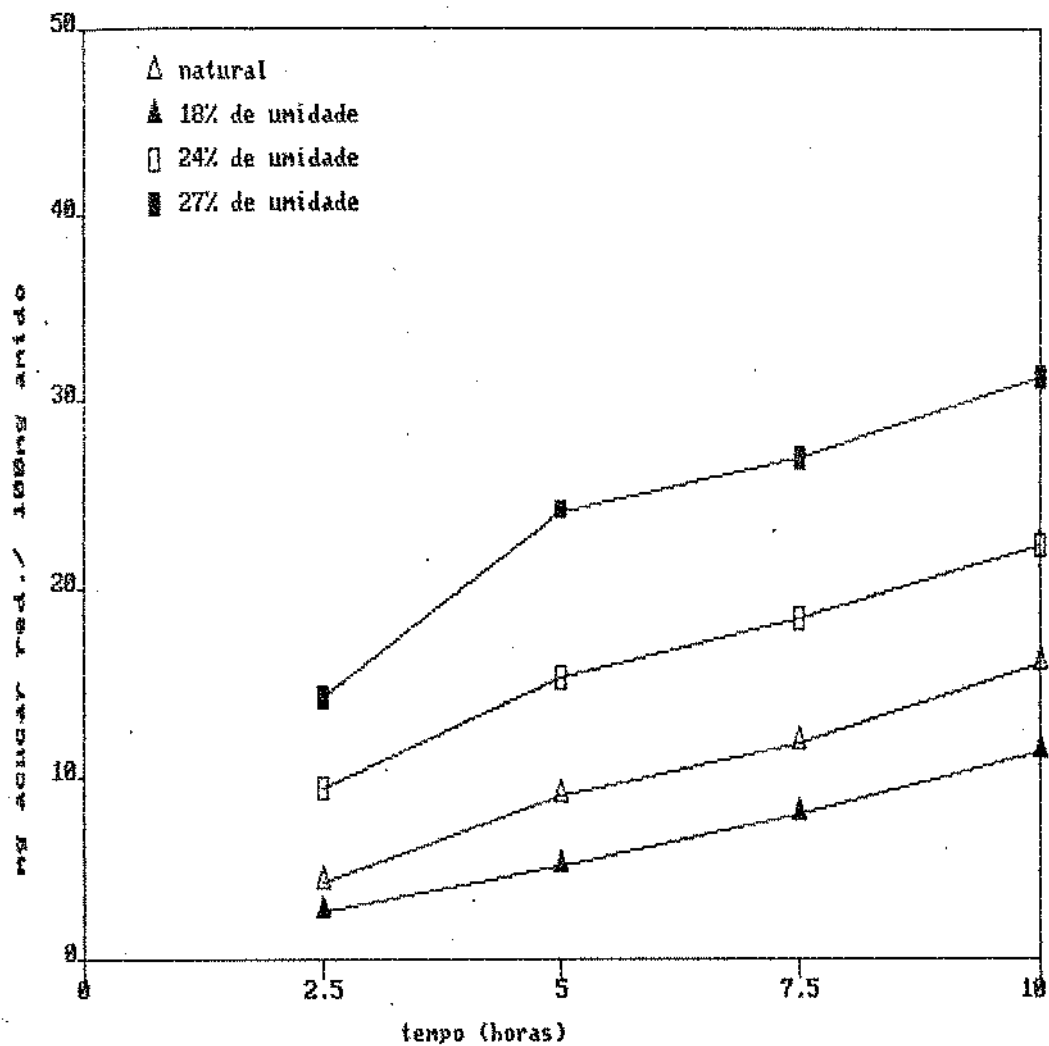


Figura 14: Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho mole tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado a 37,0°C, com  $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica

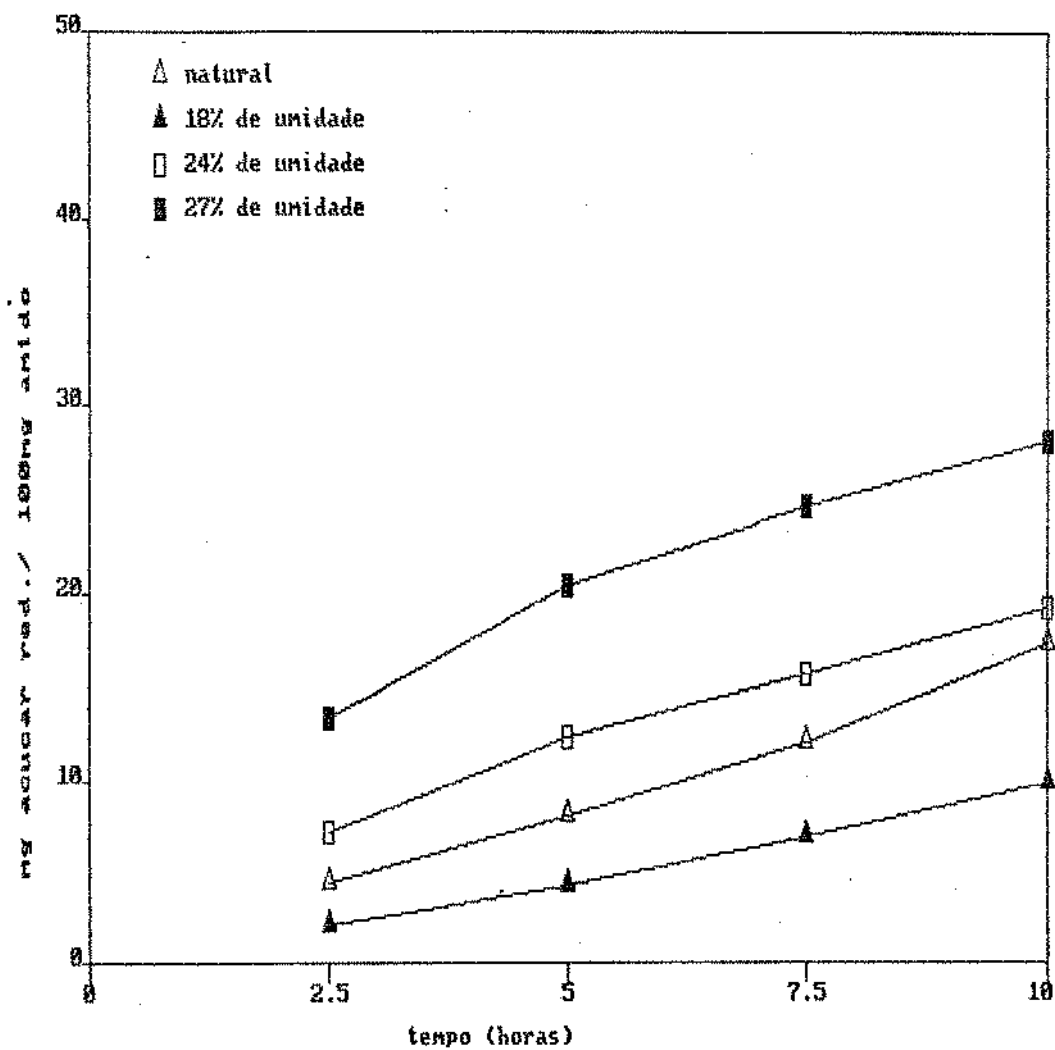


Figura 15: Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho duro tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado a 37,0°C, com  $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica

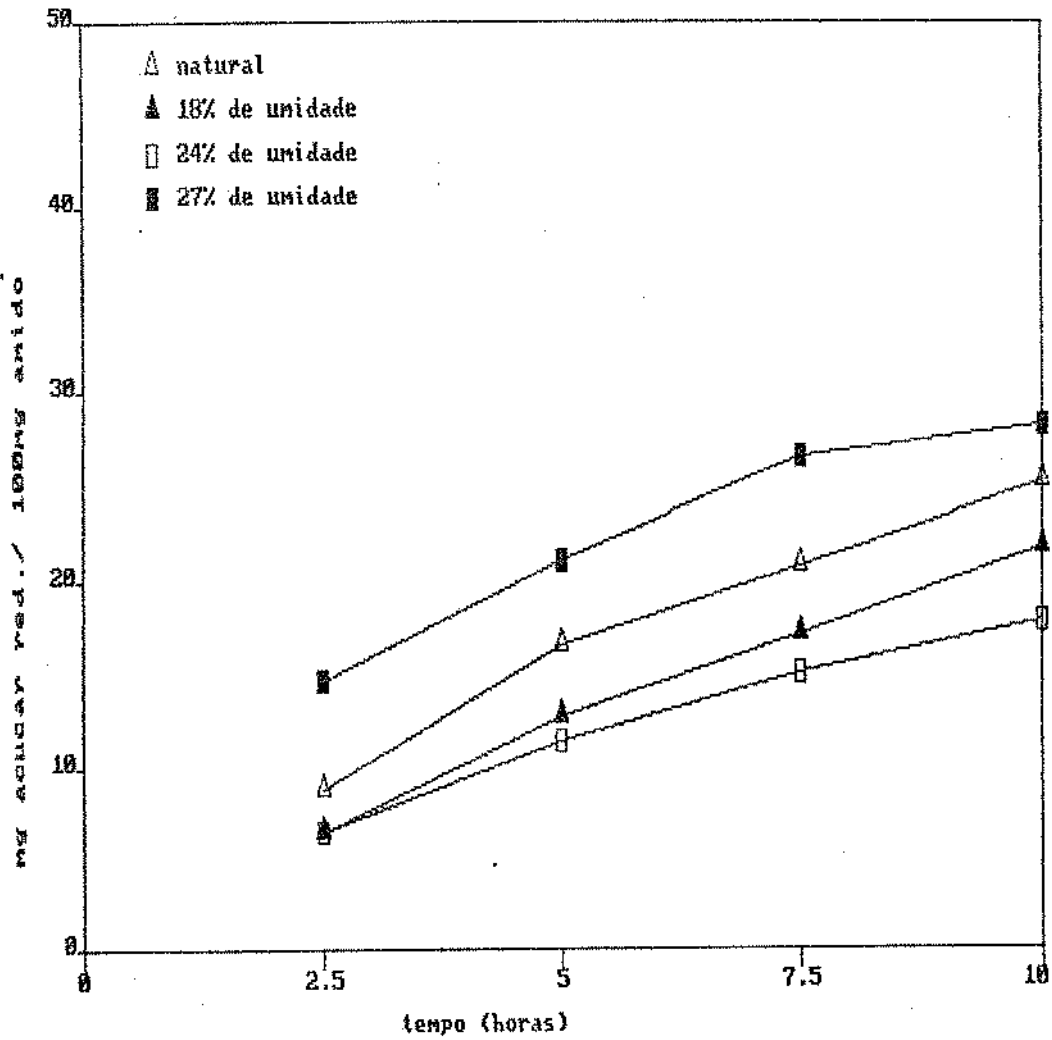


Figura 16: Porcentagem de açúcares redutores em função do tempo, produzidos a partir do amido de milho ceroso tratado a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade, incubado a 37,0°C, com  $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglucosidase fúngica



Os amidos de milho normal e ceroso naturais e tratados termicamente foram submetidos à hidrólise com 21 SKB de  $\alpha$ -amilase bacteriana/g de amido e 10 unidades de amiloglicosidase fúngica/g de amido durante 24 horas à 37,0°C e seus resíduos obtidos como em 3.2.5. A Tabela 3 mostra as porcentagens de hidrólise obtidas. Observou-se mais uma vez o acentuado efeito sinérgico da ação conjunta das enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase para o amido de milho ceroso.

#### 4.3.3. Análise dos resíduos da hidrólise enzimática

##### 4.3.3.1. Análises cristalográficas

A Figura 17 mostra os difractogramas de raios X dos amidos de milho normal e ceroso naturais e tratados enzimaticamente com  $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglicosidase fúngica, enquanto a Tabela 4 mostra os valores de intensidade, medidos em CPS, encontrados para cada pico apresentado nos difractogramas.

Os difractogramas dos amidos de milho normal e ceroso apresentaram padrões de raios X muito semelhantes, caracterizado como tipo-A, reforçando os dados obtidos por FRANCO et al (1988) e GALLANT et al (1982). Para os amidos de milho normal e ceroso tratados enzimaticamente, o mesmo padrão foi observado, porém uma queda na intensidade dos picos de ambos amidos foi verificada. IKAWA & FUJII (1980) não encontraram diferenças para os padrões de raio-X dos amidos de milho natural e tratado com amiloglicosidase, sugerindo que as enzimas devem hidrolisar igualmente tanto as áreas cristalinas como as amorfas dos grânulos deste amido.

TABELA 3: Porcentagem de hidrólise dos amidos de milho normal e ceroso tratados a 100°C/16 horas a diferentes níveis de umidade e incubados com 21 SKB de  $\alpha$ -amilase bacteriana/g de amido e 10 unidades de amiloglucosidase fúngica/g de amido a 37,0°C, durante 24 horas

AMIDO	NAT	TRATAMENTO		
		18%	24%	27%
NORMAL	38,97	26,14	34,72	45,03
CEROSO	56,28	45,65	58,55	67,21

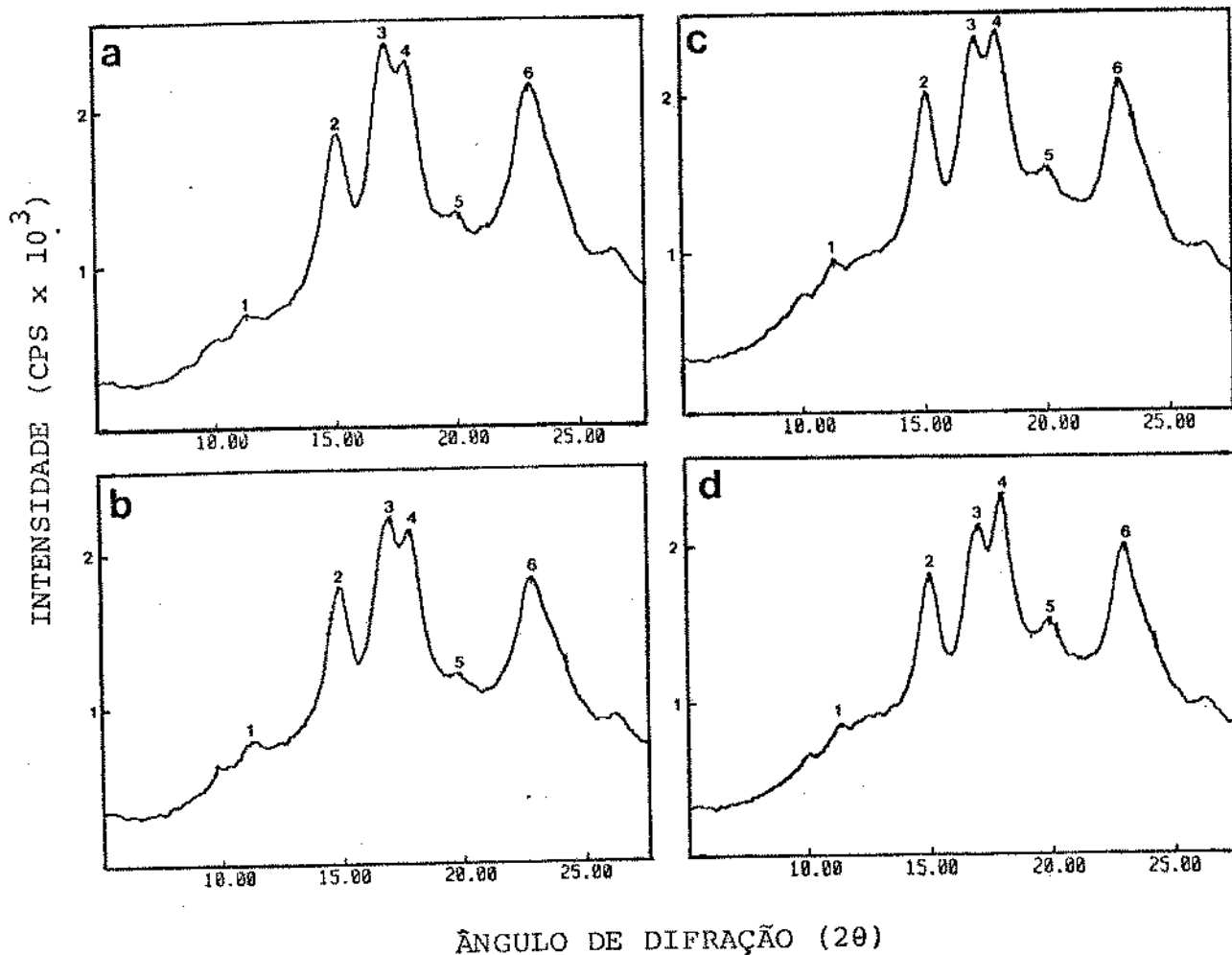


Figura 17: Difractogramas de raios X obtidos dos amidos de milho normal e ceroso naturais e submetidos à ação enzimática  
 a. amido normal natural  
 b. amido normal submetido à ação enzimática  
 c. amido ceroso natural  
 d. amido ceroso submetido à ação enzimática  
 CPS: contagens por segundo  
 Os números de 1-6 identificam os picos nos difractogramas e seus valores de intensidade estão mostrados na Tab.4

TABELA 4: Intensidade medida em CPS, dos picos mostrados nos difrac-  
togramas de raios X obtidos dos amidos de milho normal e  
ceroso naturais e submetidos à ação da  $\alpha$ -amilase e ami-  
loglucosidase

PICOS	INTENSIDADE (CPS)			
	NORMAL	NORMAL + ENZ.	CEROSO	CEROSO + ENZ.
1	716	791	953	827
2	1817	1775	1997	1759
3	2370	2203	2352	2070
4	2151	2122	2407	2250
5	1323	1208	1536	1482
6	2099	1801	2065	1942

CPS: contagens por segundo

As Figuras 18 e 19 mostram os difractogramas de raios X dos amidos de milho normal e ceroso, respectivamente, tratados termicamente a níveis de 18 e 27% de umidade submetidos ou não à ação enzimática, enquanto os valores de intensidade encontrados para cada pico apresentado nos difractogramas são mostrados na Tabela 5.

O tratamento térmico a qualquer nível de umidade reteve o padrão tipo-A para ambos amidos, porém para o amido normal o tratamento provocou acréscimo nos valores de intensidade para a amostra condicionada a 18% de umidade e um acréscimo menos acentuado para a amostra condicionada a 27% de umidade. Já para o amido de milho ceroso, observou-se um leve aumento nos valores de intensidade para a amostra condicionada a 18% de umidade enquanto para a amostra condicionada a 27% de umidade houve decréscimo destes valores com relação aos amidos naturais. Assim, o tratamento térmico provocou aumento da cristalinidade dos grânulos de amido normal e ceroso condicionados a 18% de umidade sugerindo um rearranjo das moléculas de amido com o fortalecimento das ligações internas dos grânulos e conseqüentemente maior grau de associação das cadeias de amido, como proposto por FRENCH (1984). Estes resultados explicam a porcentagem de hidrólise extremamente baixa e os menores valores de IAA obtidos para os amidos condicionados a 18% de umidade antes do tratamento térmico. Mesmo com o leve acréscimo nos valores de intensidade encontrados para o amido de milho normal condicionado a 27% de umidade, acredita-se que o tratamento térmico tenha provocado rompimento seguido de rearranjo das ligações internas dos grânulos induzindo à degradação do grânulo de amido, aumentando a área acessível à amilólise.

O tratamento térmico não provocou qualquer formação da es-

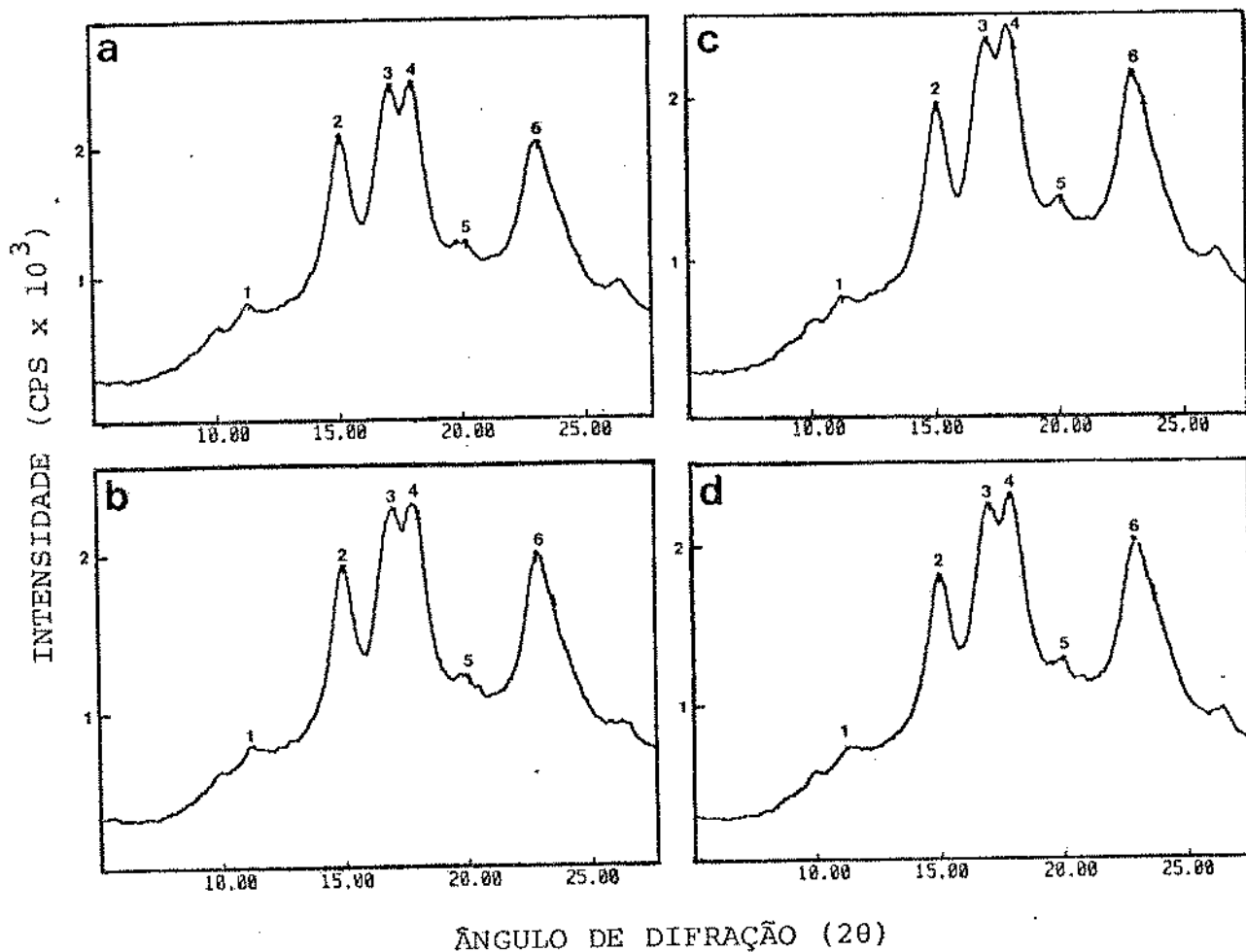


Figura 18: Diffractogramas de raios X obtidos do amido de milho normal tratado a 100°C/16 horas a níveis de 18 e 27% de umidade submetidos ou não à ação enzimática

a. amido com 18% de umidade  
b. amido com 18% de umidade e submetido à ação enzimática  
c. amido com 27% de umidade  
d. amido com 27% de umidade e submetido à ação enzimática

CPS: contagens por segundo  
Os números de 1-6 identificam os picos nos diffractogramas e seus valores de intensidade estão mostrados na Tab.5

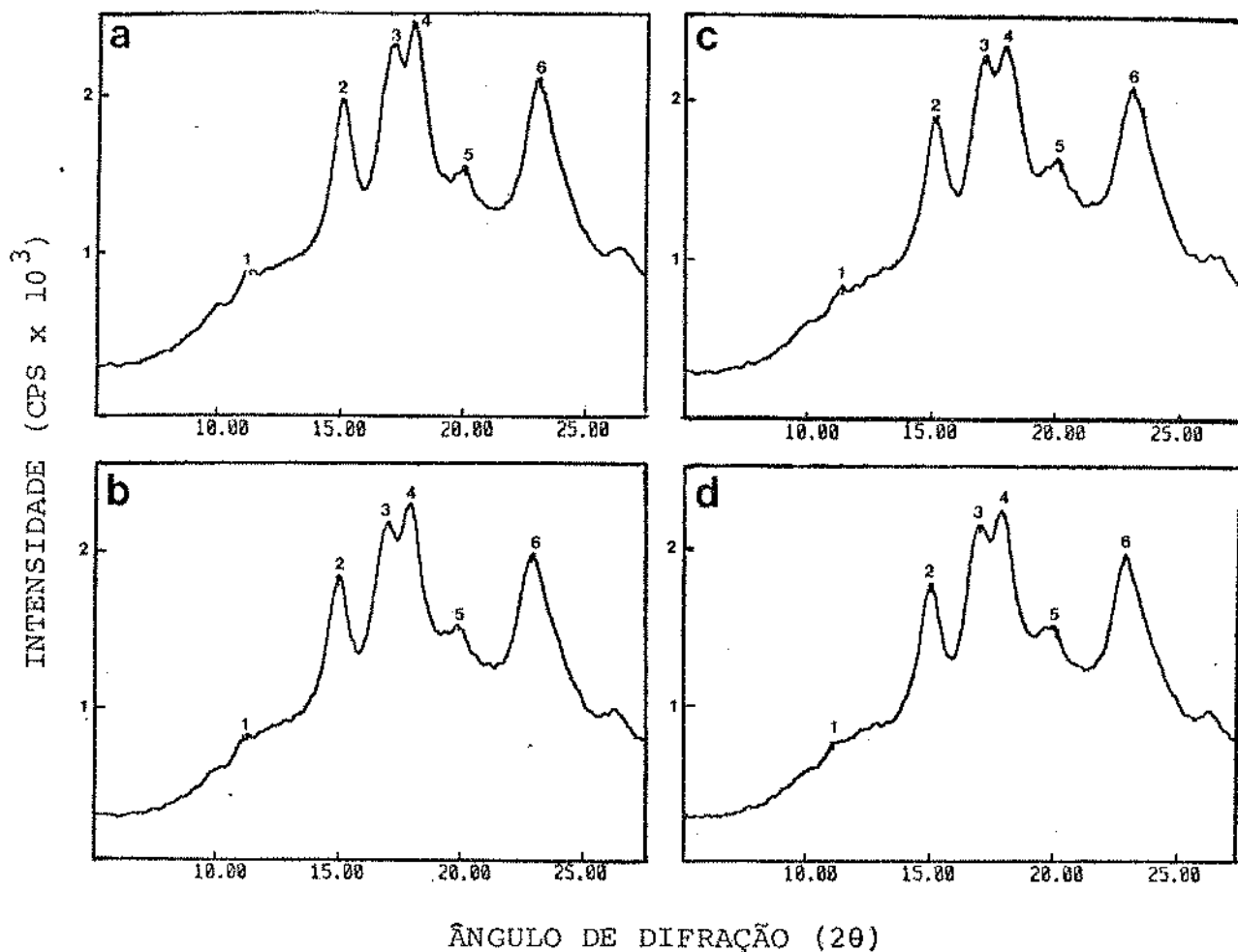


Figura 19: Difractogramas de raios X obtidos do amido de milho ceroso tratado a 100°C/16 horas a níveis de 18 e 27% de umidade submetidos ou não à ação enzimática

- a. amido com 18% de umidade
- b. amido com 18% de umidade e submetido à ação enzimática
- c. amido com 27% de umidade
- d. amido com 27% de umidade e submetido à ação enzimática

CPS: contagens por segundo  
 Os números de 1-6 identificam os picos nos difractogramas e seus valores de intensidade estão mostrados na Tab.5

TABELA 5: Intensidade medida em CPS, dos picos mostrados nos difrac-  
togramas de raios X obtidos dos amidos de milho normal e  
ceroso tratados a 100°C/16 horas a diferentes níveis de  
umidade e submetidos à ação da -amilase e amiloglucosi-  
dase

PICOS	INTENSIDADE (CPS)							
	18%	AMIDO NORMAL			18%	AMIDO CEROSO		
		18%+ENZ.	27%	27%+ENZ.		18%+ENZ.	27%	27%+ENZ.
1	893	791	774	732	919	802	841	770
2	2145	1898	1942	1790	2003	1790	1871	1764
3	2519	2244	2346	2238	2340	2145	2238	2133
4	2531	2168	2389	2304	2456	2274	2316	2227
5	1328	1221	1374	1260	1565	1516	1600	1477
6	2087	1953	2139	2003	2105	1942	2036	1947

CPS: contagens por segundo



trutura V (complexo de amilose e lipídeos), sugerida na literatura por ZOBEL (1988). Segundo este autor, o tratamento térmico com baixa umidade provoca a formação do padrão V que é caracterizado por um pico à 12,0, 6,8 e 4,4 Å, sendo que o último pico frequentemente aparece como a primeira indicação de que o complexo V está sendo formado. No entanto, um pequeno pico à 4,4 Å ( $2\theta = 20,0^\circ$ ) foi observado nos difractogramas de todos os amidos normal e ceroso naturais ou tratados termicamente e submetidos ou não à hidrólise enzimática.

Os amidos normal e ceroso tratados termicamente e submetidos à ação enzimática mostraram um decréscimo nos valores de intensidade em relação aos amidos apenas tratados termicamente.

#### 4.3.3.2. Análises microscópicas

##### 4.3.3.2.1. Microscopia óptica

A Figura 20 (a-f) mostra as micrografias ópticas dos amidos de milho normal tratados termicamente com níveis diferentes de umidade, submetidos ou não à hidrólise enzimática. Não foram observadas diferenças marcantes nos grânulos de amido de milho normal natural e tratados termicamente com 18 ou 27% de umidade, assim como não ocorreu mudança no tamanho ou forma dos grânulos (a,c,e). Para as amostras tratadas enzimaticamente foi observado, para o amido de milho normal natural, sinais de extensa corrosão principalmente no sentido radial, como já observado por FRANCO et al (1988). Para a amostra de amido de milho normal tratada termicamente a 18% de umidade e submetida à ação enzimática, verificou-se que apenas alguns grânulos desse amido apresentaram algum tipo de degradação, resulta-

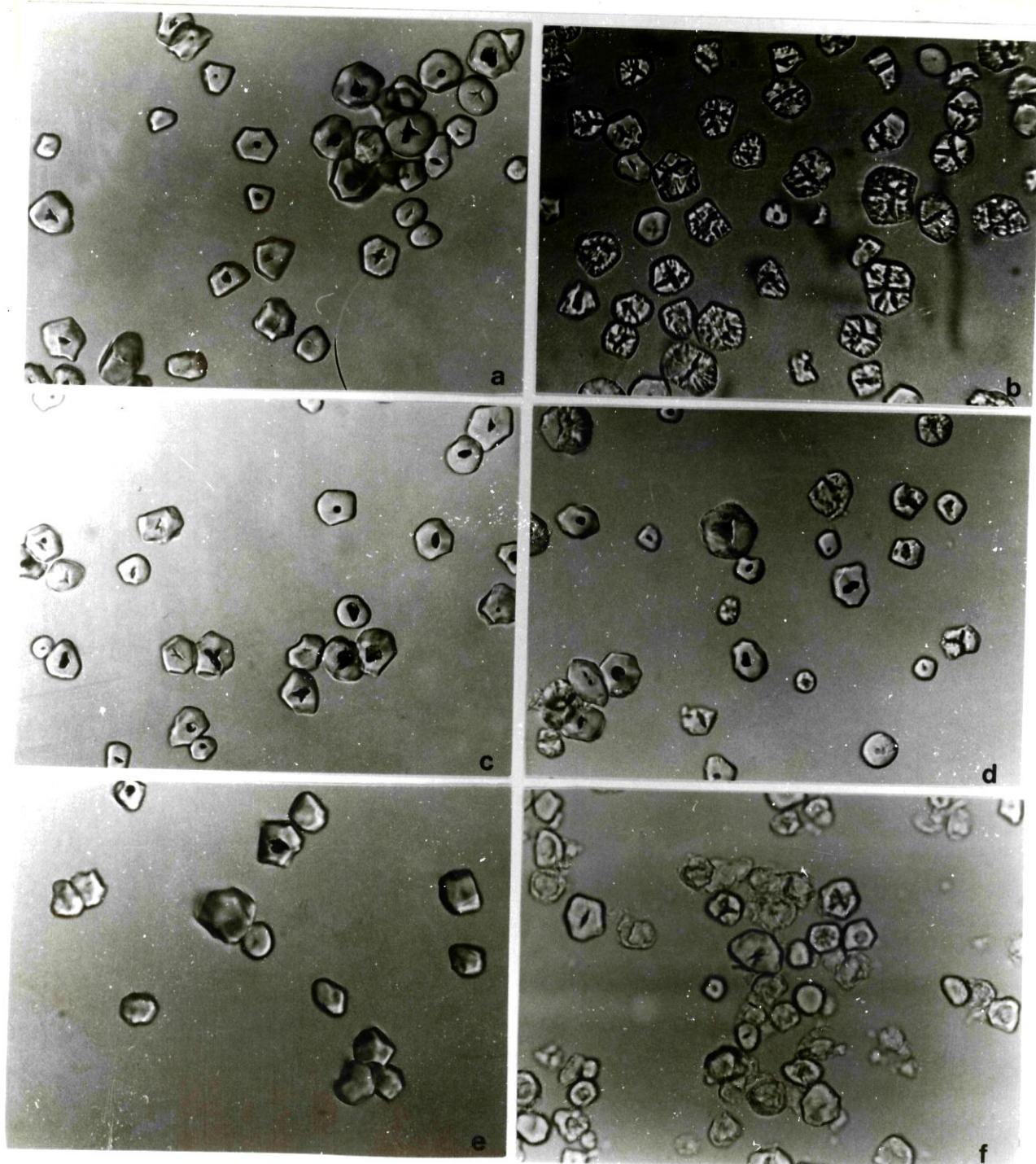


Figura 20: Micrografias dos amidos de milho normal tratados termicamente à diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação enzimática, observados em microscópio óptico comum (aumento de 1800 X exceto para f = 1500 X)  
a) amido natural; b) amido natural mais enzimas; c) amido tratado a 18% de umidade; d) amido tratado a 18% de umidade mais enzimas; e) amido tratado a 27% de umidade; f) amido tratado a 27% de umidade mais enzimas.

dos concordantes com os obtidos anteriormente para esta amostra, onde a porcentagem de hidrólise enzimática foi extremamente baixa(d). Como mencionado anteriormente, os difractogramas de raios X do amido normal tratado termicamente a 18% de umidade mostrou aumento da cristalinidade o que contribuiu para a menor taxa de hidrólise observada.

Para a amostra tratada termicamente a 27% de umidade e submetida à ação enzimática os grânulos apresentaram-se extensivamente corroídos, com aparência entumescida (f). Este fenômeno estaria diretamente relacionado ao maior IAA encontrado para os amidos tratados termicamente a 27% de umidade. O tratamento térmico a este nível de umidade começaria a romper a estrutura dos grânulos aumentando a suscetibilidade do amido à amilólise.

A Figura 21 (a-f) mostra as micrografias ópticas dos amidos de milho ceroso tratados termicamente com níveis de umidade diferentes e submetidos ou não à hidrólise enzimática. Para o amido ceroso não foram verificadas também diferenças marcantes entre os grânulos naturais e tratados termicamente. Tanto os grânulos de amido de milho ceroso natural, como aqueles tratados termicamente a qualquer nível de umidade quando submetidos à ação enzimática apresentaram-se corroídos, principalmente no sentido radial.

As "depressões" e "fissuras" acentuadas dos grânulos nas fotos dos amidos sem tratamento enzimático são devidas à artefatos da fonte de iluminação do microscópio óptico, já que estas "fissuras" ou "depressões" não ocorrem ou correspondem a depressões pouco profundas nas micrografias obtidas ao microscópio eletrônico. E de se notar, também, que os grânulos de amido ceroso quando são submetidos ao ataque enzimático deixam-se corroer ao nível de fratura.

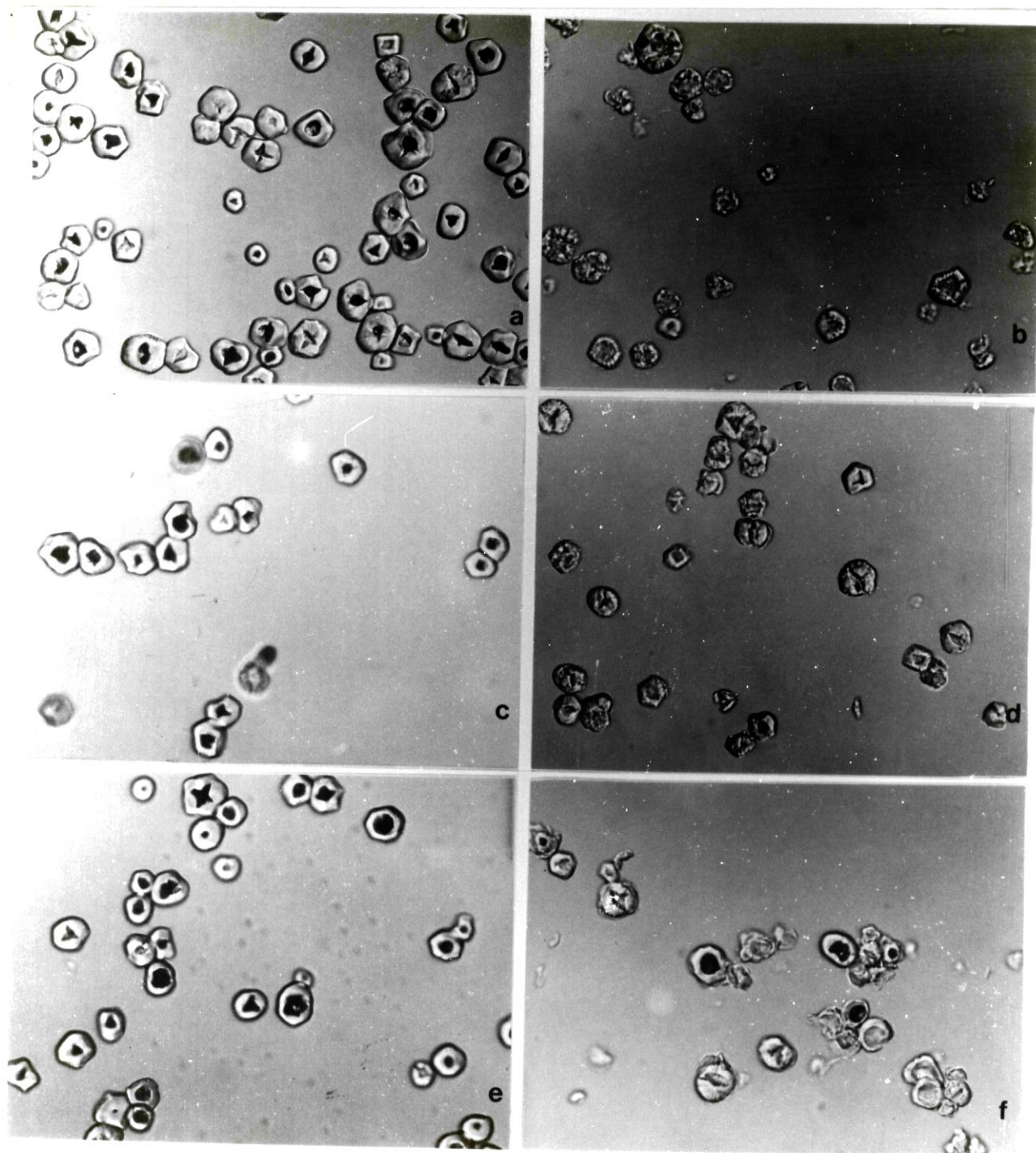


Figura 21: Micrografias dos amidos de milho ceroso tratados termicamente a diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação enzimática, observados em microscópio óptico comum (aumento de 1800 X)  
 a) amido natural; b) amido natural mais enzimas; c) amido tratado a 18% de umidade; d) amido tratado a 18% de umidade mais enzimas; e) amido tratado a 27% de umidade; f) amido tratado a 27% de umidade mais enzimas.

Este efeito é pouco aparente no grânulo natural (b) e acentua-se no tratamento com umidade à 27% (f).

As micrografias dos grânulos de amido de milho normal, observadas em microscópio óptico sob luz polarizada, são mostradas na Figura 22 (a-f). A cruz de malta característica do grânulo de amido natural não foi alterada pelo tratamento térmico, assim como não foi pelo tratamento enzimático, indicando que tanto o tratamento térmico como a hidrólise provocaram alterações nas zonas mais amorfas dos grânulos de amido. Resultados análogos foram observados para os grânulos de amido de milho ceroso.

#### 4.3.3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As Figuras 23 (a-f) e 24 (a-f) apresentam as micrografias, obtidas através de microscópio eletrônico de varredura, dos grânulos de amidos de milho normal e ceroso, submetidos ou não ao tratamento térmico e à hidrólise enzimática.

Os grânulos de amido de milho normal natural apresentaram superfícies porosas, enquanto que os tratados enzimaticamente mostraram extensiva corrosão através de canais radiais. Estes canais ocorreram pela formação de poros de forma cilíndrica.

Os grânulos de amido de milho normal tratados termicamente a 18% e 27% de umidade não apresentaram diferença do amido natural confirmando resultados de KULP & LORENZ (1981) que também não observaram mudança no tamanho, na forma, fissuração ou distorção ao microscópio eletrônico para os amidos de trigo e batata tratados termicamente.

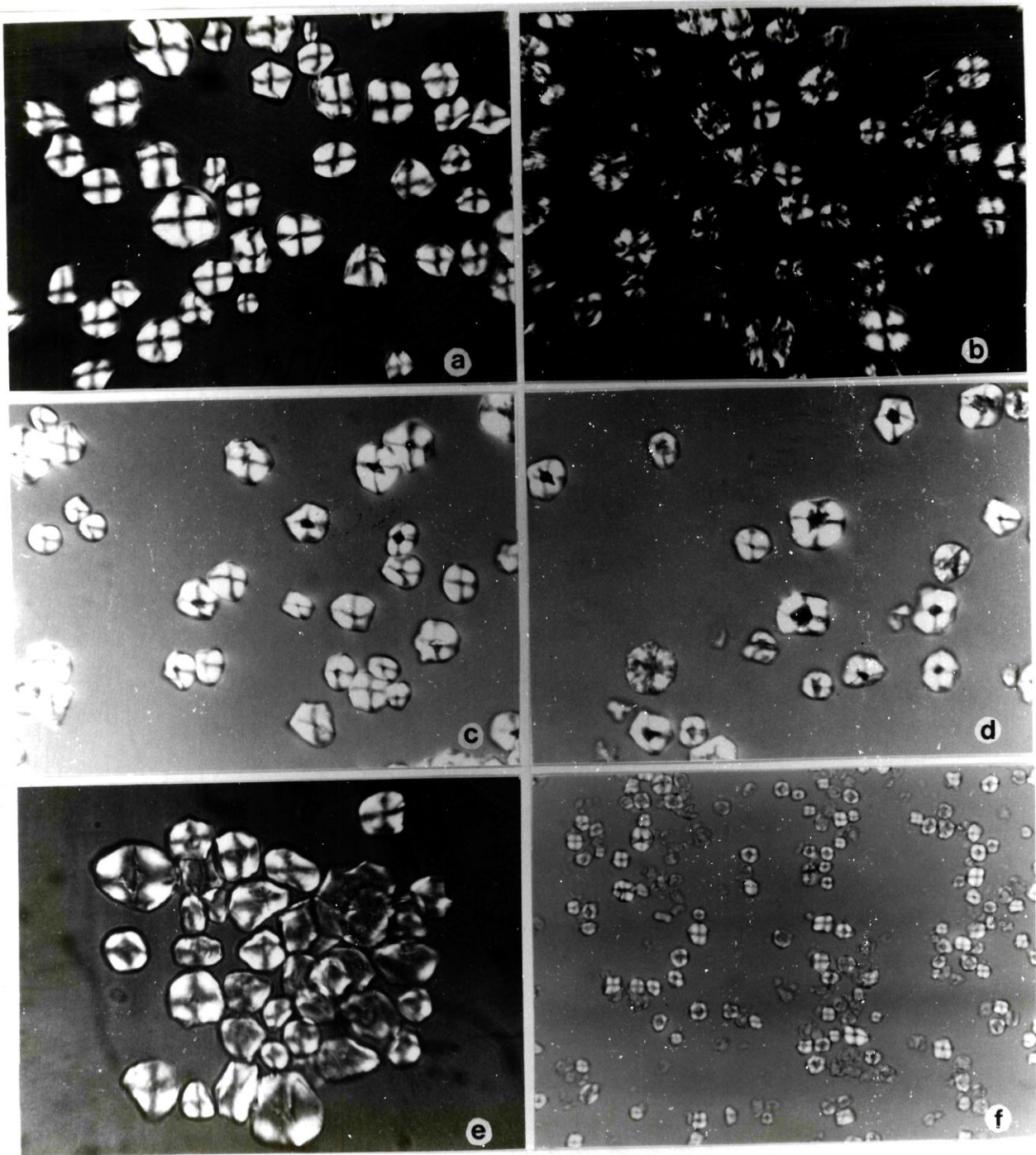


Figura 22: Micrografias dos amidos de milho normal tratados termicamente a diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação enzimática, observados em microscópio óptico sob luz polarizada

a) amido natural (2350 X); b) amido natural mais enzimas (2350 X); c) amido tratado a 18% de umidade (1800 X); d) amido tratado a 18% de umidade mais enzimas (1800 X); e) amido tratado a 27% de umidade (2350 X); f) amido tratado a 27% de umidade mais enzimas (740 X).

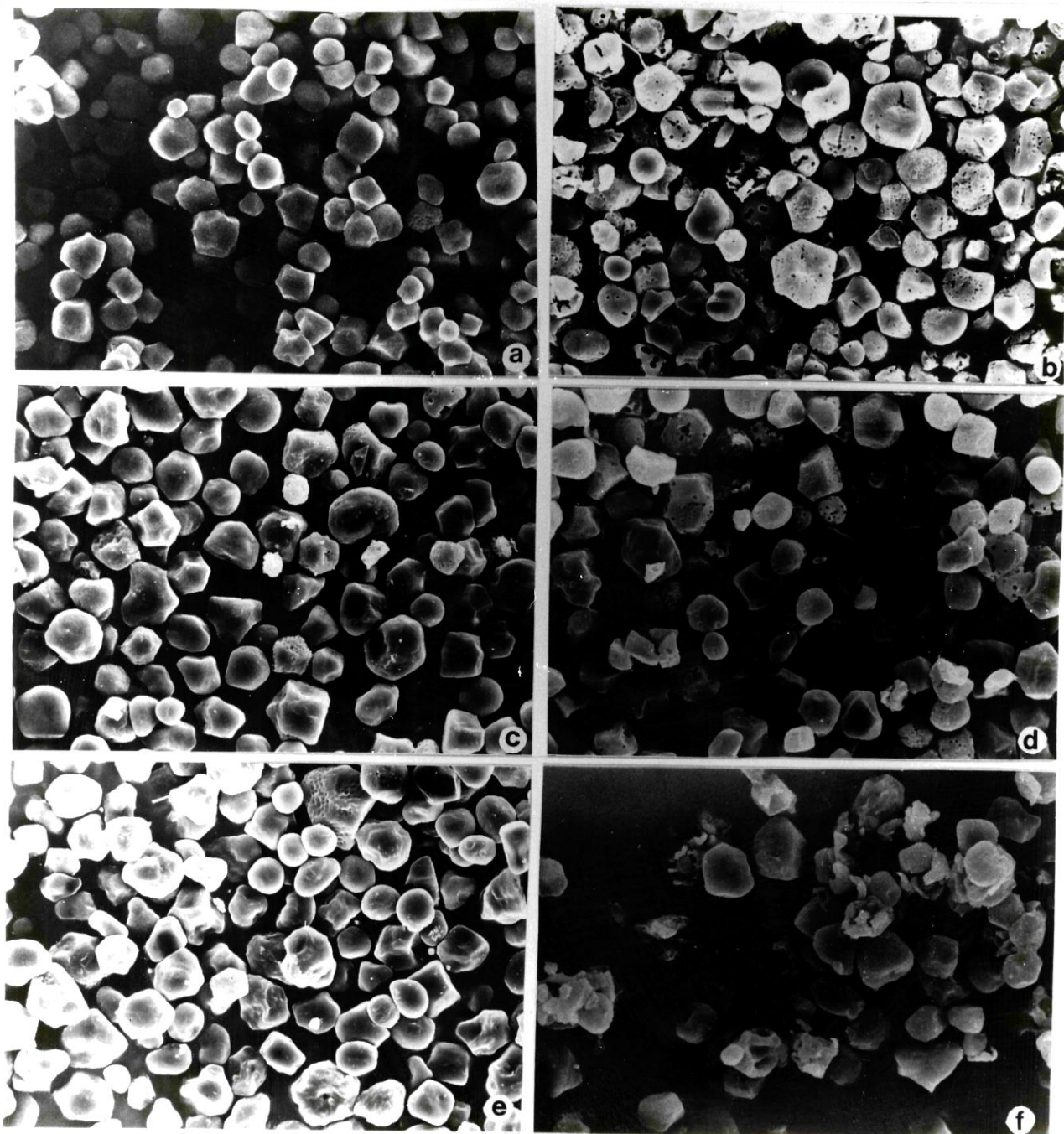


Figura 23: Micrografias dos amidos de milho normal tratados termicamente a diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação enzimática, observados em microscópio eletrônico de varredura

a) amido natural (1000 X); b) amido natural mais enzimas (1400 X); c) amido tratado a 18% de umidade (1300 X); d) amido tratado a 18% de umidade mais enzimas (1500 X); e) amido tratado a 27% de umidade (1400 X); f) amido tratado a 27% de umidade mais enzimas (1500 X).

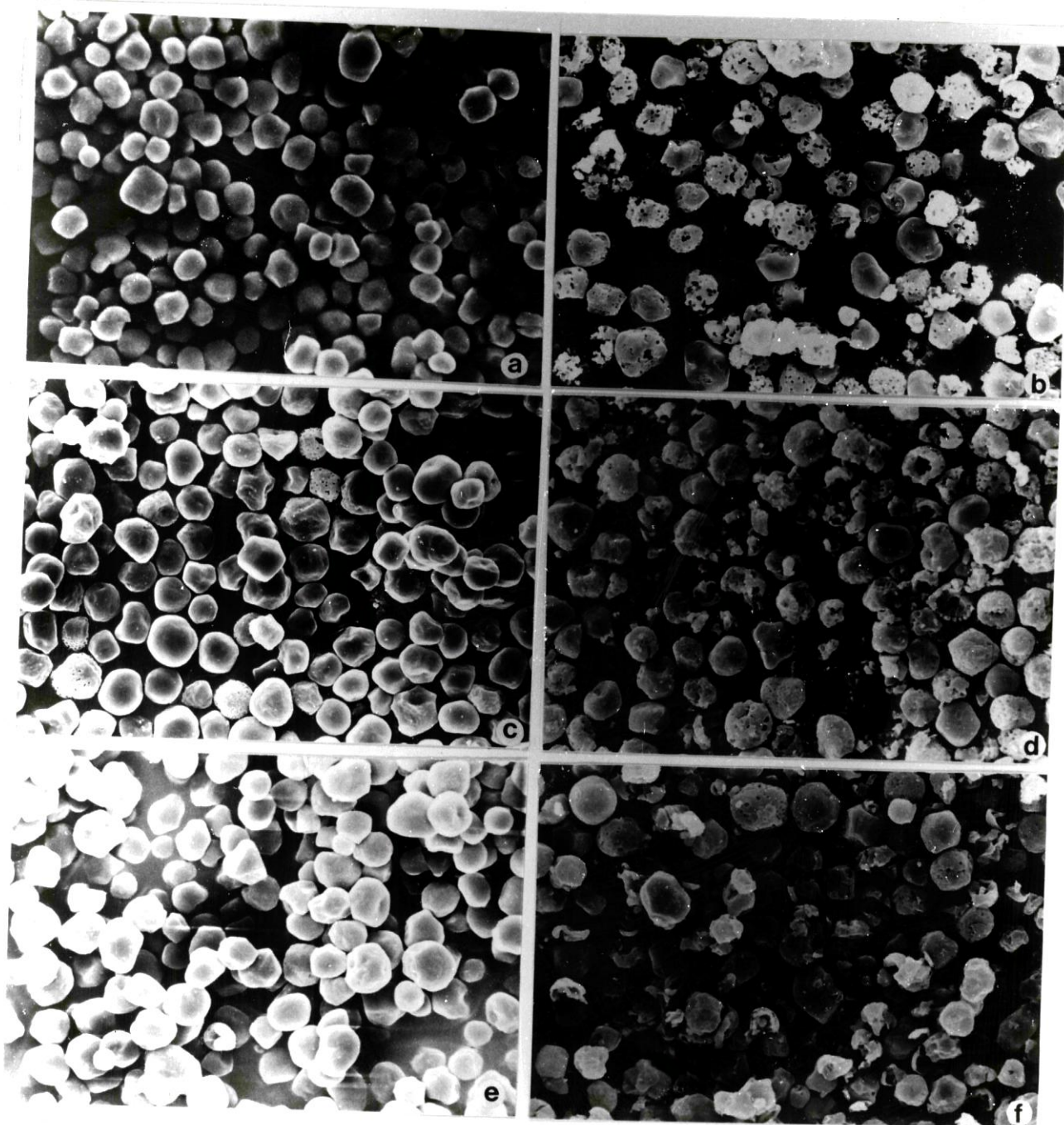


Figura 24: Micrografias dos amidos de milho ceroso tratados termicamente à diferentes níveis de umidade, submetidos ou não à ação enzimática, observados em microscópio eletrônico de varredura  
 a) amido natural (1000 X); b) amido natural mais enzimas (1300 X); c) amido tratado a 18% de umidade (1300 X); d) amido tratado a 18% de umidade mais enzimas (1500 X); e) amido tratado a 27% de umidade (1300 X); f) amido tratado a 27% de umidade mais enzimas (1500 X).



Resultados semelhantes foram obtidos para os grânulos de amido de milho ceroso. No entanto, a hidrólise enzimática sobre os grânulos de amido de milho normal e ceroso tratados termicamente a 27% de umidade, além da corrosão através de canais radiais, provoca maior quebra dos grânulos como se a estrutura restante se rompesse com mais facilidade (Fig 23,f; Fig 24,f).

A conhecida corrosão do grânulo, que fragmentando-se apresenta a série de camadas concêntricas alternadamente claras e escuras (GALLANT et al, 1972 e FRANCO et al, 1988) está demonstrada na Figura 25, onde os grânulos de amido de milho normal estiveram apenas sob tratamento enzimático.

#### 4.3.3.3. Análises cromatográficas em gel Sephadex G-50

##### 4.3.3.3.1. Permeação em gel dos amidos de milho ceroso e normal naturais e tratados termicamente a 27% de umidade e submetidos à ação da $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase

Nestes experimentos, apenas os amidos normal e ceroso naturais e tratados termicamente a 27% de umidade submetidos à ação da  $\alpha$ -amilase bacteriana e amiloglicosidase fúngica foram utilizados. Esse tratamento térmico a 27% de umidade foi selecionado porque foi capaz de romper a estrutura dos grânulos de amido, aumentando consideravelmente sua suscetibilidade à ação enzimática.

Segundo catálogo da PHARMACIA (1982), o peso molecular máximo que permeia a partícula do gel Sephadex G-50 é de aproximadamente 10.000 (DP = 60). Portanto, todo polissacarídeo com grau de polimerização maior que 60 é excluído pela matrix do gel em um deter-

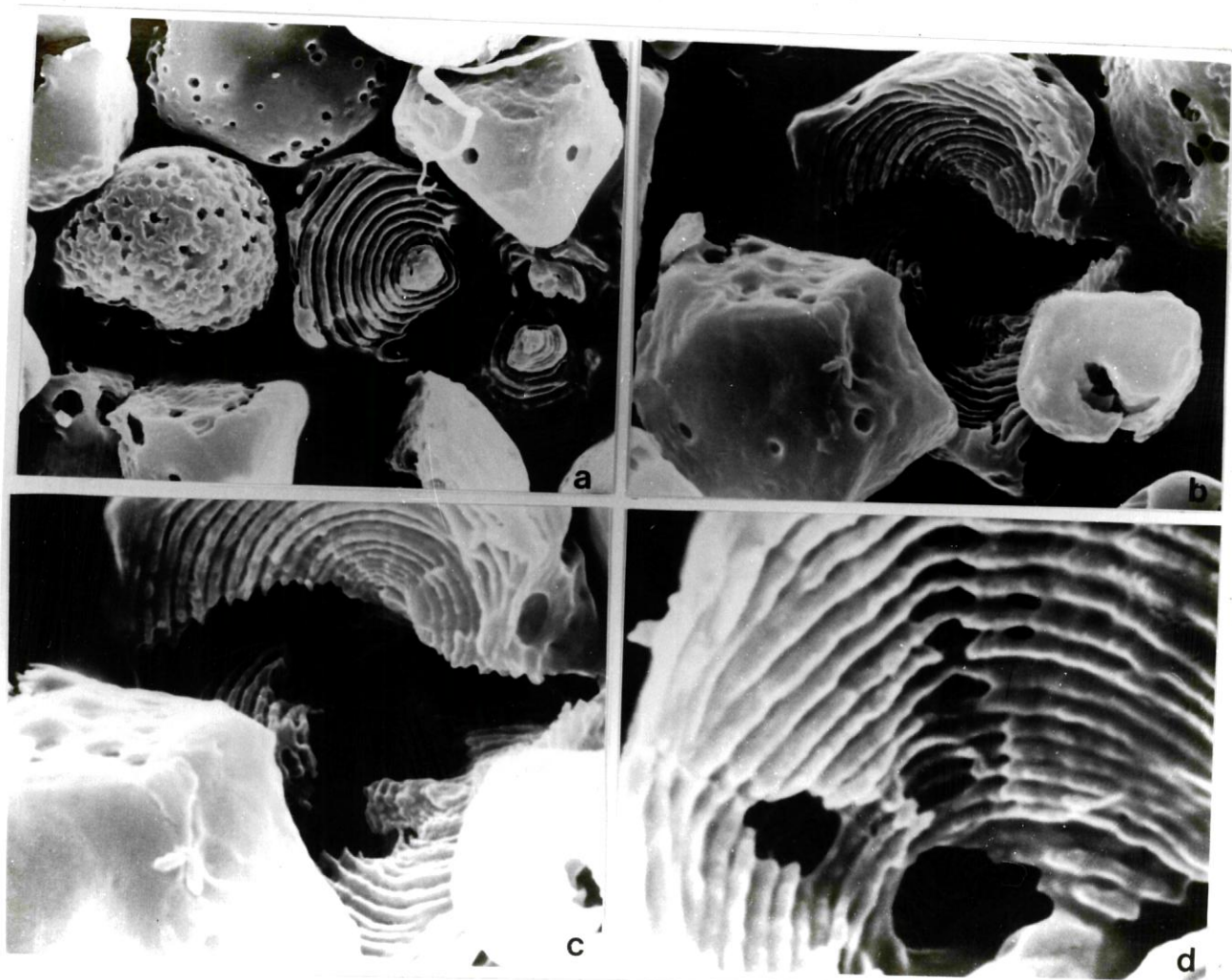


Figura 25: Micrografias do amido de milho normal tratado enzimaticamente com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase, observados em microscópio eletrônico de varredura, em vários aumentos. a) 6000 X; b) 9000 X; c) 13000 X; d) 28000 X

minado  $v_0$ . Assim, a amostra de amido de milho ceroso foi excluída pelo gel em  $v_0 = 165$  ml, pico I (Figura 26).

Os padrões de eluição da amostra de amido de milho ceroso tratada enzimaticamente com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase e daquela submetida a tratamento térmico a 27% de umidade antes do tratamento enzimático estão mostrados na Figura 27. A  $\alpha$ -glucana do amido ceroso natural apresentou dois pequenos picos a 290 e 350 ml, denominados pico II e III, respectivamente, além do pico I já detectado anteriormente em  $v_0$  para o amido ceroso natural. Após calibração da coluna de Sephadex G-50 com amilopectina de milho ceroso purificada e desramificada com pululanase observou-se que os picos II e III representam duas distribuições de cadeias com DP (grau de polimerização) de 25 e 11 respectivamente. Essas frações II e III são originárias da fração inicial I e de suas frações associadas localizadas entre os picos I e II. O tamanho extremamente pequeno desses picos e a porcentagem de hidrólise verificada para esse resíduo (56,28%) confirma que a hidrólise enzimática é muito mais específica que a hidrólise ácida. A  $\alpha$ -amilase quebrando as ligações  $\alpha(1-4)$  ao acaso e produzindo substrato para que a amiloglucosidase atue a partir das extremidades das cadeias, forneceria, no final, um resíduo com um maior DP e pequenas quantidades das frações II e III, ao contrário do ácido que atuaria em todas as direções, inclusive nas zonas com alta densidade de ligações  $\alpha(1-6)$ , provocando a formação de maiores quantidades das frações II e III. ROBIN et al (1974, 1975) encontraram um perfil semelhante para amidos lintnerizados de batata, milho e milho ceroso. Para estes amidos, a partir de 2,6% de hidrólise, os picos II e III já eram perceptíveis, e a medida que a hidrólise aumentava, estes picos se tornavam mais pronunciados, en-

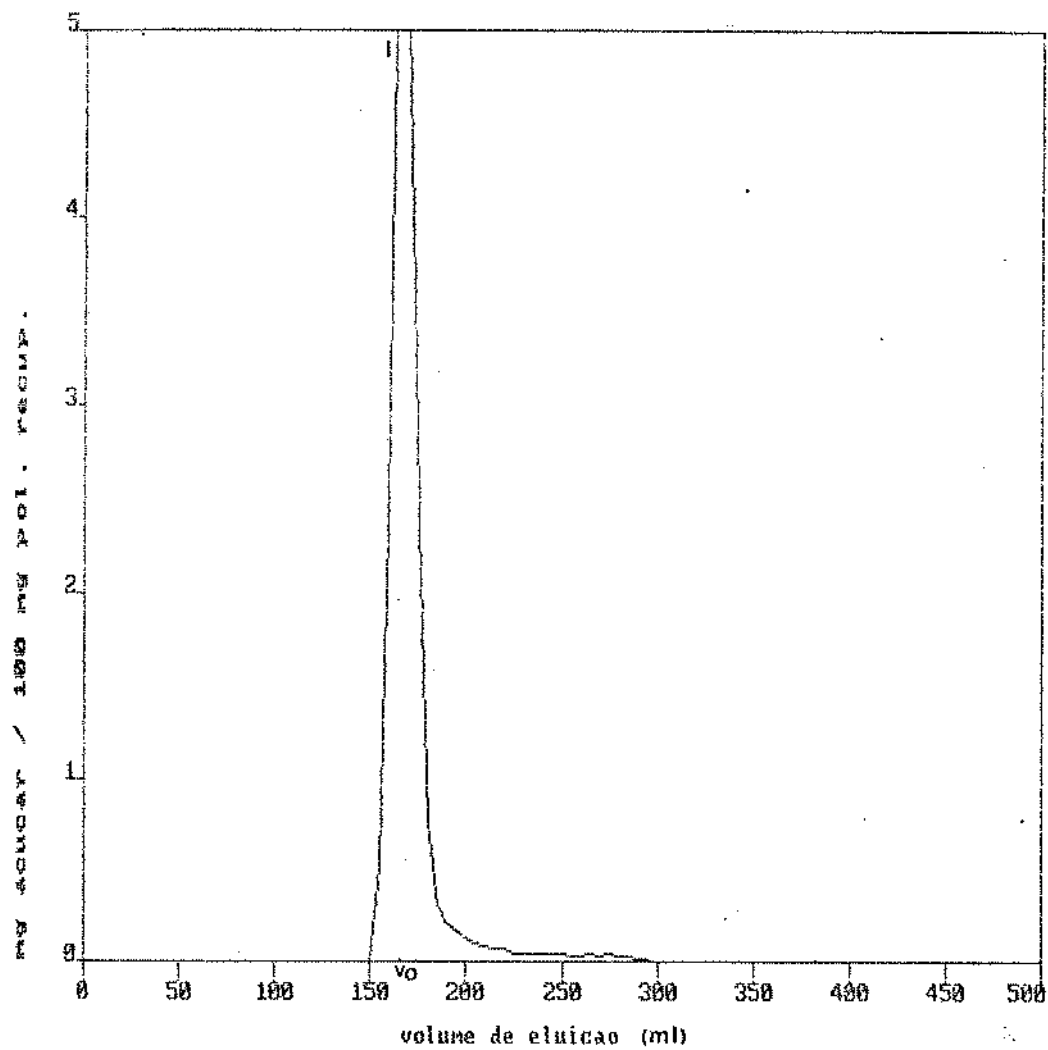


Figura 26: Padrão de eluição da amostra de amido de milho ceroso natural em gel Sephadex G-50  
 I: pico I, excluído em  $v_0 = 165$  ml

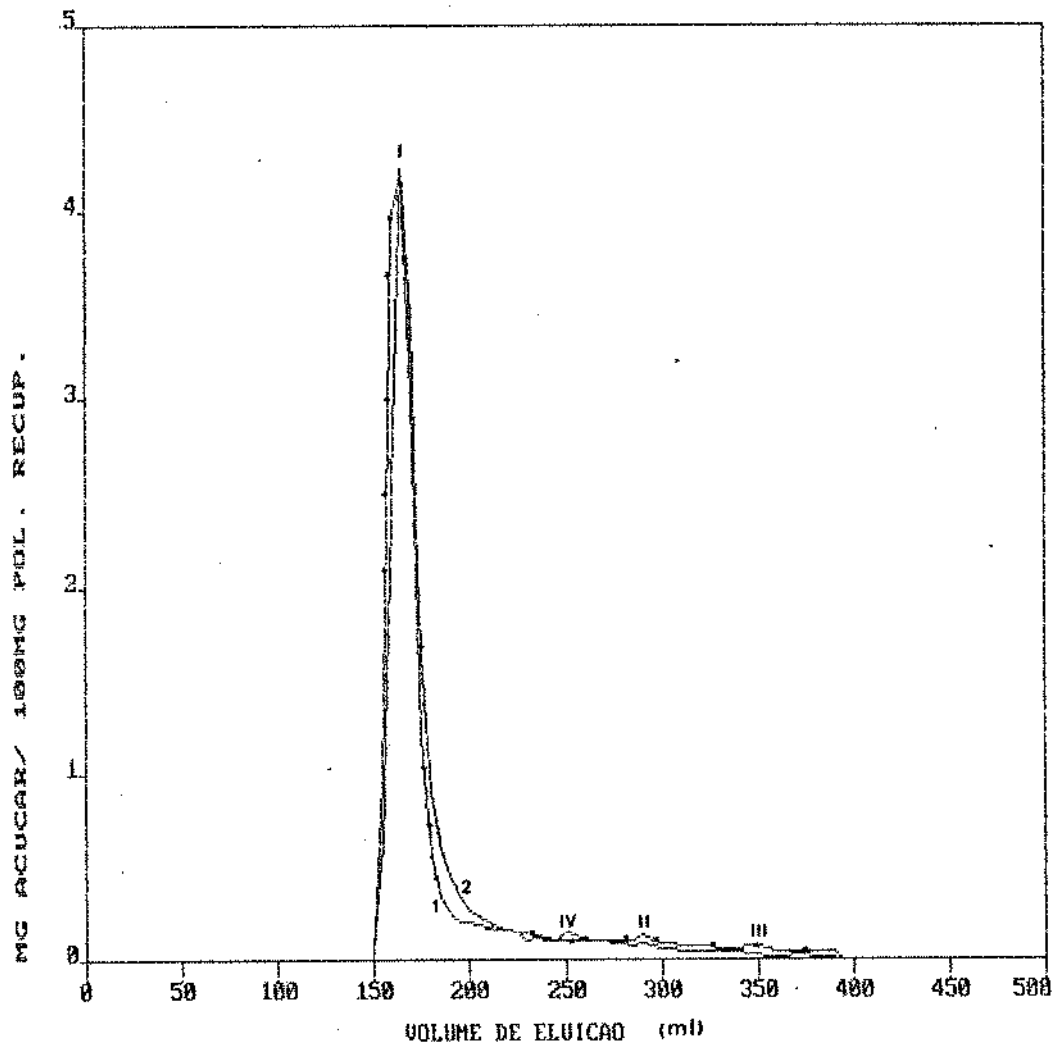


Figura 27: Padrão de eluição das amostras de amido de milho ceroso antes de qualquer ação da pululanase ou  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. amido submetido à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase(•••)

2. amido tratado termicamente à 27% de umidade e submetido à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase

I: pico I, excluído pelo gel em  $v_0 = 165$  ml, DP > 60

II: pico II a 290 ml, DP = 25

III: pico III a 350 ml, DP = 11

IV: pico IV a 250 ml, DP = 45

quanto o pico I diminuía. A partir de 56% de hidrólise, o pico I era completamente varrido do perfil e a maiores porcentagens de hidrólise, os componentes do pico II eram mais rapidamente hidrolisados que os do pico III. Finalmente esta última fração dominava o padrão de eluição.

O padrão de eluição da  $\alpha$ -glucana do amido ceroso tratado termicamente a 27% de umidade (Figura 27,2); mostrou um pico a 250 ml denominado pico IV e a permanência do pico a 290 ml, pico II. Este dado sugeriu que o tratamento térmico no amido ceroso foi capaz de romper algumas ligações resistentes do pico I, tornado a hidrólise mais acessível em certas áreas, o que provocou o aparecimento do pico IV. Além disso, o tratamento térmico também rompeu algumas ligações da fração III. Assim, esta fração encontrada no pico III de DP = 11, participaria das forças mais resistentes à hidrólise antes do tratamento térmico, porém romperia-se quando do tratamento térmico, tornando-se mais acessível à ação das enzimas. Isso explicaria o aumento da porcentagem de hidrólise para os amidos de milho ceroso tratado termicamente a 27% de umidade (de 56,28 para 67,21%).

A figura 28 mostra o padrão de eluição para as amostras de amido normal natural e submetida a tratamento térmico com 27% de umidade submetidas à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase. Um padrão diferente daquele encontrado para o amido ceroso foi observado para a  $\alpha$ -glucana do amido normal natural (Fig. 28,1) que mostrou um pico bastante acentuado à 390 ml (pico V) com DP = 7-8. O pico III observado no perfil da  $\alpha$ -glucana do amido ceroso natural também foi observado para a  $\alpha$ -glucana do amido normal, porém muito levemente. O pico V seria também originário da população I e faria parte de uma fração mais resistente à hidrólise enzimática, como acon-

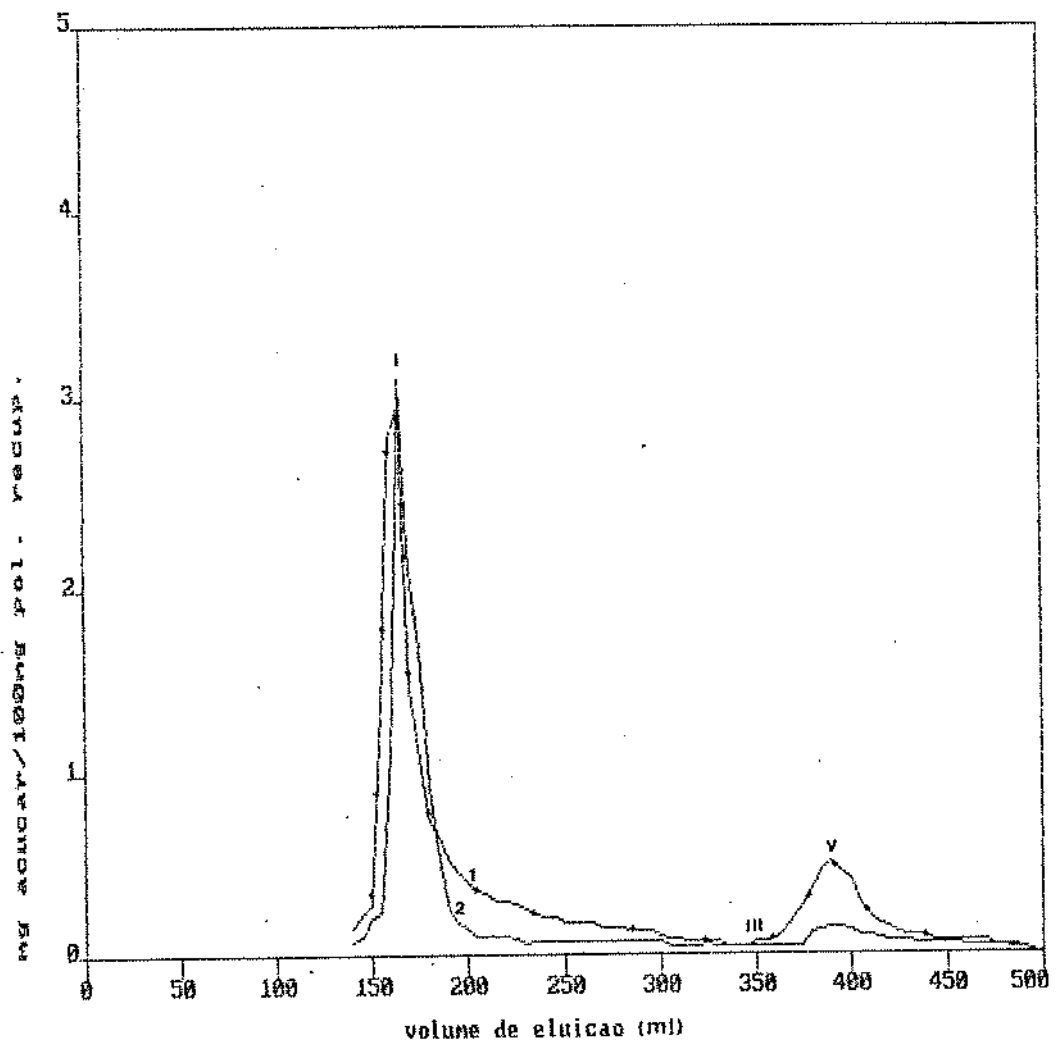


Figura 28: Padrão de eluição das amostras de amido de milho normal antes de qualquer ação da pululanase ou  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. amido submetido à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase (\*\*\*)
2. amido tratado termicamente à 27% de umidade e submetido à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase
  - I. pico I, excluído pelo gel em vo = 165 ml
  - III. pico a 350 ml, DP = 11
  - V. pico a 390 ml, DP = 7-8

teceu com as frações II e III para o amido ceroso. Estes resultados sugerem uma diferença no modo de ataque das enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase sobre os grânulos de amido de milho normal e ceroso. A presença dos picos I, III e V na  $\alpha$ -glucana do amido de milho normal natural sugere que a hidrólise ocorreu entre estas frações, em zonas mais susceptíveis ao ataque.

O padrão de eluição da  $\alpha$ -glucana do amido normal tratado termicamente (Fig. 28, 2) também mostrou a mesma fração existente no pico V de DP = 7-8, porém ocorreu o desaparecimento da fração III. Estes resultados sugerem que o tratamento térmico rompeu algumas ligações da população III, antes resistentes, criando regiões mais acessíveis à posterior hidrólise. No entanto, o tratamento térmico não foi capaz de romper as ligações que fazem parte da fração V, sendo esta, mais resistente à hidrólise e ao tratamento térmico.

#### 4.3.3.3.2. Permeação em gel dos amidos de milho ceroso e normal naturais e tratados termicamente à 27% de umidade e submetidos à ação da $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase após ação da pululanase e ação consecutiva da pululanase e $\beta$ -amilase

O padrão de eluição para o amido ceroso tratado enzimaticamente com  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase e submetido à ação da pululanase (Figura 29, 1), mostra uma distribuição trimodal com frações nos picos A (DP = 11), B (DP = 45) e C (DP = 17). A pululanase hidrolisa as ligações  $\alpha(1-6)$  não envolvidas na rede cristalina. Assim, estas três frações (A, B e C) representam cadeias de tamanhos diferentes envolvidas na rede cristalina.



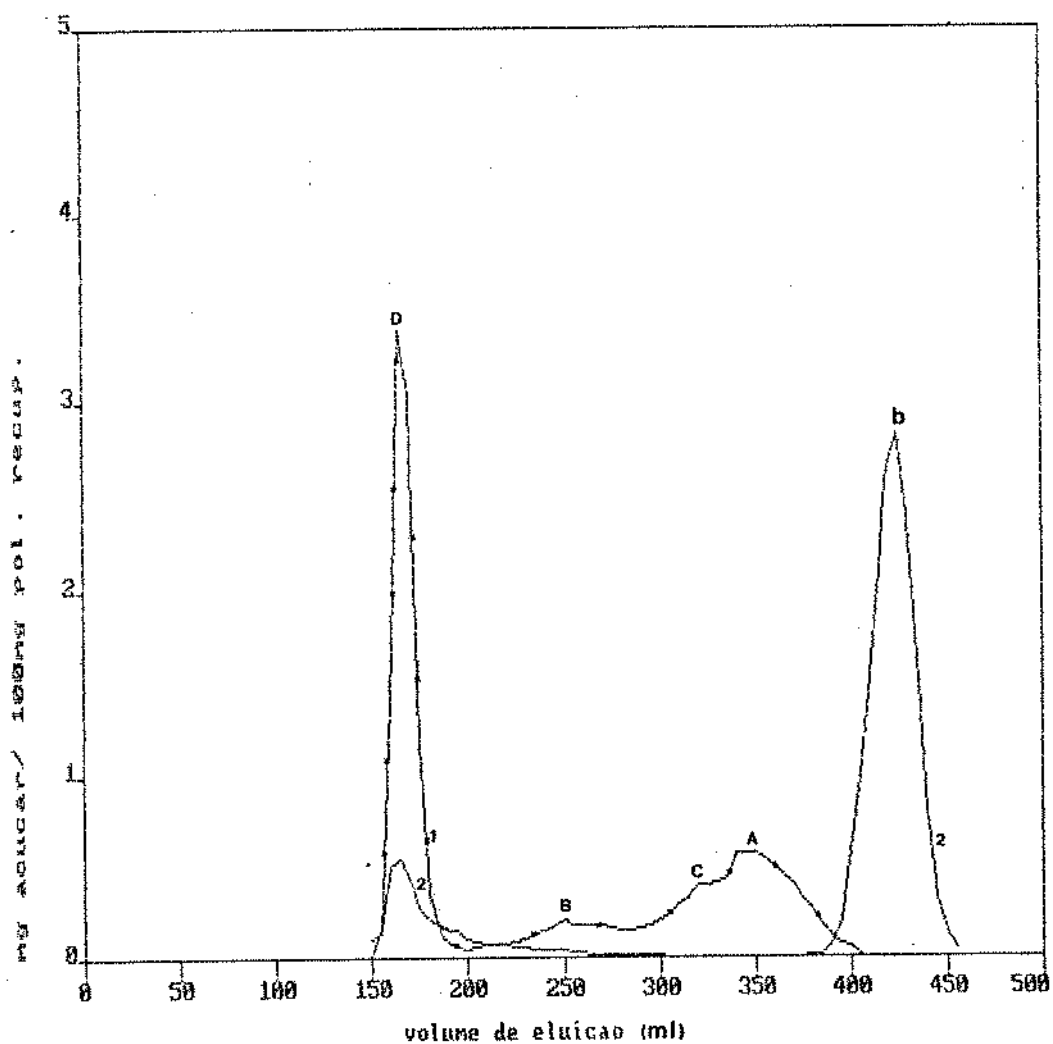


Figura 29: Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de milho ceroso tratadas enzimaticamente após ação da pululanase e/ou  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. após ação da pululanase (...)
2. após ação consecutiva da pululanase e  $\beta$ -amilase

A: pico a 350 ml, DP = 11  
 B: pico a 250 ml, DP = 45  
 C: pico a 318 ml, DP = 17  
 D: pico a 165 ml, DP > 60  
 b: pico a 425 ml, DP = 1-3

A ação consecutiva da pululanase e  $\beta$ -amilase ( $P_1\beta_1$ ), (Fig. 29, 2) transformaram as cadeias das frações A, B e C em glicose, maltose e maltotriose (figura 29, pico b). Estes resultados provam a linearidade de A, B e C, mas mostram que a pululanase não foi tão efetiva, já que uma pequena quantidade da fração I permaneceu após hidrólise da  $\beta$ -amilase, restando assim algumas  $\beta$ -dextrinas limite de alto peso molecular no pico D. A fração A que tem a mesma posição da fração III (à 350 ml) no amido hidrolisado com  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase consiste de cadeias lineares de DP = 11 e as frações intermediárias B e C contêm cadeias lineares de DP = 45 e 17, respectivamente. O pico D consiste de cadeias lineares e ramificadas de DP > 60 excluídas da matrix do gel. O aumento significativo do pico A, quando comparado com o pico III antes da desramificação resulta da contribuição de cadeias lineares originárias da desramificação de algumas cadeias da fração I, fração associada entre I e II e fração II.

O padrão de eluição do amido ceroso tratado termicamente e submetido à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, após ação da pululanase é mostrado na Figura 30 (1). Neste caso, o padrão apresentado mostra o pico A aumentando e os picos B e C diminuindo. Estes dados sugerem que as frações B e C estariam envolvidas na rede cristalina que se rompe a 27% de umidade. O tratamento consecutivo com  $\beta$ -amilase mostrou a linearidade dessas frações (Fig. 30, 2).

Para o amido normal tratado enzimaticamente com  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, a ação da pululanase mostrou também um perfil com três frações A, B e C (Figura 31, 1). O pico V apresentado antes da desramificação parece estar presente apesar de não se apresentar como um pico bem nítido. Estes resíduos são polímeros de cadeias re-

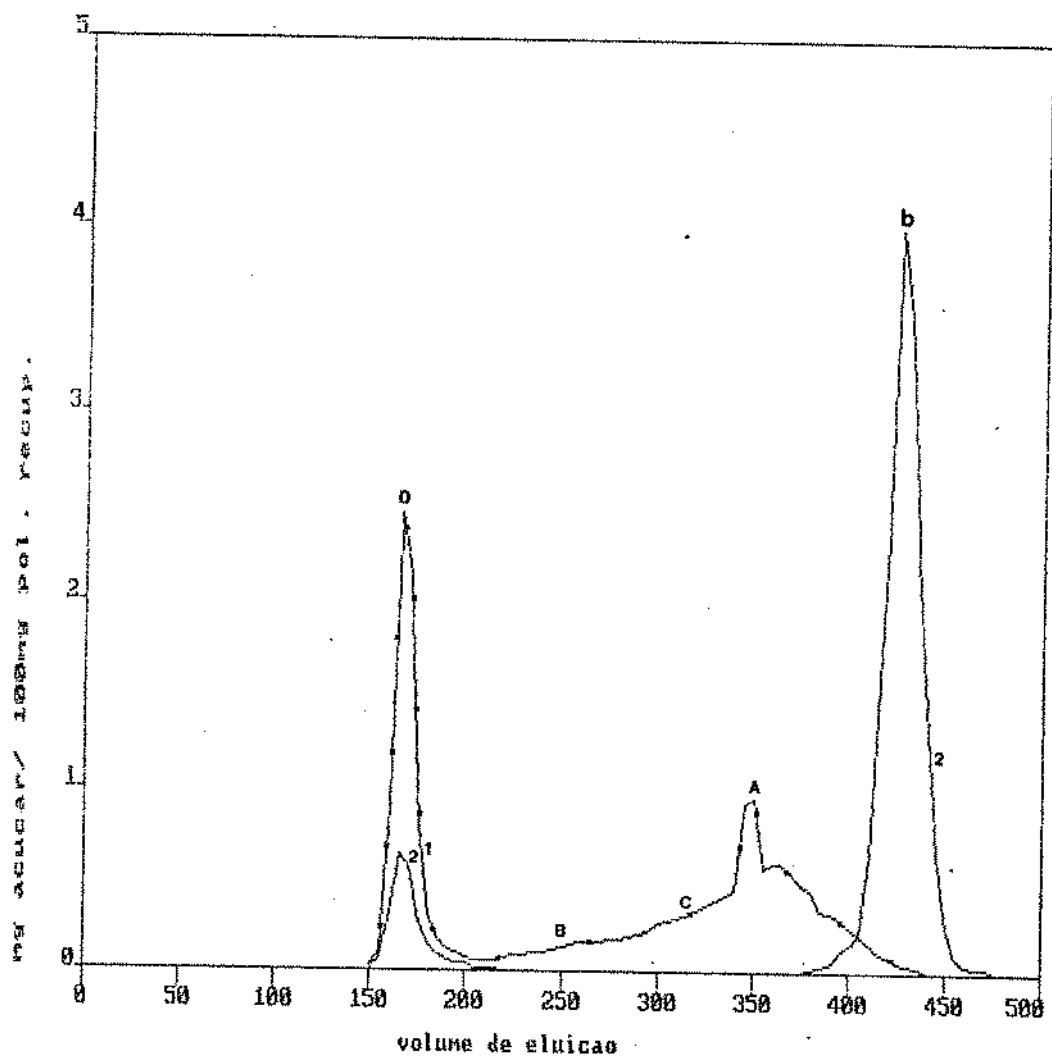


Figura 30: Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de milho ceroso tratadas térmica e enzimaticamente após ação da pululanase e/ou  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. após ação da pululanase (····)
  2. após ação consecutiva da pululanase e  $\beta$ -amilase
- A: pico a 350 ml, DP = 11  
 B: pico a 250 ml, DP = 45  
 C: pico a 318 ml, DP = 17  
 D: pico a 165 ml, DP > 60  
 b: pico a 425 ml, DP = 1-3

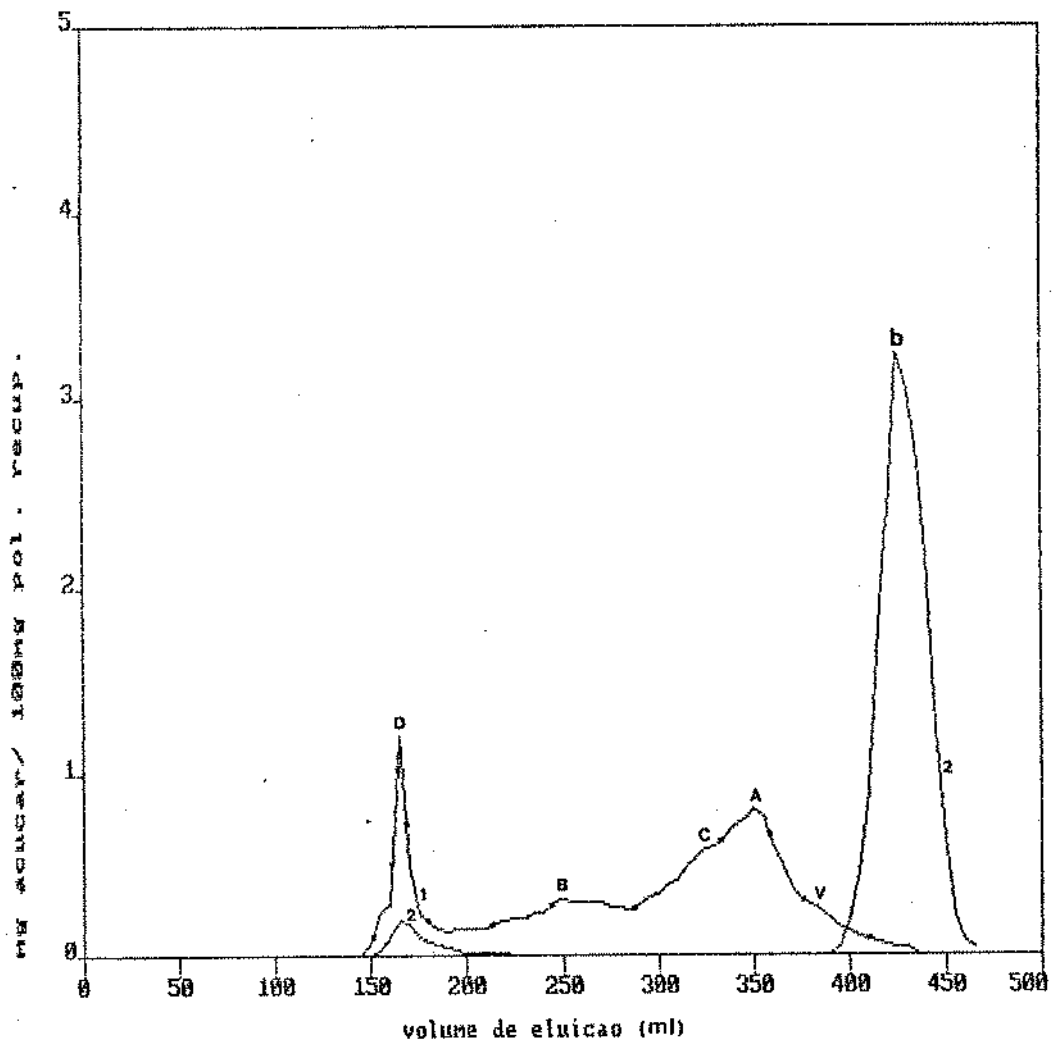


Figura 31: Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de milho normal tratadas enzimaticamente após ação da pululanase e/ou  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. após ação da pululanase (\*\*\*)

2. após ação consecutiva da pululanase e  $\beta$ -amilase

A: pico a 350 ml, DP = 11

B: pico a 250 ml, DP = 45

C: pico a 318 ml, DP = 17

D: pico a 165 ml, DP > 60

b: pico a 425 ml, DP = 1-3

V; pico a 390 ml, DP = 7-8

tas como demonstra o padrão de eluição deste amido após ação consecutiva com  $\beta$ -amilase (Figura 31, 2).

O amido normal tratado termicamente e enzimaticamente com  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, após ação da pululanase mostrou um padrão onde o pico B diminuiu com conseqüente aumento do pico A (Figura 32, 1). A exemplo do amido de milho ceroso, estes resultados sugerem que esta fração B também estaria envolvida na rede cristalina que se rompe quando o amido é submetido ao tratamento térmico ao nível de 27% de umidade. Além disso, o perfil cromatográfico deste amido mostrou a completa linearidade das frações A, B, C e D que desapareceram quando da ação da  $\beta$ -amilase, com conseqüente aparecimento de um pico bastante resolvido à 425ml (pico b) (Figura 32, 2). Esses dados indicam que a enzima pululanase foi mais efetiva para o amido normal na sua atuação, ou o tratamento térmico provocou o rompimento das ligações internas do amido melhorando a atuação da pululanase na  $\alpha$ -glucana.

4.3.3.3.3. Pemeação em gel dos amidos de milho ceroso e normal naturais e tratados termicamente a 27% de umidade e submetidos à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, após ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase; e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase

A ação da  $\beta$ -amilase sobre a  $\alpha$ -glucana do amido ceroso natural resultou na completa exclusão pelo gel da  $\beta$ -dextrina limite em  $V_0 = 165$  ml (pico E) e o aparecimento dos produtos da reação em um pico bem nítido a 425 ml (pico b) (Figura 33, 1). A ação consecutiva da pululanase sobre este resíduo mostrou o desaparecimento da

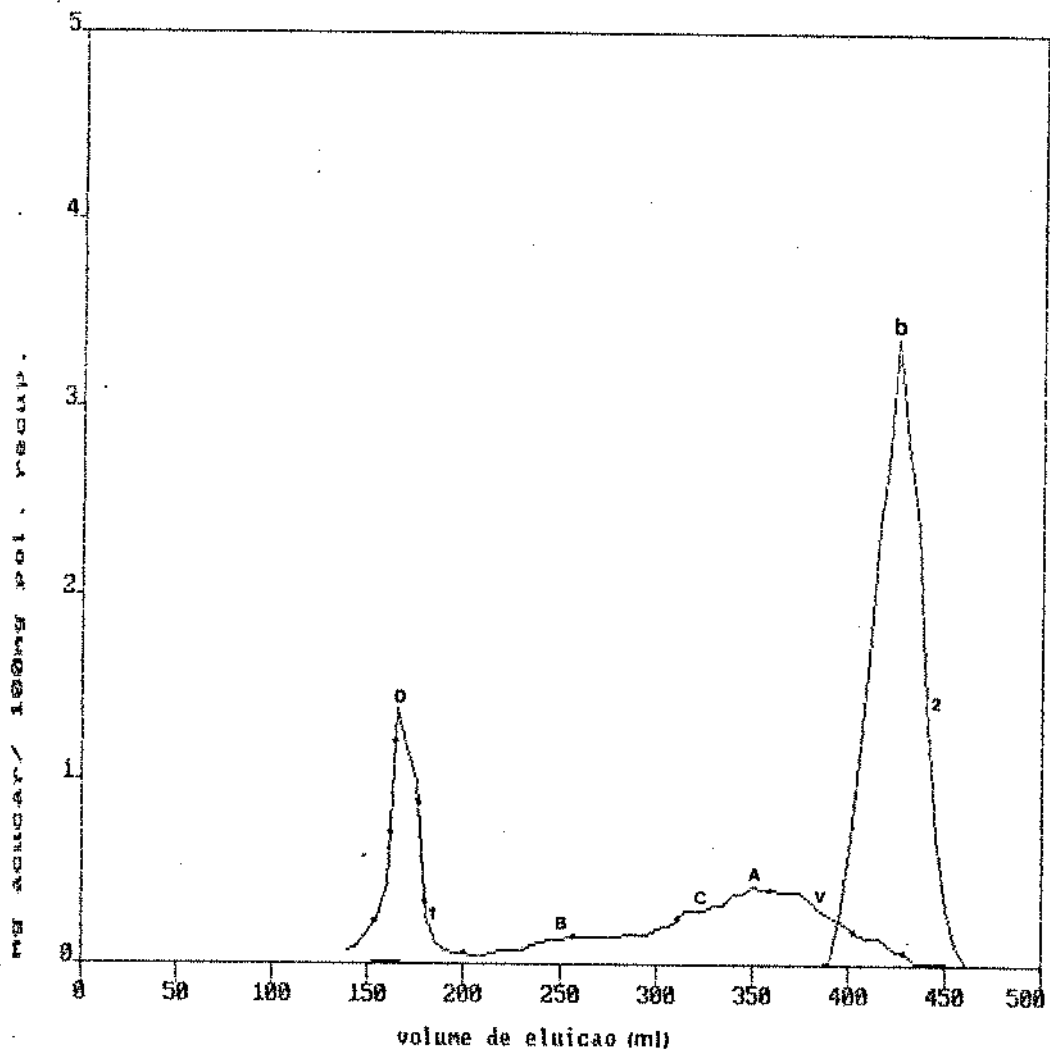


Figura 32: Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de milho normal tratadas térmica e enzimaticamente após ação da pululanase e/ou  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. após ação da pululanase (...)
  2. após ação consecutiva da pululanase e  $\beta$ -amilase
- A: pico a 350 ml, DP = 11  
 B: pico a 250 ml, DP = 45  
 C: pico a 318 ml, DP = 17  
 D: pico a 165 ml, DP > 60  
 b: pico a 425 ml, DP = 1-3  
 V: pico a 390 ml, DP = 7-8

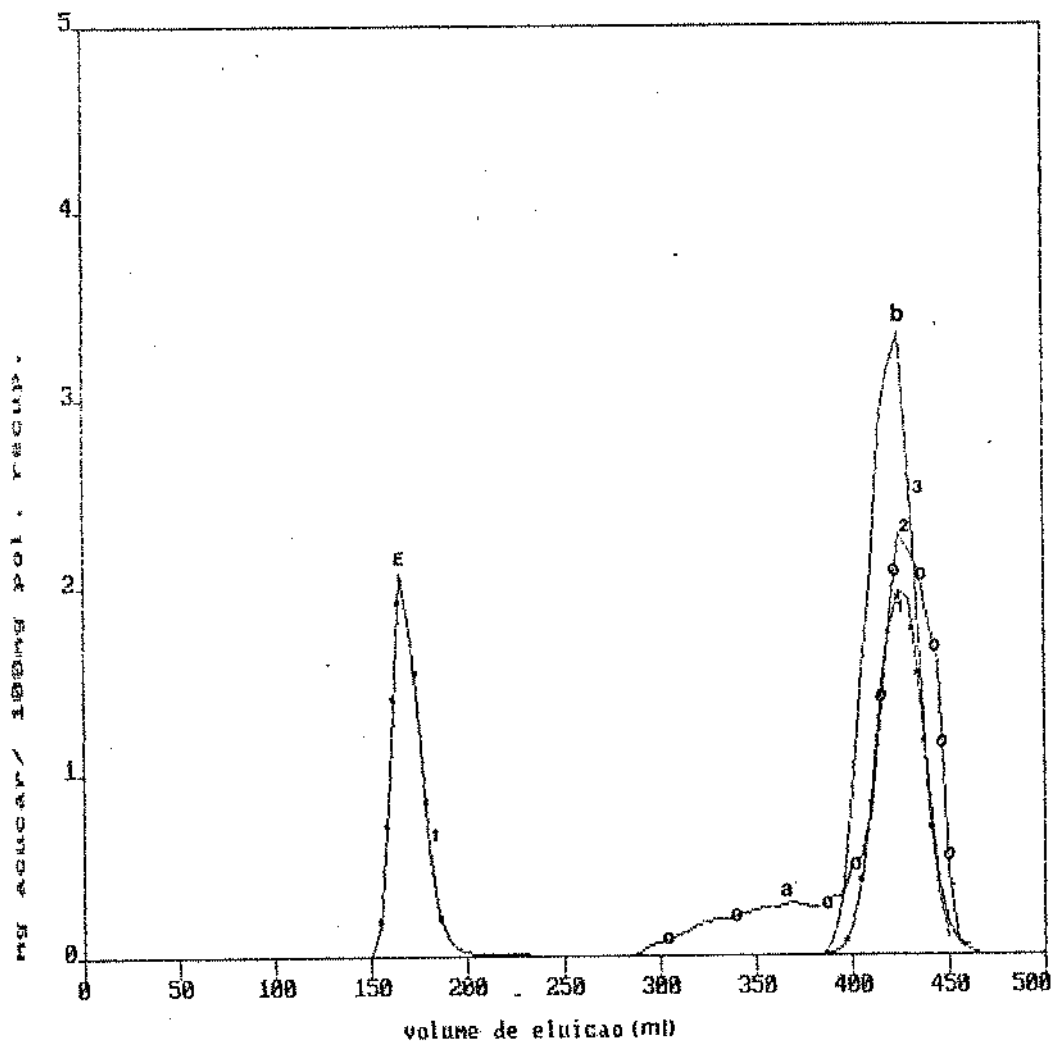


Figura 33: Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de milho ceroso tratadas enzimaticamente após ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. após ação da  $\beta$ -amilase (---)
2. após ação consecutiva da  $\beta$ -amilase e pululanase (o o o)
3. após ação consecutiva da  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase

E: pico à 165 ml, DP > 60 ( $\beta$ -dextrina limite)  
a: cauda entre 300 - 400 ml  
b: pico à 425 ml, DP = 1-3

$\beta$ -limite dextrina indicando que o encurtamento das cadeias da  $\alpha$ -glucana com  $\beta$ -amilase propiciou a hidrólise total pela pululanase resultando em um pico equivalente à maltose, maltotriose e glicose a 425 ml (pico b) e uma cauda (a) entre 300 e 400 ml (Figura 33, 2). É possível que esses resíduos da cauda sejam provenientes de cadeias ramificadas do interior da molécula. A ação posterior da  $\beta$ -amilase transformou os resíduos da cauda nos produtos apresentados no pico b (Figura 33, 3).

Os padrões de eluição para o amido de milho ceroso tratado termicamente e enzimaticamente com posterior ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase, e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase mostraram resultados semelhantes aos do amido de milho ceroso natural (Figura 34, 1, 2, 3).

Padrões cromatográficos análogos também foram obtidos para as  $\alpha$ -glucanas dos amidos de milho normal tratados ou não termicamente (Figuras 35 e 36) (1,2,3).

Foi possível concluir que existem diferenças nos resíduos dos amidos ceroso e normal tratados com  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase. No resíduo do amido de milho ceroso apareceram duas frações a 290 e 350 ml (picos II e III) muito pequenas que não são susceptíveis ao ataque da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, indicando que estas frações fazem parte das zonas cristalinas do amido. Elas também fazem parte das áreas cristalinas no amido normal. No entanto, a presença do pico V a 390 ml na sua  $\alpha$ -glucana sugere que além das duas cadeias não susceptíveis à hidrólise, existiria outra que também participaria das zonas cristalinas do amido normal. Não existem dados que nos permitam concluir se estas cadeias existiriam, no grânulo



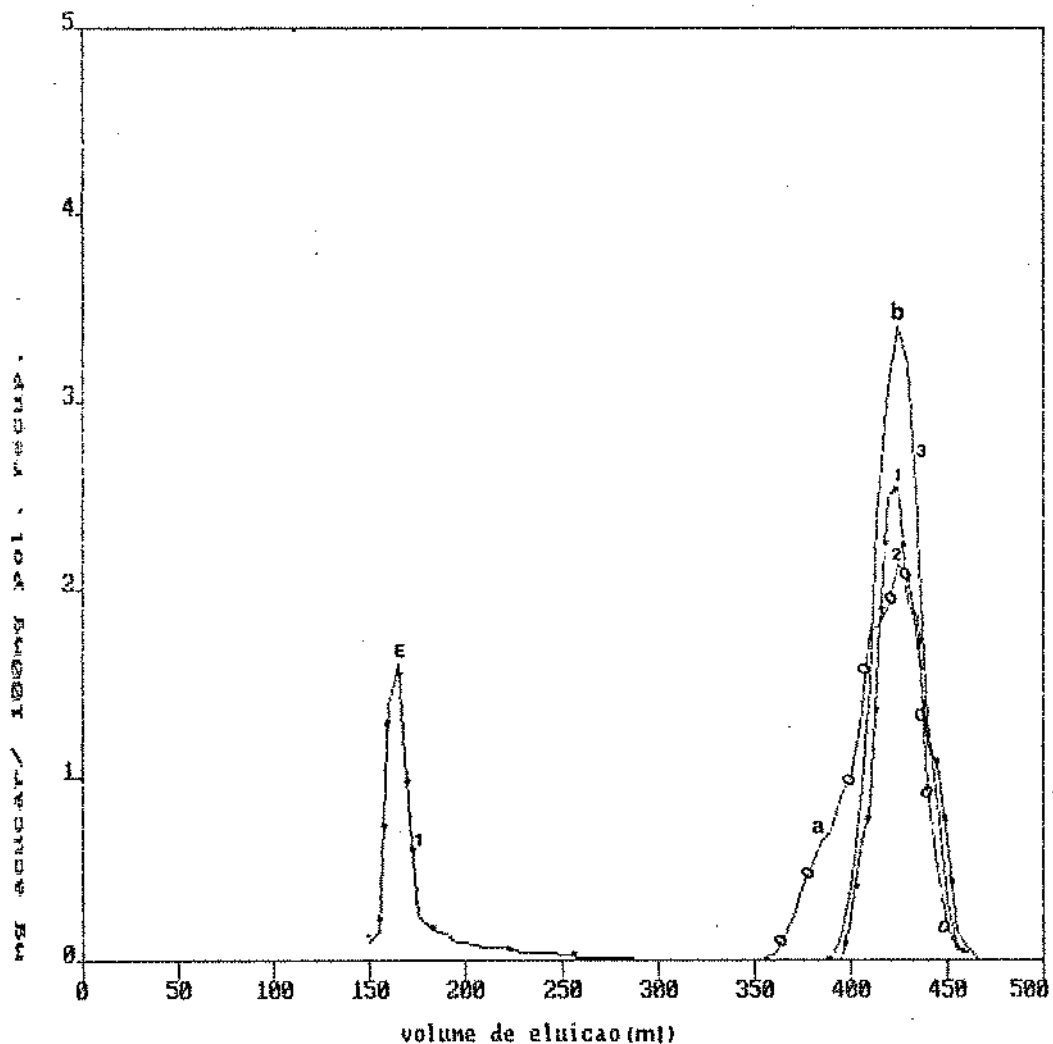


Figura 34: Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de milho ceroso tratadas térmica e enzimaticamente após ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. após ação da  $\beta$ -amilase (···)
2. após ação consecutiva da  $\beta$ -amilase e pululanase (o'oo)
3. após ação consecutiva da  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase

E: pico a 165 ml, DP > 60 ( $\beta$ -dextrina limite)  
a: cauda entre 300 - 400 ml  
b: pico a 425 ml, DP = 1-3

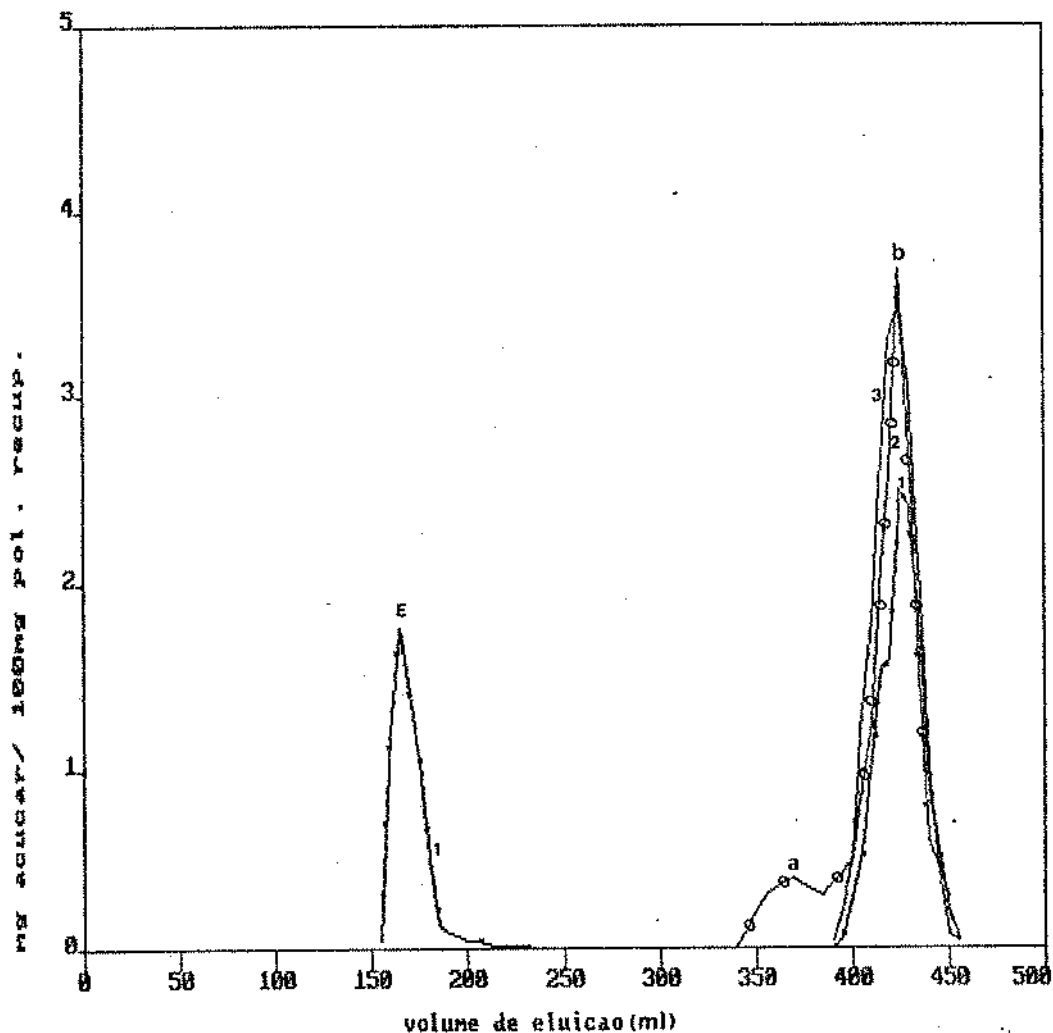


Figura 35: Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de milho normal tratadas enzimaticamente após ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. após ação da  $\beta$ -amilase(...)
2. após ação consecutiva da  $\beta$ -amilase e pululanase (ooo)
3. após ação consecutiva da  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase

E: pico a 165 ml, DP > 60 ( $\beta$ -dextrina limite)  
a: cauda entre 300 - 400 ml  
b: pico a 425 ml, DP = 1-3

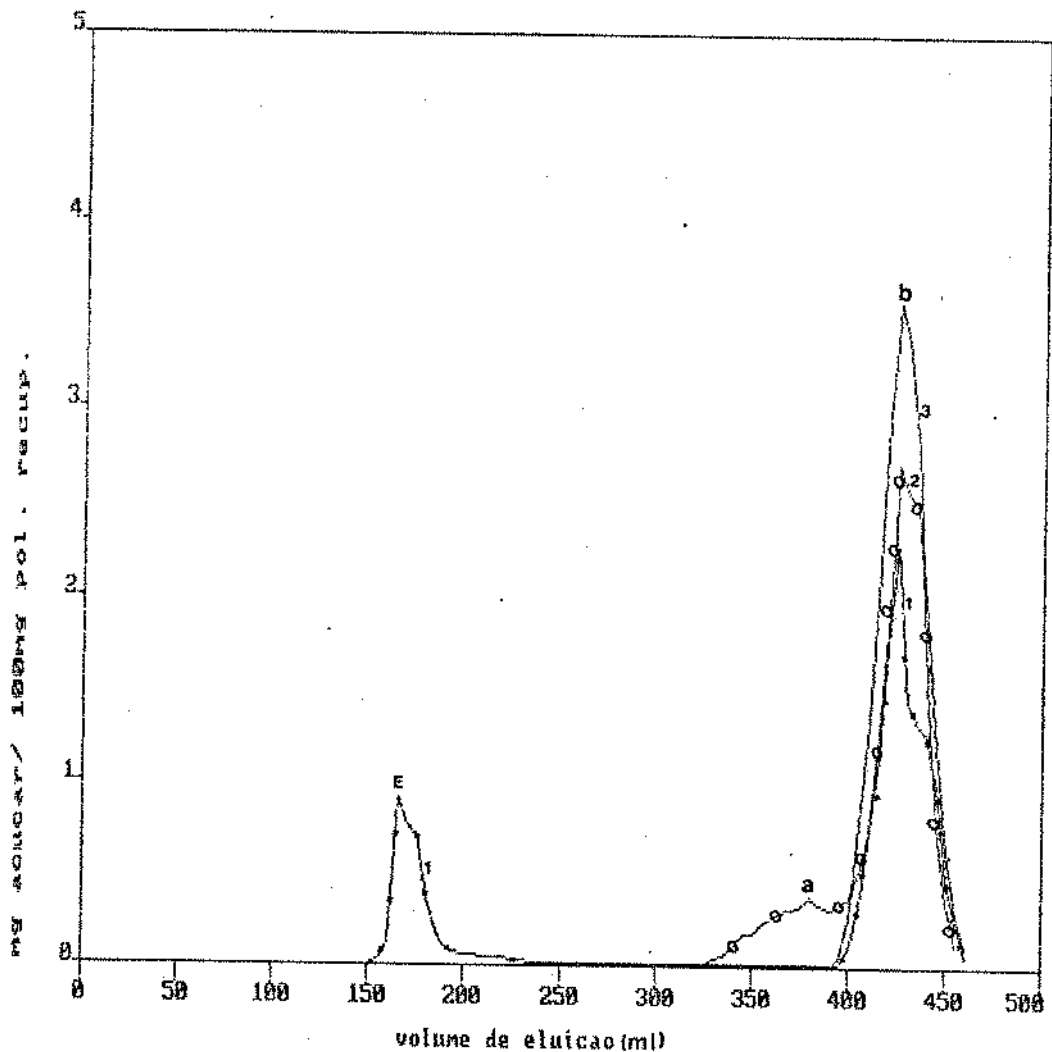


Figura 36: Padrão de eluição das frações de carboidratos das amostras de milho normal tratadas térmica e enzimaticamente após ação da  $\beta$ -amilase,  $\beta$ -amilase e pululanase e  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase em gel Sephadex G-50

1. após ação da  $\beta$ -amilase (...)
2. após ação consecutiva da  $\beta$ -amilase e pululanase (ooo)
3. após ação consecutiva da  $\beta$ -amilase, pululanase e  $\beta$ -amilase

E: pico a 165 ml, DP > 60 ( $\beta$ -dextrina limite)  
a: cauda entre 300 - 400 ml  
b: pico a 425 ml, DP = 1-3

lo, separadas das primeiras ou intercaladas por uma zona susceptível à hidrólise que, submetida à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase a separaria das demais. Independente desta observação, a presença do pico à 390 ml (pico V) sugere o arranjo cristalino distinto entre o amido ceroso e normal. Por outro lado, o tratamento térmico a 27% de umidade não foi capaz de romper totalmente suas ligações e essa fração continuou presente após tratamento térmico e enzimático como regiões não susceptíveis à hidrólise, formando, conseqüentemente, rede cristalina fortemente associada.

## V. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos neste trabalho concluiu-se que:

. O tratamento térmico a 100°C/16horas, com baixa umidade, provocou aumento de cristalinidade para os amidos normal e ceroso tratados a 18% de umidade, sugerindo rearranjo das moléculas de amido com o fortalecimento das ligações internas dos grânulos e, conseqüentemente, maior grau de associação das cadeias de amido. Essa conclusão apoiou-se também nos resultados de menores IAA, maiores intensidades dos picos dos difractogramas de raios X e pela baixa suscetibilidade destes amidos à ação da  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase. Para os amidos tratados a 27% de umidade, o tratamento térmico, provavelmente, provocou rompimento seguido de rearranjo das ligações internas dos grânulos fazendo com que ocorresse alguma degradação do amido, aumentando significativamente a área acessível à amilólise. Os grânulos de amido de milho normal foram mais afetados pelo tratamento que os grânulos de amido ceroso. No entanto, o tratamento térmico com baixa umidade reteve, em todos os casos, o padrão de cristalinidade tipo A para os amidos de milho normal e ceroso.

. O tratamento térmico com baixa umidade não provocou mudanças no tamanho ou forma dos grânulos de amido de milho normal e ceroso. As micrografias ópticas das amostras de amido submetidas à ação enzimática com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase mostraram extensa corrosão, principalmente no sentido radial. As micrografias ópticas dos grânulos de amido de milho normal tratados termicamente a 18% de umidade e submetidos à ação enzimática mostraram que apenas alguns grânulos

estavam corroídos pelas enzimas, enquanto que para as amostras tratadas a 27% de umidade, a maioria dos grânulos apresentaram-se extensivamente corroídos e com aparência entumescida

. Tanto o efeito do tratamento térmico com baixa umidade como a ação das enzimas ocorreram preferencialmente nas zonas amorfas dos grânulos de amido, como pode ser observado através das micrografias sob luz polarizada dos amidos de milho normal, tratados termicamente à 18 e 27% de umidade e submetidos à ação enzimática, que apresentaram a "cruz de malta" característica dos grânulos de amido natural.

. Os grânulos de amido natural possuem estrutura porosa e o ataque enzimático provocou extensa corrosão através de canais radiais que ocorreram pela formação de poros de forma cilíndrica. A hidrólise enzimática sobre os grânulos de amido de milho normal e ceroso tratados termicamente a 27% de umidade, além da corrosão através de canais radiais, provocou maior quebra dos grânulos como se a estrutura restante se rompesse com mais facilidade. Os grânulos de amido de milho normal e ceroso submetidos ou não ao tratamento térmico e sob ação das enzimas amilolíticas apresentaram, quando extensivamente corroídos, a conhecida estrutura disposta em camadas concêntricas alternadamente claras e escuras.

. Existem diferenças nos resíduos dos amidos de milho ceroso e normal tratados com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase. No resíduo do amido de milho ceroso os perfis de eluição mostraram duas frações a 290 e 350 ml (picos II e III), respectivamente, que não eram suscetíveis ao ataque da  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase, indicando que faziam

parte das zonas cristalinas do amido. Estas frações também faziam parte das áreas cristalinas no amido normal. No entanto, a presença do pico V a 390 ml na  $\alpha$ -glucana do amido de milho normal sugeriu que além das duas cadeias não suscetíveis à hidrólise, existiria outra que também participaria das zonas cristalinas deste amido. A presença deste pico a 390 ml sugeriu o arranjo cristalino distinto entre o amido de milho ceroso e o normal. Por outro lado, o tratamento térmico a 27% de umidade não foi capaz de romper totalmente suas ligações e esta fração continuou presente após tratamento térmico e enzimático como regiões não suscetíveis à hidrólise formando, conseqüentemente, rede cristalina fortemente associada.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AACC - AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Approved methods of the american association of cereal chemists. 7<sup>a</sup> ed. St. Paul, Minnesota, v. 1 e 2 ; 1976.

ABE, J.; NAKAJIMA, K.; NAGANO, H.; HIZUKURI, S. & OBATA, K. Properties of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus* SP K-27: A synergistic action of glucoamylase and alpha-amylase. *Carbohydrate Research* 175: 85-92; 1988.

ATWELL, W.A.; HOSENEY, R.C. & LINEBACK, D.R. Debranching of wheat amylopectin. *Cereal Chemistry* 57 (1): 12-16; 1980.

BERTOFT, E. & KULP, S.E. A gel filtration study on the action of barley  $\alpha$ -amylase isoenzymes on granular starch. *Journal of the Institute of Brewing* 92 (1): 62-72; 1986.

BERTOFT, E. Investigation of the fine structure of amylopectin using alpha-amylase and beta-amylase. *Carbohydrate Research* 189: 195-207; 1989.

BILIADERIS, C.G.; GRANT, D.R. & VOSE, J.R. Structural characterization of legume starches. I. Studies on amylose, amylopectin and beta-limit dextrans. *Cereal Chemistry* 58 (6): 496-502; 1981.



- BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal Physiology Pharmacology* 69: 60-78; 1991.
- BRUNN, H. & HENRISKNAS, H. A gel chromatographic study of molecular weight distribution in native wheat starch and its oxidation products. *Starch/Starke* 29(4): 122-126; 1977.
- CAESAR, G.V. Dextrinization. In: KERR, R.H., *Chemistry and Industry of Starch*. New York, Academic Press Inc. , 1950. 2<sup>o</sup> ed., p.345-355.
- CONE, J.W. & WOLTERS, M.G.E. Some properties and degradability of isolated starch granules. *Starch/Starke* 42 (8): 298-301; 1990.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.R.; ROBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-354; 1956.
- DUPRAT, F.; GALLANT, D.; GUILBOT, A.; MERCIER, C. & ROBIN, J. L'Amidon. In: COSTES, C. , *Polymères Vegetaux: Polimères pariétaux et alimentaires non azotés*. Biochimie Appliquée, Gauthier-Villars 1980, p. 177-231.
- EVERS, A.D. & McDERMOTT, E.E. Scanning electron microscopy of wheat starch. II. Structure of granule modified by alpha-amylolysis. Preliminary report. *Starch/Starke* 22 (1): 23-26; 1970.

EVERS, A.D.; GOUGH, B.M. & PYBUS, J.N. Scanning electron microscopy of wheat starch. IV. Digestion of large granules by glucoamylase of fungal (*Aspergillus niger*) origin. *Starch/Starke* 23 (1):16-18; 1971.

FRANCO, C.M.L. & CIACCO, C.F. Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part 1. Study of the conditions of hydrolysis. *Starch/Starke* 39 (12): 432-435; 1987.

FRANCO, C.M.L., CIACCO, C.F. & TAVARES, D.Q. Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part 2. Study of the granular structure of starch. *Starch/Starke* 40 (1): 29-32; 1988.

FRANCO, C.M.L. & CIACCO, C.F. Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules. Effect of the size of the granules. *Starch/Starke* 44 (11): 422-426; 1992.

FRANCO, C.M.L. & CIACCO, C.F. Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules. Effect of the heat-moisture treatment. (Em fase de elaboração).

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. *Journal of Animal Science* 37 (4): 1048-1061; 1973.

FRENCH, D. Chemistry and biochemistry of starch. In: WHELAN, W. L. *Biochemistry: Biochemistry of Carbohydrates*; (Biochemistry Series

One); London, 1975, v.5, p. 269-326.

FRENCH, D. Organization of starch granules. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. & PASCHAL, E.F. , *Starch: Chemistry and Technology*; London, Academic Press Inc., 1984. cap 7 , p. 183-247; 2<sup>a</sup> ed.;

GALLANT, D.; MERCIER, C. & GUILBOT, A. Electron microscopy of starch granules modified by bacterial  $\alpha$ -amylase. *Cereal Chemistry* 49 (3): 354-365; 1972.

GALLANT, D.; AVMAITRE, A. & GUILBOT, A. Dégénération in vitro de l'amidon par le suc pancréatique. Etude par microscopie électronique à transmission et à balayage. *Starch/Starke* 25 (2): 56-64; 1973.

GALLANT, D.; BEWA, G.H.; BOUCHET, B.; SZYLIT, D. & SEALY, L. On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starch. *Starch/Starke* 34 (8): 255-262; 1982.

GERNAT, Ch.; RADOSTA, S.; DAMASCHUN, G. & SCHIERBAUM, F. Supramolecular structure of legume starches revealed by X-ray scattering. *Starch/Starke* 42 (5): 175-178; 1990.

GIDLEY, M.J. & BOCIEK, S.M. Molecular organization in starches: A <sup>13</sup>CCP/ MAS NMR study. *Journal of American Chemistry Society* 107: 7040-7044; 1985.

- GIDLEY, M.J. Factors affecting the crystalline type (A -C) of native starches and model compounds: A rationalisation of observed effects in terms of polymorphic structures. *Carbohydrate Research* 161: 301-304; 1987.
- GUNJA-SMITH, Z.; MARSHALL, J.J.; MERCIER, C.; SMITH, E.E. & WHELAN, W.J. A revision of the Meyer-Bernfeld model of glycogen and amylopectin. *FEBS Letters* 101: 96-100; 1970.
- HASKA, N. & OHTA, Y. Glucose production from treated sago starch granules by raw starch digesting amylase from *Penicillium brunneum*. *Starch/Starke* 43 (3): 102-107; 1991.
- HASKA, N. & OHTA, Y. Mechanism of hydrolysis of the treated sago starch granules by raw starch digesting amylase from *Penicillium brunneum*. *Starch/Starke* 44 (1): 25-28; 1992.
- HIZUKURI, S.; KANEKO, T. & TAKEDA, Y. Measurement of the chain length of amylopectin and its relevance to the origin of crystalline polymorphism of starch granules. *Biochimica et Biophysica Acta* 760: 188-191; 1983.
- HIZUKURI, S.; Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins and its significance. *Carbohydrate Research* 147 (2): 342-347; 1986.
- HOOD, L.F. & MERCIER, C. Molecular structure of unmodified and chemically modified manioc starches. *Carbohydrate Research* 61:

53-66; 1978.

IKAWA, Y. & FUWA, H. Changes in some properties of starch granules of maize having amylose extender gene by amylase attack. *Starch/Starke* 32 (5): 145-149; 1980.

IKAWA, Y.; GLOVER, D.V.; LAFAYETE, W.; IIDA, M.; TAKAYA, T. & FUWA, H. Properties of residual starches of sugary-2 and sugary-2 opaque-2 maize following amylase hydrolysis. *Starch/Starke* 34 (2):44-49; 1982.

IMBERTY, A.; BULEON, A.; TRAN, V. & PEREZ, S. Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch/Starke* 43 (10): 375-384; 1991.

KASSEMBECK, von P. Beitrag zur Kenntnis der Verteilung von Amylose und Amylopektin in Starkekornern. *Starch/Starke* 30 (2): 40-46; 1978

KULP, K. & LORENZ, K. Heat-moisture treatment of starches. I. Physicochemical properties. *Cereal Chemistry* 58 (1): 46-48; 1981.

LEACH, H.W. & SCHOCH, T.J. Structure of the starch granules. II. Action of various amylases on granular starches. *Cereal Chemistry* 38 (1): 34-46; 1961

LEELAVATHI, K. & INDRANI, D. Amylograph pasting behaviour of cereal and tuber starches. *Starch/Starke* 39 (11): 378-381; 1987.

- LII, C-Y. & LINEBACK, D.R. Characterization and comparison of cereal starches. *Cereal Chemistry* 54 (1): 138-149; 1977.
- LINEBACK, D.R. The starch granule: Organization and properties. *Bakers Digest* 58 (2): 16-21; 1984.
- LINKO, Y.Y.; VOURIEN, V.; OLKKU, J. & LINKO, P. The effect of HTST extrusion on retention of cereal amylose activity and on enzymatic hydrolysis of barley starch. In: LINKO, P. & LARINKAN, Y., *Food Processing Engineering*, London, Applied Science Publishers. 1980, v.2; p. 210-223.
- LORENZ, K. & KULP, K. Cereal and root starch modification by heat-moisture treatment. I. Physico-chemical Properties. *Starch/Starke* 34 (2): 50-54; 1982.
- MacGREGOR, A.W. & MORGAN, J.E. Structure of amylopectins isolated from large and small starch granules of normal and waxy barley. *Cereal Chemistry* 61 (3): 222-228; 1984.
- MACMASTERS, M.M. Microscopic techniques for determining starch granule. In: WHISTLER, R.L., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, IV Starch. N.Y., London, Academic Press. 1964. p. 233-240.
- MANNERS, D.J. & MATHERSON, N.K. The fine structure of amylopectin. *Carbohydrate Research* 90: 99-110; 1981.

- MANNERS, D.J. Recent development in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers* 11: 87-112; 1989.
- MAZURS, E.G.; SCHOCH, T.J. & KITE, F.E. Graphical analysis of the Brabender viscosity curves of various starches. *Cereal Chemistry* 34 (3): 141-152; 1957.
- MERCIER, C. The fine structure of corn starches of various amylose-percentage: waxy, normal and amylo maize. *Starch/Starke* 25 (3): 78-83; 1973.
- MEYER, K.H. & BERNFELD, P. Recherches sur l'amylopectine. *Helv. Chim. Acta* 23: 875-879; 1940.
- MIAH, M.N. & UEDA, S. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part 2. Enzymatic and physicochemical properties of three forms of glucoamylase. *Starch/Starke* 29 (7): 235-237; 1977.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31 (3): 426-428; 1959.
- MITCHELL, G.A. Methods of starch analysis. *Starch/Starke* 42(4): 131-134; 1990.
- NIKUNI, Z. Studies on starch granules. *Starch/Starke* 30 (4): 105-111; 1978.

NODA, T.; TAKAHATA, Y.; NAGATA, T. & MONMA, M. Digestibility of sweet potato raw starches by glucoamylase. *Starch/Starke* 44 (1): 32-35; 1992.

OSMANN, E. Starch in the food industry. In: WHISTLER, R.L., *Starch: Chemistry and Technology*. London, Academic Press., 1967. v.2.

OOSTERGETEL, G.T. & van BRUGGEN, E.F.G. On the origin of low angle spacing in starch. *Starch/Starke* 41 (9): 331-335; 1989.

PHARMACIA FINE CHEMICALS (Gel filtration - theory and practice), Sweden, 1982. Catálogo, p.64.

RAMADAS, U.B.; PARAMAHANS, S.V. & THARANATHAN, R.N. Scanning electron microscopy of enzyme-digested starch granules. *Starch/Starke* 35 (8): 261-265; 1983.

RASPER, V. Theoretical aspects of amylographology. In: TRIPPLES, K.H., *Amylograph Handbook*. Physical Testing Methods Committee & American Association of Cereal Chemists; 1980. p. 1-5.

ROBIN, J.P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R. & GUILBOT, A. Lintnerized starches gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry* 51 (3): 389-406; 1974.

ROBIN, J.P.; MERCIER, C.; DUPRAT, F.; CHARBONNIERE, R. & GUILBOT, A. Amidons lintnésés. Etudes chromatographique et enzymatique



des résidus insolubles provenant de l'hydrolyse chlorhydrique d'amidons de céréales, en particulier de maïs cireux. *Starch/Starke* 27 (2): 36-45; 1975.

SANDSTEDT, R.M.; KNEEN, E. & BLISH, M. J. A standardized wohlgemuth procedure for alpha-amylase activity. *Cereal Chemistry* 16 (6): 712-723; 1939.

SANDSTEDT, R.M.; STRAHAN, D.; UEDA, S. & ABBOT, R.C. The digestibility of high-amylose corn starches compared to that of other starches the apparent effect of the ae gene on susceptibility to amylase action. *Cereal Chemistry* 39 (2): 123-131; 1962.

SCHOCH, T.J. Preparation of starch and the starch fractions. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.D., *Methods in Enzymology*, London and N.Y., Academic Press, 1957. v. 3, p. 5-8.

SCHOCH, T.J. & MAYWALD, E.C. Microscopic examination of modified starches. *Analytical Chemistry* 28 (3): 382-387; 1956.

SCHOCH T.J. & MAYWALD, E.C. Preparation and properties of various legume starches. *Cereal Chemistry* 45 (6): 565-573; 1968.

SHETTY, R.M.; LINEBACK, D.R. & SEIB, P.A. Determining the degree of starch gelatinization. *Cereal Chemistry* 51 (3): 364-375; 1974.

- SILJESTROM, M.; BJORCK, I. & WESTERLUND, E. Transglycosidation reactions following heat treatment of starch. Effects on enzymatic digestibility. *Starch/Starke* 41 (3): 95-100; 1989.
- SOMOBY, M. A new reagent for the determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry* 160 (1): 61-68; 1945.
- STUTE, R. Hydrothermal modification of starches: The difference between annealing and heat-moisture treatment. *Starch/Starke* 44 (6): 205-214; 1992.
- SWINKELS, J.J.M. Composition and properties of commercial native starches. *Starch/Starke* 37 (1): 1-5; 1985.
- TAKEDA, Y.; SHITAOZONO, T. & HIZUKURI, S. Molecular structure of corn starch. *Starch/Starke* 40 (2): 51-54; 1988.
- THARANATHAN, R.N.; PARAMAHANS, S.V. & WANKHEDE, D.B. Amylolytic susceptibility of native groundnut and ragi starch granules as viewed by scanning electron microscopy. *Starch/Starke* 32 (5): 158-161; 1980.
- THARANATHAN, R.N. & BHAT, R. Scanning electron microscopy of chemically and enzymatically treated black gram (*Phaseolus mungo*) and ragi (*Eleusine coracana*) starch granules. *Starch/Starke* 40 (10): 378-382; 1988.

- THEANDER, O. & WESTERLUND, E. Studies on chemical modifications in heat-processed starch and wheat flour. *Starch/Starke* 39 (3): 88-93; 1987.
- UEDA, S. OHBA, R. & KANO, S. Fractionation of the glucoamylase system from black-koji mold and the effects of adding isoamylase and alpha-amylase on amylolysis by the glucoamylase fractions. *Starch/Starke* 26 (11): 374-378; 1974.
- UEDA, S. & KANO, S. Multiple forms of glucoamylase of *Rhizopus* species. *Starch/Starke* 27 (4): 123-128; 1975.
- UEDA, S. & OHBA, R. Pullulanase responsible for digesting raw starch. *Starch/Starke* 28 (1): 20-22; 1976.
- UEDA, S.; ZENIN, C.T.; MONTEIRO, D.A. & PARK, Y.K. Production of ethanol from raw cassava starch by a nonconventional fermentation method. *Biotechnology and Bioengineering* 23 (2): 291-299; 1980.
- VAN DE KAMER, J.H. & VAN GINKEL, L.I. Rapid determination of crude fiber in cereals. *Cereal Chemistry* 29 (4): 239-251; 1952.
- WATSON, S.A. Preparation of starch and starch fractions - wholestarch- corn starch- isolation. In: WHISTLER, R.L., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v.IV Starch. London, Academic Press, 1964. p.3-5..

- WILD, D.L. & BLANSHARD, D.J.M. The relationship of the crystal structure of amylose polymorphs to the structure of the starch granule. *Carbohydrate Polymers* 6: 121-143; 1986.
- WILLIAMSON, G.; BELSHAW, N.J.; SELF, D.J.; NOEL, T.R.; RING, S.G.; CAIRNS, P.; MORRIS, V.J.; CLARK, S.A. & PARKER, M.L. Hydrolysis of A and B type crystalline polymorphs of starch by  $\alpha$ -amylase and glucoamylase I. *Carbohydrate Polymers* 18: 179-187; 1992.
- WU, H.H. & SARKO, A. The double-helical molecular structure of crystalline B-amylose. *Carbohydrate Research* 61: 7-25; 1978a.
- WU, H.H. & SARKO, A. The double-helical molecular structure of crystalline A-amylose. *Carbohydrate Research* 61: 27-40; 1978b.
- YAMAGUCHI, M.; KAINUMA, K. & FRENCH, D. Electron microscopic observations of waxy maize starch. *Journal of Ultrastructure Research* 69: 249-261; 1979.
- ZOBEL, H.F. X-ray analysis of starch granules. In: WHISTLER, R.L., *Methods in Carbohydrates Chemistry*. v. IV Starch. N. Y. and London, Academic Press, 1964. p. 109-143.
- ZOBEL, H.F. Gelatinization of starch and mechanical properties of starch pastes. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. & PASCHAL, E.F. *Starch: Chemistry and Technology*. London, Academic Press, 1984. p. 285-309.

ZOBEL, H.F. Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch/Starke* 40 (1): 1-7; 1988a

ZOBEL, H.F. Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch/Starke* 40 (2): 44-50; 1988b.

ZOBEL, H.F.; YOUNG, S.N. & ROCCA, L.A. Starch gelatinization: An X-ray diffraction study. *Cereal Chemistry* 65 (6): 443-446; 1988.