

**AMIDO DE *Castanea sativa* (Mill.):**

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÕES  
FÍSICAS E FUNCIONAIS**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Maria de Fátima Alves Pinto Lopes da Silva

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa

**Presidente:** Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa, professora catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

**Vogais:** Engenheiro Alberto Manuel Carneiro Sereno, professor associado da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto;

Doutor José Manuel Abecassis Empis, professor associado do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 1997

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

**AMIDO DE *Castanea sativa* (Mill.):**

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE MODIFICAÇÕES  
FÍSICAS E FUNCIONAIS**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Maria de Fátima Alves Pinto Lopes da Silva

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa

**Presidente:** Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa, professora catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

**Vogais:** Engenheiro Alberto Manuel Carneiro Sereno, professor associado da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto;

Doutor José Manuel Abecassis Empis, professor associado do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 1997

“ The starch grain... opens the door  
to the establishment of a new  
discipline, ... the molecular  
mechanics of organized bodies”.

Carl Nägeli's  
1858

## AGRADECIMENTOS

Na realização deste Trabalho tive a honra de contar com a superior orientação da Professora Doutora Eng.<sup>a</sup> Maria Luísa Beirão da Costa, do Instituto Superior de Agronomia, que atendeu incondicionalmente a minha solicitação e que, com disponibilidade e de forma amiga, me prestou a ajuda de que carecia, consubstanciada sobretudo na partilha dos seus vastos conhecimentos científicos, pelo que expresso a devida gratidão.

Ao Professor Doutor Eng.<sup>o</sup> Raúl Bruno de Sousa (Secção Autónoma de Química Agrícola do ISA), agradeço os conselhos e esclarecimentos que com amizade prestou.

À Eng.<sup>a</sup> Cristina Carvalho e ao Eng.<sup>o</sup> Jorge Nunes, do Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial (INETI) agradeço os ensinamentos e o apoio, preciosos na realização dos ensaios calorimétricos, e a pronta disponibilidade com que me facultaram a utilização do laboratório e do equipamento de DSC.

À Eng.<sup>a</sup> Cristina Vasconcelos e ao Eng.<sup>o</sup> Paulo Morais, do Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores (INESC), agradeço as facilidades concedidas na utilização do equipamento de impressão de DSC.

Ao Eng.<sup>o</sup> Eduardo Leitão, do Centro de Estudos de Produção e Tecnologia Agrícola / Instituto de Investigação Científica e Tropical (CEPTA/IICT), agradeço o valioso auxílio dispensado na realização da liofilização.

Ao Sr. Octávio Chaveiro, da Estação Agronómica Nacional, a minha sincera gratidão pelos ensinamentos e colaboração prestados na microscopia electrónica de varrimento, sempre acompanhados de simpatia.

À Eng.<sup>a</sup> Isabel Januário (Secção Autónoma de Agronomia Sub-Tropical e Tropical do ISA), agradeço a disponibilidade com que facultou equipamento diverso e o auxílio prestado nas determinações polarimétricas.

À Eng.<sup>a</sup> Cecília Rego (Secção Autónoma de Sanidade e Patologia Vegetal do ISA) agradeço as facilidades concedidas no uso do microscópio óptico.

À B Braun Medical Lda., na pessoa da Dr.<sup>a</sup> Alexandra Chambel, agradeço a oferta do material solicitado, importante para a realização deste estudo.

Agradeço também à empresa COPAM por ter fornecido a documentação solicitada relativa ao periódico *Starch/Stärke*.

Aos Técnicos e Auxiliares da Secção Autónoma de Ciência e Tecnologia de Alimentos do ISA, nomeadamente à D. Marília, D. Graziela, D. Júlia e D. Augusta, expresso uma palavra de apreço pela ajuda que sempre me prestaram, agradecimentos que torno extensivos à D. Rosário Pinto e à D. Lina Pereira (Reitoria da U.T.L.).

À Eng.<sup>a</sup> Filipa Almeida, em particular, agradeço a profunda amizade com que sempre me rodeou e a colaboração e incentivo que me concedeu.

Ao Altino, e aos meus Pais e Irmãos, em particular, é-me difícil traduzir em palavras tudo quanto lhes devo. O empenho, a dedicação e a motivação com que me acompanharam neste trabalho, sempre com grande carinho, jamais serão por mim esquecidos.

Lisboa, 16 de Dezembro de 1996

## RESUMO

Neste trabalho pretendeu-se avaliar comparativamente alguns aspectos do perfil físico e funcional do amido de castanha isolado por cinco processos distintos. Os processos de isolamento utilizados foram seleccionados e/ou adaptados com base em métodos laboratoriais escolhidos tendo em conta a simplicidade, rapidez e eficiência na extracção do amido.

Procedeu-se previamente a uma breve caracterização química da farinha de castanha, realçando-se o facto de o teor de amilose ser muito superior na farinha de castanha desengordurada relativamente à farinha de castanha nativa, indiciando a existência de uma proporção considerável de complexos amilose-lípidos. Na farinha desengordurada com n-butanol saturado em água chegou-se a uma relação amilose/amilopectina da ordem de 8:1.

A microscopia óptica e a microscopia electrónica de varrimento permitiram uma caracterização física dos grânulos de amido de castanha, apresentando-se estes polimorfos, embora predomine a forma ovóide. O comprimento varia de 1.9  $\mu\text{m}$  até 13.9  $\mu\text{m}$ , e a largura de 1.4  $\mu\text{m}$  até 13.3  $\mu\text{m}$ . Aparentemente, apenas um dos processos de isolamento danifica fisicamente os grânulos, distinguindo-se microscopicamente os amidos com menor grau de pureza. Os rendimentos em amido puro variaram entre 42.8% e 73% e a pureza dos amidos isolados entre 87.5% e 95.7%.

O comportamento dos cinco amidos isolados no amilógrafo Brabender foi algo distinto, apresentando diferenças razoáveis entre si no valor de consistência máxima e na fase de reofluidificância, como se verificou no acompanhamento feito por microscopia electrónica de varrimento. O amilograma da farinha apresentou menor consistência.

Os amidos isolados exibiram características calorimétricas semelhantes, apresentando duas endotermas, uma de gelatinização, e outra de fusão dos complexos amilose-lípidos. As entalpias de gelatinização apresentaram valores muito baixos, vindo ao encontro dos resultados amilográficos. Já as entalpias de fusão dos complexos apresentaram valores anormalmente elevados, justificando a suspeita de que o amido de castanha complexa em grande extensão com os lípidos. Não se registou reassociação das cadeias de amilose nem recristalização dos complexos. A presença de transição vítrea não foi também detectada nas gamas de temperatura e humidade utilizadas.

**PALAVRAS CHAVE:** Castanha, amido, isolamento, gelatinização, complexos, calorimetria.

## ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate, from a comparative point of view, the physical and functional properties of chestnut starches isolated by five different methods. The isolation processes that have been used were selected and/or adapted from laboratorial methods and chosen for being plain, straightforward and efficient in starch extraction.

Preliminary studies have been conducted to feature chestnut flour chemically. Amylose content showed to be much higher in defatted chestnut flour relating to undefatted chestnut flour, allowing to suspect the existence of a considerable proportion of amylose-lipid complexes. In fact, in water saturated n-butanol defatted flour the amylose/amylopectin ratio reached 8:1, compared to 1:1 obtained with undefatted flour.

Light microscopy and scanning electron microscopy allowed a physical characterization of chestnut starch granules, being polymorphs, predominantly ovoids. The length varies from 1.9  $\mu\text{m}$  to 13.9  $\mu\text{m}$  and the width varies from 1.4  $\mu\text{m}$  to 13.3  $\mu\text{m}$ . Apparently, just one of the isolation procedures causes serious physical damages, setting off in microscopy the less pure starches. The pure starch yields vary from 42.8% to 73% and isolated starches purity vary from 87.5% to 95.7%.

The behavior of the five isolated starches on Brabender's amylograph were distinct, showing reasonable differences in maximum consistency value and in reofluidificance phase. The same was assessed by scanning electron microscopy. Flour's amylogram presented much lower consistency.

Isolated starches exhibited similar calorimetric characteristics, showing two endotherms, one of gelatinization, and another one of amylose-lipid complexes melting. Gelatinization enthalpies were lower than for other starch sources, confirming amylographic results. Complexes melting enthalpies presented unusual higher values, justifying the suspicion that chestnut starch complex with lipids in a large extension. No evidence of amylose chains association or complexes recrystalization were noticed. The presence of glass transition was not detected for the range of temperature and moisture tested.

KEY WORDS: Chestnut, starch, isolation, gelatinization, complexes, calorimetry.

## ÍNDICE GERAL

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
Índice de Quadros	vii
Índice de Figuras	x
Lista de Abreviaturas	xiii
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 - A CASTANHA</b> .....	<b>2</b>
2.1 - ORIGEM E DIFUSÃO DO CASTANHEIRO .....	3
2.2 - ECOLOGIA DO CASTANHEIRO .....	4
2.3 - COMPOSIÇÃO E VALOR NUTRICIONAL DA CASTANHA .....	4
2.4 - IMPORTÂNCIA NA ALIMENTAÇÃO PORTUGUESA .....	6
2.5 - IMPORTÂNCIA ECONÓMICA DA CULTURA .....	7
2.6 - CARACTERÍSTICAS COMERCIAIS DAS VARIEDADES NACIONAIS E PERSPECTIVAS DO SEU APROVEITAMENTO .....	10
<b>3 - O AMIDO</b> .....	<b>14</b>
3.1 - IMPORTÂNCIA E UTILIZAÇÕES .....	14
3.2 - OCORRÊNCIA .....	15
3.3 - ISOLAMENTO A PARTIR DE CEREAIS, LEGUMINOSAS E TUBÉRCULOS .....	15
3.4 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICA .....	16
3.4.1 - MORFOLOGIA DO GRÂNULO .....	16
3.4.2 - ESTRUTURA E ORIENTAÇÃO MOLECULAR DENTRO DO GRÂNULO ...	18
3.5 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA .....	20
3.5.1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	20
3.5.2 - ESTRUTURA CRISTALINA .....	28
3.6 - CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL .....	30
3.6.1 - GELATINIZAÇÃO E EMPASTAMENTO .....	30
3.6.2 - GELIFICAÇÃO E RETROGRADAÇÃO .....	34

3.6.3 - AS TRANSIÇÕES DE FASE NO AMIDO .....	35
3.6.3.1 - Introdução .....	35
3.6.3.2 - Caracterização por Calorimetria Diferencial de Varrimento .....	36
3.6.3.3 - Estado Físico do Amido, dos Seus Componentes e do Amido Nativo .....	39
3.6.3.4 - Transição Vítrea .....	42
3.6.3.5 - Gelatinização e Fusão como Transições de Fase .....	46
3.6.4 - COMPLEXOS AMIDO-LÍPIDOS .....	55
<b>4 - PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>59</b>
4.1 - MATERIAIS .....	59
4.2 - MÉTODOS DE PREPARAÇÃO .....	59
4.2.1 - EXECUÇÃO DA SECAGEM .....	59
4.2.2 - EXECUÇÃO DA MOENDA .....	59
4.2.3 - ISOLAMENTO DO AMIDO .....	60
4.2.3.1 - Isolamento do Amido Usando Baixa Deformação a pH Alcalino (Método A).....	60
4.2.3.2 - Isolamento do Amido Usando Elevada Deformação em Água (Método B) ....	62
4.2.3.3 - Isolamento do Amido Usando Protease a Baixa Deformação (Método C) .....	62
4.2.3.4 - Isolamento do Amido Usando Sucessivamente 3 Crivos (Método D) .....	65
4.2.3.5 - Isolamento do Amido Usando Tolueno e Etanol (Método E) .....	65
4.3 - MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA .....	68
4.3.1 - DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE .....	68
4.3.2 - DETERMINAÇÃO DA CINZA .....	68
4.3.3 - DETERMINAÇÃO DA GORDURA BRUTA .....	68
4.3.4 - DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA BRUTA .....	68
4.3.5 - DETERMINAÇÃO DO AMIDO .....	68
4.3.6 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMIDO NOS AMIDOS ISOLADOS .....	69
4.3.7 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMIOLOSE .....	70
4.4 - MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FUNCIONAL .....	71
4.4.1 - AMILÓGRAFO BRABENDER .....	71
4.4.2 - MICROSCOPIA ÓPTICA .....	72
4.4.3 - MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO .....	72
4.4.4 - CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO .....	73

<b>5 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	74
5.1 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FARINHA DE CASTANHA .....	74
5.2 - COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE ISOLAMENTO DO AMIDO .....	76
5.2.1 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMIDO E CÁLCULO DO RENDIMENTO .....	76
5.2.2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS GRÂNULOS DE AMIDO .....	77
5.2.3 - CARACTERIZAÇÃO AMILOGRÁFICA .....	83
5.2.4 - CARACTERIZAÇÃO CALORIMÉTRICA .....	94
<b>6 - CONCLUSÕES</b> .....	103
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	105
ANEXO I .....	121
ANEXO II .....	122
ANEXO III .....	123

## ÍNDICE DE QUADROS

	Pág.
Quadro I – Composição da castanha (g/100g produto edível ou mg/100g produto edível) .....	5
Quadro II – Composição em glúcidos da castanha (g/100g produto edível) .....	5
Quadro III – Superfície ocupada pelo castanheiro (ha), produção e exportação de castanha (Ton.) em Portugal, 1985-1995 .....	9
Quadro IV – Quantidade de castanha (Ton.) importada por Portugal e sua proveniência, 1987-1995 .....	10
Quadro V - Características requeridas para os diferentes usos da castanha .....	10
Quadro VI – Características de algumas variedades portuguesas e sua aptidão industrial .....	12
Quadro VII – Composição de diferentes amidos expressa em percentagem de amido seco .....	21
Quadro VIII – Propriedades das fracções de amido .....	26
Quadro IX – Temperaturas de gelatinização (°C) de amidos de diversas origens botânicas determinadas por microscopia, análise entálpica diferencial e viscosimetria .....	31
Quadro X – Breve composição química da farinha de castanha .....	74
Quadro XI – Teor aparente de amilose (AM), de amilopectina (AMP) e da respectiva relação amilose/amilopectina na farinha de castanha e na farinha de castanha desengordurada .....	75
Quadro XII – Grau de pureza dos amidos isolados pelos diferentes métodos e respectivos rendimentos em amido bruto e amido puro .....	76
Quadro XIII – Dimensão dos grânulos de amido de castanha .....	82
Quadro XIV – Temperatura de início de gelatinização, consistência máxima e respectiva temperatura para a farinha de castanha e para os diversos amidos isolados .....	85
Quadro XV – Consistência a 95°C (inicial e final), consistência a 30°C (no arrefecimento), “breakdown” e “set-back” para as pastas de farinha de castanha e dos diversos amidos isolados .....	85
Quadro XVI – Características calorimétricas dos diversos amidos isolados na endoterma de gelatinização a 60% de humidade .....	99
Quadro XVII – Ordenação dos métodos de isolamento do amido de acordo com as 2 <sup>as</sup> entalpias de transição obtidas a 12, 40, 60 e 70% de humidade .....	100
Quadro XVIII - Temperaturas de transição (°C) dos amidos isolados para a 2 <sup>a</sup> endoterma, a 40% de humidade .....	101

Quadro XIX - Temperaturas de transição (°C) dos amidos isolados para a 2ª endoterma, a 60% de  
humidade ..... 101

Quadro XX - Temperaturas de transição (°C) dos amidos isolados para a 2ª endoterma, a 70% de  
humidade ..... 101

No Anexo II:

Quadro I – Dimensões de 50 grânulos de amido de castanha e respectivas média e desvio padrão... 122

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Área actual de distribuição das principais espécies de castanheiro no Mundo .....	3
Figura 2 – Área actual de ocupação do castanheiro na Europa .....	3
Figura 3 – Distribuição do castanheiro em Portugal .....	9
Figura 4 – Diagrama de fabrico de alguns derivados de castanha .....	13
Figura 5 – Grânulos de amido (ampliação aproximada: 500x) .....	17
Figura 6 – Esquema da organização estrutural do grânulo de amido .....	19
Figura 7 – Conformação em cadeira da molécula de $\alpha$ -D-glucose .....	20
Figura 8 – Diagrama esquemático da amilose .....	22
Figura 9 – Estrutura do complexo amilose-ácido esteárico .....	23
Figura 10 – Diagrama esquemático da amilopectina com ligações $\alpha$ -(1,6) nos pontos de ramificação .....	24
Figura 11 – Projecção da molécula ramificada de amilopectina .....	25
Figura 12 – Organização molecular dos constituintes do amido (amilose, amilopectina, lípidos monoacil) nos grânulos .....	27
Figura 13 – Representação esquemática da dilatação de um grânulo de amido: A - segmento não dilatado; B - segmento dilatado .....	32
Figura 14 – Amilograma tipo para um sistema amido-água, mostrando os fenómenos de empastamento, reofluidificância e “set-back” .....	33
Figura 15 – Representação esquemática do calorímetro diferencial de varrimento .....	37
Figura 16 – Representação esquemática dos dois pontos de controlo num calorímetro diferencial de varrimento .....	38
Figura 17 – Esquema de um termograma de DSC mostrando uma transição endotérmica de 1ª ordem, como por exemplo a fusão .....	38
Figura 18 – Determinação da temperatura de uma transição de 2ª ordem, $T_g$ (temperatura de transição vítrea) e da capacidade calorífica $\Delta C_p$ .....	39
Figura 19 – Modelo da “micela com franjas” da estrutura cristalina-amorfa dos polímeros parcialmente cristalinos .....	41
Figura 20 – Termograma de DSC mostrando (a) $T_g$ para material completamente amorfo; (b)	

$T_g$ e $T_m$ para material parcialmente cristalino; (c) $T_d$ entre $T_g$ e $T_m$ para um material completamente amorfo mas cristalizável, durante o aquecimento seguido de fusão e rápido arrefecimento .....	41
Figura 21 – Curva do log módulo como uma função da temperatura, ilustrando as 5 regiões de comportamento viscoelástico característico dos polímeros sintéticos parcialmente cristalinos .....	42
Figura 22 – Termograma de DSC de amido de trigo nativo a vários teores de humidade .....	44
Figura 23 – Curva da resposta da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) aos diferentes teores de humidade em amido de trigo nativo e pré-gelatinizado .....	45
Figura 24 – Representação esquemática de termogramas de DSC típicos de amido aquecido a vários teores de água .....	48
Figura 25 – Representação esquemática dos mecanismos de transição de fase nos grânulo de amido .....	50
Figura 26 – Curvas de DSC de misturas amido de arroz “ceroso”/água para várias fracções (em massa) de amido .....	51
Figura 27 – Efeito da taxa de aquecimento nos perfis de DSC em suspensões concentradas de amido .....	52
Figura 28 - Transições térmicas observadas em DSC durante o aquecimento do amido na presença de lípidos .....	56
Figura 29 – Influência da água no comportamento de fusão do complexo amilose-monoesterato de glicerol (tipo1) .....	57
Figura 30 – Método A para isolamento de amido de castanha .....	61
Figura 31 – Método B para isolamento de amido de castanha .....	63
Figura 32 – Método C para isolamento de amido de castanha .....	64
Figura 33 – Método D para isolamento de amido de castanha .....	66
Figura 34 – Método E para isolamento de amido de castanha .....	67
Figura 35 – Curva padrão para o cálculo da concentração de amilose nas diferentes amostras de farinha de castanha preparadas .....	71
Figura 36 – Fotografia, em microscópio óptico, de grânulos de amido de castanha isolados .....	78
Figura 37 – Fotografias, em microscópio electrónico de varrimento, dos grânulos de amido nativo (farinha de castanha) .....	79
Figura 38 – Fotografias, em microscópio electrónico de varrimento, dos amidos isolados .....	80
Figura 39 – Distribuição do comprimento dos grânulos de amido de castanha .....	82

Figura 40 – Distribuição da largura dos grânulos de amido de castanha .....	83
Figura 41 – Perfis dos amilogramas obtidos a 9% (p/v) de amido nos amidos isolados e na farinha de castanha .....	84
Figura 42 – Fotografias, em microscópio electrónico de varrimento, de amostras retiradas do amilógrafo no início da gelatinização .....	87
Figura 43 – Fotografias, em SEM, de amostras retiradas do amilógrafo aos 75°C .....	88
Figura 44 – Fotografias, em SEM, de amostras retiradas do amilógrafo aos 95°C .....	90
Figura 45 - Fotografias, em SEM, de amostras retiradas do amilógrafo após 15 minutos a 95°C .	92
Figura 46 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método A a 12, 40, 60 e 70% de humidade .....	94
Figura 47 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método B a 12, 40, 60 e 70% de humidade .....	94
Figura 48 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método C a 12, 40, 60 e 70% de humidade .....	95
Figura 49 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método D a 12, 40, 60 e 70% de humidade .....	95
Figura 50 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método E a 12, 40, 60 e 70% de humidade .....	96
Figura 51 - Termogramas de DSC dos 5 amidos isolados a 12 % de humidade .....	96
Figura 52 - Termogramas de DSC dos 5 amidos isolados a 40 % de humidade .....	97
Figura 53 - Termogramas de DSC dos 5 amidos isolados a 60 % de humidade .....	97
Figura 54 - Termogramas de DSC dos 5 amidos isolados a 70 % de humidade .....	98
No Anexo I:	
Figuras 1 e 2 – Fotografias digitalizadas, em SEM, usadas na determinação das dimensões dos grânulos de amido de castanha com o auxílio do programa SemAfore .....	121
No Anexo III :	
Figura 1 - Termogramas de DSC do <b>arrefecimento</b> (-5°C/minuto) para os 5 amidos isolados a 12, 40, 60 e 70% de humidade .....	123
Figura 2 - Termogramas de DSC do <b>2º aquecimento</b> (5°C/minuto) para os 5 amidos isolados a 12, 40, 60 e 70% de humidade .....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Amido A** - Amido isolado pelo método A (isolamento usando baixa deformação a pH alcalino).

**Amido B** - Amido isolado pelo método B (isolamento usando elevada deformação em água).

**Amido C** - Amido isolado pelo método C (isolamento usando protease a baixa deformação).

**Amido D** - Amido isolado pelo método D (isolamento usando sucessivamente três crivos).

**Amido E** - Amido isolado pelo método E (isolamento usando tolueno e etanol).

**DSC** - Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varrimento).

**SEM** - Scanning Electron Microscopy (Microscopia Electrónica de Varrimento).

## 1 – INTRODUÇÃO

A produção de novos alimentos ou de alimentos tradicionais com características melhoradas tem vindo a manifestar a exigência de amidos com comportamentos diferenciados dos tradicionais. De facto estes, nomeadamente o milho, a mandioca, o trigo, a batata e o arroz, não conseguem já, só por si, dar resposta adequada. Tem-se por isso muitas vezes recorrido à modificação e produção de derivados por via química ou enzimática. No entanto, a crescente procura do *natural* tem-se traduzido pela pesquisa de fontes alternativas de amido com características funcionais diferenciadas.

Possuindo cerca de 50% de amido (em base seca), a castanha revela-se como uma opção viável. Neste contexto, surge o interesse no estudo das características físicas e funcionais do amido isolado de castanha.

Acontece porém, que o estudo do amido da castanha europeia não tem merecido muita atenção por parte dos investigadores, ao contrário do amido das espécies asiáticas, que tem sido objecto de alguma investigação. Já a caracterização reológica e funcional da farinha de castanha foi alvo de estudo, nomeadamente por Lopes da Silva (1993) e Choupina (1993).

Constituiu o objectivo principal do presente trabalho avaliar comparativamente as características físicas e funcionais do amido de castanha isolado por cinco processos distintos, com o objectivo de encontrar o(s) método(s) conducentes a propriedades mais interessantes.

A tipificação dos amidos isolados e do amido nativo foi feita com base no seu grau de pureza, nas suas características físicas, avaliadas por microscopia electrónica de varrimento, e nas suas características amilográficas e calorimétricas.

## 2 – A CASTANHA

### 2.1 – ORIGEM E DIFUSÃO DO CASTANHEIRO

A castanha é o fruto da árvore pertencente ao género *Castanea*, vulgarmente designada por castanheiro. O género *Castanea* pertence à ordem *Fagales*, família *Fagaceae*, e engloba espécies sem grande aptidão para a produção frutícola, bem como espécies mais frutíferas das quais se salientam:

- *Castanea crenata* (SIEB. et ZUCC.), com origem e cultura no Japão;
- *Castanea dentata* (BORKH.), cujo centro de origem e distribuição é a América do Norte;
- *Castanea mollissima* (BLUME), originária da China;
- *Castanea sativa* (MILLER), indígena na Europa.

O castanheiro europeu ou *Castanea sativa* (MILLER) compreende ainda diversas variedades com fruto de valor comercial, aparecendo já híbridos inter-específicos desta, com outras espécies, em exploração frutícola (RODRIGUES PIRES, D., 1991).

Em Portugal, cultivava-se também a *Castanea crenata* (SIEB. et ZUCC.) como porta-enxerto da *Castanea sativa* (MILLER) por apresentar um melhor desenvolvimento e ser mais resistente às doenças (PAIVA, J., 1990).

Apesar de se desconhecer a origem do género *Castanea* (REGO, 1987) é provável a ocorrência de vários centros de origem, nomeadamente nas regiões montanhosas da China Central e Oriental (VAVILOV, 1950) e na América do Norte (GUERREIRO, 1957).

A actual área de distribuição do castanheiro está assim dividida em três grandes zonas: continente americano, continente europeu e extremo oriente.

A Figura 1 documenta o que resta de uma ampla expansão boreal que o género *Castanea* adquiriu no período Terciário, em clima temperado. Na flora Terciária da Gronelândia, do Alasca e da Escandinávia foram encontrados vestígios de folhas e de frutos de castanheiro. Naquele período, o castanheiro existia também no Canadá, Japão e, no nosso continente, em regiões que actualmente se situam em França, Jugoslávia, Áustria, Hungria e Itália, como testemunham os registos fósseis encontrados, nomeadamente de pólen.

FENAROLI (1945) adianta mesmo a hipótese do género *Castanea* já existir no final do Mesozóico. Em Portugal, há indicações da sua presença no Pliocénico (TEIXEIRA, C. & PAIS, J., 1976). Durante a época glacial, devido ao arrefecimento do clima, o

castanheiro sofreu uma regressão na sua distribuição reduzindo-se à zona Sul da Europa; mas com o período térmico pós-glaciar, caracterizado pela mudança do clima para um regime temperado, sofreu uma nova expansão.

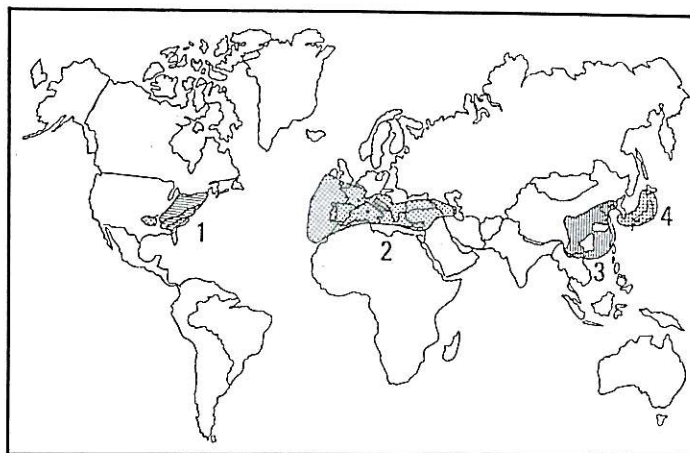


Figura 1 - Área actual de distribuição das principais espécies de castanheiro no Mundo:  
1) *Castanea dentata*; 2) *C. sativa*; 3) *C. mollissima*; 4) *C. crenata*.

Fonte: PAGLIETTA & BONOUS (1979).

No decurso dos séculos, a distribuição geográfica do castanheiro alargou-se de uma forma notável para lá dos limites naturais da espécie, por exigências de ordem económica. Hoje, está ainda presente em muitas estações extremas (por exemplo na Alemanha setentrional e na Suécia meridional), mas a sua frutificação é irregular.

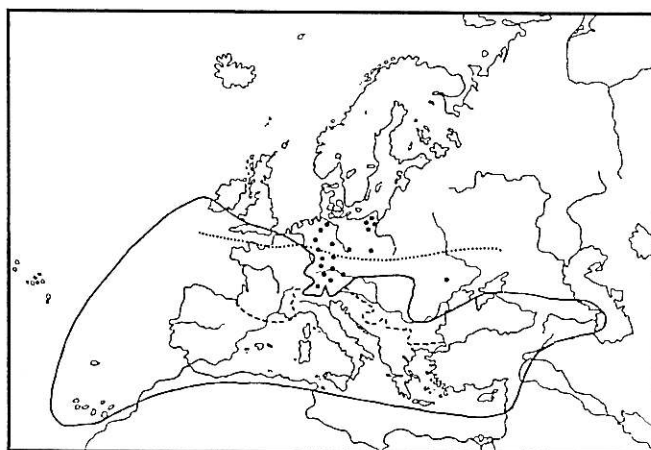


Figura 2 - Área actual de ocupação do castanheiro na Europa: (----) limite setentrional do castanheiro endêmico; (....) limite setentrional da frutificação normal; (....) estações isoladas de castanheiros.

Fonte: PAGLIETTA & BONOUS (1979).

Na Europa, a área actual de ocupação estende-se desde Portugal até ao Cáucaso, compreendendo todos os países que delimitam com o Mediterrâneo (PAGLIETTA & BOUNOUS, 1979) (Figura 2).

## 2.2 – ECOLOGIA DO CASTANHEIRO

A *Castanea sativa* (MILLER) é uma espécie de meia luz nas primeiras idades, exigindo 6 meses de temperaturas médias superiores a 10°C (OLIVEIRA e MONTEIRO ALVES, 1987). É uma espécie mesotérmica com exigências climáticas bem definidas: vive em zonas com temperaturas médias compreendidas entre 8 e 15°C (PAGLIETTA & BOUNOUS, 1979), com temperaturas médias do mês mais frio superiores a 1°C e suportando temperaturas absolutas até aos -15°C (OLIVEIRA e MONTEIRO ALVES, 1987).

A carência de água constitui um factor limitante decisivo, enquanto que uma disponibilidade significativa de água não traz qualquer prejuízo à cultura (PAGLIETTA & BOUNOUS, 1979).

Quanto à altitude encontra-se nos Alpes até 700-800m e nos locais onde a influência mediterrânica se faz sentir, como acontece na Sicilia, onde surge entre os 500 e os 1500m, ou na Sardenha, entre os 800 e os 1800m de altitude (PAGLIETTA & BOUNOUS 1979). Em Portugal, para soutos, a cota máxima é de 900m (OLIVEIRA e MONTEIRO ALVES, 1987).

As exigências pedológicas do castanheiro incluem marcantes intolerâncias ao cálcio activo, à deficiente drenagem e à compactação. Os solos mais adequados são os solos de origem granítica ou xistosa (PEREIRA, S., 1990), profundos, bem drenados, ricos em matéria orgânica e potássio, de textura ligeira e com valores de PH entre 4,8 e 6 (RODRIGUES PIRES, D., 1991). PAGLIETTA & BOUNOUS (1979) acrescentam ainda que os solos ligeiros, frescos e ricos em fósforo beneficiam o castanheiro, não suportando este os terrenos argilosos e impermeáveis. Apesar disso consideram-na uma planta rústica, pois adapta-se a solos pobres e superficiais.

## 2.3 – COMPOSIÇÃO E VALOR NUTRICIONAL DA CASTANHA

Apesar da riqueza em elementos nutritivos e das qualidades organolépticas da castanha variarem de cultivar para cultivar com as condições edafo-climáticas (natureza do

solo, altitude, exposição), e com o vigor e idade das árvores (TAVEIRA FERNANDES, 1954), a castanha apresenta um significativo valor alimentar.

A parte edível da castanha é aproximadamente de 83%, sendo constituída maioritariamente por água, como se pode constatar no Quadro I. Segue-se-lhe o amido que, expresso em termos de matéria seca, constitui cerca de 53.4%.

Quadro I – Composição da castanha (g/100g produto edível ou mg/100g produto edível).

Energia (kcal)	182		
Água (g)	48.5	Cobre (mg)	0.4
Proteína (g)	3.1	Zinco (mg)	720
Gordura (g)	1.1	Ferro (mg)	0.8
Glúcidos (g)	39.8	Potássio (mg)	525
Amido (g)	27.5	Magnésio (mg)	47
Fibra (g)	1.6*	Vit. B1 (mg)	0.220
Cálcio (mg)	20	Vit. B2 (mg)	0.120
Fósforo (mg)	63	Vit. PP (mg)	2.0
Sódio (mg)	9	Vit. C (mg)	51

\* Celulose

Fonte: GONÇALVES FERREIRA & GRAÇA, M. E. S. (1977).

O Quadro II mostra-nos a composição, em glúcidos da castanha.

Quadro II – Composição em glúcidos da castanha (g/100g produto edível).

Açúcares Redutores	Sacarose	Pentosanas	Celulose	Amido	Total
0.6	9	1.1	1.6	27.5	39.8

Fonte: GONÇALVES FERREIRA & GRAÇA, M.E.S. (1977).

A castanha apresenta assim um elevado teor de amido, o que é benéfico como factor preventivo da diabetes. Por outro lado, parece conferir-lhe uma acção anti-alérgica apreciável, segundo provam estudos feitos em crianças que apresentavam variados tipos de alergias e intolerâncias (MARTINS, I., 1983).

Segundo SINCLAIR e HOLLINGSWORTH (1969), o teor em vitamina C na castanha é significativo. São também de realçar os valores de minerais como zinco, potássio, magnésio, fósforo, e cálcio.

Pode-se afirmar que o aspecto mais significativo no valor nutricional da castanha é o seu elevado teor em glúcidos de molécula complexa, como o amido, e a existência de um baixo teor de proteínas e gordura (MARTINS, I., 1983).

## 2.4 – IMPORTÂNCIA NA ALIMENTAÇÃO PORTUGUESA

A castanha foi, durante muitos anos, um dos principais alimentos das populações rurais das regiões montanhosas do nosso país (TAVEIRA FERNANDES, 1954). O seu consumo atingia proporções elevadas, sobretudo durante os meses de Setembro a Março, não só por ser um alimento muito apreciado, mas também devido à fraca variedade e disponibilidade de outros alimentos.

Nas zonas Norte e Centro de Portugal, a alimentação dos agregados familiares de menores recursos económicos era baseada quase exclusivamente no pão de centeio, na carne, leite e legumes. No entanto, a castanha não faltava na maioria das refeições sendo consumida em fresco (crua, cozida ou assada) ou depois de seca (pilada). Em muitas localidades este fruto era transformado em farinha com a qual se confeccionavam sopas suculentas, fabricava pão e preparava puré para acompanhar a carne de porco. Mas por haver dificuldades na panificação e além disso, por o pão apresentar deficientes características organolépticas (gosto adocicado e não muito saboroso), a sua utilização foi sendo abandonada a favor do pão de centeio. Por outro lado a venda de castanha gerava algum dinheiro que ajudava a cobrir determinadas necessidades (CHOUPINA, 1993). Era ainda utilizada na engorda final do suíno destinado à matança caseira, com reconhecido sucesso na qualidade do fumeiro, e mesmo na alimentação dos ruminantes, sobretudo nos anos em que havia falta de forragens (FERREIRA CARDOSO *et al.*, 1990).

A castanha e o centeio constituíam assim, e durante muito tempo, os alimentos mais frequentes na mesa das famílias rurais mais desfavorecidas.

Com o decorrer dos anos este tipo de alimentação foi sendo progressivamente alterado, pela introdução de novas culturas e pelo aumento do consumo de outros, principalmente a batata, o milho, o trigo e o azeite. Assim, o castanheiro foi sendo relegado para os terrenos menos férteis (TAVEIRA FERNANDES, 1954) e em grande parte abandonado, condição agravada com o aparecimento de doenças e com a baixa cotação que a castanha atingia no mercado (FERREIRA CARDOSO *et al.*, 1990). Contribuiu também para esta tendência a progressiva melhoria que, apesar de tudo, se tem verificado no poder de compra das populações rurais permitindo-lhes uma maior diversificação da dieta alimentar.

Actualmente, a castanha já não serve de sustento directo das populações rurais constituindo antes uma importante fonte de rendimento já que se tem verificado uma procura crescente deste produto, sobretudo no estrangeiro.

Permanece ainda o consumo doméstico e também a procura mais relacionada com as festas de fim de ano e o consumo tradicional de castanha assada, vendida por

assadores nas ruas das cidades; nas regiões produtoras é também habitual o consumo de castanha cozida ou assada. O consumo no mercado nacional é assim, na quase totalidade, em espécie, sem mais transformações que o cozimento ou a assadura (RODRIGUES PIRES, D., 1991).

## 2.5 – IMPORTÂNCIA ECONÓMICA DA CULTURA

O castanheiro é uma essência agro-florestal de dupla vocação, ou seja, é cultivado para a obtenção de frutos de qualidade ou para a produção de lenho (ARAÚJO-ALVES *et al.*, 1990).

Devido à longevidade do castanheiro e à diversidade de idades e de terrenos ocupados, a cultura do castanheiro em Portugal, tal como a nível europeu, é caracterizada pela heterogeneidade, o que retrata um pouco a evolução histórica da valorização da castanha (RODRIGUES PIRES, D., 1991).

A partir da década de 40, a castanha deixou de ser um produto básico da alimentação nos países europeus, em particular da França, até então o maior produtor, onde o aumento do custo de trabalho aliado à quebra nos preços consequentes da menor procura, inviabilizaram a colheita da castanha nas condições tradicionais (INVUFLEC, 1978).

Entretanto em Portugal, a produção anual de castanha era ainda na década de 50, da ordem das 52 000 toneladas, sendo a superfície de produção frutícola estimada em 65 000 hectares (TAVEIRA FERNANDES, C., 1954). No entanto, a “tinta” e o cancro, principais doenças do castanheiro, os incêndios, o corte indiscriminado desta árvore para madeira e o aumento das zonas urbanas levaram a uma grande diminuição das áreas ocupadas pelo castanheiro e, conseqüentemente, a uma diminuição da produção anual de castanha (CHOUPINA, A., 1993).

Segundo PITTE (1986), a partir da década de 60 a cultura do castanheiro conheceu uma fase de modernização em Itália, que parece apresentar os sistemas de cultura mais rentáveis, colocando no mercado os melhores produtos. Este renovado interesse deveu-se em parte à procura crescente de castanha por parte da indústria de doces italiana e estrangeira, o que conduziu a um aumento dos preços (PINNAVAIA; LERICI, & MOSCATTI, 1984). Assim, ao contrário do que aconteceu em Portugal, em que a castanha se tornou um produto pouco qualificado, outros países da Europa e da Ásia, com condições idênticas às nossas, diversificaram o seu aproveitamento, surgindo hoje no mercado, após transformação tecnológica, na forma de produtos elaborados, tais como purés, compotas, castanhas em calda, castanhas com chocolate, soufflés, conservas, rebuçados, iogurtes, bolos, aperitivos e gelados (FERREIRA CARDOSO *et al.*, 1990).

A nível mundial, os principais países produtores são a Itália, França, Japão, Coreia, China, Espanha, Portugal e Grécia. Neste momento, a nível comunitário, tanto a produção francesa como a produção italiana e espanhola diminuem derivando esta situação essencialmente da incidência de doenças. Por outro lado, também nestes países o consumo em espécie está a diminuir, sendo preterido face ao consumo de produtos de luxo, derivados da indústria transformadora.

Relativamente à Comunidade Europeia em que nos inserimos, são os próprios Estados Membros os principais países de origem e também de destino, respectivamente das suas importações e das suas exportações, ocupando a França em qualquer das componentes do comércio externo, a posição de principal mercado.

Contrariando a tendência de diminuição da produção constatada na Europa, a produção tende a aumentar noutros países produtores, como a Turquia, Japão, Coreia e China.

Embora as variedades de castanho europeu sejam mais interessantes do ponto de vista do fruto, as variedades asiáticas, apesar de não terem grande interesse comercial, podem ser interessantes dadas as características de maiores calibres e produção precoce, pelo que poderão ser utilizadas em programas de melhoramento varietal (VAZ, M., 1990).

### **PRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO EM PORTUGAL**

O castanheiro, ao preferir climas frios, com chuvas em Setembro/Outubro, solos ácidos e ligeiros, de granito ou de xisto, dispõe no nosso país de condições adequadas à sua prática em áreas da Beira Interior, Trás-os-Montes e Nordeste Alentejano (VAZ, M., 1990).

Assim, as principais zonas de produção de castanha no nosso país são (FERREIRA, T., 1989):

Terra fria de Trás-os-Montes (concelhos de Carrazeda de Montenegro, Bragança e Vinhais);

Beira Interior (concelhos de Trancoso, Sabugal e Guarda);

Beira Litoral (concelhos de Sernancelhe, Sátão, V.N. de Paiva e Moimenta da Beira);

Alentejo (concelhos de Castelo de Vide e Portalegre),

localizando-se ainda algumas manchas isoladas de castanheiros no Minho (Serra do Gerês), como se pode observar na Figura 3.

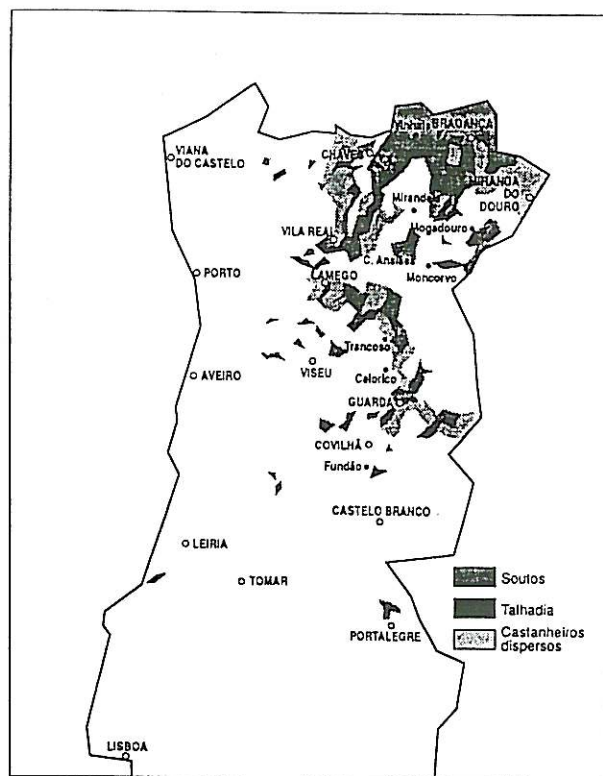


Figura 3 – Distribuição do castanheiro em Portugal.

Fonte: GUERREIRO, M.G. (1957).

O decréscimo na produção nacional que se vem verificando na última década (Quadro III) teve como causas principais a já anteriormente citada “doença da tinta”, provocada por um fungo da espécie *Phytopthora cinnamomi*, o “cancro do castanheiro”, doença provocada pelo fungo *Endothia parasitica*, a introdução de novas culturas, os cortes de castanheiro, principalmente para madeira (CHOUPINA, A., 1993) e o abandono e/ou poucos cuidados a que esta cultura tem estado votada (VAZ, M., 1990).

Quadro III - Superfície ocupada pelo castanheiro (ha), produção e exportação de castanha (Ton.) em Portugal, 1985-1995.

ANO	SUPERFÍCIE (ha)	PRODUÇÃO (Ton.)	EXPORTAÇÃO (Ton.)
1985	-	17 005	6 495
1986	-	16 325	5 222
1987	-	18 000	9 008
1988	-	-	-
1989	-	17 640	9 842.1
1990	-	17 120	14 222.1
1991	15 800	15 600	-
1992	16 770	15 000	6 996
1993	17 583	12 723	4 562.8
1994	18 620	18 481 <sup>(a)</sup>	6 806.2
1995	-	-	6 998.5 <sup>(a)</sup>

Nota: A superfície ocupada engloba os pomares em povoamento regular, assim como a correspondente às árvores dispersas.

<sup>(a)</sup> Números provisórios.

Fonte: I.N.E.

Os quantitativos exportados, embora com algumas variações, consequência de oscilações da produção por influência da maior incidência de doenças e de condicionalismos de natureza climática, manifesta tendência a aumentar, relacionando-se com a maior procura por mercados externos (VAZ, M., 1990).

A França, o Brasil, a Espanha e a Itália constituem os principais destinos da nossa castanha.

As importações foram nulas entre 1980 e 1986, tendo o país importado desde essa altura os seguintes quantitativos (Quadro IV):

Quadro IV - Quantidade de castanha (Ton.) importada por Portugal e sua proveniência, 1987-1995.

ANO	QUANTIDADE (Ton.)	ORIGEM
1987	48	Espanha
1988	0.3	Hong-Kong
1989	9.24	Espanha
1990	24.11	Espanha
1991	-	-
1992	12	Espanha
1993	400.3	Espanha
1994	156.1	Espanha
1995	7.9	Espanha

Fonte: I.N.E.

## 2.6 - CARACTERÍSTICAS COMERCIAIS DAS VARIEDADES NACIONAIS E PERSPECTIVAS DO SEU APROVEITAMENTO

A antiguidade e dispersão do castanheiro em Portugal originaram um vasto património comportando tipos bastante diversos. Estas circunstâncias deram origem a uma certa indefinição chegando à situação actual em que é frequente corresponder regionalmente nomenclatura diversa a uma mesma variedade (PINTO DE ABREU, *et al.*, 1990).

O número de variedades de castanha representativas da produção nacional ou regional é reduzido, e a caracterização das variedades identificadas é, em geral, imprecisa. As principais variedades comercializadas são: Longal, Judia, Côta, Martaínha, Lada, Bária, Colarinha e Negral (VAZ, M., 1988).

Das variedades mencionadas as três primeiras, são as mais importantes, quer pelo seu valor alimentar, quer pelo seu valor comercial, fazendo-se por isso uma breve referência (CHOUPINA, A., 1993):

**Côta** – É arredondada e de cor vermelho acastanhado. Apesar de ter um baixo poder de conservação é bastante apreciada pelas suas características organolépticas (doce e saborosa) e por ser facilmente transformada em farinha com boa aplicação em doçaria;

**Judia** – é de todas a que apresenta maior tamanho. Tem uma cor vermelho vivo e conserva-se regularmente. É relativamente doce e saborosa. Porém, descasca-se com muita dificuldade, o que limita a sua aplicação na indústria de confeitaria;

**Longal** – é de todas a que tem maior valor comercial pelo seu tamanho médio, pelo seu bom poder de conservação e pelas suas boas qualidades organolépticas. Tem cor avermelhado vivo e descasca-se com facilidade.

A composição varietal dos castanheiros que tem respondido às necessidades de um consumo familiar valoriza preferencialmente a conservação e doçura do fruto, não se adequando a uma selecção varietal apta para transformação.

Assim, a variedade Longal, de floração tardia, é menos valorizada comercialmente para consumo em fresco, pelo facto de apresentar menores calibres, sendo no entanto uma boa variedade para utilização pela indústria.

A variedade Judia é, função dos calibres apresentados, das variedades melhor pagas à produção (VAZ, M., 1990).

A castanha apresenta-se com dois tipos de frutos: a castanha propriamente dita e aquela que os franceses designam por “marron”. A distinção entre “marron” e castanha é muito importante para a indústria porque o primeiro apresenta um valor comercial mais elevado.

A castanha é septada, sendo utilizada pela indústria no fabrico de cremes, purés e farinha. Por seu lado o “marron” não é septado, possui uma cicatriz apical de forma rectangular bem desenhada, apresenta descasque e pelagem fáceis. Utiliza-se no fabrico de “marrons” inteiros, ao natural, confitados, cristalizados e também para o consumo em fresco.

Classifica-se como variedade de castanheiro “marron” aquele que apresenta menos de 12% de frutos septados. Acima desse valor a variedade é classificada como castanha (FERREIRA, T., 1989).

## TRANSFORMAÇÃO INDUSTRIAL DE CASTANHA

Apesar do principal destino da castanha ser o consumo em fresco, a tendência actual é cada vez mais a sua utilização industrial, facto que tem vindo a verificar-se nalguns países europeus como Itália e França.

No nosso país, a industrialização da castanha resume-se praticamente à sua congelação, embora se comecem a verificar, ainda em fase inicial, outras formas de transformação.

O processo de congelação da castanha inclui diversas fases de fabrico: descasque e pelagem da castanha/"marron" imediatamente após a colheita, seguindo-se o seu arrefecimento em água gelada (podendo ou não fazer-se o branqueamento), e por fim a sua congelação.

Para além da congelação, existe já uma gama muito variada de produtos obtidos a partir da castanha: puré, creme (doce) de castanha, castanha em calda, castanha confitada (castanha cristalizada - "marron glacé"), castanha/"marron" confitada em xarope, castanha/"marron" em álcool e farinha de castanha (Figura 4).

A indústria transformadora de castanha necessita, para cada tipo de fabrico de matéria prima com características bem definidas no que se refere ao calibre, estado sanitário, sabor, facilidade de descasque e pelagem como se mostra nos Quadros V e VI.

Quadro V - Características requeridas para os diferentes usos da castanha.

USOS	CALIBRE (nº cast./kg)	TRABICAÇÃO	DESCASQUE/ PELAGEM	SABOR
consumo em fresco	- de 100	melhor "marron"	ótimo	doce
"marron" ao natural	80 - 90	"marron"	bom	doce
"marron glacé"	40 - 65	"marron"	bom	doce
Doces/puré	+ de 100	indiferente	indiferente	indiferente

Fonte: FERREIRA, T. (1990).

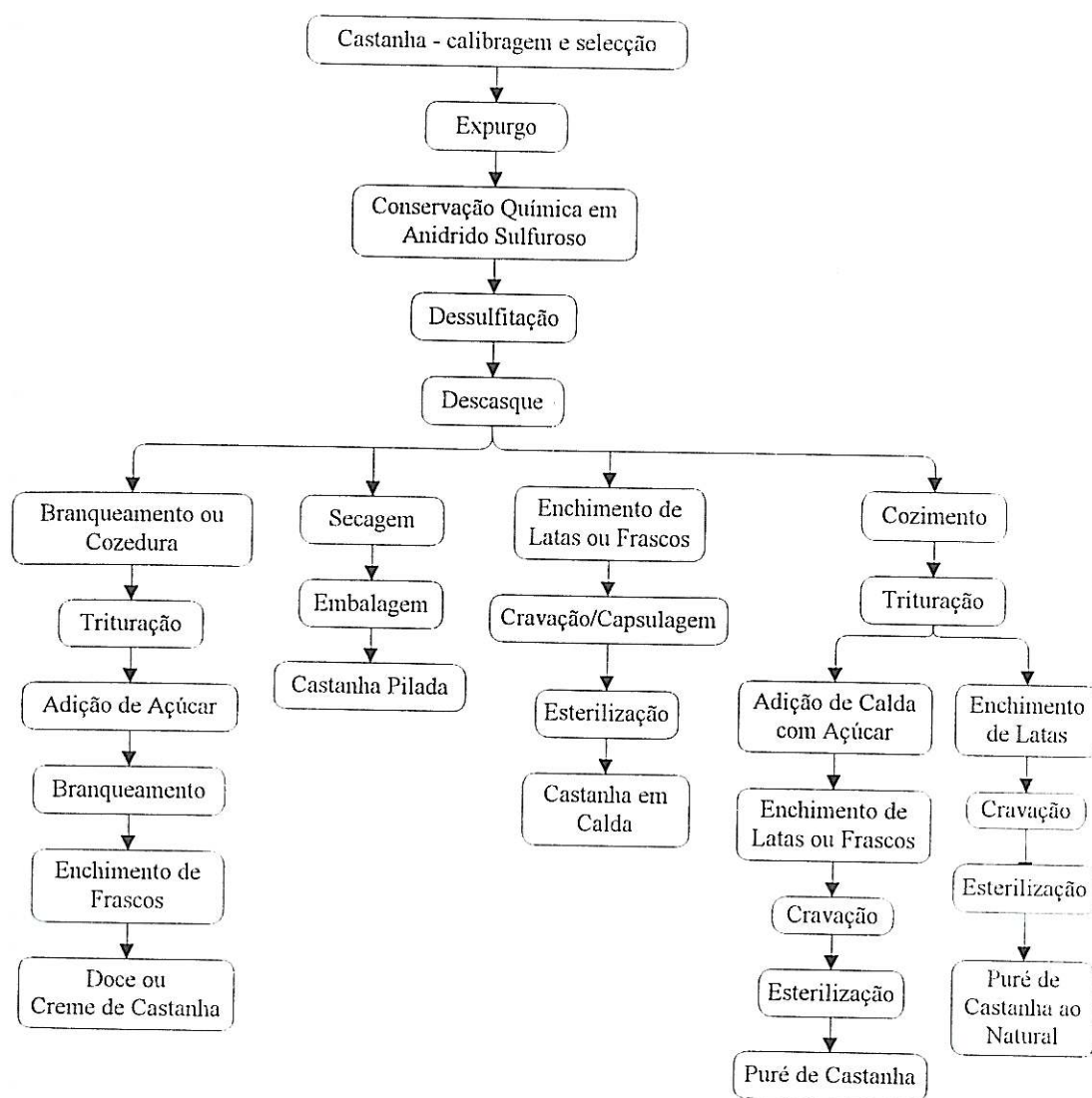


Figura 4 - Diagrama de fabrico de alguns derivados de castanha.

Fonte: FERREIRA, T. (1989).

Quadro VI - Características de algumas variedades portuguesas e sua aptidão industrial.

VARIEDADE	CALIBRE (nº frutos/kg)	% SEPTADOS	FACILIDADE DESCASQUE	SABOR	APTIDÃO INDUSTRIAL
Judia	45 - 95	90%	má	doce	creme, puré, farinha
Longal	60 - 130	0 - 2%	fácil	doce	♦ "marron": natural calda "glacé"
Lada	70 - 120	0 - 2%	boa	doce	
Côta	70 - 120	0 - 2%	boa	doce	♦ puré ♦ creme ♦ farinha

Fonte: FERREIRA, T. (1990).

### 3 – O AMIDO

#### 3.1 – IMPORTÂNCIA E UTILIZAÇÕES

O amido é a principal substância glucídica de reserva sintetizada pelos vegetais superiores a partir da energia solar, constituindo uma fonte de energia essencial para muitos organismos, especialmente para o Homem. Assim, constitui uma fracção importante num grande número de matérias-primas agrícolas, tais como os cereais (30-90% da matéria seca), as leguminosas (30-70% da matéria seca) e os tubérculos (60-90% da matéria seca), sendo o milho e seus modificados (milho “ceroso” e milho rico em amilose), a batata, o trigo, a mandioca e o arroz as principais fontes para a indústria do amido (GUILBOT & MERCIER, 1985; BULÉON *et al.*, 1990).

O amido pode ser facilmente isolado por meios físicos e devido à sua abundância tem sido possível desenvolver unidades de processamento industrial de grande capacidade.

As propriedades do amido variam consideravelmente, em muitos casos de espécie para espécie, e mesmo de variedade para variedade dentro da mesma espécie. Este facto perspectiva uma maior variedade de aplicações, o que não aconteceria no caso dos amido serem todos iguais (MEDCALF, D. G., 1973). Cerca de 50% do amido produzido industrialmente destina-se a fins alimentares. Em geral, os amidos ajudam a melhorar as propriedades funcionais dos produtos alimentares.

Os alimentos que têm como base da sua composição o amido contribuem de forma importante e desde há muito tempo para a dieta humana. Mas para além desta, outras utilizações lhe são conhecidas. Os antigos egípcios já utilizavam o amido devido à sua adesividade e o uso de amido como cola de papel data de 300 anos A.C. na China. Por volta do século XIV o amido começou a ser utilizado na Europa como goma. Foi ainda usado no branqueamento de cabelo e noutros cosméticos. A produção e o uso do amido continuou a crescer ao longo dos anos e hoje em dia constitui uma das maiores indústrias químicas e agro-alimentares do mundo. Assim, para além do fabrico de géneros alimentícios, o amido é empregue no fabrico de colas, revestimentos, gomas, agentes de floculação químicos e materiais de construção. O amido poderá ainda constituir num futuro próximo um dos materiais básicos de uma nova indústria, a indústria dos “plásticos biológicos”.

Os usos industriais do amido resultam do seu carácter único visto poder ser usado directamente sob a forma de grânulos intactos, no estado de grânulos dilatados, na forma dispersa, como um filme seco a partir de uma dispersão, ou como um pó extrudido, após conversão a uma mistura de oligossacáridos ou via hidrólise e isomerização a glucose (GUILBOT & MERCIER, 1985).

Os amidos modificados são usados na indústria têxtil (como adesivo, endurecedor, impressor, substância de polimento, etc.) e também em lavandarias e nas indústrias de papel, sabão, cosmética e farmacêutica. Mas como se disse já anteriormente, mais de metade do amido produzido vai para a indústria alimentar, sob a forma de amido nativo, de amido pré-gelatinizado ou de amido quimicamente modificado, sendo na maior parte integrado na formulação de pudins, sopas e doçaria diversa. Geralmente o amido tem de sofrer modificações por meios físicos, químicos ou enzimáticos, por forma a adquirir propriedades particulares (GUILBOT & MERCIER, 1985).

### 3.2 - OCORRÊNCIA

Na maioria das plantas, o amido existe em praticamente todos os tipos de tecidos. Os cloroplastos da maior parte das plantas superiores produzem amido como uma forma de reserva transitória dos hidratos de carbono fotossintéticos (BADENHUIZEN, 1969). O amido pode também ser sintetizado *in vitro* a partir de cloroplastos isolados.

Ao contrário dos cloroplastos, os amiloplastos estão privados de pigmentos fotossintéticos, fornecendo reservas de amido por períodos longos. Este tipo de plastídeo é encontrado em órgãos de plantas como as raízes, tubérculos e endosperma de sementes, constituindo estes órgãos de reserva as principais matérias-primas da indústria do amido (GUILBOT & MERCIER, 1985).

### 3.3 - ISOLAMENTO A PARTIR DE CEREAIS, LEGUMINOSAS E TUBÉRCULOS

Embora os métodos de obtenção de amido difiram de acordo com o tipo de matéria-prima, apresentam quase sempre três fases sucessivas: um fraccionamento anatómico (fragmentação do grão ou semente), um fraccionamento celular (rompimento das células) e uma etapa de purificação (BULÉON *et al.*, 1990).

Normalmente os processos de extracção e de purificação do amido envolvem a moagem por via húmida e são basicamente, muito semelhantes. Primeiramente os grãos

ou sementes são amaciados ao serem colocados em meio tampão, sob condições definidas de tempo e temperatura (fase de encharcamento). Com os tubérculos este passo não é necessário (BANKS & GREENWOOD, 1975). Depois, o material é moído e a mistura é peneirada com malhas de diferente abertura. A moagem da mistura e a passagem pelos peneiros é repetida até que o material que passa através do crivo esteja livre de endosperma. Após sedimentação, os grânulos de amido obtidos devem ser purificados sem degradação. A remoção do material proteico é levada a cabo através de lavagens sucessivas com água ou uma suspensão aquosa de tolueno ou de álcool (GUILBOT & MERCIER, 1985). Na indústria, o dióxido de enxofre é usado para desnaturar os enzimas e enfraquecer a matriz proteína-amido (COX *et al.*, 1944) durante a imersão e a moagem por via húmida. Por outro lado, acelera a libertação e aumenta o rendimento em amido. Mas há indícios de que este processo envolve modificações no amido (ADKINS & GREENWOOD, 1969). Há também autores (BANKS & GREENWOOD, 1975) que recomendam, à escala laboratorial, o uso de cloreto de mercúrio.

O processo de extracção por via húmida é comum em cereais, separando-se primeiro as diferentes partes anatómicas do grão (germe, farelo e endosperma), seguido do fraccionamento nos seus constituintes químicos. Por isso, os produtos primários obtidos são: amido, proteína, óleo e fibra (HOSENEY, 1986). Nalguns casos, como por exemplo na batata, os grânulos de amido apresentam-se livres, depositados nos vacúolos das células, e assim sendo o seu isolamento é relativamente simples. O material da planta é desintegrado, os grânulos de amido são lavados e arrastados com a água, sedimentados a partir da suspensão de “leite de amido” e secos.

Na generalidade dos processos laboratoriais verifica-se que a extracção é essencialmente física (centrifugação e crivagem), podendo no entanto existir uma primeira etapa onde se utilizem tratamentos químicos ou enzimáticos para acelerar o processo de separação do amido dos outros constituintes (proteína, gordura, açúcares, celulose, etc.).

### 3.4 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

#### 3.4.1 - MORFOLOGIA DO GRÂNULO

O amido isolado, puro, é uma substância sólida, branca, e relativamente insípida, não possuindo odor e sendo insolúvel em água fria (KNIGHT, 1969).

Na natureza, o amido encontra-se normalmente sob a forma de grânulos. Os grânulos de amido podem apresentar-se com forma e dimensão diversas, sendo frequentemente características da espécie a partir da qual o amido é isolado (BANKS, W.,

GREENWOOD, C. T. & MUIR, D., 1973). A Figura 5 mostra o aspecto diverso que os grânulos de amido podem apresentar.

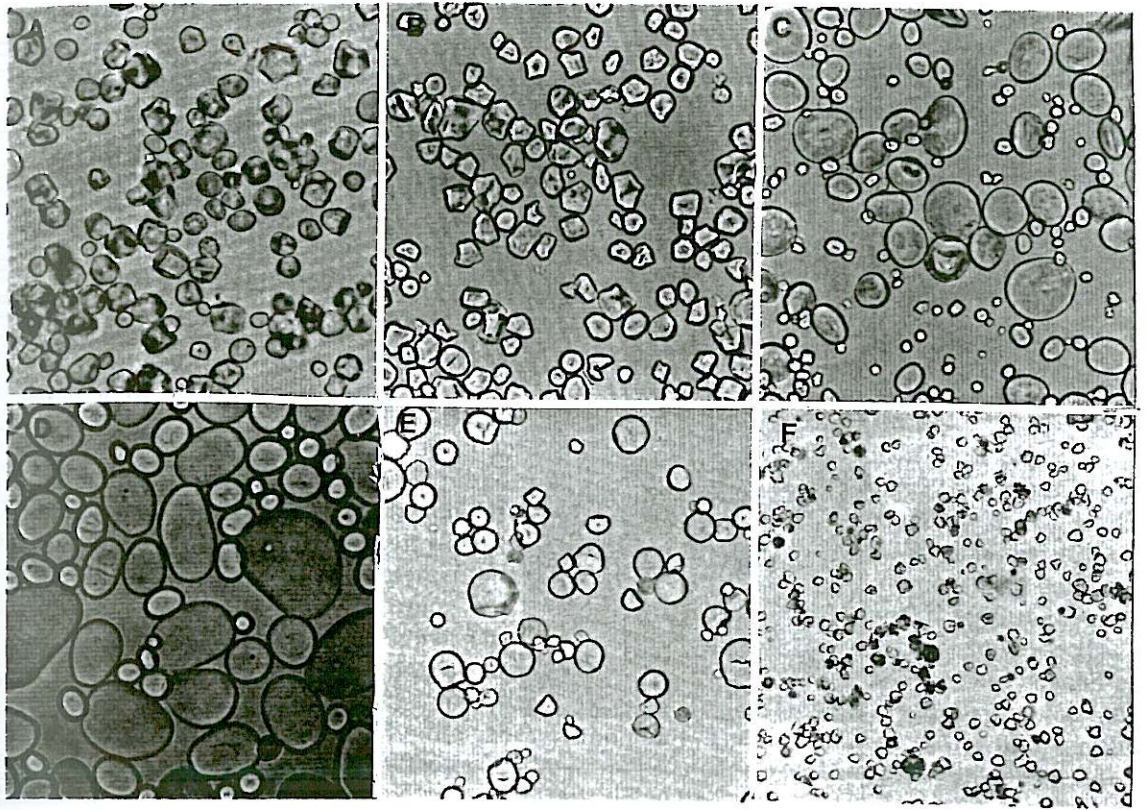


Figura 5 - Grânulos de amido (ampliação aproximada: 500x). A - amido de milho; B - amido de milho "ceroso"; C - amido de trigo; D - amido de batata; E - amido de mandioca; F - amido de arroz.

Fonte: BENNION (1980).

Segundo ZOBEL (1988), o diâmetro dos grânulos de amido pode variar entre 0.5 e 175  $\mu\text{m}$ .

Mas para além da forma e do tamanho, os grânulos de amido nativo podem ser reconhecidos pela posição do hilo e pela temperatura de gelatinização.

Os grânulos de amido provenientes de tubérculos são geralmente volumosos e elipsoidais, com um hilo excêntrico (amidos de batata, *Canna*, *Curcuma* e *Dioscorea*). Alguns são esféricos ou tronco-hemisféricos (*Manihot* e *Artocarpus*) ou poliédricos (algumas espécies *Dioscorea*).

Os grânulos de amido de cereais são muito polimorfos, podendo observar-se grânulos lenticulares (trigo, arroz, cevada e triticale), com um hilo central e um sulco circular. Nas células do endosperma existem também grânulos poliédricos muito pequenos. Estes pequenos grânulos têm por vezes faces achatadas contra grânulos

maiores durante o crescimento. Os grânulos de amido de milho são também poliédricos, com os cantos arredondados. O amido de milho rico em amilose (“amylomaize”) revela-se com grânulos filamentosos (GUILBOT & MERCIER, 1985).

Os grânulos de amido das leguminosas são reniformes, com um hilo central alongado ou estrelado (COLONNA, GALLANT & MERCIER, 1980), o qual se deve a fissuras internas. No amido de ervilhas rugosas (elevado teor em amilose) existem grânulos compostos rodeados por uma membrana plastídica.

A superfície dos grânulos de amido livres da matriz de proteínas e não danificados é relativamente lisa, apresentando-se sem quaisquer poros ou fissuras. No entanto, alguns cereais exibem grânulos com recorte dentado correspondendo a marcas feitas por corpos proteicos esféricos (GUILBOT & MERCIER, 1985). Mas para WHISTLER *et al.* (1958), a superfície de muitos grânulos de amido, particularmente os grânulos isolados e secos, apresenta variados tipos de fendas e cavidades que, segundo MEDCALF (1973), podem influenciar significativamente propriedades como a digestão enzimática, a consistência e as características de gelatinização.

#### 3.4.2 - ESTRUTURA E ORIENTAÇÃO MOLECULAR DENTRO DO GRÂNULO

Os grânulos de amido tendem a possuir simetria radial exibindo frequentemente anéis ou lamelas bem definidas (BANKS, GREENWOOD & MUIR, 1973). Sob luz polarizada, os grânulos de amido são opticamente anisotrópicos, surgindo como cristais esféricos deformados com uma cruz escura típica intersectando o hilo (Cruz de Malta). O sinal de birrefringência é positivo, o que implica que existe um elevado grau de orientação molecular dentro do grânulo, sem referência a qualquer forma cristalina particular. É geralmente aceite a ideia de que o eixo óptico coincida com a direcção da cadeia do amido, sendo aproximadamente perpendicular à superfície de crescimento do grânulo (GUILBOT & MERCIER, 1985).

A intensidade da birrefringência do amido varia largamente entre as cultivares, e entre variedades mutantes da mesma planta. Amidos com um teor de amilose relativamente elevado são usualmente menos birrefringentes (BANKS, GREENWOOD & MUIR, 1973).

O grânulo de amido cresce por via contínua decorrente da deposição de polissacáridos na superfície do grânulo em crescimento. Muitas vezes os grânulos de amido mostram anéis de crescimento que representam conchas concêntricas em camadas

alternadas de alto e baixo índice refractivo, densidade, cristalinidade e resistência ou susceptibilidade ao ataque químico e enzimático.

As regiões entre os anéis densos são aparentemente mais amorfas (menos organizadas) e mais susceptíveis à acção dos ácidos e enzimas.

Os anéis de crescimento são paralelos à superfície externa do grânulo e as moléculas de polissacáridos (amilose e amilopectina) estão orientadas radialmente ao hilo, isto é, os eixos moleculares são perpendiculares à superfície do grânulo e aos anéis de crescimento.

A estrutura do grânulo de amido depende da forma como a amilose e a amilopectina estão associadas por pontes de hidrogénio intermoleculares. Concluiu-se já que estas macromoléculas estão distribuídas por todo o grânulo, e que o seu grau de ligação mútua é responsável por heterogeneidades na estrutura. Quando estas ligações são fortes, numerosas e regulares, as cadeias associam-se como redes cristalinas; em zonas amorfas, pelo contrário, mesmo se algumas ligações de hidrogénio são fortes, as macromoléculas são mais independentes (GUILBOT & MERCIER, 1985).

A Figura 6 representa o modelo de aglomeração da estrutura da amilopectina com a de amilose confundindo-se na estrutura da amilopectina, tendo ambas uma orientação radial.

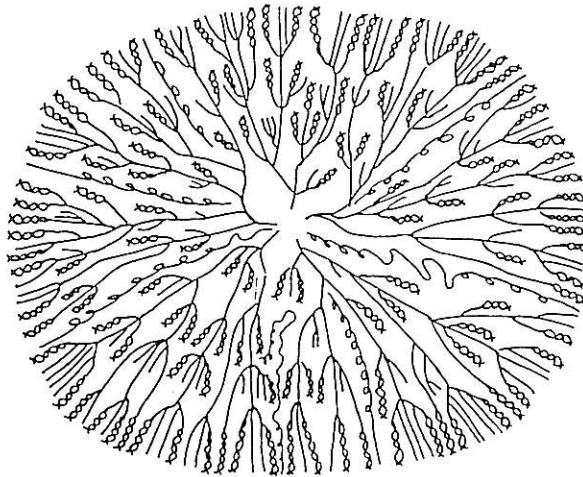


Figura 6 - Esquema da organização estrutural do grânulo de amido.

Fonte: LINEBACK & RASPER (1988).

A amilopectina é muito provavelmente a principal componente cristalina do grânulo. As cadeias externas de amilopectina existem possivelmente como duplas hélices.

Tem também sido proposta a formação de duplas hélices envolvendo amilose-amilose, amilose-amilopectina e amilopectina-amilopectina.

A superfície externa do grânulo pode ser uma região fronteira, com porções de cadeias de diferentes comprimentos estendendo-se através da fronteira, isto é, o grânulo pode assemelhar-se a uma “bola de bilhar coberta de pêlos” (LINEBACK & RASPER, 1988).

As propriedades físicas e químicas dos grânulos de amido dependem do seu teor em água, assim como da sua distribuição e actividade. De facto, a biossíntese de amido ocorre num meio rico em água e um grânulo de amido nunca recupera as suas propriedades iniciais após sofrer secagem e rehidratação mesmo sob condições suaves (BADENHUIZEN, 1969).

A estrutura invulgar do grânulo de amido, e o facto do seu comportamento ser sempre diferente do comportamento dos seus componentes quando isolados ou em mistura artificial, são determinados essencialmente por factores genéticos que governam a biossíntese do amido (GUILBOT & MERCIER, 1985).

O conhecimento acerca dos grânulos de amido é ainda incompleto e muito mais tem de ser conhecido antes da sua organização estar claramente entendida. No entanto, as propriedades do grânulo de amido devem ser relacionadas com a combinação da sua constituição química e organização física.

### 3.5 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

#### 3.5.1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O amido é essencialmente (98-99%) um homopolímero de D-glucose na sua conformação mais estável, em cadeia (Figura 7).

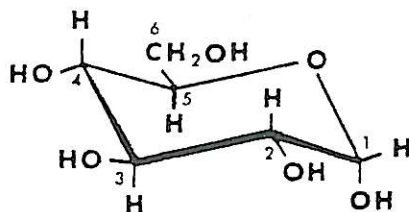


Figura 7 - Conformação em cadeia da molécula de  $\alpha$ -D-glucose.  
Fonte: ZOBEL (1988).

Os monómeros de D-glucose estão unidos maioritariamente por ligações do tipo  $\alpha$ -(1-4) (95-96%), e em menor medida por ligações do tipo  $\alpha$ -(1,6) (4-5%). Cada molécula possui na sua extremidade C<sub>1</sub> uma função pseudo-aldeídica redutora. Em concreto, a fracção glucídica do amido é uma mistura de dois polímeros com estruturas primárias muito diferentes: a amilose, molécula essencialmente linear e a amilopectina, molécula ramificada. Em certos genótipos de milho (*Zea mays*), cevada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*) e ervilha (*Pisum sativum*) está ainda presente um material de estrutura intermédia entre a de amilose e a de amilopectina.

O teor em amilose do amido está geralmente compreendido entre 17 e 35% (BULÉON *et al.*, 1992). No entanto, esta distribuição é bastante variável, existindo amidos “cerosos” (“waxy starches”) com cerca de 1% de amilose e amidos de “alto teor de amilose” (“high-amylose starches”), que têm um teor de amilose superior a 70%, como se pode observar no Quadro VII. WOLF *et al.*, (1948) demonstraram que nos cereais o teor de amilose aumenta com o grau de maturação do grão. O amido contém ainda constituintes menores (proteínas, lípidos, minerais) cujo teor e localização ao nível da semente ou grão é função da origem botânica do amido e, em menor grau, da sua história tecnológica (separação, secagem).

Quadro VII - Composição de diferentes amidos expressa em percentagem de amido seco.

ORIGEM DO AMIDO	AMILOSE	LÍPIDOS	PROTEÍNA	CINZA	FÓSFORO
Milho	28	0.65	0.30	0.10	0.015
Milho “ceroso”	<1	0.23	0.10	0.10	0.003
Milho “alto teor de amilose”	65-70	1.11	0.50	0.20	0.03
Trigo	25-28	0.24	0.33	0.30	0.05
Batata	19-22	0.09	0.05	0.30	0.04
Ervilha Lisa	33-35	0.19	0.18	0.05-0.22	0.04

Fonte: DUPRAT *et al.* (1980).

Para HOSENEY (1986) estes constituintes menores são essencialmente fósforo e azoto. Segundo MEDCALF (1973), o fósforo pode encontrar-se sob a forma de ésteres de fosfato que tenham permanecido nalgumas moléculas poliméricas durante a síntese do amido, ou sob a forma de fosfolípidos. Já o azoto provém de lípidos e proteínas (provavelmente resíduos de proteínas envolvidas na síntese do amido). Estes constituintes, se bem que estejam presentes em quantidades muito reduzidas (<1%) são susceptíveis de modificar o comportamento geral do amido, sem todavia modificar as suas bases físico-químicas (BULÉON *et al.*, 1990).

## Amilose

A amilose é um polímero essencialmente linear cujas unidades estruturais são  $\alpha$ -D-glucopiranosose que se encontram unidas por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas (Figura 8).

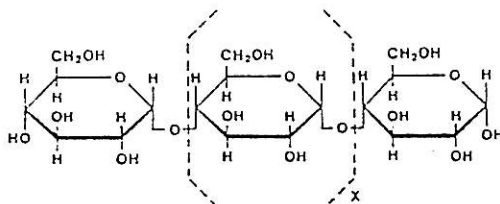


Figura 8 – Diagrama esquemático da amilose.

Fonte: ZOBEL, H. F. (1988).

Actualmente considera-se que a amilose, embora ramificada, age como uma entidade linear visto as ramificações serem poucas e muito longas (HOSENEY, 1986).

Na literatura vários autores fazem referência ao grau de polimerização da cadeia de amilose, podendo-se afirmar que normalmente, a amilose nativa contém entre 500 a 6 000 unidades (BULÉON *et al.*, 1990).

A massa molecular da amilose varia não só entre as espécies, mas também na mesma espécie, dependendo ainda da fase de maturação da planta (HOSENEY, 1986).

Em geral, as moléculas de amilose de raízes e tubérculos têm cadeias mais longas e com maior massa molecular que as moléculas de amilose dos grãos de cereais (BENNION, 1980). ZOBEL (1988) adianta os valores de 160-490 000 para a massa molecular da amilose, especificando para a amilose de milho o valor de 200-250 000 e para a amilose de batata,  $1.0 \times 10^6$ . Já GREENWOOD (1960) regista para a amilose de batata uma massa molecular de 490 000. Contudo, os valores de massa molecular obtidos dependem do método de isolamento e de fraccionamento. Por exemplo, o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente durante o isolamento do amido resulta em valores de massa molecular mais elevados do que quando se usa água e dióxido de enxofre (ZOBEL, 1988). No amido de *Castanea sativa* é de referir o estudo elaborado por CHOUPINA (1993) que permitiu chegar a um valor médio da ordem de 347 000 para a fracção do amido de menor massa molecular, que corresponderá provavelmente à amilose.

Pelo facto de possuir um carácter essencialmente linear e pela presença quase exclusiva de ligações do tipo  $\alpha$ -(1,4), a amilose é susceptível de complexar moléculas

hidrófobas, como por exemplo o iodo, ácidos gordos e cadeias hidrocarbonadas. Esta complexação assenta numa conformação helicoidal (6 a 7 resíduos/volta), na qual todos os grupos hidrófilos da cadeia se voltam para o exterior e os grupos hidrófobos para o interior, resultando a formação de uma cavidade hidrófoba (diâmetro  $\approx 4.5 \text{ \AA}$ ) que pode ser ocupada por numerosos compostos tais como o iodo molecular, certos álcoois, os lípidos e os agentes tensio-activos (Figura 9).

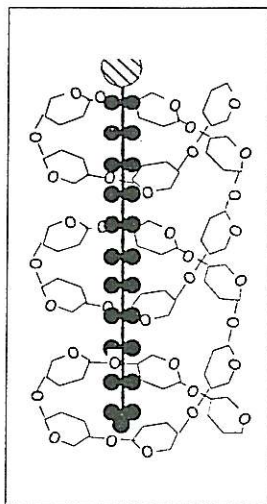


Figura 9 - Estrutura do complexo amilose-ácido esteárico. Modelo proposto por CARLSON *et al.* (1979).

Fonte: BULÉON *et al.* (1990).

A reactividade da amilose para os agentes emulsionantes decresce à medida que o número e o grau de hidrogenação das cadeias alifáticas transportadas pelo lípido aumentam. De uma maneira geral, os lípidos monoacilados (propilenoglicol, por exemplo) são os melhores complexantes da amilose (BULÉON *et al.*, 1990), mas é a reacção de complexação do iodo aquela que está na base da sua caracterização analítica (JOHN *et al.*, 1983). A bem conhecida cor azul obtida quando se mistura amilose (amido) com uma solução de iodo resulta da presença de uma cadeia poli-iodídica no centro de cada uma das hélices de amilose (ZOBEL, 1988). A amilose é caracterizada por uma capacidade de fixação do iodo na ordem de 20 mg para 100 mg de amilose e um comprimento de onda máximo entre 620 e 640 nm (BULÉON, *et al.*, 1990).

É também referida por vários autores a formação de complexos amilose-lípidos em simultâneo com a extrusão e a solubilização de amido. A formação desta nova estrutura, que ocorre em grânulos onde estejam presentes amilose e lípidos, tem sido observada em estudos feitos com difracção de raios-X, parecendo ser semelhante à estrutura V-amilose detectada pelo mesmo método em amido de milho.

Parece estar estabelecido que a formação de complexos entre a amilose e os diversos agentes complexantes previne a lexiviação da amilose durante a gelatinização,

inibe a dilatação dos grânulos de amido aquecidos em água, e reduz a capacidade do amido de se ligar com a água (ELIASSON, 1985).

Segundo GIDLEY (1995), a amilose constitui um ponto inicial de ataque dos enzimas do grânulo, permitindo-lhes um fácil acesso ao interior do grânulo.

### Amilopectina

A amilopectina constitui a fracção do amido composta por polímeros altamente ramificados, onde as unidades estruturais estão unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4), e periodicamente por ligações  $\alpha$ -(1,6) (Figura 10).

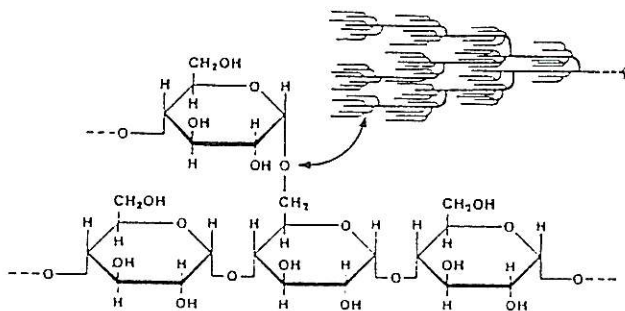


Figura 10 – Diagrama esquemático da amilopectina com ligações  $\alpha$ -(1,6) nos pontos de ramificação.

Fonte: ZOBEL (1988).

Devido à sua predominância, em geral, na composição, estrutura e propriedades do grânulo a amilopectina tem sido bastante estudada em termos de tamanho da molécula, características e comprimento da cadeia internas e externas da molécula. A Figura 11 ilustra a projecção actualmente aceite da molécula ramificada de amilopectina, com as designações A, B e C atribuídas aos segmentos de cadeia e o aspecto de “cacho” conferido pelas cadeias exteriores.

As cadeias A unem-se com uma ligação à parte final da molécula; as cadeias B ligam-se à molécula também por ligações  $\alpha$ -(1,6), podendo já transportar uma ou mais cadeias A e/ou B; a cadeia C, única, transporta o único grupo redutor ( $\emptyset$ ) (ZOBEL, 1988).

Na molécula de amilopectina, o comprimento médio dos troços lineares com ligações  $\alpha$ -1,4 é de cerca de 20-30 unidades de D-glucose (MANNERS, D. J., 1968), e a massa molecular da molécula é muito elevada, da ordem de  $10^6$  até  $10^8$ , dependendo da origem botânica, da cultivar e das condições fisiológicas na altura da síntese (BANKS & GREENWOOD, 1975). Para a fracção de maior massa molecular do amido de *Castanea*

*sativa*, CHOUPINA (1993) adianta valores na ordem de  $7.4 \times 10^6$ , que corresponderá praticamente na sua totalidade à amilopectina. Para além da massa molecular, o grau de ramificação e a frequência dos pontos de ramificação ao longo das cadeia pode variar, mesmo nos amidos da mesma espécie (POWELL, 1990).

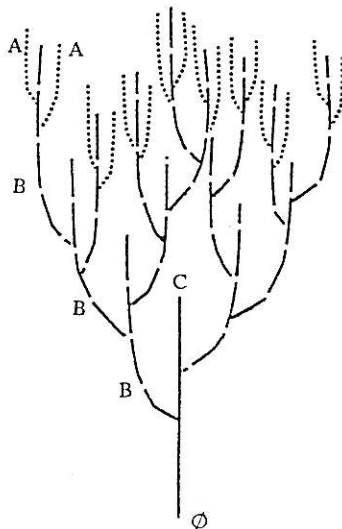


Figura 11 - Projecção da molécula ramificada de amilopectina.  
Fonte: ZOBEL (1988).

A preponderância das cadeias de baixo grau de polimerização e a presença de ligações  $\alpha$ -(1,6) sobre as cadeias longas conduzem, ao nível das propriedades da amilopectina:

- a uma fraca e relativamente constante percentagem de hidrólise por  $\beta$ -amilase (50-60%), qualquer que seja a origem botânica da amilopectina (BANKS & GREENWOOD, 1975);
- a uma fraca capacidade de ligação ao iodo (inferior a 1 mg de iodo fixado por 100 mg de amilopectina), que se traduz por um comprimento de onda máximo situado a 540 nm (BULÉON *et al.*, 1990).

De facto, complexos estáveis como os que a amilose consegue estabelecer não foram ainda identificados na amilopectina, aparentemente devido ao menor comprimento e à disposição dos segmentos lineares da amilopectina obtendo-se uma cor vermelho-púrpura característica (ZOBEL, 1988).

A amilopectina apresenta tendência a formar, nomeadamente por retrogradação, material cristalino, incluindo complexos. A capacidade para formar estes complexos é todavia mais limitada do que no caso da amilose (BANKS, GREENWOOD & MUIR, 1973).

O Quadro VIII sumaria as propriedades genericamente reconhecidas à amilose e à amilopectina.

Quadro VIII - Propriedades das fracções de amido.

PROPRIEDADE	AMILOSE	AMILOPECTINA
ESTRUTURA MOLECULAR	Linear ( $\alpha$ -1,4)	Ramificada ( $\alpha$ -1,4; $\alpha$ -1,6)
SOLUÇÕES DILUÍDAS	Instável	Estável
GEL	Firme, Irreversível	Macio, Reversível
FILMES	Coerentes	Descontínuos
FORMAÇÃO DE COMPLEXOS	Favorável	Desfavorável
COR DA REACÇÃO COM O IODO	Azul	Vermelho-púrpura
DIGESTIBILIDADE, B-AMILASE	100%	60%
GRAU DE POLIMERIZAÇÃO (Nº UNIDADES D-GLUCOSE)	1 500 - 6 000	$3 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$

Fonte: ZOBEL (1988).

A propensão das moléculas de amilose para se associarem é por todos reconhecida. Já a amilopectina requer, em geral, concentrações elevadas (superiores a 30%) para a cristalização. Na associação molecular e/ou cristalização que ocorre nos geis constituem-se ligações físicas por pontes de hidrogénio de preferência às ligações químicas cruzadas.

Os geis de amilose são firmes devido ao envolvimento da molécula linear de amilose em mais de um cristalito. Uma vez formados, os geis de amilose requerem em geral, temperaturas de autoclave (110-160°C) para serem reversíveis. Já os geis de amilopectina são macios devido às poucas interacções intermoleculares, consequência da forma em “cacho”.

No caso dos geis de amilopectina, os pontos de ramificação da cadeia molecular interferem com uma associação regular e extensa entre os segmentos moleculares. Consequentemente, as temperaturas necessárias para inverter a associação e solubilizar os geis de amilopectina podem variar desde a temperatura ambiente até 95°C, dependendo do grau de associação molecular ou de cristalização que se desenvolveu (ZOBEL, 1988).

Para a organização das moléculas de amido dentro dos grânulos BLANSHARD (1986) sugeriu um modelo que é apresentado na Figura 12.

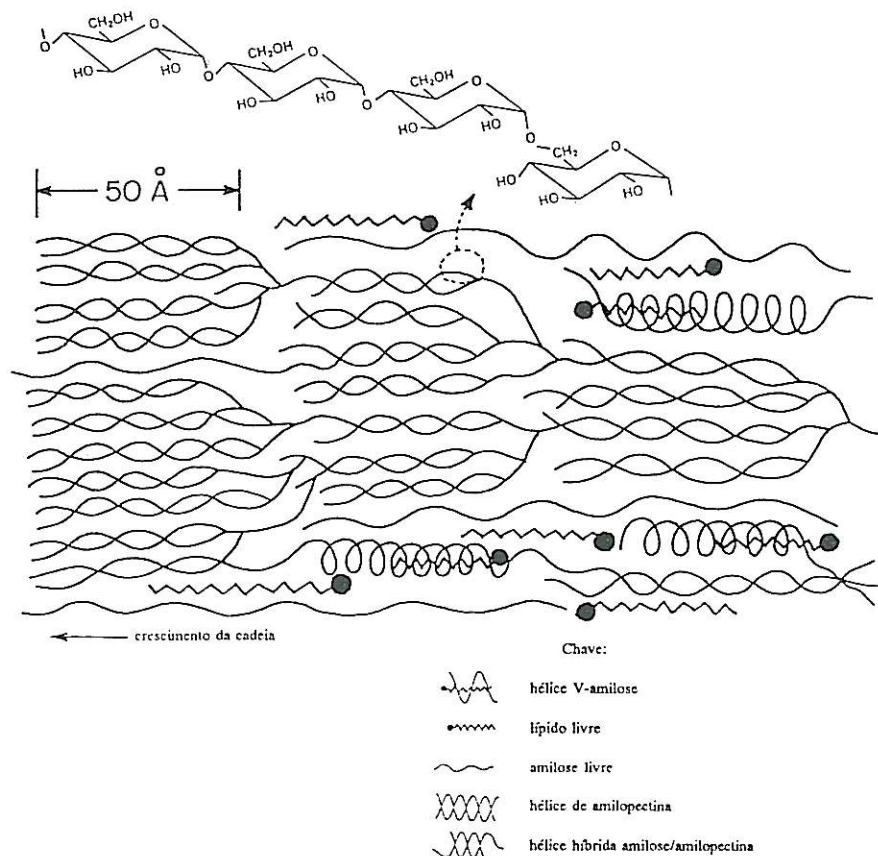


Figura 12 – Organização molecular dos constituintes do amido (amilose, amilopectina, lípidos monoacil) nos grânulos.  
 Fonte: BLANSHARD (1986).

Segundo este autor, as moléculas de amilose e de amilopectina estão dispostas radialmente em direcção à superfície do grânulo. Mais recentemente, GIDLEY (1995) afirma que a ordenação da amilopectina é predominantemente radial dentro dos grânulos e que a amilose poderá estar colocada tangencialmente a esta direcção.

As estruturas da amilose e da amilopectina que foram apresentadas são as que geralmente são aceites como sendo as que compõem o amido. Contudo, é duvidoso que estas duas estruturas sejam as únicas componentes do amido, existindo provavelmente moléculas intermédias.

### Material intermédio

A existência de um material intermédio, possuidor de propriedades intermédias (capacidade de ligação ao iodo, hidrólise por  $\beta$ -amilase) entre as de amilose e as de amilopectina, foi já evidenciada por diversos investigadores (BANKS & GREENWOOD, 1975).

Os teores observados são função da origem botânica do amido e da sua riqueza em amilose. As espécies com um teor em amilose entre 20 a 30% como os cereais ou a batata, contêm baixas quantidades (5 a 7%) deste material intermédio. Este, é bastante superior nos amidos ricos em amilose, como os amidos de ervilha rugosa ou de milho rico em amilose, onde pode ultrapassar os 10% (BANKS & GREENWOOD, 1975 ; COLONNA & MERCIER, 1984).

Pensa-se que estas moléculas correspondam a formas imperfeitas de amilopectina, por disfunção dos mecanismos de biossíntese da amilopectina (BULÉON *et al.*, 1990).

Os trabalhos que têm sido feitos sobre a estrutura molecular da amilose e da amilopectina têm permitido esclarecer os modelos estruturais que foram já confirmados por uma grande variedade de plantas. Todavia, existe ainda uma importante lacuna na ausência de conhecimento sobre a variedade das distribuições de massas moleculares, que determinam todas as propriedades mecânicas destas macromoléculas (poder espessante e gelificante, aplicações termoplásticas, etc.).

### 3.5.2 – ESTRUTURA CRISTALINA

No estado nativo, a amilose e a amilopectina estão dispostas como entidades granulares semi-cristalinas, cujo tamanho morfologia e posição do hilo estão sob controlo genético.

Ao nível macromolecular, os grânulos de amido apresentam uma coesão radial covalente correspondente ao eixo longitudinal das macromoléculas de amido, e uma coesão tangencial adquirida com o estabelecimento local de ligações intermoleculares por pontes de hidrogénio. Estas exercem-se continuamente em distâncias reduzidas (< 100 Å), contribuindo para a formação de zonas cristalinas no grânulo, consecutivamente à agregação de um grande número de cadeias. Estas estão separadas uma das outras por regiões completamente desordenadas, chamadas zonas amorfas.

O modelo de “micelas com franjas” é classicamente utilizado para conceptualizar uma rede tridimensional composta por microcristalitos reticulando as regiões amorfas. Estes cristalitos difracionam os raios-X dando dois tipos principais de diagramas de difracção em função da origem botânica do amido e eventualmente dos tratamentos tecnológicos a que poderá ter sido sujeito:

- 1 - de tipo “A”, característico dos amidos de cereais;
- 2 - de tipo “B”, característico dos amidos de tubérculos, de cereais ricos em amilose (>40%), e dos amidos retrogradados.

Nos amidos de leguminosas existem estruturas “C” intermédias que correspondem quer a uma mistura de cristalitos do tipo “A” e “B” no seio da estrutura granular, quer a uma mistura de grânulos do tipo “A” e “B”. Por complexação da amilose com o iodo, álcoois, fenol, timol, ciclohexano, e lípidos monoacilados (ácidos gordos e monoglicéridos) os amidos denominados complexantes formam ainda diagramas de difracção do tipo “V” (BULÉON, *et al.*, 1990).

### A Cristalinidade

É frequente admitir-se que a cristalinidade dos amidos é essencialmente devida às moléculas de amilopectina. Esta hipótese assenta sobre dois tipos de observações. É possível retirar a fracção de amilose por lixiviação com água quente sem perda substancial de cristalinidade. Por outro lado, os amidos ricos em amilopectina são geralmente mais cristalinos do que os mutantes ricos em amilose. Porém, não existe qualquer prova experimental que exclua a presença de amilose nas zonas cristalinas.

A água tem um papel essencial na expressão da cristalinidade. Assim, o aparecimento de estruturas cristalinas “A” ou “B” dependeria sobretudo da temperatura e da actividade da água no meio de síntese. Por outro lado, o perfil dos espectros de difracção de raios-X é muito sensível ao teor em água da amostra: os raios dos espectros afinam-se tanto mais quanto mais hidratado estiver o amido (BULÉON *et al.*, 1990). Esta interrelação entre a estrutura cristalina e a hidratação dos amidos torna difícil a medição da cristalinidade dos grânulos, que tem sido avaliada em cerca de 30%.

### As Zonas Amorfas

No grânulo de amido não existe um limite bem marcado entre a fase cristalina e a fase amorfa, e as moléculas atravessam alternadamente estas duas zonas. A proporção do grânulo que se apresenta sob a forma amorfa é ainda desconhecida e depende ela também, da actividade da água do meio.

GIDLEY & BOCIK (1985) e HORII *et al.*, (1987) determinaram por Ressonância Magnética Nuclear, a existência de três fracções estruturais no seio do grânulo. Duas fracções, uma amorfa ou organizada em hélices duplas, dependendo do teor em água do meio. Esta fracção estará situada na extremidade das zonas cristalinas e poderá ser parcial e reversivelmente desorganizada no decurso da secagem (HORII *et al.*, 1987).

A absorção de água pelo grânulo manifesta-se por uma dilatação reversível da fase amorfa e pelo estabelecimento num primeiro tempo, de ligações por pontes de

hidrogénio entre as cadeias. Num segundo tempo, após se terem formado todas as ligações por pontes de hidrogénio que seriam possíveis, a água age como um plastificante, permitindo o alinhamento dos cristalitos por extensão das fases amorfas (situadas entre as zonas cristalinas).

Vários trabalhos têm mostrado que no interior dos grânulos hidratados 25 a 30% da água está íntimamente ligada à estrutura, participando provavelmente nas estruturas cristalinas. Os 70 a 75% de água restante, está disponível como solvente de moléculas tais como os oligósidos, os ácidos aminados e os sais (BULÉON, *et al.*, 1990).

### 3.6 - CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

#### 3.6.1 - GELATINIZAÇÃO E EMPASTAMENTO

Embora os grânulos de amido nativo sejam completamente insolúveis em água fria, quando uma solução de amido é aquecida têm lugar uma série de alterações, designadas no seu conjunto por *gelatinização* e *empastamento*. Estas modificações são responsáveis pelas propriedades do amido utilizado nos produtos alimentares, das quais se salientam a reactividade, a susceptibilidade ao ataque enzimático e a formação de geis ou pastas (LINEBACK & RASPER, 1988).

Existem várias definições para gelatinização e empastamento, mas as que geram maior consenso são as que se expõem a seguir (ATWELL *et al.*, 1988):

- *gelatinização* é a ruptura da ordem molecular dentro do grânulo de amido acompanhada de alterações irreversíveis em propriedades tais como a dilatação granular, a fusão cristalina, a perda de birrefringência, o desenvolvimento de viscosidade, e a solubilização do amido. O início da gelatinização e a sua extensão dependem da concentração de amido, do método de observação, do tipo de grânulo e da heterogeneidade da população de grânulos que está sob observação;
- *empastamento* é o fenómeno imediatamente posterior à gelatinização, na dissolução do amido. Envolve a dilatação dos grânulos, a exsudação (ou lixiviação) de componentes moleculares a partir do grânulo, e eventualmente, a ruptura total dos grânulos.

Quando há um aquecimento progressivo em água de grânulos de amido, inicialmente a sua dilatação é reversível e as propriedades ópticas do grânulo mantêm-se (LUND, D., 1984). Mas ao atingir-se uma determinada temperatura – *temperatura de gelatinização*, os grânulos aumentam irreversivelmente de volume (entumescem) e a propriedade de birrefringência é perdida, alterando-se significativamente a sua estrutura.

A temperatura de gelatinização varia consoante a origem botânica do amido e é em larga medida controlada pela fracção de amilopectina: quanto maior é, menor é a capacidade de gelatinização (Quadro IX).

Quadro IX – Temperaturas de gelatinização (°C) de amidos de diversas origens botânicas, determinadas por microscopia, análise entálpica diferencial e viscosimetria.

Origem do Amido	Temperatura correspondente à perda de birrefringência em			Análise entálpica diferencial			Viscosimetria
	5%	50%	95%	T. inicial (°C)	T. final (°C)	$\Delta H_G$ (J/g)	
Milho	62	67	72	70	89	18.1	75 - 80
Milho "ceroso"	63	68	72	68	90	19.7	65 - 70
Milho "rico em amilose"	67	80	90	70	90	31.2	90 - 95
Trigo	58	61	64	50	86	19.7	80 - 85
Batata	58	63	68	57	87	27.7	60 - 65

Fonte: BULÉON, *et al.* (1990).

Para uma população de grânulos de amido, a gelatinização tem lugar num intervalo de 5 a 15°C (BULÉON, *et al.*, 1990), indicando que os grânulos podem exibir diferentes temperaturas de gelatinização (LUND, 1984). Em cada grânulo a gelatinização processa-se durante 0.5 a 1.0°C (BULÉON, *et al.*, 1990).

A dilatação é causada pela quebra das ligações de hidrogénio entre as moléculas poliméricas e pela sua hidratação crescente (MEDCALF, 1973).

A propriedade de dilatação ("swelling property") deve-se ao contributo e interacção de três características do amido: à sua natureza altamente "hidroxidável" (devida às moléculas de D-glucose); ao elevado tamanho molecular dos polímeros que o constituem e à própria forma granular em que se encontra (MEDCALF, 1973).

De acordo com LEACH (1965), a dilatação do amido depende da força e do carácter da rede micelar dentro do grânulo. Isto por sua vez, depende da razão entre a amilose e a amilopectina, do tamanho das moléculas e da presença de componentes que não sejam hidratos de carbono.

O aumento de volume começa nas zonas mais desorganizadas, amorfas e intercrystalinas dos grânulos. À medida que estas zonas dilatam, exercem uma tensão nas regiões cristalinas adjacentes, que se tendem a distorcer (Figura 13) (LINEBACK & RASPER, 1988).

À medida que aumenta a temperatura do sistema, a hidratação é maior, estendendo-se às regiões mais cristalinas do grânulo. Este dilata, constituindo-se uma rede micelar expandida no seu interior, como mostra a Figura 13B.

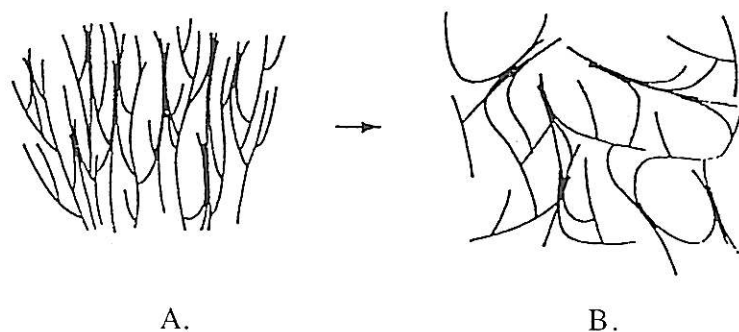


Figura 13 – Representação esquemática da dilatação de um grânulo de amido. A – segmento não dilatado; B – segmento dilatado. As zonas mais escuras representam áreas cristalinas no grânulo.

Fonte: MEDCALF (1973).

À medida que aumenta a temperatura do sistema, a hidratação é maior, estendendo-se às regiões mais cristalinas do grânulo. Este dilata, constituindo-se uma rede micelar expandida no seu interior, como mostra a Figura 13B.

O aquecimento faz com que algumas regiões da dupla hélice se desenrolem, dando-se a quebra da estrutura cristalina da amilopectina. As cadeias que se encontram libertas ficam hidratadas e entumescem lateralmente rompendo a estrutura cristalina. As moléculas de amido não são capazes de sofrer dilatação longitudinal, pelo que tendem a contrair-se formando uma estrutura enrolada ao acaso, impedindo assim a dilatação na direcção da cadeia. A hidratação e o aumento da mobilidade molecular permitem uma redistribuição das moléculas, ocorrendo a difusão para o meio de moléculas de amilose (LINEBACK & RASPER, 1988). Há como que uma lixiviação de moléculas de amilose a partir dos grânulos de amido (WANISKA & GOMEZ, 1992).

HOSENEY *et al.* (1986) sugerem mesmo que a gelatinização do amido se processa desde o centro em direcção à superfície do grânulo.

Com o crescente aquecimento e hidratação, os grânulos deixam de resistir a tensões mecânicas e térmicas, perdendo a sua integridade (LINEBACK & RASPER, 1988).

O grau de gelatinização pode ser determinado qualitativa e/ou quantitativamente por métodos físicos, químicos e bioquímicos (LUND, 1984). Um método útil para seguir a gelatinização do amido, consiste no registo num gráfico, das alterações da consistência quando uma suspensão de amido em água é aquecida, aumentando a temperatura a uma taxa constante. O instrumento normalmente usado para este propósito é um viscosímetro especial – *amilógrafo Brabender*. Este, representa graficamente as alterações de consistência durante a gelatinização.

Quando o amido é posto em água, esta penetra nos grânulos, dilatando-os. À medida que se aumenta a temperatura os grânulos chocam entre si aumentando a consistência da pasta (LUND, 1984), o que coincide com a perda de birrefringência.

Continuando o aquecimento, os grânulos de amido começam a ficar distorcidos e alguns são solubilizados. O amido solúvel continua a reter água, aumentando a consistência. Estas alterações que se verificam após a gelatinização do amido (perda de birrefringência) são designadas por *empastamento*.

Durante o tempo de espera a 92-95°C muito poucas alterações ocorrem no amido não dissolvido, pelo que a solubilização não aumenta e verifica-se a diminuição da consistência. Este facto é causado pela orientação das moléculas solúveis no sentido do escoamento. Este fenómeno é designado por *reofluidificância* e constitui uma importante propriedade das pastas de amido.

Em seguida, o amilógrafo procede a um arrefecimento controlado (1,5°C/minuto), verificando-se um novo aumento na consistência e, eventualmente, a formação de um gel semi-sólido. Isto deve-se à diminuição da energia do sistema, permitindo assim o estabelecimento de mais pontes de hidrogénio (HOSENEY, 1986). A sua causa é a reassociação de moléculas de amido, incluindo polímeros que foram lexiviados dos grânulos durante a cozedura (MEDCALF, 1973). Esta fase é aqui designada por "set-back" (Figura 14) e a pasta de amido exhibe comportamento tixotrópico (ATWELL, W. A., 1986).

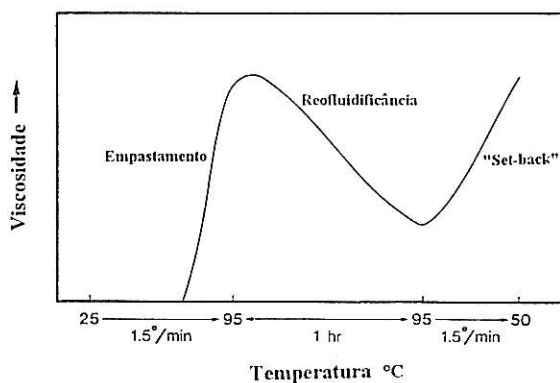


Figura 14 – Amilograma tipo para um sistema amido-água, mostrando os fenómenos de empastamento, reofluidificância e "set-back".

Fonte: HOSENEY (1986).

Normalmente a consistência da pasta aumenta rapidamente até um valor máximo (o qual é uma medida do poder espessante), e a quebra que se segue é uma medida da

capacidade dos grânulos inchados na pasta do amido de resistir ao “adelgaçamento” resultante do aquecimento prolongado e da acção de corte mecânico (KNIGHT, 1969).

Para ATWELL (1986), os principais factores que influenciam a consistência de uma suspensão de amido são a concentração, o peso molecular ou tamanho, a temperatura, o tempo a uma tensão de deformação constante e os diferentes tipos de associações entre os polímeros do amido.

### 3.6.2 - GELIFICAÇÃO E RETROGRADAÇÃO

As pastas de amido são instáveis à temperatura ambiente. O gel forma-se quando a pasta de amido é arrefecida. À medida que a pasta arrefece, as cadeias tornam-se menos energéticas e as pontes de hidrogénio mais fortes resultando um gel firme.

Com o envelhecimento do gel ou devido a fenómenos de congelação-descongelação, as cadeias de amido tendem a interagir fortemente e a água é forçada a abandonar o sistema, designando-se este fenómeno por *sineresis*.

Devido aos longos períodos de armazenamento podem ocorrer mais interacções entre as cadeias de amido e, eventualmente, a formação de cristais. Estes acontecimentos são colectivamente descritos pelo termo *retrogradação* e correspondem à cristalização das cadeias de amido no gel.

Pelo facto das áreas cristalinas diferirem no seu índice de refração, o gel torna-se mais opaco à medida que se dá a retrogradação. Consequentemente torna-se mais rígido e emborrachado, em parte devido à cristalização e em parte devido à interacção das cadeias (HOSENEY, 1986).

Pensa-se que a retrogradação tenha uma grande influência na textura, digestibilidade e na aceitação pelo consumidor de produtos com base em amido (BILIADERIS, 1992).

A retrogradação do amido ocorre em dois passos cineticamente distintos:

- (1) rápida gelificação da amilose por reassociação das moléculas e
- (2) lenta recristalização de cadeias curtas de amilopectina.

Enquanto a amilose usualmente gelifica fora dos grânulos de amido imediatamente após a gelatinização (HOOVER e HADZIYEV, 1981), a amilopectina permanece normalmente dentro do grânulo dilatado, onde recristaliza lentamente (MORRIS, 1990). BILIADERIS e ZAWISTOWSKI (1990) acrescentam ainda que a

gelificação da amilose depende muito pouco da temperatura de armazenamento, ao passo que a gelificação da amilopectina é um processo muito mais sensível à temperatura, requerendo elevada concentração de polímeros, o que aliás já tínhamos visto anteriormente.

Há alimentos que têm como base o amido, que durante ou após o processamento são bombeados, agitados, arrefecidos, e embalados. No decorrer destas operações moléculas lineares do amido podem ser parcialmente lixiviadas dos grânulos dilatados e formar associações moleculares entre si ou com outros constituintes como por exemplo lípidos, sais, ácidos, açúcares e proteínas. Os grânulos de amido dilatados podem quebrar-se em fragmentos, microgeis e moléculas pois estão mais susceptíveis à acção mecânica (LEACH, 1965).

Para BILIADERIS (1989), as associações mais comuns no amido de alimentos são a retrogradação (amilose-amilose), a recristalização (amilopectina-amilopectina) e a formação de complexos amilose-lípidos.

Vários autores citados por BEMILLER (1990), referem a existência de vários factores que favorecem a retrogradação, nomeadamente as baixas temperaturas, o pH neutro, o grau de polimerização relativamente baixo, a ausência de ramificações, a diminuição do grau de polidispersividade, o aumento da concentração, a presença de substâncias desidratantes, a ausência de agentes molhantes e a presença de certos iões inorgânicos.

### **3.6.3 - AS TRANSIÇÕES DE FASE NO AMIDO**

#### **3.6.3.1 - INTRODUÇÃO**

A temperatura, o tempo e o teor em água exercem um efeito enorme sobre o estado físico e a qualidade dos alimentos e materiais biológicos. Estes materiais são frequentemente metaestáveis, sofrendo transições de fase e de estado em vários processos e durante o armazenamento. A cinética de várias alterações está relacionada com estas transições e, por conseguinte, com a mobilidade molecular. Assim, na base de um controlo adequado do processamento de um alimento e das condições de conservação está frequentemente, a compreensão das transições de fase e de estado e a relação entre a mobilidade molecular e a estabilidade.

A temperatura e o conteúdo em água são duas variáveis que determinam alterações, desejáveis ou prejudiciais, na qualidade de um alimento. Harry Levine e Louise Slade foram os pioneiros na descrição dos alimentos como sistemas metaestáveis e

do papel da água como agente plastificante nos alimentos sólidos. Em particular, tem-se admitido que a temperatura de transição vítrea dos materiais biológicos amorfos é um dos principais atributos no controlo do “tempo de prateleira” (“shelf-life”) dos alimentos de baixa humidade e congelados (ROOS, Y., 1995).

As transições de fase são alterações no estado físico dos materiais, tendo efeitos significativos nas suas propriedades físicas. Compostos quimicamente puros como a água ou muitos compostos orgânicos e inorgânicos nos alimentos, têm temperaturas de transição de fase precisas. O termo transição refere-se à alteração no estado físico que é causada por uma mudança na temperatura ou pressão.

A maior parte dos alimentos sólidos são materiais amorfos ou parcialmente cristalinos. O amido nativo é um exemplo de um material parcialmente cristalino, sendo composto por amilose, essencialmente amorfa, e por amilopectina, parcialmente cristalina. Em materiais alimentares amorfos, uma mudança na temperatura pode resultar numa transição vítrea. É ainda importante notar que podem ocorrer mudanças entre o estado amorfo e o estado cristalino em função do tempo (ROOS, Y., 1995).

O aquecimento provoca alterações nas propriedades estruturais e reológicas, normalmente como consequência de transições conformacionais, sendo a gelatinização do amido um exemplo disso (WRIGHT, 1984). Assim, o aquecimento de alimentos sólidos é frequentemente usado para detectar as temperaturas às quais ocorrem essas alterações nas propriedades físicas e térmicas, como por exemplo, na capacidade calorífica, na viscosidade ou alterações nas características texturais. Neste contexto, as técnicas de análise térmica como a Calorimetria Diferencial de Varimento são de grande importância. No caso especial do amido, o estudo do seu comportamento térmico assume grande importância devido à sua representatividade como componente alimentar e às suas propriedades físicas na estabilidade e textura dos alimentos.

### 3.6.3.2 - CARACTERIZAÇÃO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO

A Calorimetria Diferencial de Varimento (Differential Scanning Calorimetry - DSC) é uma das técnicas mais comuns da determinação das transições de fase em materiais inorgânicos, orgânicos, poliméricos e alimentares. Esta técnica permite quantificar o calor absorvido ou libertado durante mudanças no estado físico ou no estado químico (AGUILERA & STANLEY, 1990).

A operação deste equipamento consiste na selagem de uma pequena quantidade de amostra (5-20 mg) do material numa célula de alumínio. Esta célula e uma outra

tomada de referência e contendo um material inerte, são sujeitas a aquecimento a uma taxa específica, frequentemente sob pressão aplicada para contrariar a expansão interna, usando aquecedores rigorosos e individuais, obtendo-se a diferença no fluxo de calor, necessária para manter as duas células a igual temperatura (Figura 15). Estes valores são então convertidos em temperaturas e entalpias de transição, podendo também obter-se a cinética destas reacções (AGUILERA & STANLEY, 1990). A calorimetria diferencial de varrimento pode também quantificar a energia fornecida à amostra e à referência (ROOS, 1995).

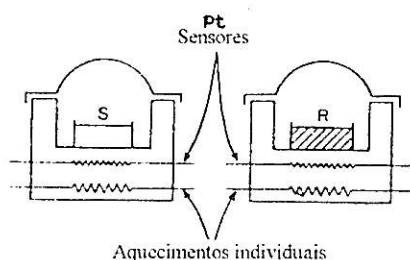


Figura 15 - Representação esquemática do Calorímetro Diferencial de Varrimento.  
Fonte: DODD *et al.* (1987).

Assim, o DSC é usado para detectar variações endotérmicas e exotérmicas que ocorrem durante uma medição dinâmica, como uma função da temperatura, ou isotermicamente, como uma função do tempo (ROOS, 1995).

A Figura 16 representa de uma forma esquemática, os dois pontos de controlo de um calorímetro: um dos pontos de controlo assegura que as temperaturas da amostra e da referência aumentam a uma taxa pré-definida; o outro ponto assegura que o “input” de energia ao sistema é compensado por efeitos endotérmicos ou exotérmicos que ocorrem na amostra.

A calibração do instrumento é geralmente levada a cabo com um metal de elevada pureza cujas temperatura de fusão e entalpia de fusão são conhecidas com rigor. O que mais frequentemente é usado é o índio.

As curvas dos termogramas traduzem os “inputs” de calor diferencial na amostra (expresso numa taxa de calorimetria  $dH/dT$  em  $mJ.s^{-1}$ ) em ordenadas, e a temperatura ou tempo em abcissas.

Alterações na amostra que estejam associadas com absorção ou libertação de calor causam uma alteração diferencial no fluxo de calor, o que é traduzido por um pico. A área debaixo do pico é directamente proporcional às alterações entálpicas e a sua direcção indica quando o fenómeno é endotérmico ou exotérmico (BILIADERIS, 1983).

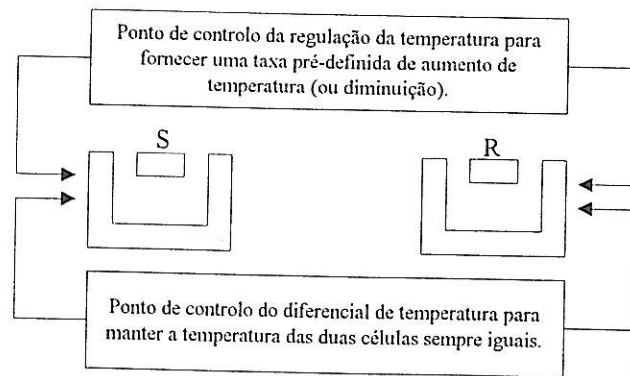


Figura 16 - Representação esquemática dos dois pontos de controlo num calorímetro diferencial de varrimento.

Fonte: Perkin-Elmer Corporation (1970).

As transições de fase de 1ª ordem (como a gelatinização, a fusão e a cristalização) produzem picos (Figura 17), enquanto que as transições de fase de 2ª ordem (como a transição vítrea, por exemplo), originam um “degrau” no traçado do termograma (Figura 18).

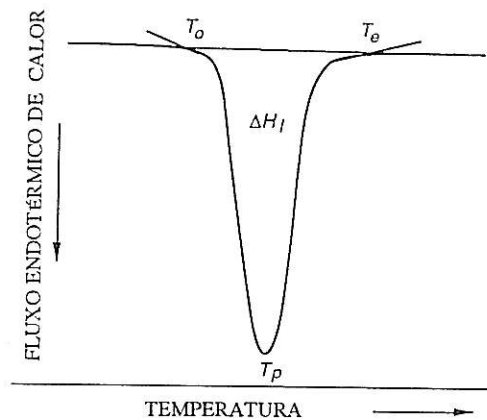


Figura 17 - Esquema de um termograma de DSC mostrando uma transição endotérmica de 1ª ordem, como por exemplo a fusão.  $T_o$  - temperatura inicial de fusão;  $T_p$  - temperatura do pico da endoterma;  $T_e$  - temperatura final de fusão.  $T_o$  e  $T_e$  obtêm-se a partir da intersecção das tangentes aos pontos onde ocorre desvio da linha de base. A integração do pico é usada para obter o calor latente de transição,  $\Delta H_c$ .

Fonte: Roos (1995).

A partir dos termogramas que exibem transições de 1ª ordem podem obter-se as temperaturas de transição e o calor latente de transição, que é obtido pela integração do pico. Já os termogramas que mostram transições de 2ª ordem podem ser usados para

deduzir, para além das temperaturas de transição, variações na capacidade calorífica (ROOS, 1995).

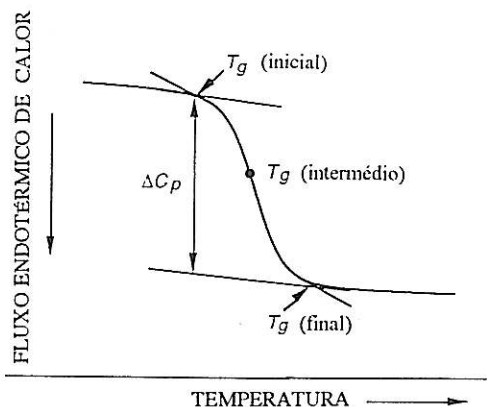


Figura 18 - Determinação da temperatura de uma transição de 2ª ordem,  $T_g$  (temperatura de transição vítrea) e da capacidade calorífica  $\Delta C_p$ .  
Fonte: ROOS (1995).

Algumas das aplicações do DSC na determinação das transições de fase em alimentos incluem alterações tais como a cristalização e a fusão de água, lípidos e outros componentes dos alimentos, a desnaturação de proteínas e a gelatinização e retrogradação do amido. Já a transição vítrea (transição de 2ª ordem) é uma transição sólido-sólido observada nalgumas substâncias amorfas e que traduz a passagem brusca a um estado de maior mobilidade. Este tipo de transição é observável em vários produtos alimentares sólidos ou congelados e, em particular, em produtos constituídos por amido (MA & HARWALKAR, 1990).

Normalmente as amostras são colocadas em células que podem ser hermeticamente fechadas. Por esta razão o método pode ser usado para observar transições de fase e para determinar temperaturas de transição sem alteração do teor em água. Um conteúdo de água constante é extremamente importante na determinação das transições de fase dos materiais alimentares. A água tem um enorme efeito nas temperaturas de transição e o seu impacto no comportamento do alimento não pode ser subvalorizado (ROOS, 1995).

### 3.6.3.3 - ESTADO FÍSICO DO AMIDO, DOS SEUS COMPONENTES E DO AMIDO NATIVO

A forma exacta como os polímeros do amido contribuem para as regiões cristalina e amorfa não está ainda esclarecida (LELIÈVRE, 1992). No entanto, sabe-se que a amilose e a amilopectina podem existir nos estados cristalino, parcialmente cristalino e

amorfo. Nos grânulos de amido nativo a amilose existe no estado amorfo não cristalino e a amilopectina exibe cristalinidade parcial (ROOS, 1995). Nalguns amidos, parte da fracção de amilose poderá estar co-cristalizada com a amilopectina (BILIADERIS 1991b). A extensão de cristalinidade nos grânulos de amido situa-se geralmente entre 15 e 35% (ROOS, 1995).

A fase amorfa do grânulo de amido é heterogénea e consiste em amilose amorfa e regiões parcialmente cristalinas de amilopectina (BILIADERIS, 1992).

As transições de fase dos grânulos de amido nativo são observadas quando este é aquecido num excesso de água. As transições observadas incluem transições tanto na porção amorfa como na porção cristalina do grânulo (ROOS, 1995).

As transições de fase que estão associadas com a gelatinização e perda da estrutura nativa dos grânulos definem e explicam as diferenças nas propriedades físicas dos amidos e o seu comportamento nos produtos alimentares.

Os estudos mais recentes que têm sido feitos sobre a estrutura química e física do amido salientam o carácter metaestável dos sistemas aquosos de amido, e a necessidade de tratar fenómenos como a gelatinização, a gelificação e a retrogradação sob a perspectiva do amido como um polímero parcialmente cristalino plastificado pela água (BILIADERIS, 1991; SLADE & LEVINE, 1987a). Da mesma forma tem-se reconhecido a semelhança entre os polímeros sintéticos e o amido, nomeadamente quanto à organização relativa das macromoléculas no estado sólido. SLADE & LEVINE (1987b) usaram um modelo de “micela com franjas” (Figura 19) para conceptualizar uma rede tri-dimensional do amido composto por regiões microcristalinas que ligam covalentemente regiões amorfas de segmentos flexíveis de cadeias. Num polímero parcialmente cristalino como o amido, três transições características são possíveis:

- uma transição vítrea, à temperatura  $T_g$  (“glass transition temperature”), para o componente amorfo;
- uma transição de fase, à temperatura  $T_m$  (“melting temperature”), para o componente cristalino;
- uma transição de cristalização, à temperatura  $T_d$  (“denaturation temperature”), para o componente completamente amorfo mas que é cristalizável, como se mostra na Figura 20.

O diagrama de estado pode assim ser usado na previsão do estado físico de alimentos ricos em amido a vários teores de humidade e valores de temperatura. É o caso dos produtos à base de cereais, com uma estrutura vítrea, crocante, e produtos de panificação (SLADE & LEVINE, 1994, 1995).

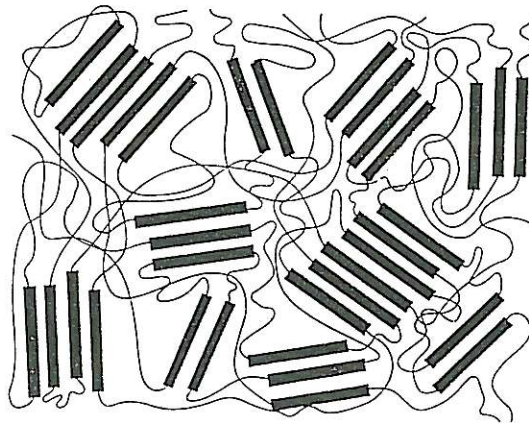


Figura 19 – Modelo da “micela com franjas” da estrutura cristalina-amorfa dos polímeros parcialmente cristalinos.

Fonte: SLADE & LEVINE (1987b).

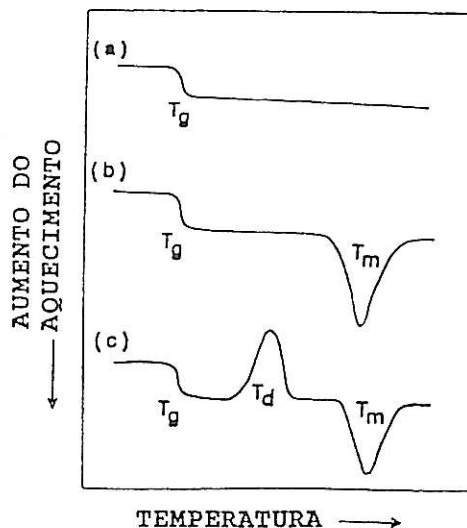


Figura 20 – Termogramas de DSC mostrando (a)  $T_g$  para material completamente amorfo; (b)  $T_g$  e  $T_m$  para material parcialmente cristalino; (c)  $T_d$  entre  $T_g$  e  $T_m$  para um material completamente amorfo mas cristalizável, durante o reaquecimento seguido de fusão e rápido arrefecimento.

Fonte: SLADE *et al.* (1988).

Quando a concentração de água é limitada, a completa gelatinização não ocorre para a gama habitual de temperatura. Mas à medida que a temperatura aumenta, os grânulos de amido tornam-se progressivamente mais móveis e as regiões cristalinas eventualmente fundem. O amido poderá então mostrar o seu habitual comportamento viscoelástico conferido pelo material fundido termoplástico, como se mostra na Figura 21 (LEVINE & SLADE, 1990).

Modificações na estrutura do amido como a fusão, gelatinização ou fragmentação, são afectadas por factores, tais como a razão água/amido, a temperatura, a

taxa de aquecimento, a morfologia, a razão amilose/amilopectina, a deformação ou corte, a distribuição do tamanho dos grânulos, a adição de açúcares, sais, proteínas, lípidos e outros factores (DONOVAN, 1977; 1979; BILIADERIS *et al.*, 1980; LAI & KOKINI, 1991). Estes factores também afectam as resultantes propriedades viscoelásticas do amido (KOKINI *et al.*, 1992).

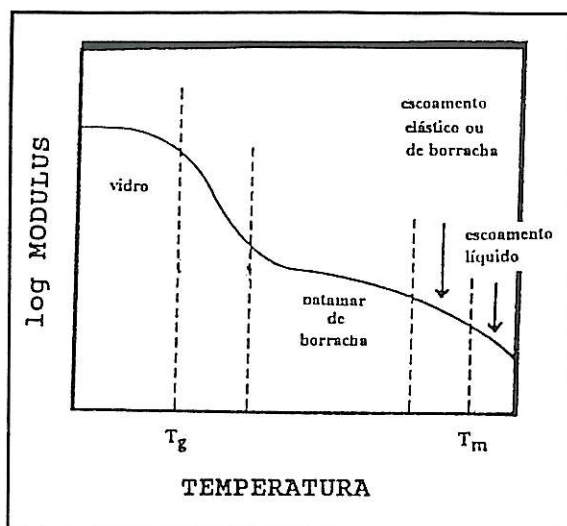


Figura 21 – Curva do log módulo como uma função da temperatura, ilustrando as 5 regiões de comportamento viscoelástico característico dos polímeros sintéticos parcialmente cristalinos.

Fonte: LEVINE & SLADE (1990).

Modificações na estrutura do amido como a fusão, gelatinização ou fragmentação, são afectadas por factores, tais como a razão água/amido, a temperatura, a taxa de aquecimento, a morfologia, a razão amilose/amilopectina, a deformação ou corte, a distribuição do tamanho dos grânulos, a adição de açúcares, sais, proteínas, lípidos e outros factores (DONOVAN, 1977; 1979; BILIADERIS *et al.*, 1980; LAI & KOKINI, 1991). Estes factores também afectam as resultantes propriedades viscoelásticas do amido (KOKINI *et al.*, 1992).

#### 3.6.3.4 - Transição Vítrea

Um *polímero perfeitamente cristalino* funde a uma temperatura definida. A acompanhar a fusão ocorrem alterações descontínuas no volume e na entalpia, que são variáveis termodinâmicas primárias. Assim, a fusão é uma transição de 1ª ordem.

Num *polímero amorfo* a baixas temperaturas, o movimento molecular das cadeias poliméricas está “congelado” numa conformação ao acaso, tornando-se vítreo e imóvel. Quando se aplica energia térmica, inicia-se o movimento molecular e as moléculas ficam com energia suficiente para deslizarem uma após outra (LEVINE, 1983). Neste ponto, o polímero torna-se viscoso, emborrachado e flexível. Esta alteração física reflecte o aumento do movimento dos maiores segmentos (20-50 carbonos) da “espinha dorsal” do polímero e é chamada transição vítrea. Na transição vítrea há uma mudança descontínua na capacidade de aquecimento (1ª derivada da entalpia com respeito à temperatura) e no coeficiente de expansão térmica (razão da variação do volume em relação à temperatura). Embora a transição vítrea seja associada a alterações nestas variáveis de 2ª ordem, considera-se um fenómeno cinético (EISENBERG, 1984). O amido, sendo um *polímero semi-cristalino*, deverá exibir ambas as transições.

O movimento molecular do polímero, que define a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), é contrariado por forças coesivas ao longo da cadeia e entre cadeias. Cadeias rígidas requerem temperaturas elevadas para que se atinja o nível de movimento molecular necessário à transição vítrea (ZELEZNAK & HOSENEY, 1987). Vários investigadores constataram que a presença de grupos laterais volumosos ou ligações cruzadas (“cross-links”) entre as cadeias diminuem a mobilidade da cadeia e aumentam  $T_g$ , enquanto que grupos laterais flexíveis fazem diminuir  $T_g$  (ARMENIADES & BAER, 1977). JIN *et al.* (1984) sugeriram ainda que as regiões cristalinas actuam como ligações físicas cruzadas conferindo rigidez às regiões amorfas, tendo um efeito semelhante ao das ligações químicas cruzadas.

De acordo com a literatura sobre polímeros, existe uma ampla diferença entre  $T_g$  e  $T_o$  (temperatura de início de gelatinização). Sabe-se também que estes polímeros podem ser maleabilizados, isto é, podem-se tornar maleáveis, flexíveis. A maleabilização dos cristais ocorre no intervalo de temperaturas entre  $T_g$  e  $T_o$ . Vários investigadores documentaram a ocorrência de maleabilização de cristais no amido (YOST & HOSENEY, 1986).

MAURICE *et al.* (1985) já tinham afirmado que ocorre uma transição vítrea mesmo antes da fusão dos cristalitos, sendo a gelatinização controlada pela mobilidade molecular na fase amorfa que envolve os cristalitos. Ensaio experimentais realizados por BILIADERIS *et al.* (1986b) em amido de arroz confirmaram esta ideia, mas LIU & LELIÈVRE (1991) detectaram  $T_g$  a temperaturas muito mais baixas. No entanto, a mudança na capacidade calorífica de dispersões aquosas de amido usada para medir  $T_g$  com DSC é frequentemente muito pequena, e a detecção de  $T_g$  pode ser bastante difícil (BILIADERIS, 1991a,b). BILIADERIS *et al.* (1986b), sugerem ainda que muitos grânulos de amido não apresentam esta transição com nitidez provavelmente devido à natureza heterogénea da fase amorfa.

A  $T_g$  é reversível e por conseguinte, um polímero vítreo pode ser aquecido, arrefecido abaixo do seu ponto vítreo e exibir uma transição vítreo durante um segundo aquecimento (ZELEZNAK & HOSENEY, 1987).

Vários factores influenciam  $T_g$  pela alteração da geometria molecular, flexibilidade, ou forças entre as cadeias do polímero. Alguns desses factores são apresentados de seguida.

#### a) Teor de Humidade

É sabido que a água e outros solventes de baixo peso molecular têm um efeito plastificante em muitos polímeros e que diminuem  $T_g$  (FUZEK, 1980). CHAN *et al.* (1986), referem que a plastificação de moléculas orgânicas vítreas pela água pode afectar as suas características de relaxação, à semelhança da plastificação de polímeros sintéticos, o que é extremamente importante na caracterização e comportamento dos alimentos no processamento e armazenamento (LEVINE & SLADE, 1988).

De acordo com a literatura, à medida que o teor de humidade diminui, há um concomitante aumento em  $T_g$ .

Quando ZELEZNAK & HOSENEY (1987), realizaram ensaios de DSC numa série de amostras de amido de trigo cujos teores de humidade variavam entre 12 e 24%, verificaram que ocorria uma clara mudança na capacidade calorífica das amostras com teores de humidade entre 13 e 22% (Figura 22).

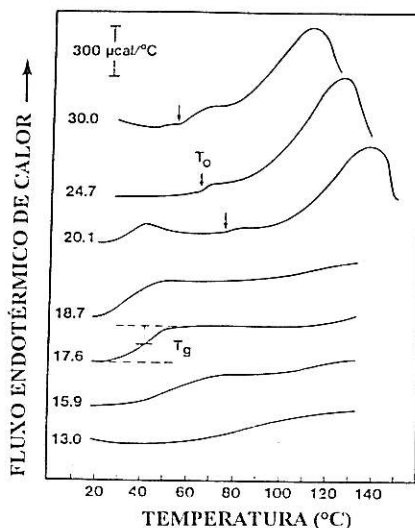


Figura 22 - Termograma de DSC de amido de trigo nativo a vários teores de humidade. As setas indicam a temperatura de início de gelatinização ( $T_o$ ) nas amostras com 30.0, 24.7 e 20.1% de humidade. A temperatura de transição vítreo ( $T_g$ ) é mostrada nas amostras com 20.1, 18.7, 17.6, 15.9 e 13.0% de humidade.

Fonte: ZELEZNAK & HOSENEY (1987).

Existia um progressivo aumento na temperatura de transição vítrea com a diminuição dos níveis de humidade, dando uma curva típica  $T_g$  vs. humidade (Figura 23).

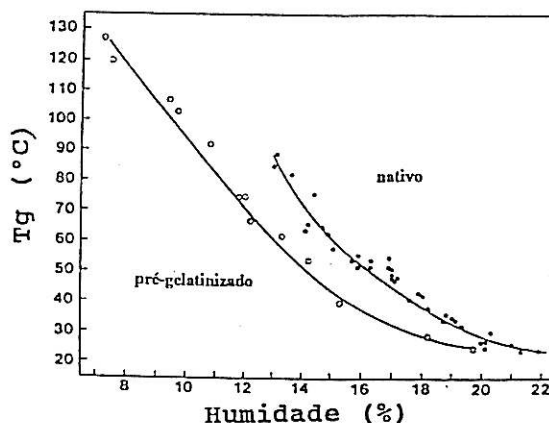


Figura 23 – Curva da resposta da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) aos diferentes teores de humidade em amido de trigo nativo e pré-gelatinizado.  
Fonte: ZELEZNAK & HOSENEY (1987).

Para níveis de humidade superiores a 22%,  $T_g$  ocorreu abaixo da temperatura ambiente. Isto indica claramente que uma transição vítrea ocorre no amido.

#### b) Cristalinidade

Estudo feitos em polímeros semi-cristalinos sintéticos mostram que à medida que o grau de cristalinidade aumenta, a  $T_g$  também aumenta (JIN *et al.*, 1984). Assim, à medida que a razão entre as regiões amorfas e as regiões cristalinas aumenta,  $T_g$  deverá diminuir. ZELEZNAK & HOSENEY (1987) investigaram a transição vítrea de amido de trigo pré-gelatinizado e compararam com a de amido de trigo nativo (Figura 23). A diferença em  $T_g$  aparentemente reflecte a diferença no grau de cristalinidade entre os dois amidos. O amido pré-gelatinizado não era cristalino, enquanto que o amido nativo tinha 15 a 35% de material cristalino (BANKS & GREENWOOD, 1975). Os resultados para o amido mostraram-se assim consistentes com aqueles que têm sido observados com polímeros sintéticos.

A explicação sugerida para estes resultados tem por base a já referida ideia de que no amido, as regiões cristalinas estão provavelmente, entremeadas ao longo das regiões amorfas, actuando como ligações físicas cruzadas na rede polimérica. Os cristalitos não estão envolvidos na transição vítrea, excepto no sentido em que actuam como pontos de ligação que restringem o movimento da “espinha dorsal” do polímero. Assim, em polímeros com um maior grau de cristalinidade, há uma maior restrição ao movimento dos segmentos, resultando num aumento de  $T_g$ . Este efeito é semelhante ao da diminuição da humidade. Além disso, o efeito do decréscimo de humidade é mais

acentuado num sistema de maior cristalinidade, como se pode observar na comparação entre amido nativo e pré-gelatinizado.

### c) Mono e Oligossacáridos

Pode-se considerar que os mono e oligossacáridos têm baixa massa molecular em comparação com o amido e os seus componentes. Assim, ROOS (1995) afirma que podem ser considerados como plastificantes do amido e diminuir  $T_g$ . ROOS & KAREL (1991) consideram mesmo que, em geral, a adição de componentes com baixa massa molecular diminui  $T_g$ .

### d) Tamanho das Moléculas de Amido

Segundo ROOS & KAREL (1991), a moléculas de amido maiores corresponde uma temperatura de transição vítrea maior. Se houver uma diminuição no tamanho destas moléculas, haverá um valor de  $T_g$  menor.

A importância de reconhecer que a água em particular, diminui  $T_g$  relaciona-se fundamentalmente com o controlo pela transição vítrea de processos como a gelatinização e a retrogradação, que influenciam a textura e a estabilidade dos produtos alimentares que contenham amido. Estes fenómenos processam-se somente na gama de temperaturas  $T_g < T < T_m$  (BILIADERIS, 1992).

Visto que os polímeros no estado vítreo são mecânica e quimicamente inertes numa escala de tempo realista, o arrefecimento brusco e o armazenamento de um produto abaixo da sua  $T_g$  característica permitirá preservar a maior parte das suas qualidades. Contudo, deve-se ter em conta que quando um produto passa de um estado vítreo para um estado emborrachado (por exemplo pelo aumento da temperatura ou do teor de humidade), há uma enorme quebra na viscosidade (de  $10^{12}$  para  $10^3$  Pa.s) e no módulo de elasticidade (de  $10^9$  para  $10^3$  Pa), resultando um aumento da mobilidade da cadeia e das reacções cinéticas (NOEL *et al.*, 1990; BILIADERIS, 1992).

### 3.6.3.5 - GELATINIZAÇÃO E FUSÃO COMO TRANSIÇÕES DE FASE

A gelatinização do amido ocorre durante o aquecimento do amido nativo numa quantidade suficiente de água. Detecta-se a gelatinização pela observação de diversas alterações na fracção de amido. De acordo com OLKKU & RHA (1978), a gelatinização

inclui (1) perda de birrefringência dos grânulos; (2) difusão a partir dos grânulos e dissolução de moléculas lineares; (3) aumento da claridade da mistura amido-água; (4) hidratação e dilatação dos grânulos até um tamanho várias vezes superior ao original; (5) um marcado aumento da consistência até um valor máximo e (6) formação de uma pasta ou de um gel.

Já para MARCHANT & BLANSHARD (1978), o fenómeno da gelatinização poderia resumir-se a três etapas: difusão de água para o interior do grânulo; perda de birrefringência devido à hidratação (que é facilitada pela fusão) e dilatação dos grânulos.

#### a. Estudos por Perda da Birrefringência

A perda de birrefringência em suspensões amido-água pode ser usada na determinação da gama de temperaturas de gelatinização com o auxílio da microscopia óptica sob luz polarizada. BURT & RUSSEL (1983) mostraram que a perda de birrefringência estava associada à finalização da transição de fusão observada em DSC e que ocorreu mesmo a elevadas temperaturas e baixo teor de água. O amido de trigo perde por completo a birrefringência quando é aquecido a 65°C em excesso de água (>70% de humidade), mas quando este teor é reduzido para 50%, a temperatura necessária é 75°C. Para um teor em água de 30%, um tratamento térmico a 132°C é insuficiente para causar a perda de birrefringência no mesmo amido (ELIASSON & LARSSON, 1993).

#### b. Estudos por Difraccção de Raios-X

A fusão de cristalitos durante a gelatinização é apoiada por estudos com difraccção de raios-X, os quais mostram a perda de ordem semicristalina (ROOS, 1995). Segundo ZOBEL *et al.* (1988), em polímeros sintéticos a fusão provoca o desaparecimento dos cristais devido à formação de um estado líquido amorfo. É sabido que os polímeros sintéticos apresentam uma elevada viscosidade, mesmo no estado líquido, o que obviamente se aplica a biopolímeros e biopolímeros plastificados pela água como o amido (ROOS, 1995).

A perda de cristalinidade durante o aquecimento do amido numa quantidade suficiente de água ocorre à medida que a temperatura vai aumentando acima da temperatura de gelatinização.

A extensão da cristalinidade pode ser observada pelo decréscimo de intensidade no padrão de difraccção de raios-X. ZOBEL *et al.* (1988), verificaram que a teores de humidade elevados e intermédios a perda de cristalinidade registada a partir da intensidade do padrão de difraccção no amido de batata está de acordo com a temperatura de fusão determinada por DSC. Os mesmos autores constataram que os resultados obtidos por DSC e raios-X confirmam a teoria de que a gelatinização e a ruptura do grânulo dependem

dos cristalitos com vários graus de perfeição. Os cristalitos tornam-se desordenados a temperaturas que dependem da quantidade de água disponível para a fusão. ZOBEL *et al.* (1988) concluíram que para um teor de água igual ou superior a 30%, o comportamento do amido foi análogo ao de outros polímeros naturais e sintéticos onde o grau de ordem de cristalinidade e as interações com plastificantes constituem os principais factores que determinam, entre outras propriedades, o comportamento de fusão.

### c. Estudos por DSC

Termogramas de DSC de amido com teores de água baixos e intermédios mostram frequentemente múltiplas endotermas, que têm sido interpretadas de modo diferente por diferentes autores (ROOS, 1995). Na Figura 24 apresentam-se as transições térmicas que sugerem a gelatinização e a fusão dos cristalitos durante o aquecimento.

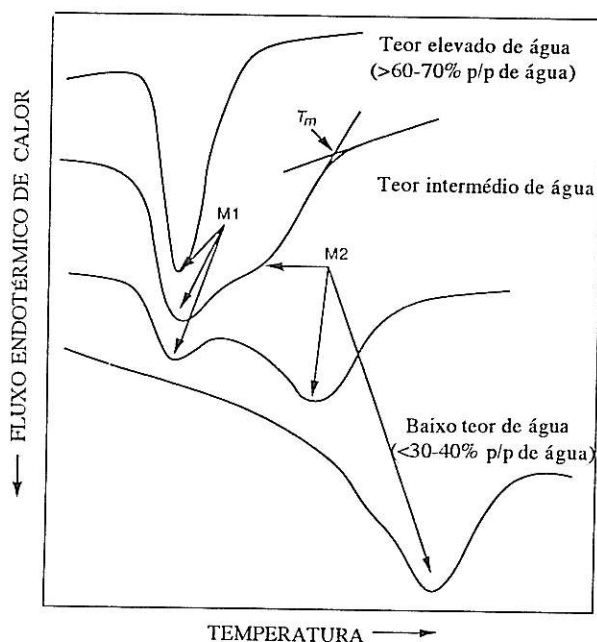


Figura 24 - Representação esquemática de termogramas de DSC típicos de amido aquecido a vários teores de água. O aquecimento a teores elevados de água até à gama de temperatura de gelatinização produz uma endoterma simples,  $M_1$ . A teores de humidade intermédios outra endoterma,  $M_2$ , é observada como uma saliência da endoterma  $M_1$  ou como uma endoterma separada. A baixos teores de humidade obtém-se somente  $M_2$ . A temperatura de fusão,  $T_m$ , aumenta com o acréscimo do teor em água.

Fonte: Roos (1995).

Estas transições podem produzir duas endotermas,  $M_1$  e  $M_2$ , as quais reflectem a desorganização dos cristalitos induzida pela água e pelo aquecimento. A elevadas temperaturas podem também ser observadas transições, as quais têm sido atribuídas

a processos de ordem-desordem de complexos amilose-lípidos (BILIADERIS *et al.*, 1986b; BILIADERIS, 1991a, b).

Algumas teorias têm sido propostas para explicar o fenómeno da multiplicidade dos picos. DONOVAN (1979) sugeriu primeiro que quando há excesso de água no meio, todos os cristalitos de amido fundem cooperativamente (endoterma  $M_1$ ); este processo é facilitado pela hidratação/dilatação das regiões amorfas do grânulo. À medida que a água se torna limitante, somente parte dos cristalitos funde com este mecanismo, enquanto que os restantes dão origem a uma segunda endoterma,  $M_2$ , registada a uma temperatura mais elevada, de acordo com a teoria das interacções polímeros-água de FLORY (1953). Esta teoria, baseada em termodinâmicas de equilíbrio, descreve o decréscimo do ponto de fusão de equilíbrio de um polímero  $T_m^\circ$  para um novo valor  $T_m$ , como uma função da fracção de volume do diluente, de acordo com a equação de Flory-Huggins.

ROOS (1995), afirma que os resultados experimentais onde se aplicou esta equação são escassos. A equação de Flory tem sido útil para descrever razoavelmente bem a fusão do amido por DSC, particularmente para volumes molares de água inferiores a 0.7 (BILIADERIS, 1992). A sua aplicação a sistemas de amido tem sido questionada recentemente, pois as condições de verdadeiro equilíbrio não têm sido encontradas durante a gelatinização (SLADE & LEVINE, 1987). Não obstante, de um ponto de vista prático, a análise de Flory é útil por fornecer uma base de comparação da estabilidade térmica dos materiais ricos em amido e permitir uma estimativa da  $T_m$  aparente sob variados teores de humidade e regimes de aquecimento (BILIADERIS, 1992).

Outra das explicações que tem sido adiantada baseia-se no facto das zonas cristalinas, em diferentes grânulos, apresentarem diferente estabilidade (EVANS & HAISMAN, 1982; LIU & LELIÈVRE, 1992). A água migra de um local para outro dentro da amostra à medida que os diversos grânulos gelatinizam. Assim, os picos das endotermas bifásicas correspondem a transições de fusão de material cristalino (cristalitos), com diferentes estabilidades, a diferentes teores de água. Crê-se que se o teor de água da suspensão é suficientemente elevado, isto é, para cima de 65%, cada grânulo absorve água sem restrição e observa-se um único pico na endoterma ( $M_1$ ). Se o teor de água é inferior a este nível, há competição entre os grânulos pela água. Os grânulos menos estáveis fundem primeiro, absorvem água e esgotam-na rapidamente. Os grânulos mais estáveis fundem a temperaturas mais elevadas ( $M_2$ ). À medida que o teor em água é reduzido, poucos grânulos apresentam capacidade para gelatinizar num meio restrito em água e então, o primeiro pico decresce em tamanho, enquanto que o segundo pico aumenta e é atingido a uma temperatura mais elevada. Se o teor em água é suficientemente reduzido, detecta-se somente o 2º pico a temperatura mais elevada (LELIÈVRE, 1992).

Contrariando a hipótese acima descrita, e tendo como base resultados calorimétricos em amido, BILIADERIS *et al.* (1986) propuseram que os múltiplos perfis de

fusão simplesmente reflectiam a fusão dos cristalitos e processos de reorganização que ocorram simultaneamente durante o aquecimento dinâmico no calorímetro ( Figura 25).

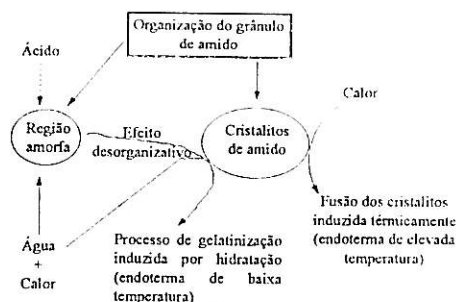


Figura 25 - Representação esquemática dos mecanismos de transição de fase nos grânulos de amido.

Fonte: BILIADERIS (1983).

Na sequência das etapas de gelatinização-fusão (parciais ou não), que se observam na maior parte dos tratamentos hidrotérmicos, a cristalinidade da amostra diminui, e o amido vai adquirir uma estrutura muito mais acessível aos enzimas. Mas a elevada degradabilidade do amido gelatinizado é devida fundamentalmente ao aumento da capacidade de absorção da água que, em consequência, induz uma melhor acessibilidade aos enzimas ( BULÉON *et al.* , 1990).

No caso do amido granular, a gelatinização necessita de um amolecimento prévio da fracção amorfa para haver uma suficiente absorção de água. Segundo os mesmos autores, os termogramas com múltiplos picos referidos na literatura compreenderiam de facto fenómenos de fusão e de recristalização. A gelatinização seria então a passagem de um estado cineticamente metaestável a um estado instável, onde as cadeias se reorganizariam. SLADE & LEVINE (1990) recomendam que se considere o amido como uma dispersão de cristalitos na fase amorfa: a água está localizada essencialmente nesta última fase. Assim, a condição prévia a qualquer gelatinização é uma transição vítrea, que permita às moléculas de água reentrar nas fases condensadas (ZELEZNAK & HOSENEY, 1987). As moléculas de água devem ser consideradas como um *agente plastificante*, que vai aumentar a mobilidade dos segmentos de cadeias nas zonas amorfas, aumentando o volume livre e diminuindo a viscosidade local: é necessário que exista 30% de água para que o efeito plastificante surja. Quando as moléculas de solventes estão presentes, a interacção entre estas moléculas e os segmentos amorfos do polímero conduzem a uma diminuição da temperatura de transição vítrea: é uma plastificação (BILIADERIS *et al.*, 1986).

Como vimos até agora, embora seja largamente aceite a ideia de que a transição endotérmica que ocorre durante a gelatinização seja devida, pelo menos em parte, a uma fusão, mantém-se ainda uma considerável controvérsia quanto à natureza exacta dos

fenómenos moleculares envolvidos (BILIADERIS, 1991). Parte da controvérsia tem origem no facto da gelatinização ser um acontecimento relativamente complexo e as curvas de DSC variarem com factores tais como o teor de humidade, a taxa de aquecimento e o tamanho da amostra.

#### a) Teor de Humidade

A dependência da temperatura da endoterma do teor de água e o efeito plastificante da água no amido causam uma diminuição acentuada na temperatura de fusão. Adições de pequenas quantidades de água nestes materiais aumentam a mobilidade das cadeias, provocando uma relaxação estrutural e descendo a temperatura de fusão. O efeito plastificante do aumento dos teores de água a uma temperatura constante, é equivalente ao aumento da temperatura para um teor de humidade constante (SLADE & LEVINE, 1987a).

A Figura 26 mostra perfis de DSC típicos para misturas de água e amido de arroz “ceroso”.

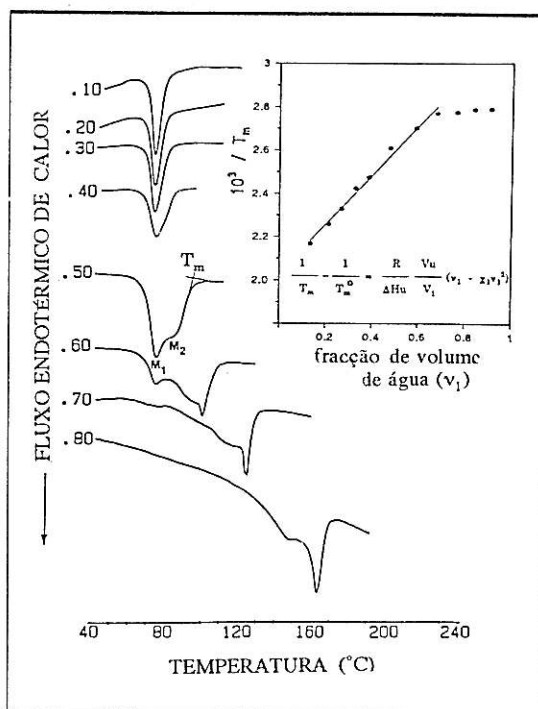


Figura 26 - Curvas de DSC de misturas amido de arroz “ceroso”/água para várias fracções (em massa) de amido. O rectângulo inserto mostra os valores de fusão de acordo com a teoria de Flory.

Fonte: BILIADERIS (1992).

Verifica-se que as misturas de água e amido de arroz “ceroso” contendo mais do que 60% (p/p) de água mostram uma endoterma simples e simétrica que ocorre acima do intervalo de temperaturas de gelatinização. Parece assim que a perda de cristalinidade durante o aquecimento do amido com suficiente teor em água ocorre a temperaturas mais elevadas do que a temperatura de gelatinização (ROOS, 1995).

Para baixos teores de água o tamanho da endoterma de fusão diminui com o decréscimo do teor de água, confirmando os resultados obtidos por DONOVAN (1979) para a batata.

#### b) Taxa de Aquecimento e Tamanho da Amostra

Quando se aquecem a diferentes taxas suspensões relativamente concentradas de amido, os perfis de DSC apresentam diferenças (LELIÈVRE, 1992). Taxas de aquecimento mais lentas traduzem perfis de DSC com maior números de picos do que taxas de aquecimento mais rápidas (Figura 27).

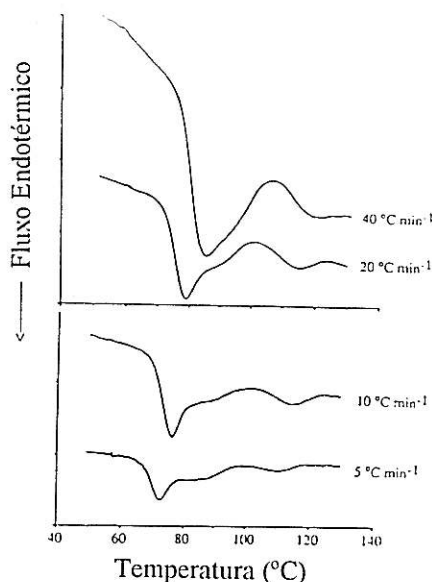


Figura 27 - Efeito da taxa de aquecimento nos perfis de DSC em suspensões concentradas de amido.

Fonte: LIU & LELIÈVRE (1991b).

Mas este registo não significa necessariamente que a taxas de aquecimento mais lentas ocorra recristalização após uma fusão parcial no início e que, quando o aquecimento é mais rápido (30°/min.), não exista tempo suficiente para que estes processos tenham lugar (LELIÈVRE, 1992).

BILIADERIS *et al.* (1986) sugerem a seguinte explicação: para taxas de aquecimento lentas, imediatamente após o pico  $M_1$  e devido à mobilidade molecular, existe uma oportunidade para rearranjos moleculares das cadeias dos cristalitos. Quando a

taxa de aquecimento aumenta e por causa do “annealing” ser um processo relativamente lento, em  $M_1$  ocorrerá a fusão de mais cristalitos.

Outro factor a influenciar poderá ser o de que as taxas de aquecimento mais rápidas talvez não permitam uma redistribuição da água na amostra (LIU & LELIÈVRE, 1991).

#### c) Efeito “annealing”

Se a taxa de aquecimento é suficientemente lenta, ocorre a fusão parcial seguida de cristalização. A temperatura da endoterma é então aumentada. Este fenómeno é fácil de demonstrar em ensaios onde a suspensão de amido é mantida a uma dada temperatura (NAKAZAWA *et al.*, 1984).

#### d) Presença de Solutos

Frequentemente, a presença de glúcidos traduz-se num aumento da temperatura de gelatinização, podendo ou não afectar a entalpia de gelatinização. Tem-se considerado que isto é devido:

- (1) à capacidade dos glúcidos de diminuírem a água disponível (DERBY *et al.*, 1975);
- (2) às interacções amido-glúcidos que estabilizam as regiões amorfas (HANSEN *et al.*, 1989);
- (3) ao aumento do volume livre e efeito anti-plastificante da sacarose comparativamente com a água pura (LEVINE & SLADE, 1990).

WOOTTON & BAMUNUARACHCHI (1980) testaram em DSC o efeito da sacarose e do cloreto de sódio no comportamento de gelatinização do amido de trigo, tendo verificado que para concentrações de sacarose de 0 a 45% (p/p) registou-se uma diminuição na entalpia de gelatinização ( $\Delta H_G$ ) e um aumento do pico da endoterma de gelatinização. Quanto ao cloreto de sódio, até uma concentração de 6% (p/p) na fase aquosa, também diminui a  $\Delta H_G$ , mas teores elevados de NaCl aumentam  $\Delta H_G$  e diminuem a temperatura do pico.

CHUNGCHAROEN & LUND (1987) verificaram que a sacarose e o sal aumentam a temperatura de gelatinização do amido de arroz decrescendo a respectiva entalpia. Estes autores estão de acordo com MAURICE *et al.*, (1985) e BILIADERIS *et al.*, (1986b) os quais consideram ser o grânulo de amido constituído por três fases: cristalitos, fase amorfa consistindo essencialmente em amilose, e regiões amorfas intracristalinas constituídas por ramificações densas de amilopectina.

Na presença de solutos como os glúcidos e os sais, a mobilidade da água e a sua capacidade de actuar como plastificante diminuem (CHINACHOTI *et al.*, 1991a), resultando em necessidades energéticas maiores para existirem transições de fase (SPIES & HOSENEY, 1982). A presença de NaCl a concentrações entre 1 e 2% pode causar um aumento muito maior na temperatura de gelatinização do que a sacarose, provavelmente devido às interacções iónicas entre o sódio e os grupos hidróxilo do amido (CHINACHOTI *et al.*, 1991b). Para EVANS & HAISMAN (1982) cada soluto tem um efeito específico na temperatura de gelatinização.

#### e) Danos Mecânicos

Os danos mecânicos podem afectar a resposta da estrutura do amido aos vários regimes de temperatura, tempo e concentração de solventes aos quais o amido é exposto para gelatinizar (BILIADERIS, 1990).

Os valores de  $T_p$  (temperatura máxima do pico da endoterma) obtidos por PRAVISANI *et al.*, (1985) eram superiores aos obtidos por STEVENS & ELTON (1971) e DONOVAN (1979) tendo HART & BLANSHARD (1982) tentado justificar as diferenças com os diferentes processos de extracção do amido.

STEVENS & ELTON (1971) usaram o DSC para estudar em amido de trigo, os danos provocados nos grânulos devido a acções mecânicas como a moenda. Verificaram que à medida que os danos aumentavam, a entalpia de gelatinização diminuía. Este comportamento foi interpretado por WRIGHT (1984) como resultante da gelatinização parcial do amido provocado pela penetração de água nas secções danificadas do grânulo precedente ao aquecimento.

AHMED & LELIÈVRE (1978) mostraram, por ensaios de DSC, que a ordem nos grânulos é alterada após a secagem de suspensões aquosas de amido de trigo (20 a 40% p/p). Assim que a temperatura excedesse certos limites (40°C) existia uma redução nos valores de  $\Delta H_G$ , presumivelmente devido à fusão parcial dos cristalitos menos termo-estáveis dos grânulos (NAKAZAWA *et al.*, 1984; MAURICE *et al.*, 1985).

#### f) Razão Amilose/Amilopectina

Esta razão também é importante como elemento de análise nas transições de fase. STEVENS & ELTON (1971) compararam endotermas de amostras com 50% de humidade, de amido de milho rico em amilose (70% de amilose), de amido de milho normal (25% amilose) e de amido de milho “ceroso” (100% amilopectina). O valor de  $\Delta H_G$  obtido para o amido “ceroso” foi de -4.9 cal/g, enquanto que para o amido normal foi de -3.6 cal/g. Para o amido rico em amilose não foi determinado qualquer valor porque o pico era muito pequeno e extenso.

As entalpias de transição usualmente observadas para os grânulos de amido situam-se entre 2.2-6.0 cal/g (BILIADERIS *et al.*, 1986). Em geral, quanto mais resistente for o grânulo á gelatinização, mais energia é requerida para a fusão da sua estrutura (WOOTON & BAMUNUARACHCHI, 1979a; BILIADERIS, 1986).

Segundo BILIADERIS (1990), a temperatura de fusão e a entalpia de transição podem não ser rigorosamente determinadas devido à influência de todos estes factores. Assim, as entalpias de gelatinização devem ser interpretadas com precaução quando usadas como índice de cristalinidade do amido, porque elas dependem de diferentes acontecimentos termodinâmicos: inchamento dos grânulos, fusão dos cristalitos (endoterma), hidratação e recristalização (exoterma).

### 3.6.4 - COMPLEXOS AMIDO-LÍPIDOS

Anteriormente já se referiu que a amilose forma complexos com o iodo, álcoois e ácidos gordos. Diversos produtos de panificação incluem emulsionantes na sua formulação por terem capacidade para retardar o a firmeza e retrogradação do amido. O mecanismo exacto da sua acção é ainda incerto, mas é frequentemente relacionado com a formação de complexos amilose-lípidos (BILIADERIS, 1991a, b). Para MEUSER *et al.*, (1987) os lípidos com cadeias de ácidos menos saturados são complexados em menor extensão. A formação desta nova estrutura, que ocorre em grânulos onde estejam presentes amilose e lípidos, tem sido observada em estudos por difracção de raios-X, dando um modelo de estrutura do tipo V. Este complexo entre a amilose e a fracção de lípidos do amido tem provavelmente, a forma de uma hélice com 6 e/ou 7 resíduos de glucose por volta. Metodologias como a Ressonância Magnética Nuclear têm permitido concluir que estes complexos existem já nos grânulos de amido nativo (MORRISON, 1995). Estudos feitos em cereais pareceram ainda revelar que os lípidos do amido não estão ditribuídos uniformemente pela fracção de amilose, e muito provavelmente existem dois tipos de amilose, designados por amilose complexada com lípidos (“lipid-complexed amylose”) e amilose livre de lípidos (“lipid-free amylose”) (MORRISON *et al.*, 1993).

Os complexos amilose-lípidos podem apresentar diferentes formas estruturais que diferem sobretudo no grau de organização das hélices (BILIADERIS, 1992; MORRISON, 1995):

- os complexos do tipo I são essencialmente amorfos, apresentam baixo valor de  $T_m$  e podem passar a uma forma semi-cristalina (tipo II);
- os complexos do tipo II exibem os padrões típicos de V-amilose.

É interessante verificar que a entalpia de transição dos complexos mantém-se constante com o acréscimo de cristalinidade, o que indica que as interações entre as hélices contribuem muito pouco para o total de energia requerido para dissociar o complexo, isto é,  $\Delta H$  inclui essencialmente contribuições energéticas provenientes da desordem conformacional das hélices. A formação de complexos é termorreversível no arrefecimento do complexo amilose-lípido fundido, apresentando histerese térmica devido a um arranjo das hélices amilose-lípidos numa organização de elevada ordenação, correspondendo a estruturas supermoleculares por agregação de hélices (BILIADERIS *et al.*, 1985).

Parece certo que a formação de complexos entre a amilose e os diversos agentes complexantes previne a lexiviação da amilose durante a gelatinização, inibe a dilatação dos grânulos de amido aquecidos em água, e reduz a capacidade do amido de se ligar com a água (ELIASSON, 1985).

KUGIMIYA *et al.*, (1980) referem que a presença de complexos nos sistemas de amido é revelada em DSC por uma transição endotérmica na gama 110 a 120°C, devido á sua fusão.

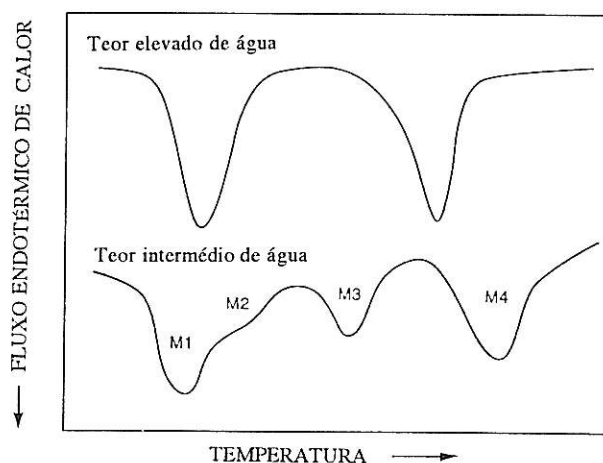


Figura 28 - Transições térmicas observadas em DSC durante o aquecimento do amido na presença de lípidos. A teores intermédios de água, as endotermas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> ocorrem durante a gelatinização, enquanto que as endotermas M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub> são devidas à fusão dos complexos amilose-lípidos. Uma exoterma entre M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub> indica a recristalização dos complexos amilose-lípidos fundidos em M<sub>3</sub>. A elevados teores de água obtêm-se duas endotermas bem separadas, uma relativa à gelatinização do amido e outra devida à fusão dos complexos amilose-lípidos.

Fonte: Roos (1995).

Como se mostra na Figura 28, os termogramas de DSC de amidos contendo lípidos apresentam uma 1ª endoterma a baixa temperatura, que é atribuída à fusão dos cristalitos originais. A exoterma que surge é provavelmente devida à recristalização dos

complexos amilose-lípidos, enquanto que a endoterma obtida a temperatura mais elevada é resultado da fusão do material recristalizado.

BILIADERIS *et al.*, (1985), referem que a água é essencial para os fenómenos de fusão e recristalização. Para estes autores, a água é necessária para plastificar os segmentos das cadeia amorfas, o que facilita a mobilidade das cadeias e a fusão a baixas temperaturas. A cristalização a elevados teores de água produz complexos cristalinos menos perfeitos e metaestáveis.

O teor de água influencia o pico das temperaturas de transição. Estes efeitos estão ilustrados na Figura 29 para o complexo amilose-monoesterato de glicerol. Verifica-se que a elevados teores de água, a fusão é altamente cooperativa e há uma transição única. Contudo, com o decréscimo do teor de humidade (<70%) a temperatura do pico é elevada e uma segunda transição a altas temperaturas aparece progressivamente (BILIADERIS, 1992).

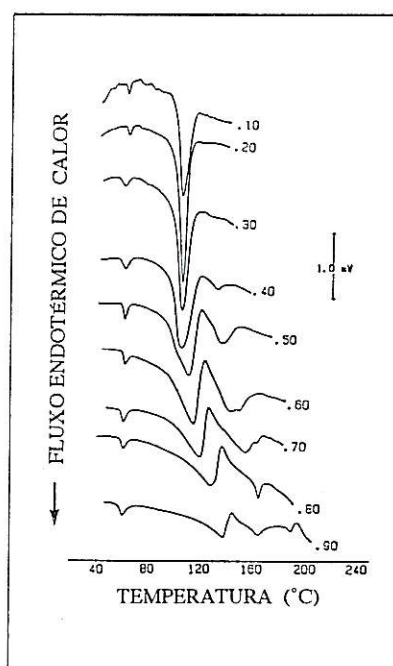


Figura 29 - Influência da água no comportamento de fusão do complexo amilose-monoesterato de glicerol (tipo I). Os números indicam o peso das fracções de complexo. Taxa de aquecimento de 10°C/min.

Fonte: BILIADERIS (1992).

Pelo facto da formação dos complexos ser termorreversível, as curvas de arrefecimento em DSC podem mostrar uma exoterma, indicando que durante o arrefecimento houve cristalização dos complexos amilose-lípidos fundidos (BILIADERIS, 1985).

Como já foi dito, os complexos amilose-lípidos podem formar-se durante a gelatinização. KUGIMIYA & DONOVAN (1981) verificaram que a entalpia de gelatinização dos vários amidos era menor quando a gelatinização ocorria com lípidos, tendo sugerido que este valor era aparentemente mais baixo, devido à cristalização exotérmica dos complexos amilose-lípidos que ocorreria em simultâneo.

ELIASSON (1986) também constatou que a entalpia de gelatinização diminuía na presença de agentes tensoactivos, provavelmente devido à libertação em simultâneo de calor pela formação de complexos.

As entalpias de fusão dos complexos amilose-lípidos variam usualmente entre 2 a 6 cal/g, dependendo da complexidade e das condições empregues para a formação dos complexos (BILIADERIS *et al.* , 1986).

## 4 – PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 – MATERIAIS

Os materiais utilizados foram:

- castanha fresca, adquirida no comércio, e que após secagem em estufa foi moída e crivada de acordo com os pontos 4.2.1 e 4.2.2;
- amido, obtido a partir de farinha de castanha e isolado por cinco processos distintos, descritos no ponto 4.2.3;
- protease, proveniente de *Aspergillus oryzae* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), com uma actividade de cerca de 3.5 unidades/mg sólido. Uma unidade de actividade da protease foi definida como a quantidade de enzima que liberta 1.0  $\mu\text{mol}$  de tirosina por minuto a partir da caseína, a pH 7.5 e 37°C.

### 4.2 – MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

#### 4.2.1 – EXECUÇÃO DA SECAGEM

A castanha fresca foi disposta em tabuleiros e seca em estufa de ventilação forçada a 40-42°C durante 3 dias. Após a secagem, foi descascada manualmente e moída.

#### 4.2.2 - EXECUÇÃO DA MOENDA

Obteve-se farinha de castanha após moenda da castanha seca num moíño de facas Thomas (Arthur H. Thomas Co., Phila., P.A., USA) usando um crivo de 1 mm de malha. Procedeu-se de seguida a uma segunda moenda, esta num moíño laboratorial Danfoss (Falling Number 3100), com um crivo de malha mais apertada (0.8 mm).

A farinha assim obtida foi depois guardada em recipientes estanques e à temperatura de refrigeração (2-4°C).

#### 4.2.3 - ISOLAMENTO DO AMIDO

Não obstante a relativamente extensa pesquisa bibliográfica efectuada, não se encontrou qualquer método de isolamento de amido aplicado a farinha de castanha. Assim, e tendo em conta o principal objectivo deste trabalho, seleccionaram-se 5 métodos de extracção de amido que tinham sido aplicados a outro tipo de materiais. Nessa selecção, tentou-se fazer uma escolha criteriosa e fundamentada de métodos laboratoriais que fossem na generalidade rápidos, simples e eficientes na extracção do amido, sem contudo deixarem de ser distintos entre si.

Os métodos utilizados, elaborados com base nos métodos seleccionados, são os que a seguir se depreendem.

##### 4.2.3.1 - ISOLAMENTO DO AMIDO USANDO BAIXA DEFORMAÇÃO A PH ALCALINO

###### (MÉTODO A)

Este método é baseado no método descrito com o mesmo nome por LIM *et al.*(1992), para a extracção de amido de aveia.

Cerca de 100 g de farinha de castanha foi misturada com 500 mL de hidróxido de sódio 0.01M e sujeita a agitação à temperatura ambiente durante 60 minutos. Seguiu-se a centrifugação (1,440 x g/ 20 minutos) desta mistura, tendo-se descarregado o sobrenadante e ressuspenso o sedimento em 500 mL de água destilada. Esta mistura foi então filtrada através de um peneiro de aço inox (53µm). O filtrado foi neutralizado com ácido clorídrico 1 M e a mistura foi centrifugada (1,440 x g/ 20 minutos). O sobrenadante foi descarregado, juntamente com os resíduos de cor castanha dispostos em camadas sobre o amido, os quais foram cuidadosamente removidos por raspagem. O amido foi lavado com água destilada (3 x 200 mL), recolhido por centrifugação, e seco durante 2 dias em estufa a 40-45°C (Figura 30).

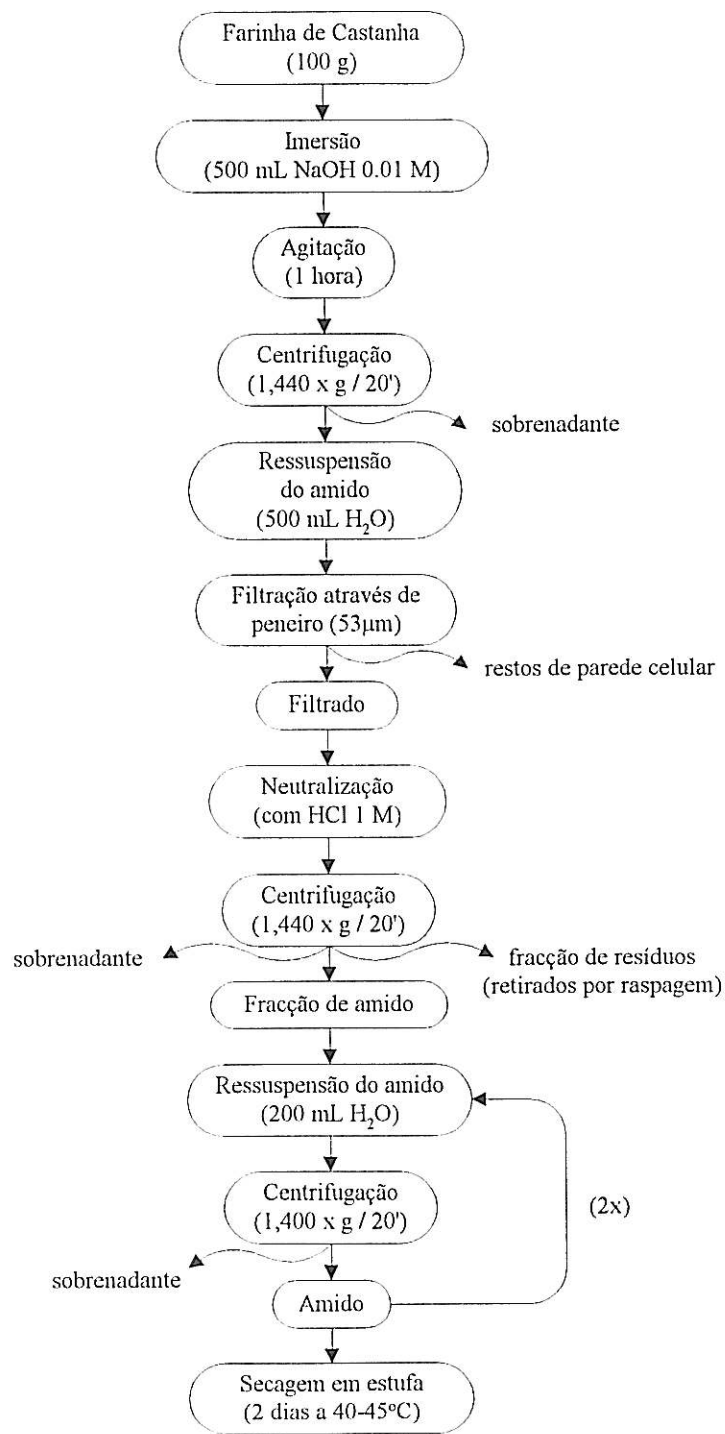


Figura 30 - Método A para isolamento de amido de castanha.

#### 4.2.3.2 - ISOLAMENTO DO AMIDO USANDO ELEVADA DEFORMAÇÃO EM ÁGUA

##### (MÉTODO B)

Este método é baseado no método descrito com o mesmo nome por LIM *et al.* (1992), para a extracção de amido de aveia.

Cerca de 120 g de farinha de castanha foi imersa em 360 mL de água destilada durante 6 horas a 20°C. Este encharcamento da farinha permitiu o enfraquecimento da ligação entre o amido e a proteína. Colocou-se depois o recipiente onde estava a mistura num banho de gelo. Sujeitou-se então a mistura a elevada deformação com o auxílio de um homogeneizador de tecidos, mais precisamente de um desintegrador (B. Braun Melsungen - Groschopp u. Co., Viersen/Rhed., West Germany). A mistura deformada, com uma temperatura final entre 4 e 10°C, foi então centrifugada (1,440 x g/ 20 minutos) e o sobrenadante e os resíduos foram descarregados. O sedimento de amido foi ressuspensão em água destilada e a mistura foi filtrada através de um peneiro de aço inox (53µm). O filtrado foi centrifugado (1,440 x g/ 20 minutos), o sobrenadante e os resíduos descarregados, e o amido foi seco durante 2 dias em estufa a 40-45°C (Figura 31).

#### 4.2.3.3 - ISOLAMENTO DE AMIDO USANDO PROTEASE A BAIXA DEFORMAÇÃO

##### (MÉTODO C)

Este método baseia-se no método com o mesmo nome descrito por LIM *et al.* (1992) no isolamento de amido de aveia.

Uma mistura de farinha de castanha (120 g), 600 unidades de protease e água destilada (360 mL), foi ajustada a pH 7.5 e manteve-se a 37°C durante 6 horas. O pH foi ajustado com NaOH 0.1M. Esta mistura foi centrifugada (1,440 x g/ 12 minutos) e o sobrenadante e as fracções residuais foram descarregadas. A fracção de amido foi ressuspensão em água e filtrada através de um peneiro (53 µm). O leite de amido recolhido foi então centrifugado (1,440 x g/ 20 minutos), repetindo-se a seguir a ressuspensão, a filtração e a centrifugação. Depois de isolado, o amido foi seco da forma usual (Figura 32).

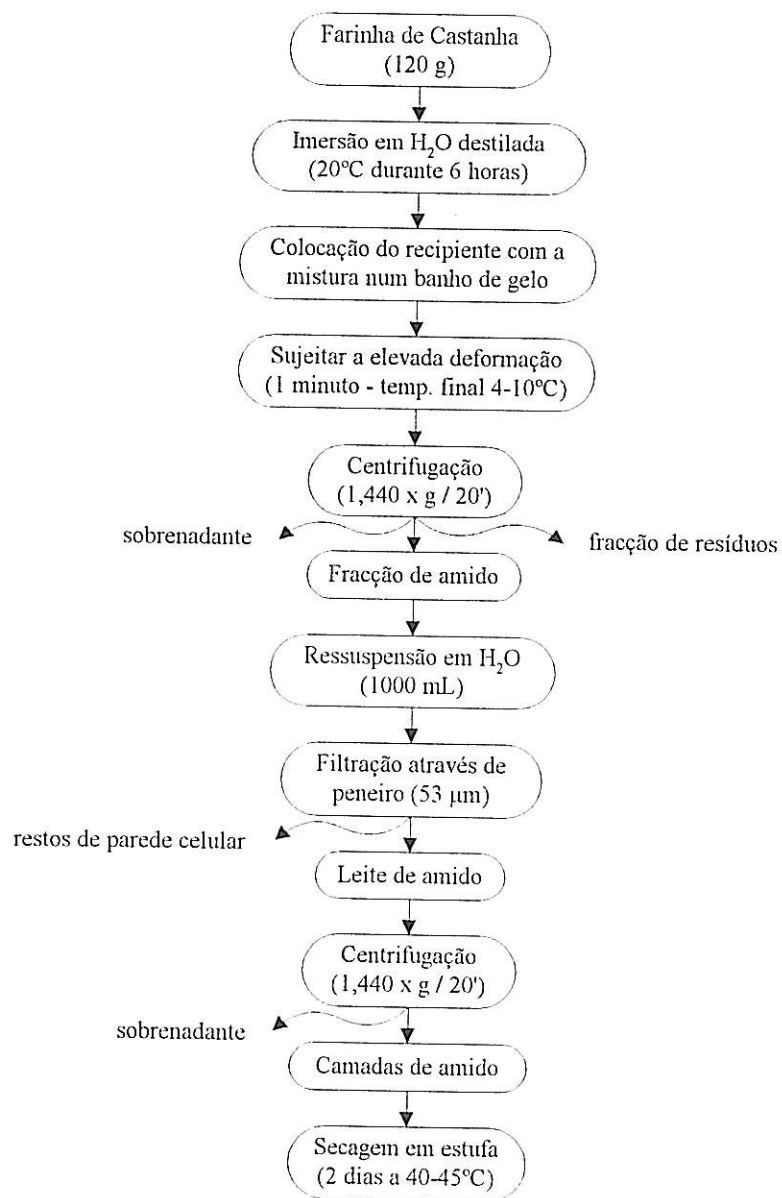


Figura 31 - Método B para isolamento de amido de castanha.

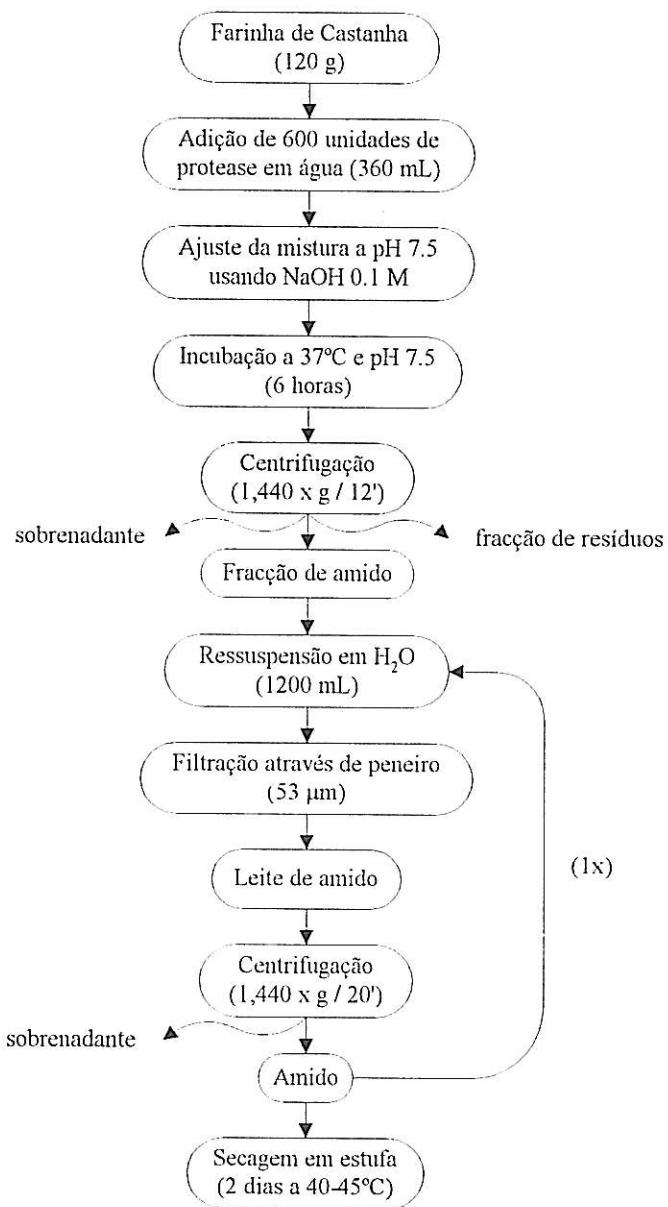


Figura 32 - Método C para isolamento de amido de castanha.

#### 4.2.3.4 - ISOLAMENTO DO AMIDO USANDO SUCESSIVAMENTE 3 CRIVOS

##### (MÉTODO D)

Este método baseia-se no método C proposto por Perez *et al.* (1993) na extracção de amido de amaranto.

Uma mistura de farinha de castanha (120 g) com uma solução de NaOH 0.25% (aproximadamente 300 mL) foi homogeneizada com um misturador. Colocou-se depois essa mistura num banho de refrigeração (4°C) durante a noite. No dia seguinte passou-se o homogeneizado por um crivo 180 µm. Recuperou-se a mistura que ficou retida no crivo e adicionou-se cerca de 150 mL da solução de NaOH (0.25%), tendo-se de novo homogeneizado com o misturador e crivado. A lavagem, homogeneização e passagem pelo crivo (180 µm) repetiram-se ainda por mais três vezes. Fez-se então passar a suspensão resultante sucessivamente por um crivo 75 µm e um crivo 53 µm. Centrifugou-se depois a mistura (1,440 x g/20 minutos). Depois de retirado o sobrenadante, raspou-se a camada mucilaginosa. Suspendeu-se o amido precipitado em água destilada e repetiu-se a centrifugação e a raspagem da camada mucilaginosa as vezes que se achou necessárias. Finalmente fez-se a neutralização da solução de amido com HCl 0.2 N. Secou-se em estufa a 40-45°C durante 2 dias (Figura 33).

#### 4.2.3.5 - ISOLAMENTO DO AMIDO USANDO TOLUENO E ETANOL

##### (MÉTODO E)

Este método baseia-se no método de isolamento de amido de loto utilizado por SUZUKI *et al.* (1992).

Preparou-se uma mistura de farinha de castanha com água destilada gelada, tendo-se de seguida espremido o homogeneizado numa gaze em dupla camada e à mão. O “bolo” da gaze voltou a ser espremido com água gelada. O extracto resultante foi mantido durante várias horas (de um dia para o outro) a 2°C. Recuperou-se então o amido do extracto por decantação. O amido foi lavado várias vezes por suspensão em água fria e centrifugação a 1,440 x g durante 30 minutos. O amido crú foi depois agitado durante 15 minutos com uma mistura de água e tolueno (2 : 1). O amido foi recolhido a partir desta suspensão leitosa por centrifugação a 1,440 x g durante 30 minutos, e o tratamento de tolueno foi repetido para remover a proteína. Depois, o amido foi lavado uma vez em etanol e várias vezes com água destilada por centrifugação. O amido assim purificado foi seco em estufa a 40-45°C durante 2 dias (Figura 34).

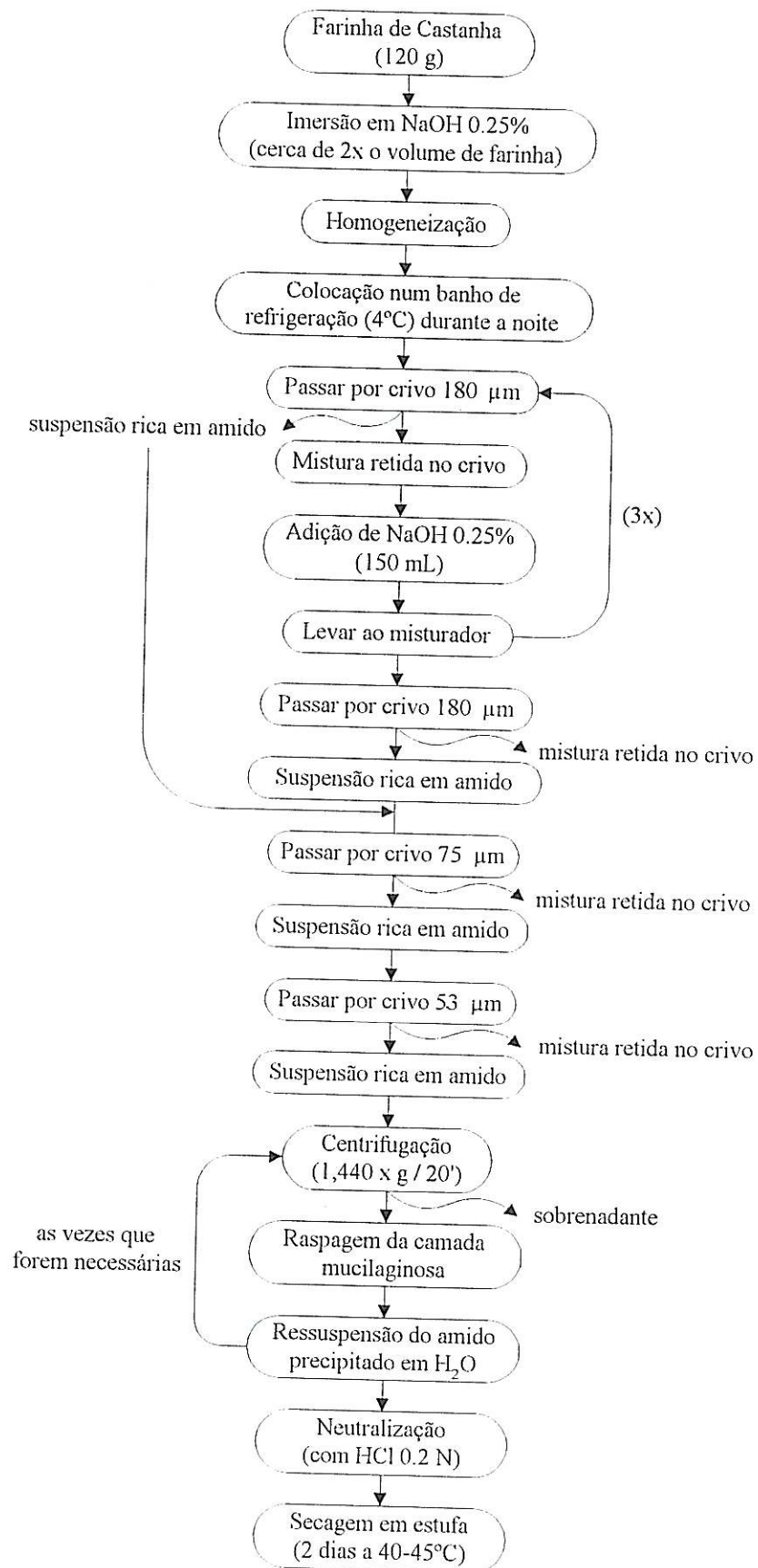


Figura 33 - Método D para isolamento de amido de castanha.

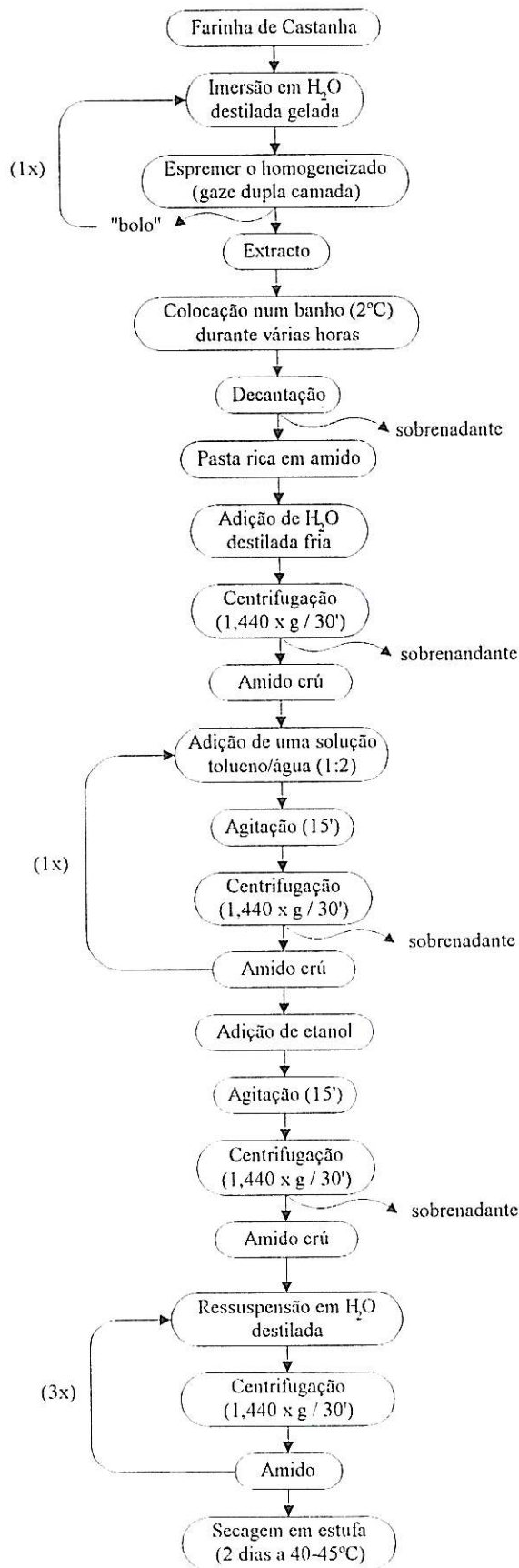


Figura 34 - Método E para isolamento de amido de castanha.

## 4.3 – MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

### 4.3.1 – DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE

A humidade da farinha de castanha e dos amidos isolados foi determinada por gravimetria após dessecação em estufa à temperatura de 100-105°C, até se atingir peso constante.

### 4.3.2 – DETERMINAÇÃO DA CINZA

Foi efectuada por calcinação da amostra em mufla (a 550°C) até peso constante (Método A.O.A.C., 1975).

### 4.3.3 – DETERMINAÇÃO DA GORDURA BRUTA

Esta fracção foi determinada por extracção com éter de petróleo (40-60°C) num aparelho de Soxhlet durante 16 horas.

### 4.3.4 - DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA BRUTA

Para esta determinação multiplicou-se por 6.25 a percentagem de azoto total obtido pelo método de Kjeldhal, usando como catalizador o sulfato de cobre saturado.

### 4.3.5 - DETERMINAÇÃO DO AMIDO

O teor de amido da farinha de castanha foi determinado por polarimetria, usando como solvente dimetilsulfóxido (DMSO) a 90%, segundo o método descrito por GARCIA & WOLF (1972).

Pesou-se um grama de farinha de castanha (até 1 mg de erro) e misturou-se com o solvente, sujeitando-se a mistura resultante a agitação à temperatura ambiente durante 24

horas. O amido dissolvido foi então separado por centrifugação. Antes de se medir a rotação óptica fez-se ainda uma diluição do extracto amido-DMSO, obtendo-se o teor de amido em castanha numa base seca da seguinte forma:

$$\% \text{Amido} = \frac{(a)(100)(V_1)(V_3/V_2)}{[\alpha]_{546}^{25}(P)(W)(100 - \% \text{humidade})} \quad (1)$$

onde

$\alpha$  = rotação óptica observada, em graus;

$[\alpha]_{546}^{25} = 220^\circ$  = rotação específica do amido em DMSO (90%);

P = comprimento da célula, em dm;

W = peso da farinha, em g;

$V_1$  = volume da mistura extracto de farinha de castanha-DMSO, em mL;

$V_3/V_2$  = factor de diluição, com  $V_2$  = volume da mistura (mL) extracto castanha-DMSO que foi diluído directamente com DMSO (90%) e  $V_3$  = volume final da mistura extracto-DMSO (mL).

#### 4.3.6 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMIDO NOS AMIDOS ISOLADOS

O grau de pureza do amido foi determinado recorrendo ao doseamento do amido pelo método polarimétrico de Ewers (Projecto de Norma Internacional ISO/DIS 10 520 (1994)), tendo-se usado o polarímetro electrónico PolAAr 21 (CA Optical Activity, LTD). O princípio deste método comporta duas determinações:

- uma porção da amostra é parcialmente hidrolizada com ácido clorídrico diluído e após clarificação e filtração, é medida a rotação óptica por polarimetria;
- uma segunda porção da amostra é tratada com etanol a 40% (v/v), para extrair os açúcares solúveis e os polissacáridos de menor massa molecular. Após clarificação e filtração, é medida por polarimetria a rotação óptica das substâncias solúveis em etanol a 40% (v/v).

O teor de amido na amostra foi dado como uma percentagem (de massa) relativa à matéria seca pela fórmula:

$$\frac{2000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}} \times \frac{100}{TMS} \quad (2)$$

onde:

P poder de rotação óptica total (graus);

P' poder de rotação óptica (graus) das substâncias solúveis em etanol;

TMS teor de matéria seca do amido (em percentagem);

$[\alpha]_D^{20}$  rotação óptica específica do amido puro, tendo-se adoptado para este tipo de amido o valor  $+184.0^\circ$ .

#### 4.3.7 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMILOSE

O teor de amilose da farinha de castanha foi determinado por colorimetria, segundo o método proposto por JULIANO (1971). Este método baseia-se na medição, a 620 nm, da intensidade da coloração azul resultante da reacção entre uma solução de iodo e a amilose presente na amostra.

Esta determinação foi efectuada na farinha de castanha original e na farinha de castanha desengordurada por três processos distintos:

- 1º extracção por éter de petróleo (40-60°C) durante 16 horas em aparelho de Soxhlet;
- 2º extracção por éter de petróleo (40-60°C) durante 16 horas, seguida de extracção por metanol a 85% (16 horas), ambas em aparelho de Soxhlet;
- 3º extracção por éter de petróleo (40-60°C) durante 16 horas em aparelho de Soxhlet, seguida de extracção por n-butanol saturado em água (extracção a quente por três vezes, durante 1 hora cada), segundo o método descrito por SRIDHAR & LAKSMINARAYANA (1994).

A determinação da concentração de amilose nas amostras de farinha assim preparadas baseou-se numa curva padrão previamente traçada (Figura 35). Para o seu estabelecimento utilizaram-se soluções de amilose com concentrações que variavam de 0.000 a 0.020 mg/mL.

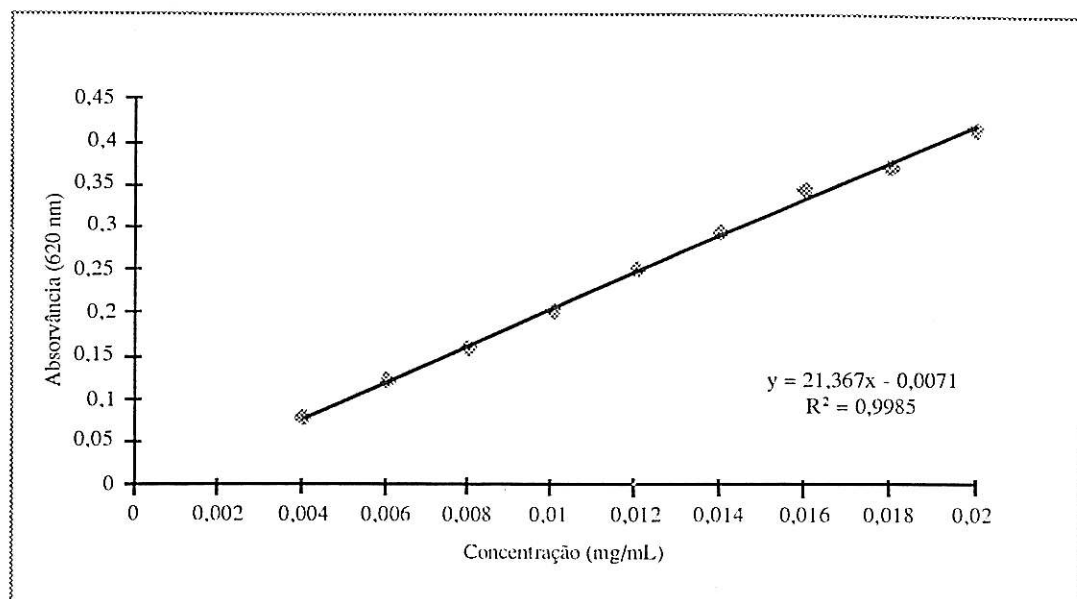


Figura 35 - Curva padrão para o cálculo da concentração de amilose nas diferentes amostras de farinha de castanha preparadas.

#### 4.4 - MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FUNCIONAL

##### 4.4.1 - AMILÓGRAFO BRABENDER

As características de gelatinização da farinha de castanha e dos amidos isolados foram determinadas a partir de perfis amilográficos, obtidos num amilógrafo Brabender Duisburg.

Os amilogramas foram executados numa concentração fixa de 9% (p/v) de amido, tendo os ensaios sido conduzidos pelo seguinte regime:

- 1º - aquecimento desde 30 até 95°C à taxa 1,5°C/minuto;
- 2º - manutenção a 95°C durante 15 minutos;
- 3º - arrefecimento até 30°C à taxa 1,5°C/minuto.

#### 4.4.2 - MICROSCOPIA ÓPTICA

A fim de se observar, numa primeira fase, a forma e o aspecto geral dos grânulos de amido de castanha, procedeu-se á execução de preparações para o microscópio óptico da seguinte forma:

colocou-se uma gota de uma solução de iodo (0.2 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 100 mL de água) numa lâmina e, com a ajuda de uma hansa previamente esterilizada, diluiu-se uma porção de amido isolado nessa gota. Cobriu-se com uma lamela e observou-se ao microscópio óptico (Laborlux S, Leitz) que tinha incorporado uma câmara fotográfica (Wild Leitz, Wild MPS 52).

#### 4.4.3 - MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

A microscopia electrónica de varrimento permitiu uma observação mais rigorosa da forma e aspecto geral dos grânulos de amido de castanha (no amido nativo e nos amidos isolados), e a determinação precisa do seu tamanho.

A preparação das amostras seguiu o procedimento habitual em materiais biológicos deste tipo:

os porta-objectos foram parcialmente cobertos com fita adesiva (aderente dos dois lados) e sobre eles foram polvilhadas as amostras. Após se ter retirado o excesso de amostra com um insuflador procedeu-se à metalização das amostras com uma fina película de ouro-paládio (80 : 20).

Procedeu-se igualmente à observação de amostras retiradas do amilógrafo em quatro pontos distintos de cada ensaio realizado. Estas amostras foram sujeitas a uma rápida congelação em azoto líquido seguida de liofilização a  $-50^{\circ}\text{C}$  durante 30 horas. As amostras assim secas foram preparadas em porta-objectos como se descreveu anteriormente.

As fotografias foram tiradas num microscópio electrónico de varrimento ISI-D 130 (International Scientific Instrument), operado a 10kV com uma intensidade de corrente de 30  $\mu\text{A}$ .

A determinação das dimensões dos grânulos de amido foi feita com o auxílio do programa SemAfore, num microscópio electrónico de varrimento Jeol JSM 5420.

#### 4.4.4 - CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO

Na avaliação das características calorimétricas dos amidos isolados usou-se um calorímetro diferencial de varrimento Perkin-Elmer DSC 7 (Norwalk, CT) equipado com um controlador TAC 7/DX. A calibração foi feita com água desionizada e padrões de índio.

As amostras de amido (cerca de 3mg de amido base pura e seca) foram pesadas em cápsulas de alumínio de 20 $\mu$ L de capacidade, tendo-se adicionado água desionizada com uma micro-seringa por forma a que se atingisse o teor de humidade pretendido (12%, 40%, 60% e 70%).

Após terem sido hermeticamente fechadas, as cápsulas foram de novo pesadas, tendo permanecido em repouso durante uma hora à temperatura ambiente, para que se atingisse o equilíbrio no seu interior. Todos os ensaios seguiram o seguinte regime:

- 1º aquecimento (30 a 180°C) à taxa de 5°C/minuto;
- arrefecimento (180 a 30°C) à taxa de -5°C/minuto;
- 2º aquecimento (30 a 180°C) à taxa de 5°C/minuto.

Uma cápsula cravada e vazia foi usada como referência. As transições térmicas do amido foram definidas em termos de temperatura de início da endoterma ( $T_o$ ), temperatura do pico da endoterma ( $T_p$ ) e temperatura final da endoterma ( $T_e$ ), todas em °C, e entalpia de transição ( $\Delta H$ , J/g ou kJ/g).

## 5 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.1 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FARINHA DE CASTANHA

A matéria-prima que serviu de base a todo este trabalho foi sujeita a uma breve caracterização química, cujos primeiros resultados se expõem no quadro seguinte:

Quadro X - Breve composição química da farinha de castanha <sup>a</sup>.

Humidade	Gordura Bruta <sup>b</sup>	Proteína Bruta <sup>b</sup>	Cinza <sup>b</sup>	Amido <sup>b</sup>
9.37	2.99	7.04	2.04	48.26

<sup>a</sup> Valores médios de 2 ensaios.

<sup>b</sup> Valores expressos em % relativa à matéria seca.

Da análise dos resultados verifica-se que na farinha de castanha (castanha pilada moída), o constituinte maioritário é o amido, que expresso em termos de extracto seco se aproxima dos 50%. De igual forma os teores de gordura bruta, proteína bruta e de cinza bruta estão dentro dos valores normais já registados anteriormente por CHOUPINA (1993) e GONÇALVES FERREIRA & GRAÇA, M.E.S. (1977).

Quanto à composição química do próprio amido, nomeadamente a proporção relativa amilose/amilopectina, foi estimada com base no teor de amilose determinado para a farinha de castanha desengordurada.

Apesar do teor de amilose do amido ser habitualmente determinado com base na reacção clássica entre a amilose e o iodo, que constituem um complexo azul que é medido espectrofotometricamente ou por titulação potenciométrica, esta reacção não é um indicador absoluto do teor de amilose devido às interferências originadas pela amilopectina e pela presença de materiais intermédios. Contudo, demonstrou-se recentemente (WANG *et al.*, 1993) que existe uma correlação de cerca de 96% entre os valores do complexo amilose-iodo medidos pelos métodos tradicionais e o teor de amilose determinado por cromatografia de exclusão. Assim, os métodos baseados nesta reacção continuam a ser uma forma conveniente de estimar o teor de amilose. Apesar de, em geral, consumirem bastante tempo, fornecem resultados rigorosos e reproduzíveis (KNUTSON & GRAVE, 1994). Estes métodos envolvem quase sempre a dispersão e

desengorduramento do amido. Os ácidos gordos provenientes da gordura durante a dispersão do amido reduzem a cor azul do complexo por competirem directamente com o iodo na complexação da amilose. É ainda sabido que a amilose pode constituir naturalmente complexos com a gordura. Por estas razões justifica-se o desengorduramento prévio da amostra.

No nosso caso fez-se a determinação da amilose na amostra normal (farinha de castanha) e na amostra desengordurada (farinha de castanha sem gordura), tendo-se obtido os resultados expressos no Quadro XI.

Quadro XI - Teor aparente<sup>a</sup> de amilose (AM), de amilopectina (AMP) e da respectiva relação amilose/amilopectina na farinha de castanha e na farinha de castanha desengordurada.

AMOSTRA		Teor Aparente de		Relação AM/AMP
		Amilose <sup>b</sup> (AM)	Amilopectina <sup>b</sup> (AMP)	
Farinha de Castanha		24.81	23.45	1.06
Farinha de Castanha	éter de petróleo	33.25	15.01	2.22
	éter de petróleo + metanol (85%)	40.87	7.39	5.53
Desengordurada com	éter de petróleo + n-butanol sat. em água	43.12	5.14	8.39

<sup>a</sup> Valores médios de 2 ensaios.

<sup>b</sup> % (p/p) de farinha (base seca).

Como era previsível, o teor aparente de amilose na farinha de castanha é inferior ao valor obtido em qualquer das amostras de farinha de castanha desengordurada. Nestas últimas, o seu valor vai aumentando quando o desengorduramento é feito respectivamente por éter de petróleo, éter de petróleo + metanol (85%) e por éter de petróleo + n-butanol saturado em água.

Estes resultados estão de acordo com o que tem vindo a ser publicado, nomeadamente em trabalhos realizados com cereais desengordurados por diferentes solventes (CHUNG, O. K., 1991; FINNEY, POMERANZ & HOSENEY, 1976; MENDER, A., 1976; ROONEY, 1978; LORENZ & HWANG, 1986; SRIDHAR & LAKSMINARAYANA, 1994).

É comum considerar-se a existência de uma fracção de lípidos livres e uma outra de lípidos ligados. Os lípidos livres constituem a fracção de lípidos facilmente extraída por solventes não polares tais como éter de petróleo, hexano e éter dietílico num aparelho

de Soxhlet, num extractor Goldfish ou por agitação. Os lípidos ligados são aqueles que, a partir do resíduo proveniente da extracção dos lípidos livres, são extraídos com solventes mais polares, geralmente álcool ou álcool diluído numa pequena porção de um outro solvente, que frequentemente é a água. No entanto, é habitual considerar-se ser o n-butanol saturado em água o solvente mais eficiente, o que foi por nós confirmado, de entre os três processos de desengorduramento utilizados.

Recentemente (CHUNG, 1991) foi introduzida uma outra categoria de lípidos: os lípidos do amido. Estes, constituirão a fracção ligada ao amido e de difícil extracção, visto estarem presentes dentro dos grânulos de amido. Mesmo um solvente polar como o n-butanol saturado em água não os consegue remover à temperatura ambiente, sendo necessária a extracção a quente.

Ao fazermos o desengorduramento com éter de petróleo (para remoção dos lípidos livres), seguido do desengorduramento a quente com n-butanol saturado em água (para remoção dos lípidos ligados e dos lípidos do amido) estaremos possivelmente a fazer a extracção mais eficiente. Por essa razão, a estimativa do teor de amilose feita nesta amostra será provavelmente a mais próxima do valor real.

## 5.2 - COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE ISOLAMENTO DO AMIDO

### 5.2.1 - GRAU DE PUREZA DOS AMIDOS ISOLADOS E CÁLCULO DO RENDIMENTO

A determinação do teor de amido nos diversos amidos isolados revelou-nos o grau de pureza do amido obtido em cada processo. Esses resultados estão expressos no Quadro XII.

Quadro XII - Grau de pureza dos amidos isolados pelos diferentes métodos e respectivos rendimentos em amido bruto e amido puro.

Método de Isolamento	Teor de Amido no Amido Isolado <sup>a</sup> (%)	Rendimento em Amido Bruto <sup>a</sup> (%)	Rendimento em Amido Puro <sup>a</sup> (%)
A	93.53	62.52	58.48
B	91.66	73.92	67.75
C	91.44	79.86	73.02
D	95.73	44.70	42.79
E	87.52	74.22	64.96

<sup>a</sup> Médias de duas determinações, expressas em base seca (%p/p).

Pela análise do quadro pode constatar-se ser o método D (isolamento de amido usando sucessivamente três crivos) aquele que permite obter o amido mais puro (95.73%) seguindo-se, por ordem decrescente de pureza, os métodos A (93.53%), B (91.66%), C (91.44%) e E (87.52%). Contudo, é também o método D aquele que mostra o mais baixo rendimento, quer am amido bruto, quer em amido puro. Ainda relativamente a este parâmetro, é o método C (isolamento de amido usando protease) aquele que exibe melhores resultados, ou seja, é aquele que apresenta um melhor rendimento em amido puro (73.02%).

Uma observação mais atenta dos resultados revela que os métodos B e C obtiveram praticamente o mesmo grau de pureza no amido. No entanto, com o método C há uma maior recuperação do amido existente na farinha, isto é, perde-se menos amido durante o processo de isolamento. Sob este ponto de vista, o método C será pois preferível ao método B.

Não obstante o método E ter um rendimento em amido puro de 64.96% é, de longe, o amido com menor grau de pureza (87.52%).

Podemos ainda afirmar que nos métodos A, B e C, os rendimentos em amido bruto, respectivamente 62.5%, 73.9% e 79.9%, estão (sobretudo os dois últimos), relativamente próximos dos valores obtidos por LIM *et al.* (1992) com os mesmos métodos (com ligeiras alterações) em farinha de aveia, e que foram respectivamente de 85.5%, 78.8% e 88.8%.

Para os métodos D e E não é possível fazer essa comparação porque os respectivos autores não fazem referência ao rendimento dos processos.

### 5.2.2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS GRÂNULOS DE AMIDO

Neste trabalho fez-se uma caracterização dos grânulos de amido de castanha tendo em conta aspectos como o tamanho, a forma e a aparência geral.

A microscopia óptica permitiu obter imagens como a que é documentada pela Figura 36, que nos mostra grânulos de amido de castanha isolados, detectando-se facilmente a presença de camadas concêntricas de amido, que correspondem a anéis de crescimento do grânulo, e que estarão possivelmente associadas a zonas com índices refractivos alternadamente altos e baixos.

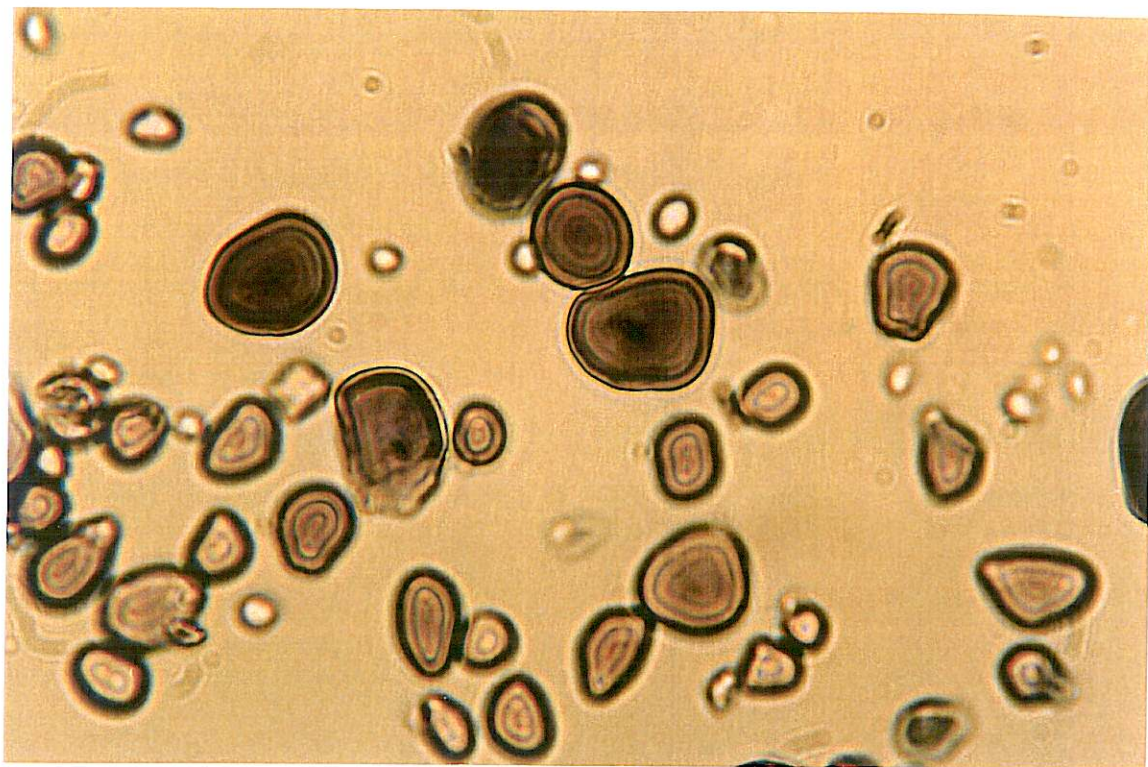


Figura 36 - Fotografia, em microscópio óptico, de grânulos de amido de castanha isolados, notando-se a presença dos anéis de crescimento (ampliação aproximada - 1000 X).

A microscopia electrónica de varrimento permitiu fazer uma caracterização mais precisa do aspecto, forma e tamanho dos grânulos, tendo-se procedido à medição destes quer na farinha de castanha, quer nos diferentes amidos isolados (Figuras 37 e 38).

Os grânulos de amido da farinha de castanha apresentam-se com a superfície coberta de partículas semelhantes a pequenas lascas, conferindo-lhes um aspecto bastante rugoso (Figura 37 A). Os grânulos estão envolvidos por uma espécie de material pulverizado que deverá ser constituído essencialmente por proteína e fibra (Figura 37 B) e que lhes dá um aspecto “empoeirado”.

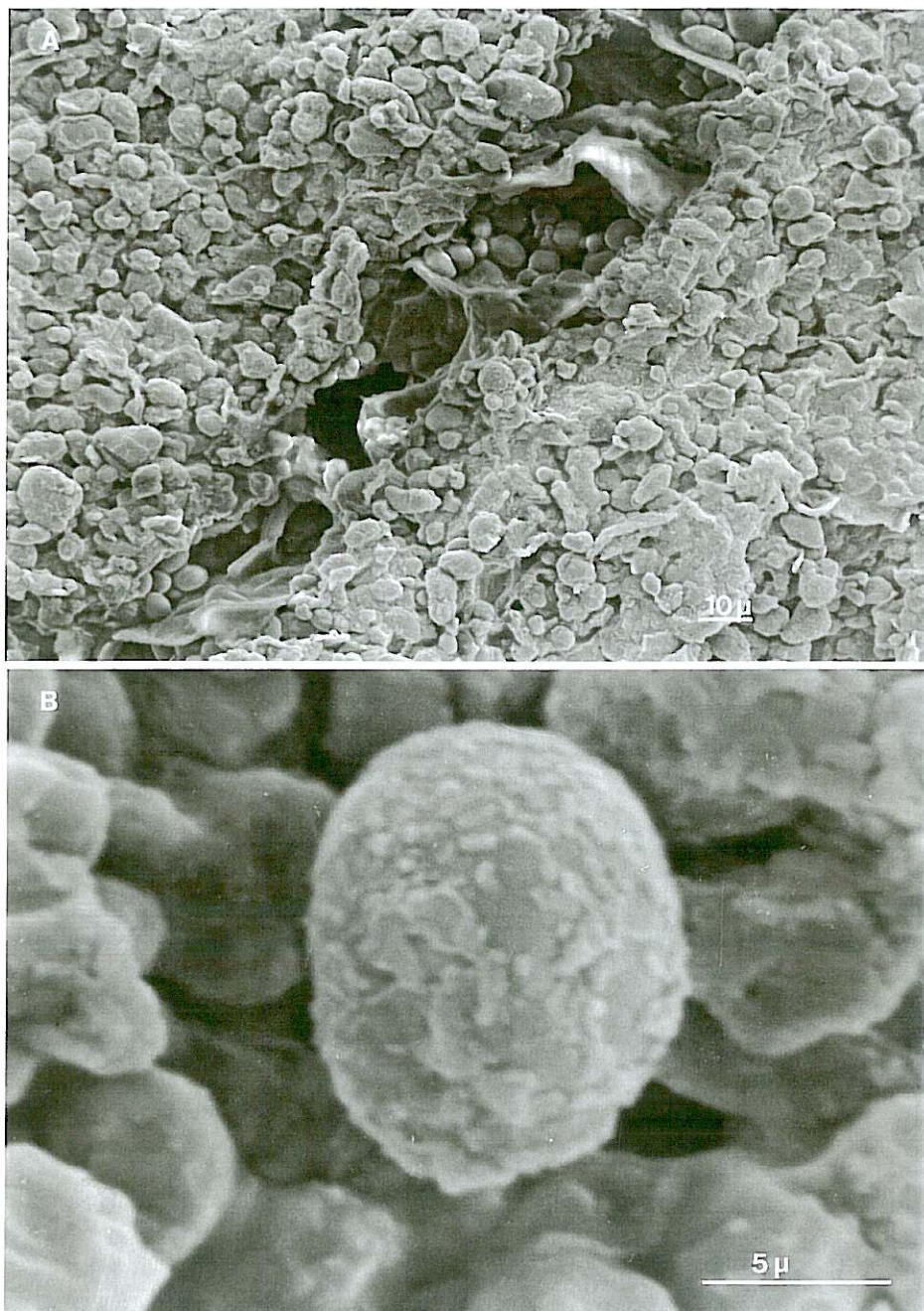


Figura 37 - Fotografias, em microscópio electrónico de varrimento, dos grânulos de amido nativo (farinha de castanha): A - aspecto geral da farinha, identificando-se facilmente os grânulos de amido; B - grânulo de amido nativo de castanha.

Já a superfície dos grânulos de amido livres da matriz de proteínas (grânulos dos amidos isolados) é semelhante em todos os amidos (A, B, C, D e E), sendo a superfície dos grânulos, em geral, lisa. No entanto, os grânulos apresentam frequentemente mossas ou concavidades, sulcos, estrias e outros tipos de irregularidades. Há também grânulos mais pequenos que têm por vezes faces achatadas contra grânulos maiores durante o crescimento (Figura 38).

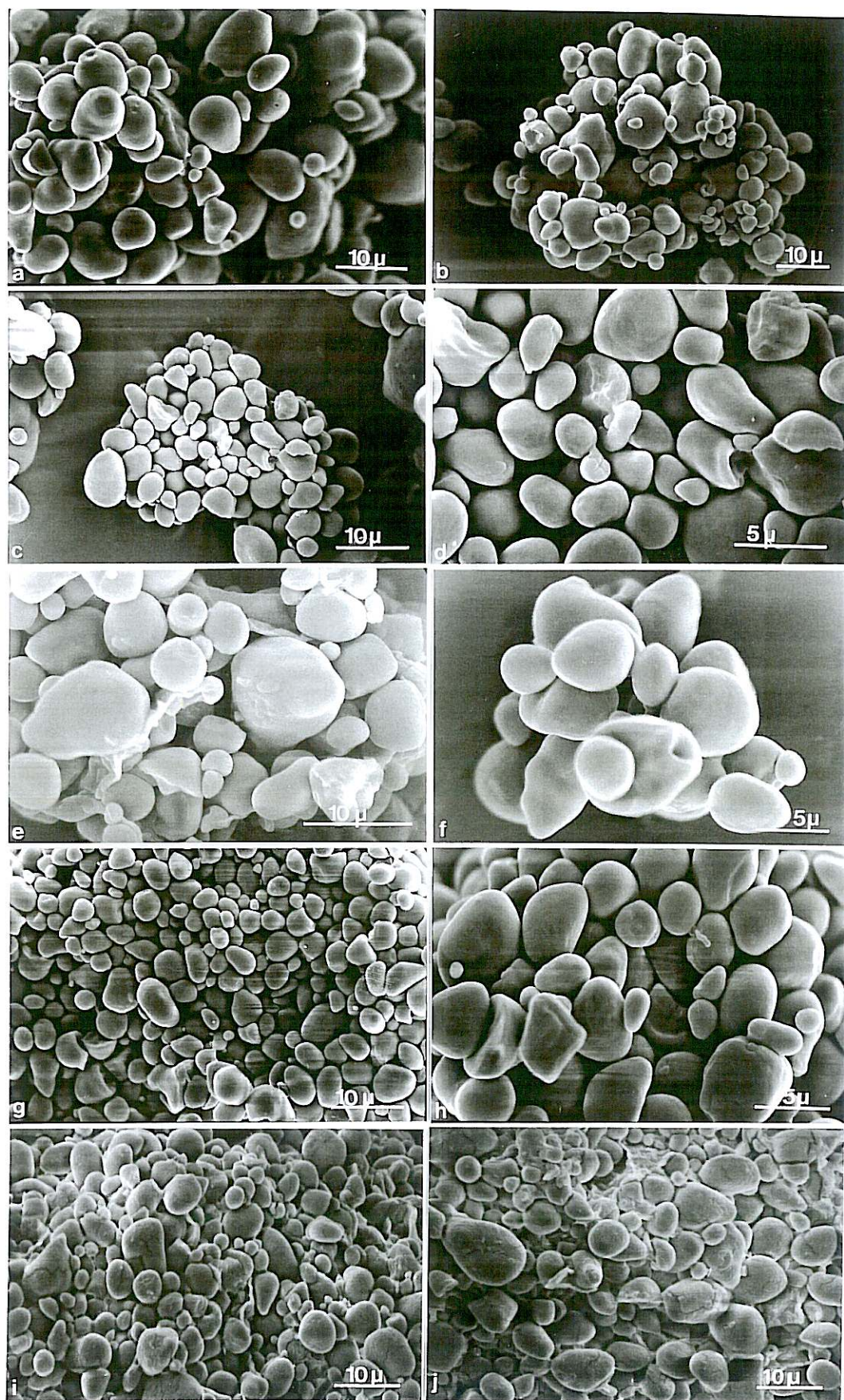


Figura 38 - Fotografias, em microscópio electrónico de varrimento, dos amidos isolados: a e b - amido isolado pelo método A; c e d - amido isolado pelo método B; e e f - amido isolado pelo método C; g e h - amido isolado pelo método D; i e j - amido isolado pelo método E.

Pode contudo considerar-se haver algumas diferenças no aspecto dos diferentes amidos isolados, nomeadamente:

- as fotografias dos grânulos isolados pelos métodos C e E mostram a presença de algumas impurezas, que corresponderão provavelmente a restos da matriz de proteína (Figura 38e, f, i, j), o que vem ao encontro dos resultados obtidos relativamente ao grau de pureza do amido, já que estes amidos eram os menos puros;
- o amido com maior grau de pureza, o amido isolado pelo método D, era aquele que apresentava claramente maior brancura na sua cor;
- é evidente a presença de fissuras nos grânulos de maior dimensão isolados pelo método E, enquanto que os grânulos mais pequenos parecem estar completamente íntegros. Nos restantes amidos não se detectou qualquer dano deste tipo nos grânulos. Isto é bem visível nas fotografias apresentadas na Figura 38, podendo atribuir-se ao facto do método E ser algo violento para a integridade dos grânulos e isso talvez aconteça porque há um número elevado de centrifugações a que o amido é sujeito, acrescido do uso de tolueno e etanol.

Quanto à **forma**, os grânulos de amido de castanha são polimorfos, apresentando as mais variadas formas, havendo grânulos esféricos, semi-esféricos, ovóides, com forma de feijão, com forma cónica, cilíndrica, com forma de gota e outras formas mais irregulares para as quais se torna difícil obter uma descrição precisa e correcta. Apesar disso, pode-se dizer que predomina a forma ovóide. Esta descrição vem ao encontro da que já anteriormente tinha sido feita por CHROUPINA (1993) relativamente a esta mesma espécie.

Relativamente ao **tamanho** dos grânulos, este é muito variável. Constatou-se igualmente que esta ampla variação de tamanhos se mantinha quer no amido nativo, quer nos diferentes amidos isolados.

Tendo em conta a ampla variedade de formas que se encontrou, optou-se por medir em cada grânulo apenas o valor do comprimento e o valor da largura, não se determinando outros parâmetros, como por exemplo, o diâmetro (Quadro XIII).

Quadro XIII - Dimensão dos grânulos de amido de castanha <sup>a</sup>.

Comprimento ( $\mu\text{m}$ )		Largura ( $\mu\text{m}$ )	
máximo	mínimo	máxima	mínima
13.90	1.90	13.30	1.35

<sup>a</sup> resultados obtidos a partir da medição de 50 grânulos.

A partir dos valores de comprimento e de largura medidos, procedeu-se à elaboração de classes pela regra de Sturges, tendo-se então obtido a distribuição dos valores por 7 classes de medida, da forma que se mostra nas Figuras 39 e 40.

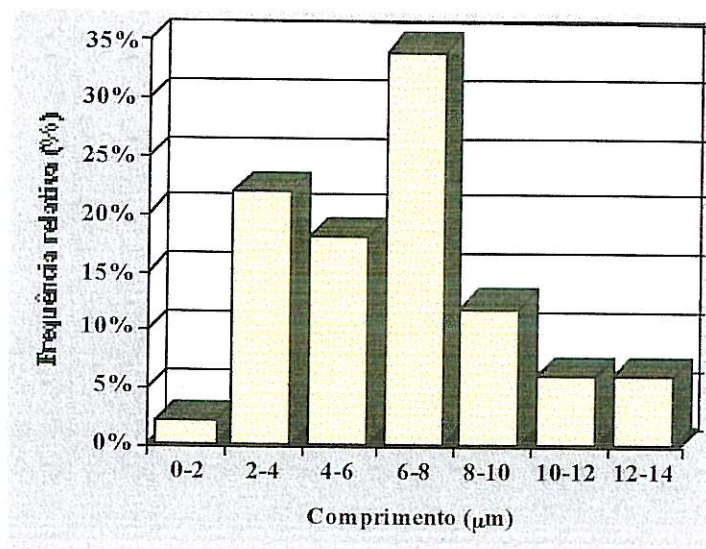


Figura 39 - Distribuição do comprimento dos grânulos de amido de castanha.

Os valores mínimo e máximo encontrados para o comprimento dos grânulos estão próximos dos valores encontrados por CHOUPIÑA (1993) para amido de castanha, respectivamente, 1.38  $\mu\text{m}$  e 17.83  $\mu\text{m}$ .

De acordo com as distribuições de frequências apresentadas (baseadas nos valores determinados da forma que se mostra nos Anexos I e II), verifica-se que cerca de 52% dos grânulos apresenta um comprimento entre 4 e 8  $\mu\text{m}$ , tendo a classe 6 - 8  $\mu\text{m}$  a maior representatividade (34%).

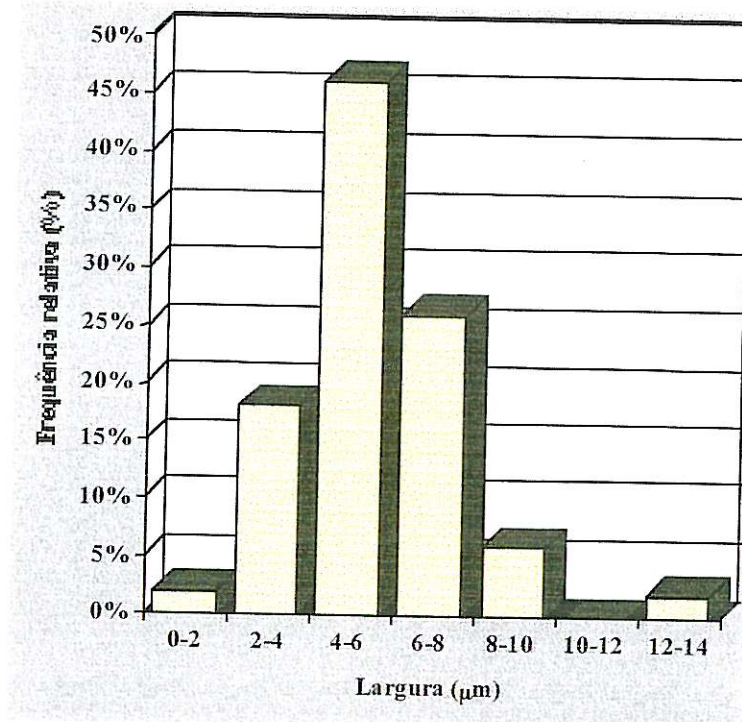
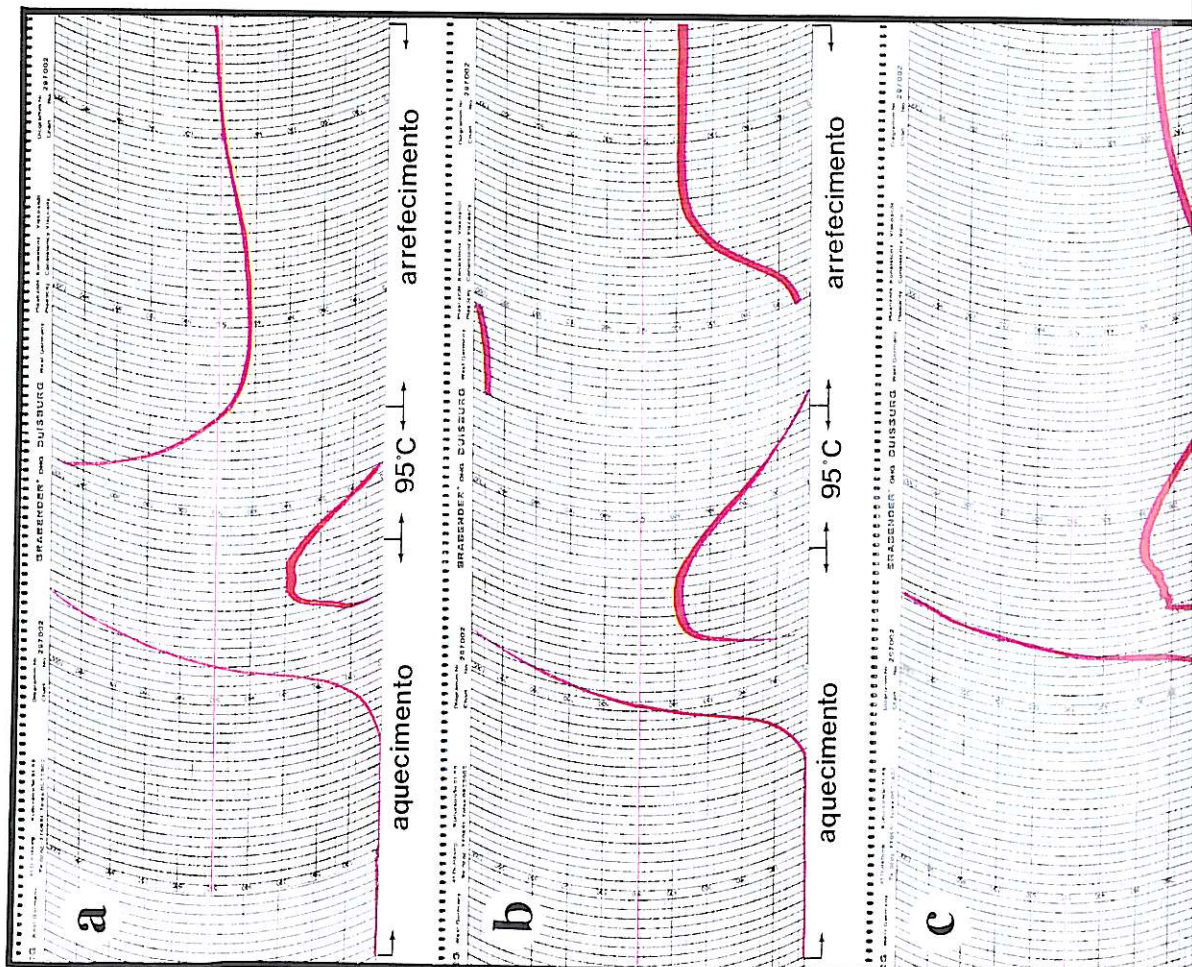


Figura 40 - Distribuição da largura dos grânulos de amido de castanha.

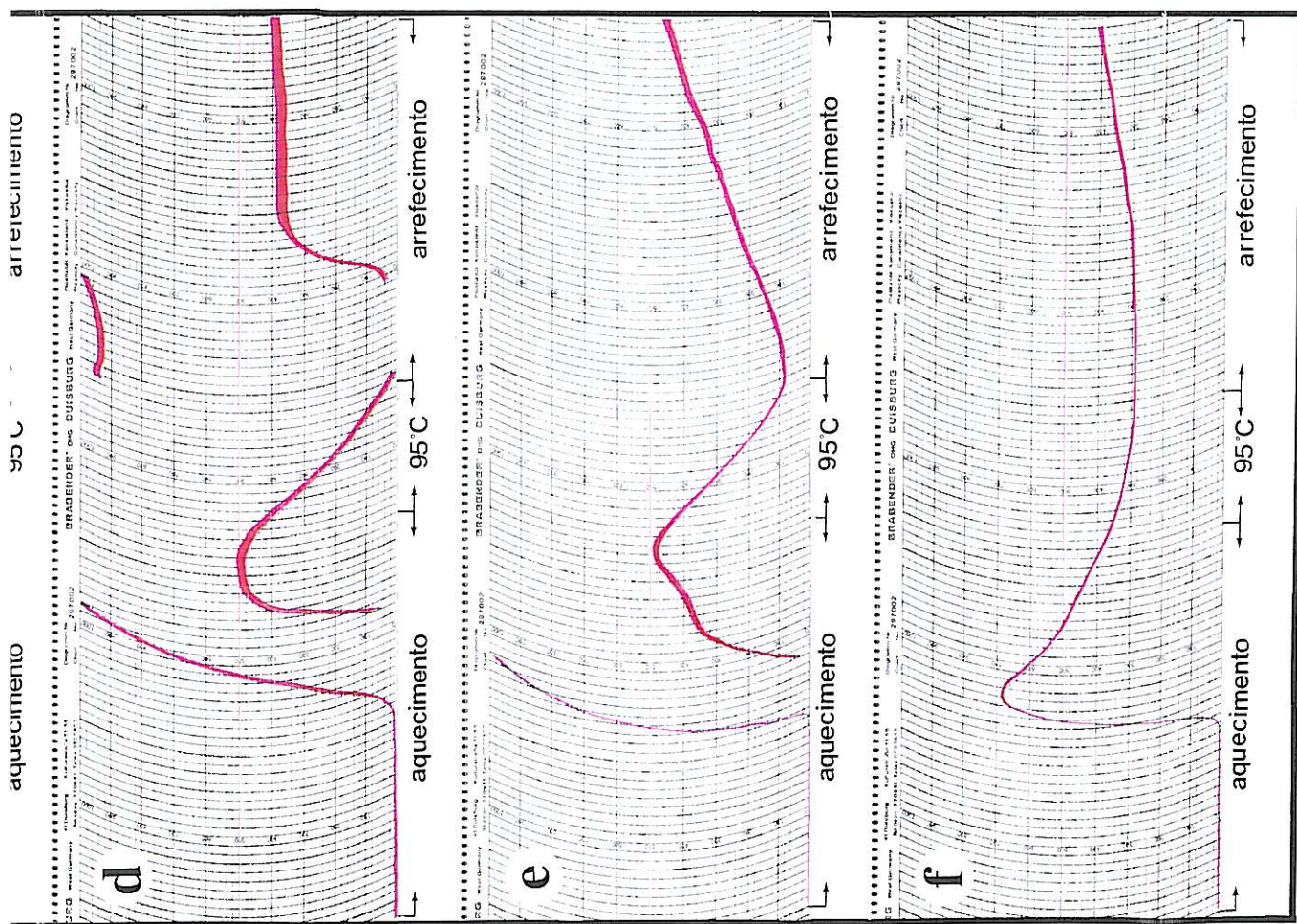
Relativamente à largura, a variabilidade foi ainda menor, concentrando-se cerca de 46% dos grânulos medidos na classe 4 - 6  $\mu\text{m}$ . A quase totalidade dos grânulos (96%) apresenta-se com a largura entre 2 e 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.3 - CARACTERIZAÇÃO AMILOGRÁFICA

A Figura 41 mostra os perfis amilográficos obtidos a partir dos diversos amidos de castanha isolados e da farinha de castanha original. Com base nestes perfis, elaboraram-se os Quadros XIV e XV.



- a - amido isolado pelo método A;
- b - amido isolado pelo método B;
- c - amido isolado pelo método C;
- d - amido isolado pelo método D;
- e - amido isolado pelo método E;
- f - farinha de castanha.



Quadro XIV - Temperatura de início de gelatinização, consistência máxima e respectiva temperatura para a farinha de castanha e para os diversos amidos isolados.

	Temperatura de início de gelatinização (°C)	Consistência Máxima (U.B.)	Temperatura no máximo de consistência (°C)
<b>Amido Isolado</b>			
Método A	64 - 64.5	1270	91 - 95
Método B	62.5 - 63	1370	91 - 95
Método C	65.5 - 66	1245	95
Método D	63 - 63.5	1450	93
Método E	63.5	1450	95
Farinha de Castanha	62	685	73

Quadro XV - Consistência a 95°C (inicial e final<sup>b</sup>), consistência a 30°C (no arrefecimento), "breakdown"<sup>c</sup> e "set-back"<sup>d</sup> para as pastas de farinha de castanha e dos diversos amidos isolados.

	<u>CONSISTÊNCIA<sup>a</sup> (Unidades Brabender)</u>				
	<u>95°C</u>				
	inicial	final <sup>b</sup>	"Breakdown" <sup>c</sup>	"Set-back" <sup>d</sup>	30°C
<b>Amido Isolado</b>					
Método A	1270	595	855	105	520
Método B	1370	1010	410	410	1370
Método C	1200	1080	205	190	1230
Método D	1435	970	515	440	1340
Método E	1450	1055	400	370	1420
Farinha de Castanha	390	290	400	120	405

<sup>a</sup> Valores obtidos em ensaios a 9% (p/v) de amido.

<sup>b</sup> Após permanecer 15 minutos a 95°C.

<sup>c</sup> Diferença entre a consistência máxima e a consistência mínima obtida no arrefecimento.

<sup>d</sup> Diferença entre a consistência final a 30°C e a consistência mínima obtida no arrefecimento.

## Início de Gelatinização

A temperatura de início de gelatinização oscila, nos amidos isolados, entre 62.5 e 66°C, podendo ordenar-se, relativamente a esta propriedade, os processos de isolamento da seguinte forma: o amido isolado pelo método B registou o início de gelatinização mais precoce (62.5 - 63°C), seguido dos amidos isolados pelos métodos D, E, A e C. É no entanto este último amido (isolado usando protease), aquele que apresenta o valor mais distante em relação à temperatura de início de gelatinização detectada na farinha de castanha (62°C). Parece assim que os processos de isolamento conferem alguma protecção ao amido, o que se poderá explicar pelo facto de estes amidos isolados não contactarem já com os enzimas que ainda existem na farinha, os quais, como se sabe, iniciam o seu ataque nas zonas mais desorganizadas, amorfas e intercrystalinas dos grânulos, que são precisamente as zonas onde se inicia o aumento de volume do grânulo na gelatinização. Assim sendo, ao usar-se protease no isolamento pelo método C, ter-se-á degradado uma boa parte dos enzimas presentes, e na sua ausência, este amido não fica tão fragilizado iniciando a gelatinização um pouco mais tarde. Outra explicação possível poderá consistir na menor degradação mecânica que este método provoca.

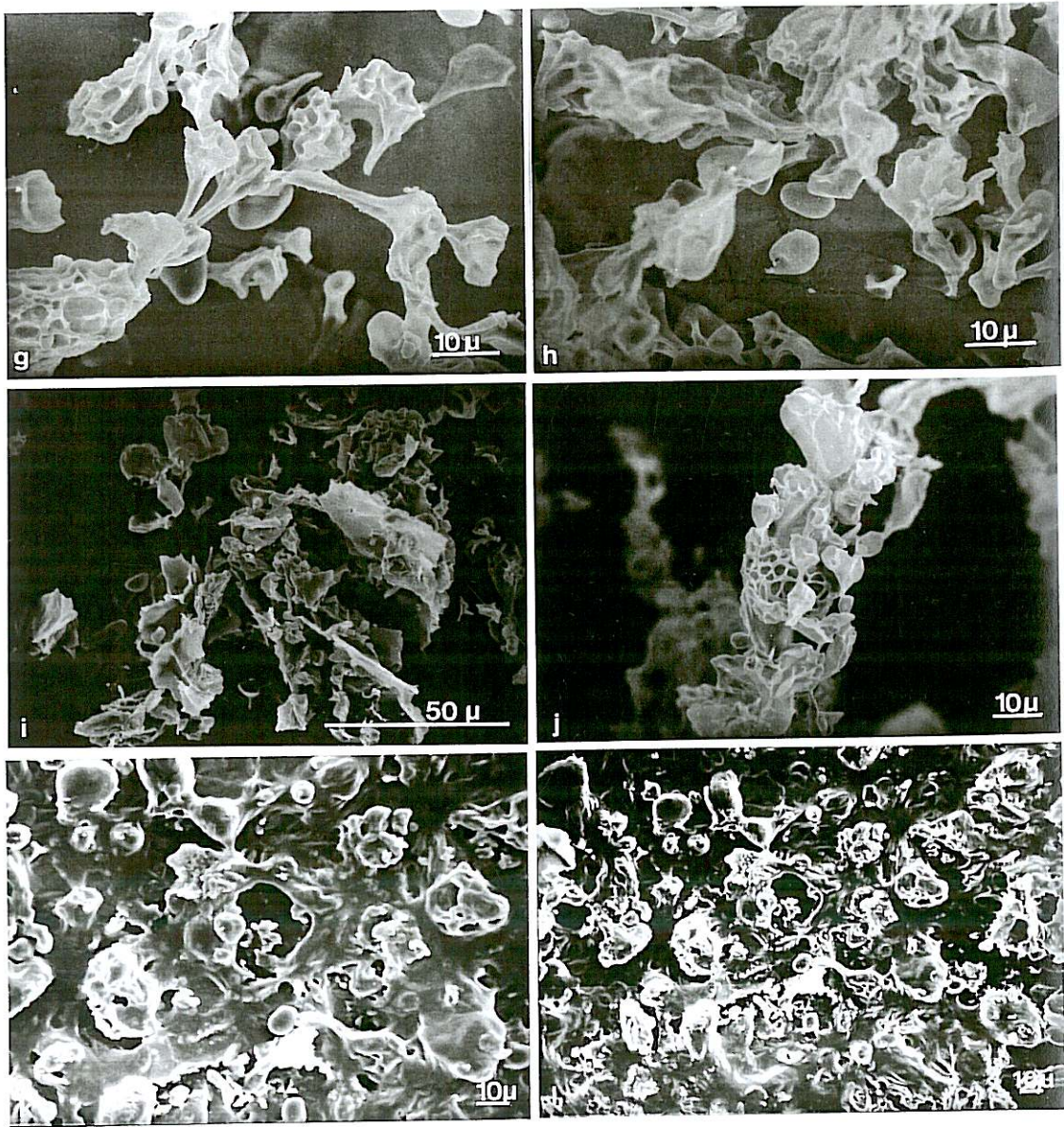
Os métodos B e E são ainda claramente os métodos mais violentos no isolamento do amido, quer pelas condições de elevada tensão por uso de um desintegrador (método B), quer pelo elevado número de centrifugações e uso de tolueno e etanol (método E). Por outro lado, as Figuras 38i e 38j revelam a existência de grânulos com fissuras. Ora, como se sabe, os danos mecânicos podem afectar a resposta da estrutura do amido às condições a que é exposto para gelatinizar (BILIADERIS, 1990). Assim, talvez se justifique o início de gelatinização mais precoce nos amidos isolados pelos métodos B e E como resultante da gelatinização parcial do amido provocado pela penetração de água nas secções danificadas do grânulo.

No caso do amido granular, a gelatinização necessita de um amolecimento prévio da fracção amorfa para haver uma suficiente absorção de água, pois a água tem um efeito desorganizativo. Esta é mais uma razão que vem reforçar o que já foi dito atrás pois estes dois métodos (B e E), juntamente com o método D são os processos de isolamento que sujeitam o amido durante mais tempo ao repouso dentro de água. Por coincidência ou não, são também estes três processos os que iniciam mais cedo a gelatinização.

As fotografias expostas na Figura 42 ilustram o início de gelatinização. Nesta fase, há uma grande heterogeneidade na população de grânulos, existindo grânulos perfeitamente íntegros e regulares, outros a deformarem-se, e outros já completamente deformados. Pode também constatar-se que os grânulos dilatam e deformam-se assimetricamente, alongando-se e enrugando a sua superfície. Com a continuação do



Figura 42 - Fotografias, em microscópio electrónico de varrimento, de amostras r  
método A; c e d - amido isolado pelo método B; e e f - amido isolado p  
método E; k e l - farinha de castanha.



etúradas do amilógrafo no início da gelatinização: a e b - amido isolado pelo  
pelo método C; g e h - amido isolado pelo método D; i e j - amido isolado pelo

aquecimento, existem cada vez mais grânulos distorcidos e alguns são solubilizados. O amido solúvel continua a reter água, aumentando a consistência. Aos 75°C é ainda visível a presença de grânulos intactos, especialmente na farinha de castanha (Figura 43).



Figura 43 - Fotografias, em SEM, de amostras retiradas do amilógrafo aos 75°C: a - amido A; b - amido B; c - amido C; d - amido D; e - amido E; f - farinha de castanha.

## Consistência Máxima e Respectivo Valor de Temperatura

Pode constatar-se pela observação do Quadro XV, que a consistência máxima alcançada por qualquer dos amidos isolados (de 1270 a 1450 U.B.), é muito superior à consistência máxima obtida pela farinha de castanha (685 U.B.) à mesma concentração em amido, sendo 1.85 a 2.11 vezes maior. Por outro lado, a farinha de castanha atinge a consistência máxima muito mais cedo (aos 73°C), enquanto que os amidos isolados alcançam-na por volta dos 91-95°C. Mais uma vez pareceram ser os métodos D, E e B aqueles que se salientam dos restantes, tomando neste caso os valores de viscosidade claramente mais elevados. Estamos em crer que a justificação para este facto reside nos argumentos já lançados anteriormente.

Nesta fase, o fenómeno do empastamento ainda está a ter lugar:

- a dilatação já terá ocorrido em praticamente toda, ou quase toda, a população de grânulos;
- ocorre ainda a exsudação (ou lixiviação) de componentes moleculares (essencialmente amilose) a partir do grânulo, e eventualmente, a ruptura total dos grânulos, pois com o crescente aquecimento e hidratação, os grânulos deixam de resistir a tensões mecânicas e térmicas, perdendo a sua integridade.

A Figura 44 documenta imagens obtidas por SEM em amostras recolhidas no preciso momento em que se atingia a consistência máxima. Pode ver-se que em todos os amidos isolados há uma desintegração completa dos grânulos, não se distinguindo sequer os seus vestígios. Na verdade, a lixiviação da amilose resulta na formação de uma massa de fios densamente interligados, adquirindo um aspecto “rendilhado”, tipo filigrana (Figura 44a, b, c, d e e). Não obstante os amidos isolados terem, de facto, um aspecto semelhante, é notório que os amidos com maior consistência máxima (amidos isolados pelos métodos D, E e B) apresentam um aspecto de rede filamentosa ou de “rendilhado” mais largo, como que tendo “poros” maiores, relativamente aos amidos isolados pelos métodos A e C, que apresentam consistência máxima mais baixa. Esta diferença é particularmente visível no amido isolado pelo método C, que tem um “rendilhado” mais apertado.

A Figura 44f mostra-nos que a pasta de farinha de castanha, neste ponto, tem um aspecto muito diferente das pastas dos amidos isolados: apresenta um aspecto denso, como que de uma massa fundida, podendo-se ainda reconhecer a forma de alguns grânulos de amido que, presume-se, não tenham chegado a perder a sua integridade. Nesta eventualidade, poder-se-á, se nos for permitido, aventar a seguinte hipótese: talvez na farinha, a lixiviação da amilose a partir do interior dos grânulos se faça em menor

extensão, e assim sendo, a consistência não atinge os valores registrados nos amidos isolados. Seguindo esta ordem de ideias, então, no arrefecimento da pasta em princípio não se irá também atingir uma consistência elevada, já que não haverá reassociação de moléculas de amilose fora dos grânulos. Mas isto esclarecer-se-á mais à frente.

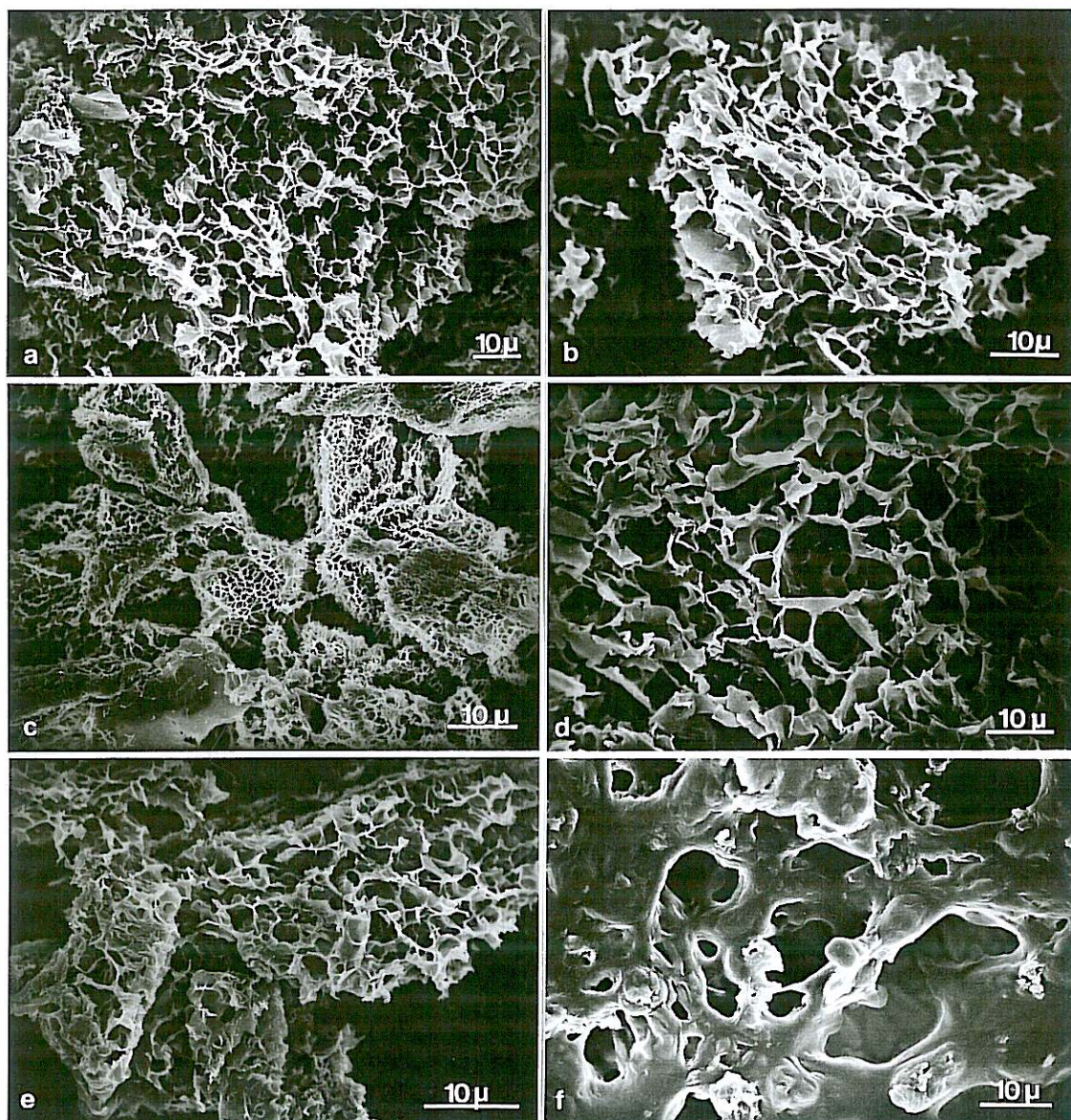


Figura 44 - Fotografias, em SEM, de amostras retiradas do amilógrafo aos 95°C: a - amido A; b - amido B; c - amido C; d - amido D; e - amido E; f - farinha de castanha.

Pelo facto do amido de castanha ter uma elevada proporção de amilose, sobretudo quando comparada com a da maior parte dos cereais (milho, trigo, arroz, triticale) e tubérculos estudados, a sua capacidade de gelatinização é muito maior, pois é nas zonas mais desorganizadas e amorfas, onde predomina a amilose, que se inicia a hidratação e conseqüente dilatação. É por essa razão que os valores de consistência obtidos no amido de castanha são muito superiores aos valores obtidos nas mesmas condições com outros amidos. CHROUPINA (1993) já tinha igualmente chegado a esta conclusão ao comparar a farinha de castanha e a farinha de milho.

### Reofluidificância

A observação dos perfis amilográficos (Figura 41) no período de 15 minutos em que a temperatura das pastas foi mantida a 95°C permite concluir que durante este espaço de tempo diminuiu a consistência de todas as pastas, embora em proporção variável. A maior quebra na viscosidade ocorreu na pasta do amido isolado pelo método A (cerca de 53%), e a menor quebra na do amido isolado pelo método C (diminuiu 10%), enquanto que os restantes, incluindo a farinha de castanha tiveram um decréscimo da viscosidade na ordem dos 25-32%. Estes resultados de alguma forma revelam que a pasta de amido isolado pelo método C é a que apresenta maior estabilidade a 95°C, não obstante ser o amido que apresenta o valor mais baixo de consistência máxima.

Durante este tempo de espera a 95°C muito poucas alterações ocorrem no amido não dissolvido, pelo que a solubilização não aumenta. A diminuição da consistência que se verifica, é normalmente denominada liquefacção do amido e é causada pela orientação das moléculas no sentido do escoamento. Segundo KNIGHT (1969), este “adelgaçamento” é resultante do aquecimento prolongado e da acção de corte mecânico. É de salientar ainda que a consistência máxima coincide quase sempre com a consistência inicial aos 95°C (ou a uma temperatura muito próxima), com excepção da farinha de castanha. Já a consistência final aos 95°C, que equivale à consistência no início do arrefecimento, corresponde a um valor muito próximo ou mesmo coincidente com a consistência mínima do arrefecimento.

A Figura 45 regista imagens captadas nesta fase. Comparando-as com as da Figura 44 parece ter havido uma espécie de compactação das estruturas, apresentando-se menos “porosas” e mais densas. Os amidos isolados pelos métodos C e B dão mostras de ser excepções, tendo sido, por sinal, os que tiveram menor quebra de consistência. Parece ainda que na farinha (Figura 45f), mesmo após 15 minutos a 95°C, existem grânulos que não perderam a sua integridade.

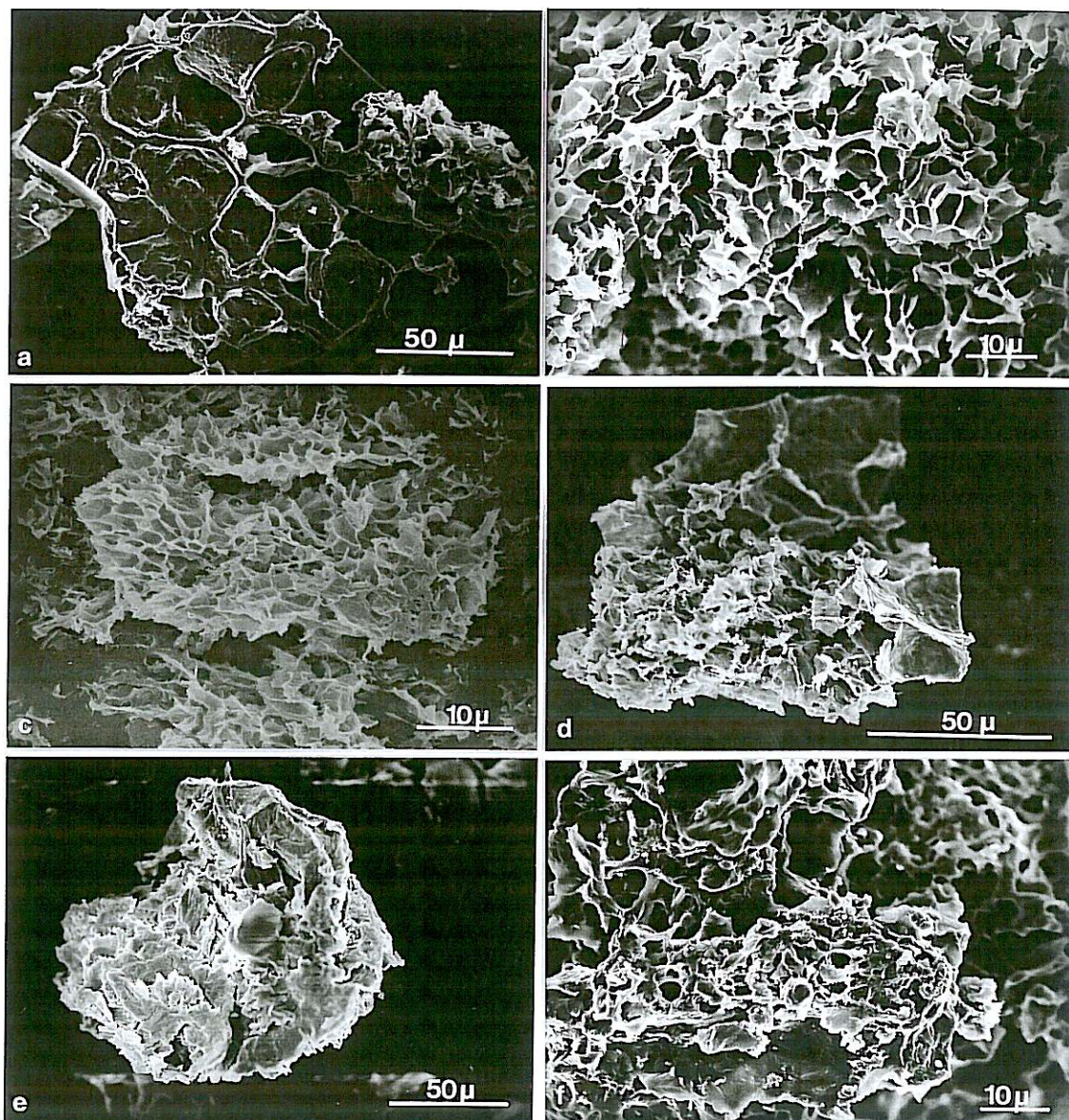


Figura 45 - Fotografias, em SEM, de amostras retiradas do amilógrafo após 15 minutos a 95°C: a - amido A; b - amido B; c - amido C; d - amido D; e - amido E; f - farinha de castanha.

## Gelificação e Retrogradação

As moléculas de amilose que foram lixiviadas dos grânulos de amido têm tendência a reassociarem-se ligando-se fortemente entre si por ligações de hidrogénio. Em soluções relativamente concentradas, como é o caso da castanha (elevado teor de amilose), isto conduz à formação de um gel “emborrachado”, e posteriormente à saída de água do gel (sinéresis) à medida que as ligações de hidrogénio aumentam e o gel se contrai. Após uma rápida gelificação da amilose por reassociação das moléculas, há uma lenta recristalização de cadeias curtas de amilopectina.

À medida que o gel arrefece, as cadeias tornam-se menos energéticas e as pontes de hidrogénio mais fortes, resultando um gel mais firme o que se traduz por um aumento da consistência (Quadro XV).

O aumento de consistência mais acentuado verificou-se com o amido isolado pelo método D, seguido pelos amidos isolados pelos métodos B e E. É interessante notar serem estes mesmos amidos aqueles que obtiveram maiores valores de consistência máxima, o que se justifica já que possivelmente terão lixiviado dos grânulos um número muito maior de moléculas de amilose que posteriormente, no arrefecimento, se reassociam aumentando a consistência de uma forma mais relevante que nos outros amidos.

No final do ensaio, aos 30°C, continuam a ser os amidos isolados pelos métodos E, B e D que apresentam os maiores valores de consistência, na ordem de 1300 - 1400 U.B., seguidos pelo amido isolado pelo método C. A farinha de castanha e o amido isolado pelo método A exibem uma viscosidade bastante mais baixa, na ordem de 400 - 500 U.B..

Segundo ELIASSON (1985), parece certo que a formação de complexos entre a amilose e os diversos agentes complexantes previne a lixiviação da amilose durante a gelatinização e inibe a dilatação dos grânulos de amido aquecidos em água. Assim, podemos presumir que os complexos amilose-lípidos estabelecidos na farinha de castanha poderão, em grande parte, justificar os valores de consistência repetidamente mais baixos que registou.

### 5.2.4 - CARACTERIZAÇÃO CALORIMÉTRICA

Os ensaios calorimétricos efectuados aos diversos amidos isolados a diferentes teores de humidade, permitiram confirmar que também no amido de castanha há

proporcionalidade entre a entalpia de transição e o teor de água da amostra, como se pode constatar pela observação das Figuras 46, 47, 48, 49 e 50.

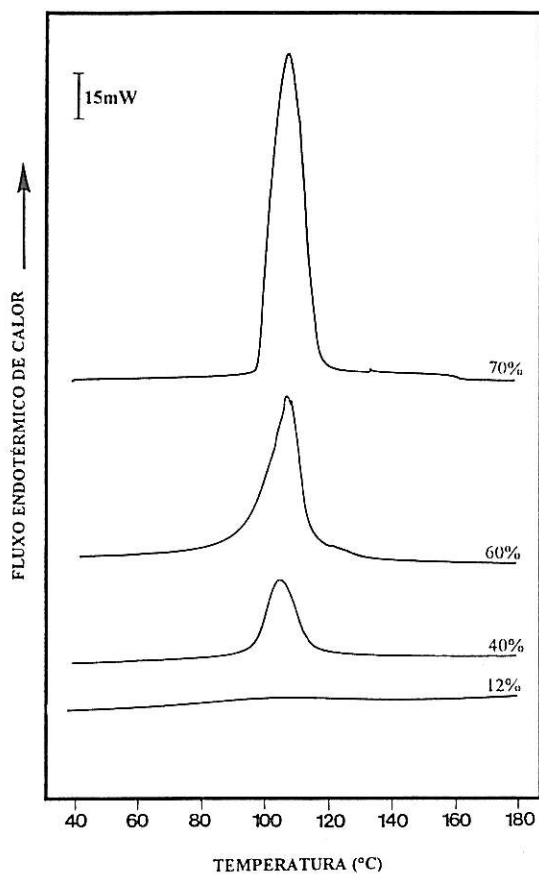


Figura 46 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método A a 12, 40, 60 e 70% de humidade.

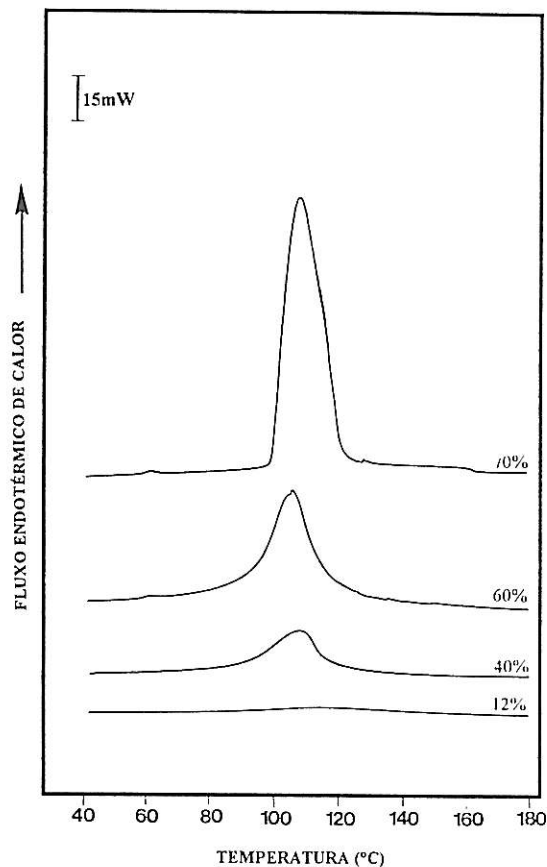


Figura 47 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método B a 12, 40, 60 e 70% de humidade.

Mas para o mesmo teor de humidade, o comportamento térmico dos 5 amidos isolados é já um pouco diferente, com excepção dos ensaios realizados a 12% de humidade (Figura 51). De facto, a este teor de humidade não são visíveis grandes diferenças no traçado dos termogramas, não se detectando quaisquer transições de fase no intervalo de temperaturas utilizado. O mesmo já não se passou a 40, 60 e 70% de humidade (Figuras 52, 53 e 54). Nestes, é notória a presença nalguns ensaios, de um pequeno pico à volta dos 55 - 65°C, correspondendo certamente à gelatinização do amido. Esta transição a baixa temperatura reflecte fenómenos de ordem-desordem dos cristalitos de amido, induzidos pela acção do calor e da água.

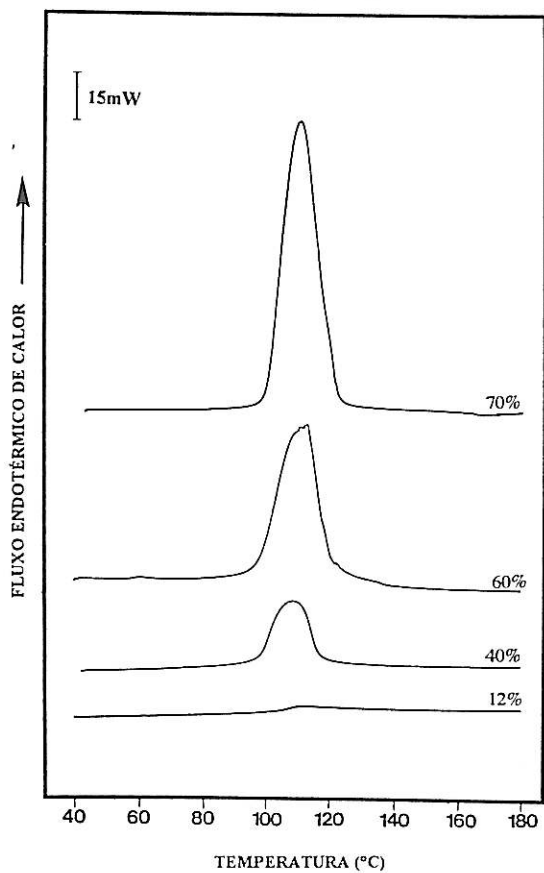
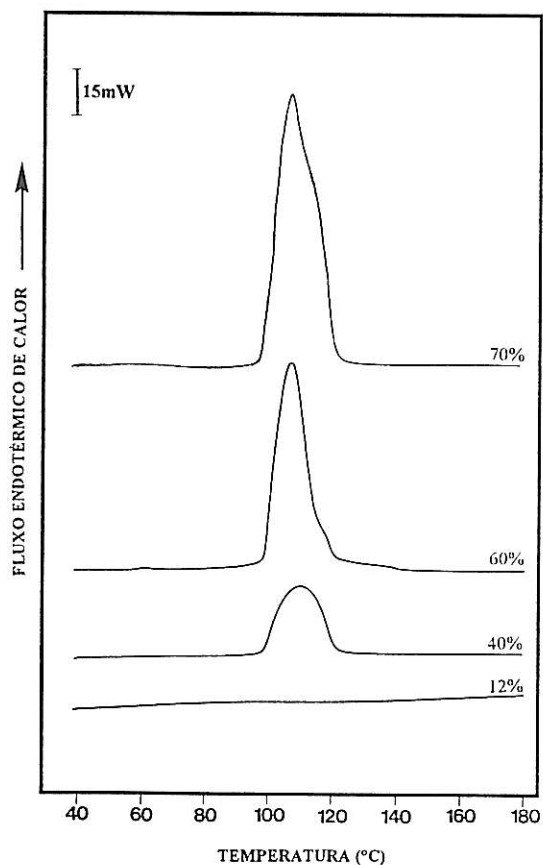


Figura 48 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método C a 12, 40, 60 e 70% de humidade.

Figura 49 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método D a 12, 40, 60 e 70% de humidade.



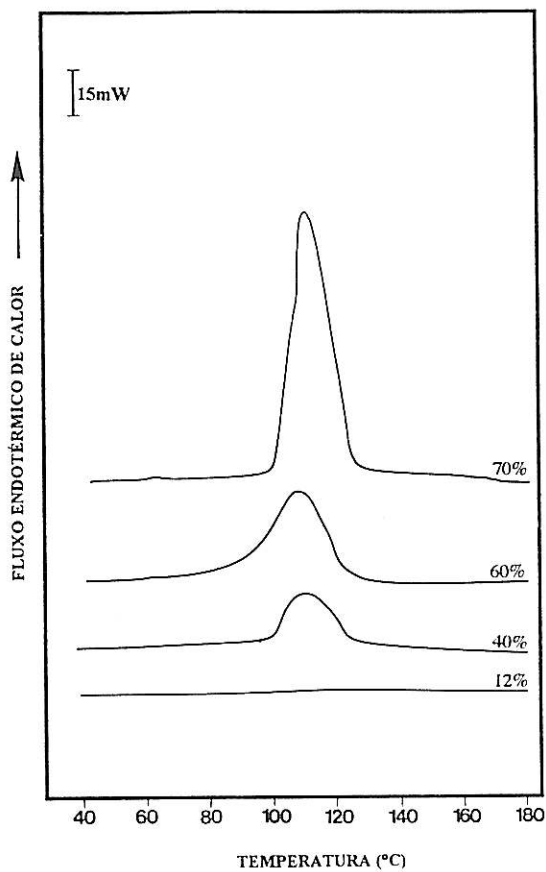
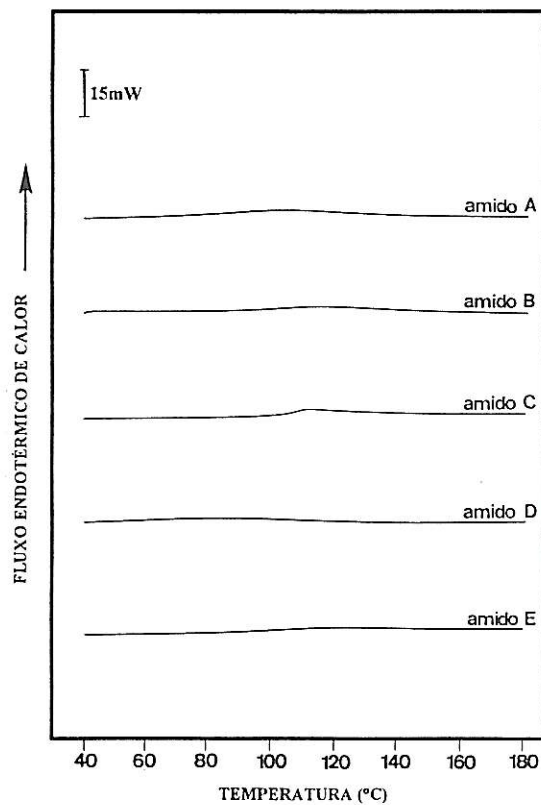


Figura 50 - Termogramas de DSC do amido isolado pelo método E a 12, 40, 60 e 70% de humidade.

Figura 51 - Termogramas de DSC dos 5 amidos isolados a 12% de humidade.



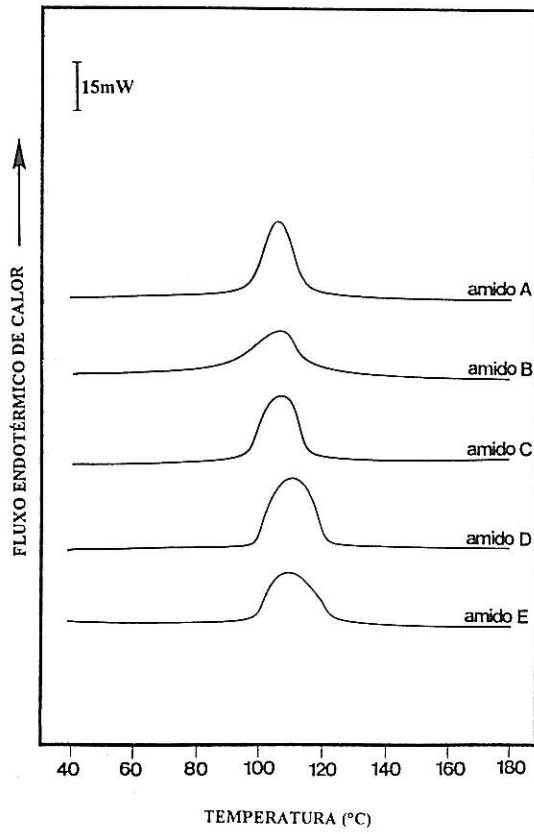
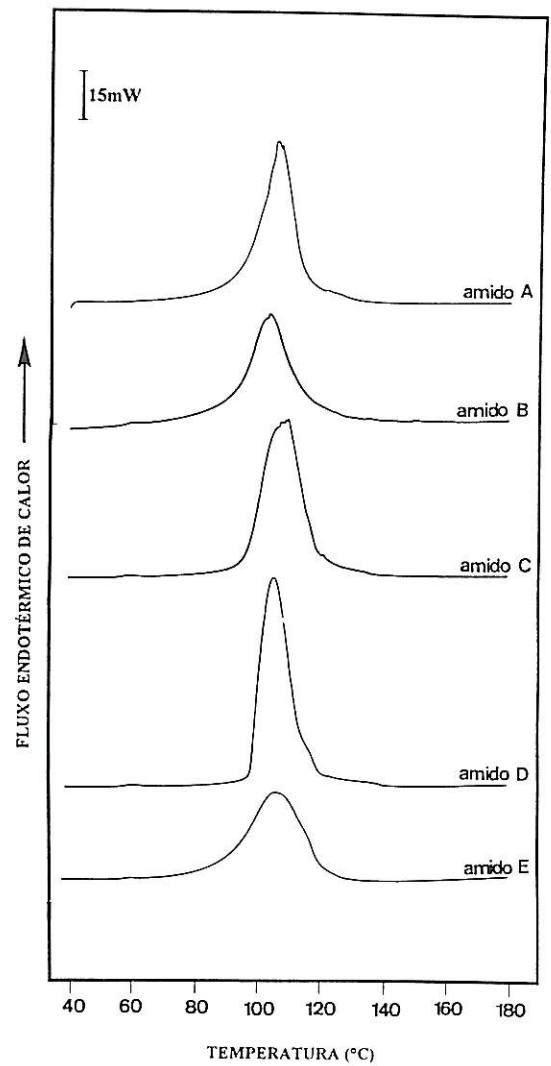


Figura 52 - Termogramas de DSC dos 5 amidos isolados a 40% de humidade.

Figura 53 - Termogramas de DSC dos 5 amidos isolados a 60% de humidade.



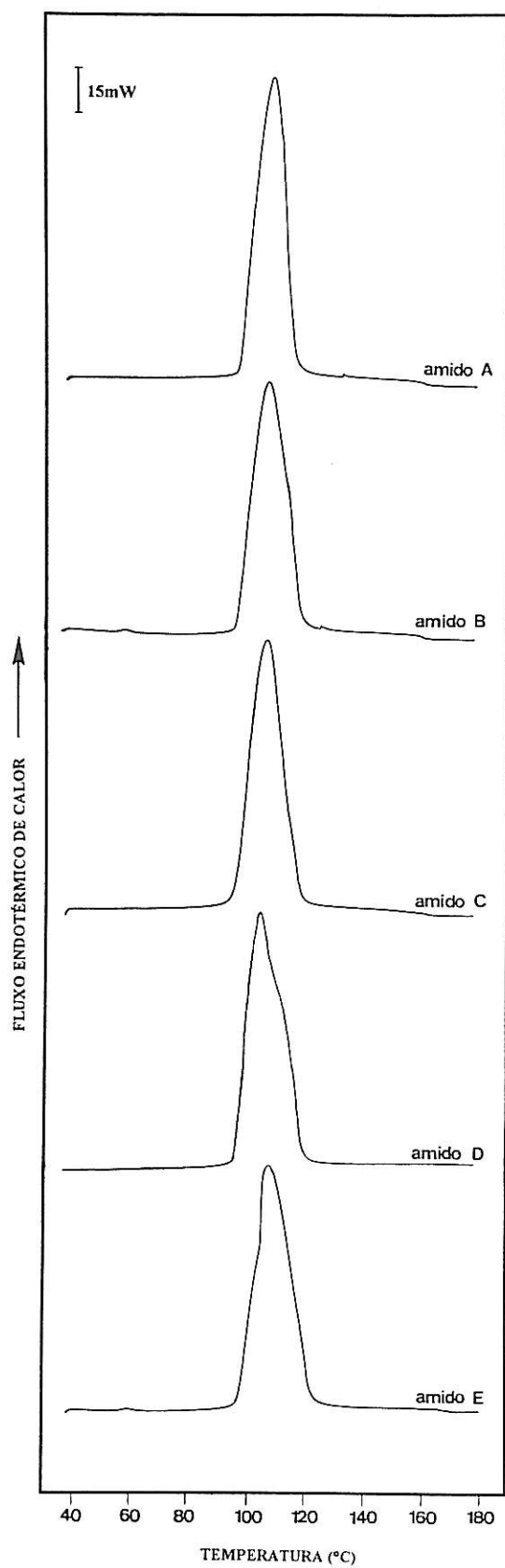


Figura 54 - Termogramas de DSC dos 5 amidos isolados a 70% de humidade.

O Quadro XVI apresenta as características calorimétricas obtidas na endoterma de gelatinização a 60% de humidade.

Quadro XVI - Características calorimétricas dos amidos isolados na endoterma de gelatinização a 60% de humidade\*.

Método de Isolamento do Amido	Temperaturas de Transição (°C)			Entalpias de Transição (J/g)
	T <sub>o</sub>	T <sub>p</sub>	T <sub>c</sub>	
A	58.4	63.8	68.9	- 2.8
B	57.0	60.6	65.6	- 2.9
C	56.0	60.5	64.7	- 3.0
D	55.6	60.7	64.5	- 2.7
E	56.7	61.2	65.6	- 1.4

\*Valores obtidos a partir de um ensaio.

As entalpias de gelatinização obtidas são relativamente baixas, indicando que há pouca resistência dos grânulos à gelatinização, vindo ao encontro das boas características amilográficas registadas - desenvolvimento de elevada viscosidade. Os amidos isolados pelos métodos E e D apresentam as entalpias de menor valor absoluto, podendo-se afirmar que serão os amidos que gelatinizam mais facilmente. Estes mesmos amidos já tinham registado a maior consistência máxima. Os restantes amidos apresentam entalpias muito próximas.

É curioso que as temperaturas de início (T<sub>o</sub>) e do pico (T<sub>p</sub>) da endoterma de gelatinização sejam inferiores aos valores determinados amilograficamente. Presume-se assim que, no momento em que registamos a temperatura de início de gelatinização dos amilogramas, já a gelatinização se terá efectivamente iniciado, não sendo o amilógrafo (aparentemente) sensível, e o aumento de viscosidade não surge em simultâneo, mas posteriormente.

Esta transição não surge nos ensaios a 12% e 40% de humidade, possivelmente porque não existe uma quantidade crítica de água para que se inicie a gelatinização.

Para além desta, surge uma outra endoterma na gama de temperaturas 90-126°C. Esta endoterma atribuir-se-á provavelmente à fusão dos complexos amilose-lípidos existentes, estando as respectivas entalpias de transição reunidas no Quadro XVII.

De todos, é o amido isolado pelo método D (isolamento usando sucessivamente 3 crivos) aquele que apresenta entalpias maiores (em valor absoluto), seguido pelos amidos isolados pelos métodos A, C, E e B. Esta ordem não é certamente casual, até porque é mantida para três dos níveis de humidade estabelecidos. Pelo facto do

isolamento do amido pelo método D ser exclusivamente físico, recorrendo-se à separação por peneiros e por centrifugação, não deverá afectar a estabilidade dos complexos amilose-lípidos, enquanto que os restantes processos de isolamento provavelmente destruirão parte desses complexos. No caso do método E, pensa-se que a acção do etanol contribua para desestabilizar os complexos.

Quadro XVII - Ordenação dos métodos de isolamento do amido de acordo com as 2<sup>as</sup> entalpias de transição obtidas a 12, 40, 60 e 70% de humidade\*.

Teor de humidade (%)	Método de Isolamento do Amido	Entalpias de Transição (kJ.g <sup>-1</sup> )
12	A, B, C, D, E	0
40	D	- 0.758
	A	- 0.525
	C	- 0.522
	E	- 0.514
	B	- 0.377
60	D	- 1.102
	C	- 1.049
	A	- 0.830
	E	- 0.777
	B	- 0.722
70	D	- 1.403
	A	- 1.387
	C	- 1.367
	E	- 1.354
	B	- 1.350

\*Valores obtidos a partir de um ensaio.

De um modo geral, as entalpias de transição são grandes, em valor absoluto, em relação aos valores que frequentemente são apresentados na literatura para amidos de outras origens, e para teores de água semelhantes. Certamente que a explicação mais provável reside na maior proporção amilose/amilopectina que o amido de castanha tem, comparativamente com esses amidos e conseqüentemente, presume-se, no maior número de complexos amilose-lípidos, o que é reforçado pelos valores de amilose determinados na farinha nativa e na farinha desengordurada (ver ponto 5.1).

Os Quadros XVIII, XIX e XX, apresentam as temperaturas de início ( $T_o$ ), de pico ( $T_p$ ) e de conclusão ( $T_c$ ) da principal endoterma registada nos ensaios a 40, 60 e 70% de humidade.

Quadro XVIII - Temperaturas de transição (°C) dos amidos isolados para a 2ª endoterma, a 40% de humidade\*.

Método de Isolamento do Amido	T <sub>o</sub>	T <sub>p</sub>	T <sub>e</sub>
A	95.2	105.6	116.7
B	89.3	107.2	121.2
C	97.3	108.5	118.1
D	98.4	111.0	123.8
E	99.6	110.0	125.9

\*Valores obtidos a partir de um ensaio.

Quadro XIX - Temperaturas de transição (°C) dos amidos isolados para a 2ª endoterma, a 60% de humidade\*.

Método de Isolamento do Amido	T <sub>o</sub>	T <sub>p</sub>	T <sub>e</sub>
A	89.8	106.5	118.4
B	84.1	105.3	123.8
C	93.8	111.4	125.6
D	97.3	106.7	120.5
E	83.2	107.0	124.5

\*Valores obtidos a partir de um ensaio.

Quadro XX - Temperaturas de transição (°C) dos amidos isolados para a 2ª endoterma, a 70% de humidade\*.

Método de Isolamento do Amido	T <sub>o</sub>	T <sub>p</sub>	T <sub>e</sub>
A	98.2	109.1	120.7
B	97.7	109.0	123.0
C	97.0	108.5	122.8
D	97.7	107.1	124.5
E	97.3	107.9	126.1

\*Valores obtidos a partir de um ensaio.

Pela sua análise verifica-se que a temperatura de início da endoterma (T<sub>o</sub>) diminui com o aumento de 40 para 60% no teor de humidade. Também a temperatura do pico da endoterma diminui na generalidade dos amidos com o acréscimo de humidade. Isto justifica-se pelo facto de a água actuar como plastificante dos segmentos das cadeias amorfas, provocando uma relaxação estrutural e facilitando a mobilidade das cadeias e a

fusão a temperaturas mais baixas. No entanto, de 60% para 70% de humidade já não se verifica essa diminuição em  $T_o$ .

A 40% de humidade, a  $T_o$  mais elevada é a do amido isolado pelo método E, seguido por ordem decrescente, pelos amidos D, C, A e B. Já a 60% de humidade o amido isolado pelo método E é o que inicia a transição mais cedo, continuando os amidos D, C e A a terem, por esta ordem, os valores de  $T_o$  maiores. Anteriormente já tínhamos visto que foram estes mesmos amidos (D, C e A) que registaram os maiores valores de entalpia de transição.

De uma maneira geral, constata-se que os amidos que iniciam a transição mais cedo registam também a temperatura do pico ( $T_p$ ) mais baixa. Não obstante, é interessante notar que o amido isolado pelo método E apresenta, a estes três níveis de humidade, um perfil calorimétrico característico: o pico da endoterma tem uma quebra mais suave, como que se alongando na fase descendente (Figura 50). De alguma forma isto pode-nos dar a ideia da presença de outro tipo de materiais que não o amido, e que fundem simultaneamente com os complexos amilose-lípidos. Sustenta esta hipótese o facto deste amido ser aquele que apresenta menor grau de pureza, como foi determinado analiticamente e confirmado por SEM. Esses materiais poderiam ser resíduos da matriz de proteína. A contribuir para o fortalecimento desta ideia estão ainda os valores de  $T_c$  (temperatura de conclusão da endoterma) obtidos para este amido que são repetidamente os mais elevados de entre os cinco amidos isolados.

Imediatamente a seguir a cada um destes ensaios de aquecimento procedeu-se a um arrefecimento e posterior 2º aquecimento sem se retirarem as cápsulas do calorímetro, nas condições já descritas no ponto 4.4.4. Desta forma, tentou-se pesquisar a possibilidade de restabelecimento dos complexos anteriormente fundidos, não se tendo verificado quaisquer transições de fase, quer endotérmicas, quer exotérmicas, indicando que, depois do 1º aquecimento, não há capacidade para a reassociação das cadeias de amilose nem para a recristalização dos complexos com os lípidos, como se pode constatar pela observação dos gráficos apresentados em anexo (Anexo III). Alguns dos factores que afectam a associação das cadeias de amilose incluem, entre outros, a taxa de arrefecimento e a presença de lípidos complexantes (SIEVERT & WÜRSCH, 1993).

Em nenhum dos amidos isolados se detectou quaisquer indícios de transição vítrea, para os teores de humidade ensaiados. Provavelmente a transição vítrea poderia evidenciar-se para valores de temperatura e/ou de humidade inferiores aos utilizados, respectivamente, 30°C e 12%.

## 6 – CONCLUSÕES

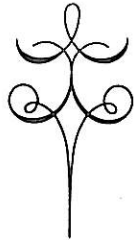
Os cinco processos de isolamento que foram adoptados neste trabalho permitiram a obtenção de amidos com um elevado grau de pureza, apresentando contudo propriedades funcionais algo distintas. Aparentemente, apenas um dos processos de isolamento danifica fisicamente os grânulos, distinguindo-se microscopicamente os amidos com menor grau de pureza.

Os perfis amilográficos dos amidos isolados mostraram-se diferentes entre si e também distintos do perfil da farinha de castanha. Os valores de consistência mais baixos registados para a farinha, deverão em grande parte atribuir-se à prevenção da lexiviação da amilose na gelatinização conferida pelos complexos amilose-lípidos da farinha. De facto, os resultados obtidos na determinação do teor aparente de amilose na farinha de castanha nativa e na farinha desengordurada indiciam haver no amido de castanha um elevado teor em amilose e, de uma forma relativamente extensa, complexação entre a amilose e os lípidos. Esta suspeita foi confirmada pelos ensaios calorimétricos efectuados aos amidos isolados.

Os amidos isolados apresentaram características térmicas semelhantes, exibindo a 60 e 70% de humidade duas endotermas: uma de gelatinização e outra de fusão dos complexos amilose-lípidos. Verificou-se que os amidos necessitam de elevada energia para fundir os complexos, mas muito pouca para gelatinizar e fundir os cristalitos, o que é corroborado pela elevada viscosidade obtida no amilógrafo. A elevada proporção amilose/amilopectina e a relativamente extensa complexação da amilose com os lípidos justifica as elevadas entalpias registadas na gama 90-126°C.

Pode concluir-se que o processo de isolamento do amido afecta claramente as propriedades funcionais que este irá apresentar. Assim, consoante o fim a que se destina o amido, deve ser seleccionado o processo de isolamento. Qualquer dos métodos adoptados pode ser recomendado no isolamento de amido para uso na alimentação humana, não requerendo o uso de substâncias químicas eventualmente tóxicas e caras. Estes estudos poderão ser prosseguidos no sentido de trazer metodologias aplicadas à escala industrial. Outras orientações que se poderão seguir em futuros trabalhos situam-se na investigação da estrutura do grânulo de amido de castanha através de metodologias como a difracção por raios-X e a R.M.N., no estudo dos complexos e do amido-resistente, e na continuação da caracterização calorimétrica do amido de castanha, determinando com rigor a temperatura de transição vítrea e realizando ensaios mais completos e aprofundados.

Naturalmente que este trabalho está longe de ser conclusivo, constituindo apenas uma pequena contribuição relativamente ao estudo que poderá e deverá ser feito num material até agora pouco explorado e de elevado potencial como é a castanha, e em particular, o seu amido.



## BIBLIOGRAFIA

- ABREU, C. & LOPES, A. (1988). Doenças da Tinta. Floresta e Ambiente – Revista de Divulgação Técnica. **16**. Lisboa.
- ADKINS, G. K. & GREENWOOD, C. T. (1969). *Stärke*. **21**, 153-155 (cit. Guilbot & Mercier, 1985).
- AGUILERA, J. M. & STANLEY, D. W. (1990). *Microstructural Principles of Food Processing & Engineering*. Elsevier Science Publishers LTD. p. 43-80.
- AHMED, M. & LELIÈVRE, J. (1978). Effect of various drying procedures on the crystallinity of starch isolated from wheat grains. *Starch/Stärke* **30**: 78-79 (cit. Correia, 1996).
- ALBUQUERQUE, J. F. M. (1976). Carta Ecológica de Portugal. Rep. de Est. Int. e Prop. do Min. da Economia. Lisboa.
- ARAÚJO-ALVES, J. P.; TORRES-PEREIRA, M. S. & TORRES-PEREIRA, J. M. (1990). Caracterização Taxonómica de “cultivares” de *Castanea sativa* MILL. Baseada em Aspectos de Economia de Água. *Actas de Horticultura do I Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas*. Vol. IV - Fruticultura/Viticultura. Assoc. Port. de Horticultura e Fruticultura e Soc. Española de Cienc. Hort.. Lisboa. p.236.
- ARMENIADES, C. D. & BAER, E. (1977). Transitions and relaxations in polymers. In: *Introduction to Polymer Science and Technology: An SPE Textbook*. H. S. Kaufman. Ed. Wiley. Page 239. New York (cit. Zeleznak & Hosney, 1987).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1975). *Official Methods of Analysis*. 13<sup>th</sup> Ed. Washington, D.C.
- ATWELL, W. A. (1986). Viscosity of Flour and Starch in High Water Systems. In: *Fundamentals of Doughs Rheology*. Ed. Hamed Faridi & Jon M. Faubion: 12-18. St. Paul (Minnesota).

- ATWELL, W. A.; HOOD, L. F.; LINEBACK, D. R.; VARRIANO-MARSTON, E. & ZOBEL, H. F. (1988). The Terminology and Methodology Associated with Basic Starch Phenomena. *Cereals Food World*. **33** (3): 306-311.
- BADENHUIZEN, N. P. (1969). *The Biogenesis of Starch Granules in Higher Plants*. Appleton. New York (cit. Guilbot & Mercier, 1985).
- BANKS, W. & GREENWOOD, C. T. (1975). *Starch and its Components*. Halsted Press. New York (cit. Zeleznak e Hosenev, 1987).
- BANKS, W.; GREENWOOD, C. T. & MUIR, D. D. (1973). The Structure of Starch. In: *Molecular Structure and Function of Food Carbohydrate*. Ed. G.G. Birch & L.F. Green. Applied Science Publishers LTD. London. 177-193.
- BEMILLER, J. N. (1990). Starch amylose. In: *Industrial Gums. Polysaccharides and Their Dderivatives*, 2<sup>nd</sup> ed. R. L. Whistler & J. N. BeMiller. Academic Press. New York. Cap. 2 (cit. Correia, 1996).
- BENNION, M. (1980). Starch. In: *The Science of Food*. John Wiley & Sons. New York. p.269-289.
- BILIADERIS, C. G. (1983). DSC in Food Research - A Review. *Food Chem.* **10**: 239-265 (cit. Correia, 1996).
- BILIADERIS, C. G. (1989). The structure and Interactions of Starch with Food Constituints. Presented at *Symposium, Starch in Human Nutrition*, June 19-21. Univ. of Saskatchewan, Saskatoo, Sask., Canada (cit. Waniska & Gomez, 1992).
- BILIADERIS, C. G. (1990). Thermal Analysis of Food Carbohydrates. In: *Thermal Analysis of Foods*. Ed. V. R. Harwalkar & C.-Y. Ma. Elsevier Applied Science Publishers. New York. 168-191.
- BILIADERIS, C. G. (1991a). The Structure and Interactions of Starch with Food Constituints. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**: 60-78 (cit. Roos, 1995).
- BILIADERIS, C. G. (1991b). Non-equilibrium phase transitions of aqueous starch systems. In: *Water Relationships in Food*. Ed. H. Levine and L. Slade. Plenum Press, New York, pp. 251-273 (cit. Roos, 1995).
- BILIADERIS, C. G. (1992). Structures and Phase Transitions of Starch in Food Systems. *Food Technology*, **46** (6) : 98-145.

- BILIADERIS, C.; MAURICE, T. J. & VOSE, J. R. (1980). Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *J. Food. Sci.* **45**: 1669-1674.
- BILIADERIS, C. G.; PAGE, C. M. & MAURICE, T. J. (1986a). On the multiple melting transitions of starch/monoglyceride systems. *Food Chem.* **22**: 279-295.
- BILIADERIS, C. G.; PAGE, C. M.; MAURICE, T. J. & JULIANO, B. O. (1986b). Thermal characterization of rice starches: A polymeric approach to phase transitions of granular starch. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 6-14 (cit. Zeleznak e Hosney, 1987).
- BILIADERIS, C. G.; PAGE, C. M.; SLADE, L. & SIRETT, R. R. (1985). Thermal Behavior of amylose-lipid complexes. *Carbohydr. Polym.* **5**: 367-389 (cit. Roos, 1995).
- BILIADERIS, C. G. & ZAWISTOWSKI, J. (1990). Viscoelastic behavior of ageing starch gels. Effects of concentration, temperature and starch hydrolyzates on network properties. *Cereal Chem.*, **67**: 240-246 (cit. Biliaderis, 1992).
- BLANSHARD, J. M. V. (1986). The Significance of the Structure and Function of the Starch Granule in Baked Products. In: *Chemistry and Physics of Baking*, Ed. Blanshard, J.M.V., Frazier, P.J. e Galliard, T. Royal Society of Chemistry. London: 1-13.
- BULÉON, A.; COLONNA, P. & LELOUP, V. (1990). Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. In: *Industries Alimentaires et Agricoles*. N° 6. pp. 515-532.
- BURT, D. J. & RUSSEL, P. L. (1983). Gelatinization of low water content wheat starch-water mixtures. A combined study by DSC and light microscopy. *Starch* **35**: 354-360 (cit. Roos, 1995).
- CAMBRA, R. (1986). Economía de la Producción Frutal. Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Estacion Experimental de Aula Dei Zaragoza. pág. 13 .
- CARLSON, T. L.; LARSSON, K.; DINH-NGUYEN KROG, N. (1979). A study of the amylose-monoglyceride complex by Raman Spectroscopy. *Stärke*. **31**, 222-224 (cit. Buléon *et al.*, 1990).

- CHAN, R. K.; PATHMANATHAN, K. & JOHARI, G. P. (1986). Dielectric relaxations in the liquid and glassy states of glucose and its water mixtures. *J. Phys. Chem.* **90**: 6358-6362 (cit. Roos, 1995).
- CHINACHOTI, P.; KIM-SHIN, M.-S.; MARI, F. & LO, L. (1991). Gelatinization of wheat starch in the presence of sucrose and sodium chloride: Correlation between gelatinization temperature and water mobility as determined by oxygen-17 NMR. *Cereal Chem.* **68**: 245-348 (cit. Roos, 1995).
- CHINACHOTI, P.; WHITE, V. A.; LO, L. & STENGLE, T. R. (1991). Application of high resolution carbon-13, oxygen-17 & sodium-23 NMR to study the influence of water, sucrose and sodium chloride on starch gelatinization. *Cereal Chem.* **68**: 238-244 (cit. Roos, 1995).
- CHOUPINA, A. B. (1993). *Possibilidades de Utilização de Farinha de Castanha na Produção de Extrudidos - Avaliação de Modificações Físico-Químicas*. Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa. p. 4-102.
- CHUNG, O. K. (1991). Cereals Lipids. In: *Handbook of Cereal Science and Technology*. Edited by Klaus J. Lorenz, Karel Kulp. Marcel Dekker, Inc. New York, p. 497-498.
- CHUNGCHAROEN, A. & LUND, D. B. (1987). Influence of solutes and water on rice starch gelatinization. *Cereal Chem.* **64**: 240-243 (cit. Roos, 1995).
- COLONNA, P. & MERCIER, C. (1984). Macromolecular structure of wrinkled- and smooth-pea starch components. *Carbohydrate Res.* **126**, 233-247 (cit. Buléon *et al.*, 1990).
- COLONNA, P.; GALLANT, D. & MERCIER, C. (1980). *J. Food Sci.* **45**, 1629-1636 (cit. Guilbot & Mercier, 1985).
- CORREIA, P.M.R. (1996). *Características do Amido de Triticale - Morfologia e Funcionalidade*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. U. T. L. Lisboa. p. 57-89.
- COX, M. J.; MAC MASTERS, M. M. & HILBERT, G. E. (1944). *Cereal Chem.* **21**, 447-465 (cit. Guilbot & Mercier, 1985).
- DAVIDSON, V. J.; PATON, D.; DIOSADY, L. L. & LAROCQUE, G. (1985). Degradation of wheat starch in a Single Screw extruder: Characteristics of extruded starch polymers. *J. Food Sci.*, **49**: 453.

- DERBY, R. I.; MILLER, B. S.; MILLER, B. F. & TRIMBO, H. B. (1975). Visual observation of wheat-starch gelatinization in limited water systems. *Cereal Chem.* **52**: 702-713 (cit. Roos, 1995).
- DODD, J. W.; TONGE, K. H. & CURREL, B. R. (1987). *Thermal Methods - Analytical Chemistry by Open Learning*. John Wiley & Sons. New York (cit. Correia, 1996).
- DONOVAN, J. W. (1977). A study of the baking process by differential scanning calorimetry. *J. Food Agric.* **28** : 571 (cit. Kokini *et al.*, 1992).
- DONOVAN, J. W. (1979). Phase transition of the starch water system. *Biopolymers.* **18** : 263-275 (cit. Wang, *et al.*, 1991).
- DRAFT INTERNATIONAL STANDARD ISO/DIS 10 520 (1994). Native starches - Determination of starch content - Ewers polarimetric method.
- DUPRAT, F.; GALLANT, D.; GUILBOT, A.; MERCIER, C. & ROBIN, J. P. (1980). *Les polymères végétaux*, pp. 176-231. Ed. B. Monties, Gauthier-Villars (cit. Buléon *et al.*, 1990).
- EISENBERG, A. (1984). The glassy state and the glass transition. *Physical Properties of Polymers*. J. E. Mark, Ed. American Chemical Society. Page 55. Washington, D.C. (cit. Zeleznak & Hosney, 1987).
- ELIASSON, A.-C. & LARSSON, K. (1993). *Cereals in Breadmaking*. Marcel Dekker, New York (cit. Roos, 1995).
- ELIASSON, A.-C. (1985). Starch gelatinization in the presence of emulsifier. A morphological study of wheat starch. *Starch/Staerke*; **34**: 411 (cit. Szczodak & Pomeranz, 1992).
- ELIASSON, A.-C. (1986). On the effects of surface active agents on the gelatinization of starch - A calorimetric investigation. *Carbohydr. Polym.* **6**: 463-476 (cit. Roos, 1995).
- EVANS, I. D., & HAISMAN, D. R. (1982). The effect of solutes on the gelatinization temperature range of potato starch. *Staerke* **34**: 224 (cit. Lelièvre, 1992).
- FENAROLI, L. (1945). *Il Castagno*. Vol. I. Ramo Editorial degli Agricoltori. Roma. 211pp.
- FERREIRA CARDOSO, J. V.; FONTAÍNHAS FERNANDES, A. A. & TORRES PEREIRA, J. M. (1990). Composição Química e Valor Nutritivo do Fruto

de *Castanea sativa* MILL. - Estudo Comparativo de Algumas Cultivares da Região de Trás-os-Montes. *Actas de Horticultura do I Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas*. Vol. IV - Fruticultura/Viticultura. Assoc. Port. de Horticultura e Fruticultura e Soc. Española de Cienc. Hort.. Lisboa. p.242.

FERREIRA, T. (1989). Novas Utilizações Industriais da Castanha. *Vida Rural* Nº 20, 2ª Quinzena de Dezembro. pp. XVI-XIX.

FERREIRA, T. (1990). Castanha - Perspectivas do seu Aproveitamento. *Revista da V Feira Nacional dos Frutos Secos*. 9-14 Outubro. Torres Novas. pp 18-19.

FINNEY, K. F.; POMERANZ, Y. & HOSENEY, R. C. (1976). Effects of solvent extraction on lipid composition, mixing time and bread loaf volume. *Cereal Chemistry* **53** (3): 383-388.

FLORY, P. J. (1953). *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, Ithaca, NY (cit. Roos, 1995).

FUSEK, J. F. (1980). Glass transition temperature of wet fibers. In: *Water in Polymers*. S.P. Rowland, ed. ACS Symp. Ser. 127. American Chemical Society. Page 515. New York (cit. Zeleznak & Hosenev, 1987).

GARCIA, W. J. & WOLF, M. J. (1972). Polarimetric Determination of Starch in Corn With Dimethyl Sulfoxide as a Solvent. *Cereal Chemistry* (**49**): 298-306.

GIBSON, L. & ASHBY, M. (1988). *Cellular Solids*. Pergamon Press (Cit. Barret & Peleg, 1992).

GIDLEY, M. J. (1995). Structural Order in Starch Granules and Its Loss During Gelatinization. In: *Gums and stabilizers for the food industry*. 6<sup>th</sup> Ed. G. O. Philips, P. A. Williams & D. J. Wedlock. IRL Press, Oxford. (cit. Correia, 1996).

GIDLEY, M. J. & BOCIEK, S. M. (1985). <sup>13</sup>C CP/MAS NMR Studies of amylose inclusion complexes, cyclodextrines and the amorphous phase of starch granules: relationships between glycosidic linkage conformation and solid-state <sup>13</sup>C chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3820-3829 (cit. Buléon *et al.*, 1990).

GOMEZ, M. H. & AGUILERA, J. M. (1984). A physicochemical model for extrusion of corn starch. *J. Food Sci.*, **49**: 40-43.

- GONÇALVES FERREIRA, F. A. & GRAÇA, M. E. S. (1977). Tabela da Composição dos Alimentos Portugueses. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Reimpressão.
- GREENWOOD, C. T. (1960). *Starch* 12. p.169 (cit. Zobel, 1988).
- GUERREIRO, M. G. (1957). Castanheiros - Alguns Estudos sobre a sua Ecologia e Melhoramento Genético. Dissertação para a obtenção do título de Professor Agregado do ISA. Alcobaça. 111 pp.
- GUILBOT, A. & MERCIER, C. (1985). Starch. In: *The Polysaccharides*. Volume 3. Edited by Gerald O. Aspinall. Academic Press, Inc. London. p. 210-265.
- HANSEN, L. M.; SETSER, C. S. & PAUKSTELIS, J. V. (1989). Investigations of sugar-starch interactions using carbon-13 NMR. I. Sucrose. *Cereal Chem.* **66**: 411- 415 (cit. Roos, 1995).
- HARMAN, H. H. (1976). *Modern Factor Analysis*. Univ. of Chicago Press. Chicago and London: 133-135.
- HARPER, J. M. (1984). Recent applications and research perspective in the field of extrusion-cooking. In: *Thermal Processing and Quality of Foods*. Zenthen, P. *et al.* Elsevier Applied Science Publishers. London e New York. pp. 25-30.
- HARPER, J.M. (1981). *Extrusion of Foods*. Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL (Cit. Barret & Peleg, 1992).
- HART, P. E. & BLANSHARD, J. M. V. (1982). The effect of extraction method upon the gelatinization behavior of wheat starch granules. *Starch/Stärke* **34**: 293-297 (cit. Correia, 1996).
- HOOVER, R. & HADZIYEV, D. (1981). Characterization of potato starch and its monoglycerides complexes. *Stärke*, **33** : 290-300 (cit. Waniska & Gomez, 1992).
- HORII, F.; YAMAMOTO, H.; HIRAI, A. & KITAMARU, R. (1987). Structural study of amylose polymorphs by cross-polarization-magic angle spinning, <sup>13</sup>C - NMR Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 160, 29 - 40 (cit. Buléon *et al.*, 1990).
- HOSENEY, R. C. (1986). Cereal Starch. In: *Principles of Cereal, Science and Technology*. Pub. American Association of Cereal Chemists, Inc. Cap. 2. St. Paul, Minnesota.

- HOSENEY, R. C.; ZELEZNAK, K. J. & YOST, D. A. (1986). A note on the gelatinization of starch. *Stärke* **38**: 407 - 409 (cit. Waniska & Gomez, 1992).
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE). (1985 a 1994). Estatísticas Agrícolas: Produção de Frutos no Continente e Importação e Exportação dos Principais Produtos da Agricultura ou Relacionados com esta Actividade.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE). (1993 a 1995). Comércio Internacional por NC/Países.
- INVUFLEC (1978). Le Châtaignier - Production et Culture. *Comité Nacional Interprofessionel de la Chaitagne et du Marron*. pag.12. Nîmes.
- JIN, X.; ELLIS, T. S. & KARASZ, F. E. (1984). The effect of cristallinity and crosslinking on the depression of the glass transition temperature in nylon 6 by water. In: *J. Polymer Sci.*, Polymer Phys. Ed. 22 : 1701 (cit. Zeleznak & Hosenev, 1987).
- JOHN, M.; SCHMIDT, J.; KNEIFEL, H. (1983). Iodine maltosaccharine complexes : relation between chain lenght and colour. *Carbohydr. Res.* 119, 254 - 257 (cit. Buléon *et al.*, 1990).
- JULIANO, B. O. (1971). A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Sci. Today* **16**: 334-340.
- KNIGHT, J. W. (1969). *The Starch Industry*. Pergamon Press. London: 1-31.
- KNUTSON, C. A. & GROVE, M. J. (1994). Rapid Method for Estimation of Amylose in Maize Starches. *Cereal Chemistry* **71** (5): 469-471.
- KOKINI, J. L.; LAI, LIH-SHIUH & CHEDID, L. L. (1992). Effects of Starch Structure on Starch Rheological Properties. *Food Technology*, **46** (6): 124-139.
- KUGIMIYA, M.; DONOVAN, J. W. & WONG, R. Y. (1980). Phase transitions of amylose-lipid complexes in starches: a calorimetric study. *Starch* **32**: 265-270 (cit. Roos, 1995).
- LAI, L. S. & KOKINI, J. L. (1991). Physicochemical changes and rheological properties of starch during extrusion (a review). *Biotechnol. Prog.* **7** : 251-266 (cit. Kokini, *et al.*, 1992).

- LEACH, H. W. (1965). Gelatinization of Starch. In: *Starch: Chemistry and Technology*. Roy L. Whistler and Eugene F. Paschall, eds. Academic Press. Vol. I. New York (cit. Medcalf, 1973).
- LELIÈVRE, J. (1992). Thermal analysis of carbohydrates as illustrated by aqueous starch systems. In: *Developments in Carbohydrate Chemistry*. Edited by Richard J. Alexander & Henry F. Zobel. American Assoc. of Cereal Chemists. 2<sup>nd</sup> Ed. St. Paul MN. p. 137-161.
- LEVINE, H. & SLADE, L. (1990). Influences of the glassy and rubbery states. *Dough Rheology and Baked Product Texture*. Ed. H. Faridi and J.M. Faubion AVI Pub. Co. Inc. pp. 157-330. New York (cit. Kokini, *et al.*, 1992).
- LEVINE, I. N. (1983). Solids and liquids. In: *Physical Chemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw Hill. Page 827. New York (cit. Zeleznak & Hosenev, 1987).
- LIM, W. J.; LIANG, Y. T.; SEIB, P. A. & RAO, C. S. (1992). Isolation of Oat Starch from Oat Flour. *Cereal Chemistry* **69** (3): 233-236.
- LINEBACK, D. R. & RASPER, V. F. (1988). Wheat Carbohydrates. In: *Wheat Chemistry and Technology*, Ed. Y. Pomeranz. 3<sup>rd</sup> ed. Vol 1. Cap. 6. Washington.
- LINKO, P.; COLONNA, P. & MERCIER, C. (1981). High-temperature, short-time extrusion cooking. In: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 4. Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, Minnesota. 145-235 (Cit. Guilbot & Mercier, 1985).
- LIU, H. & LELIÈVRE, J. (1991). Effects of heating rate and sample size on DSC traces of starch gelatinized at intermediate water levels. *Starch* **43**: 225 (cit. Lelièvre, 1992).
- LIU, H. & LELIÈVRE, J. (1992). A DSC study of melting transitions in aqueous suspensions containing blends of wheat and rice starch. *Carbohydr. Polym.* **17**: 145 (cit. Lelièvre, 1992).
- LOPES DA SILVA, M. F. A. P. (1992). *Avaliação da Modificação do Amido de Castanha Após Extrusão-Cozedura*. Trabalho Final de Curso de Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia/ U.T.L. Lisboa.
- LORENZ, K. & HWANG, Y. S. (1986). Lipids in Proso Millet (*Panicum miliaceum*) Flours and Brans. *Cereal Chemistry* **63** (5): 387-390.

- LUND, D. (1984). Influence of Time, Temperature, Moisture, Ingredients and Processing Conditions on Starch Gelatinization. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Editor Thomas E. Furia. CRC Press, Inc. Vol. 20, No. 4. p . 249-273.
- MANNERS, D. J. (1968). The biological synthesis of starch. In: *Starch and its derivatives* (4<sup>th</sup> ed.). J.A. Radley ed.. Chapman and Hall. London (cit. Medcalf, 1973).
- MARCHANT, J. L. & BLANSHARD, J. M. V. (1978). Studies of the dynamics of the gelatinization of starch granules employing a small angle light scattering system. *Starch* **30**: 257-264 (cit. Roos, 1995).
- MARTINS, I. (1983). Importância dos Frutos Secos em Nutrição. *Revista do Centro de Nutrição* **7** (1) pp. 59-71.
- MASON, W. R. & HOSENEY, R. C. (1986). Factors affecting the viscosity of extrusion-cooked wheat starch. *Cereal Chemistry*. **63** (5): 436-441.
- MAURICE, T. J.; SLADE, L.; SIRETT, R. R. & PAGE, C. M. (1985). Polysaccharide-water interactions - Thermal behavior of rice starch. In: *Properties of Water in Foods* . Ed. D. Simatos and J. L. Multon. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 211-227 (cit. Roos, 1995).
- MEDCALF, D. G. (1973). Structure and Composition of Cereal Components as Related to Their Potencial Industrial Utilization - Starch. In: *Industrial Uses of Cereals*. Y. Pomeranz and Chairman. Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul. Minnesota. p. 121-137.
- MELCHIOR, H. (1954). Beitrag Zur Kenntnis der Struktur der Getreide Starkekörner. *Ber. Deutsch. bot. Ges.* **67** : 394 (cit. Medcalf, 1973).
- MENGER, A. (1976). Technologic and Nutritional Aspects of Fats and Emulsifiers in Baked Goods. *Lipids*, Vol. 2: Technology. Edited R. Paoletti, G. Jacini and R. Porcellatti. Raven Press. New York. p. 419-420.
- MERCIER, C. & FEILLET, P. (1975). Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products. *Cereal Chem.* **52**: 283 (cit. Diosady, 1986).
- MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GREBAUT, J. & DE LA GUERIVIERE, J. F. (1980). Formation of amylose-lipid complexes by twin-screw extrusion cooking of manioc starch. *Cereal Chem.*, **57**: 4.

- MEUSER, F. & WIEDMANN, W. (1989). Extrusion Plant Design. In: *Extrusion Cooking*. C. Mercier, P. Linko and J. M. Harper, Eds. AACC, Inc. St. Paul, Minnesota. p. 91-93.
- MEUSER, F.; VON LENGERICH, B. & KOEHLER, F. (1982). The influence of extrusion parameters on the functional properties of wheat starch. *Stärke*, 34: 366 (cit. Choupina, 1993).
- MORRIS, V. J. (1990). Starch gelation and retrogradation. *Trends Food Sci. Technol.*, 1: 2-6 (Cit. Waniska & Gomez, 1992).
- MORRISON, W. R. & LAIGNELET, B. (1983). An improved colorimetric method for determining appparent and total amylose in cereal and other starches. *J. Cereal Sci.* 1:9 (cit. Morrison, 1995).
- MORRISON, W. R. (1995). Starch Lipids and How They Relate to Starch Granule Structure and Funcionality. *Cereal Foods World* 40 (6): 437-446.
- NAKAZAWA, F.; NOGOCHI, S.; TAKAHASHI, J. & TAKADA, J. (1984). Thermal equilibrium state of starch-water mixture studied by DSC. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2647 (cit. Liu & Lelièvre, 1992).
- NOEL, T. R.; RING, S. G. & WHITTAM, M. A. (1990). Glass Transitions in Low Moisture Foods. *Trends Food Sci. Technol.* 1: 62-67 (cit. Biliaderis, 1992).
- OLIVEIRA, A. M. & MONTEIRO ALVES, A. A. (1987). Quadro Ecológico-Cultural da Silvicultura do Castanheiro. Encontro sobre Soutos e Castiçais. Castelo de Vide, Portalegre e Marvão, 16 pp.
- OLKKU, J. & RHA, C. K. (1978). Gelatinization of starch and wheat flour starch. *Food Chem.* 3: 293-317 (cit. Roos, 1995).
- OWUSU-ANSAH, J., VAN DE VOORT, F. P. & STANLEY, D. W. (1983). Physicochemical changes in corn starch as a function of extrusion variables. *Cereal Chem.* 60 : 319-324 (cit. Kokini, *et al.*, 1992).
- PAGLIETTA , R. & BOUNOUS, G. (1979). *Il Castagno da Frutto*. Edagricole - Edizioni Agricole. Bologna. pp. 1-139.
- PAIVA, J. (1990). O castanheiro em Portugal. Quercus – Associação Nacional de Conservação da Natureza. Coimbra.

- PEREIRA, S. (1990). O Castanheiro e a Aveleira na Beira Interior. *Vida Rural* Nº 17 , 1ª Quinzena de Setembro. p. 22-25.
- PEREZ, E.; BAHNASSEY, Y. A. & BREENE, W. M. (1993). A Simple Laboratory Scale Method for Isolation of Amaranth Starch. *Starch* 45 (6): 211-214.
- PERKIN-ELMER CORPORATION (1970). *Thermal Analysis Newsletter*. No.9. V. S. Patent 3263484. Norwalk. Conn. (cit. Correia, 1996).
- PINNAVAIA, G.; LERICI, C. R. & MOSCATTI, P. (1984). Proprietà funzionali della farina di castagne in relazione ai processi di cottura-estruzione – Nota 1. *Tecnica Molitoria*. Ottobre 1984. p. 725-732.
- PINTO DE ABREU, C.; GOMES PEREIRA, J. & VALDIVIESSO, T. (1990). Caracterização das Variedades de Castanheiro Portugesas. *Actas de Horticultura do I Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas*. Vol. IV - Fruticultura/Viticultura. Assoc. Port. de Horticultura e Fruticultura e Soc. Española de Cienc. Hort.. Lisboa. p.254-258.
- PITTE, JEAN-ROBERT (1986). *Terres de Castanide – Hommes et Paysages du Châtaignie de l'Antiquité à nos Jours*. Librairie Arthème Fayard. pp. 347-361 .
- POWELL, E. L. (1990). Starch amylopectin (waxy corn and waxy sorghum). In: *Industrial Gums - Polysaccharides and Their Derivatives*. 2<sup>nd</sup> Ed. Roy L. Whistler & J. N. BeMiller. Cap. 25. Academic Press. New York.
- POWERS, P. P. (1988). Current practices and application of descriptive methods. In *Sensory Analysis of Foods*. J.R. Piggot (ed.). Elsevier Applied Science. London and New York: 187-286.
- PRAVISANI, C. I.; CALIFANO, A. N. & CALVELO, A. (1985). Kinetics of starch gelatinization in potato. *J. Food Sci.* 50: 657-660 (cit. Correia, 1996).
- REGO, F. M. C. C. (1987). “História Recente do género *Castanea* nos continentes Europeu e Americano”. Encontro sobre Soutos e Castiçais. Castelo de Vide, Portalegre e Marvão. 15pp.
- RODRIGUES PIRES, D. (1991). *Estudo Prospectivo da Produção de Castanha no Distrito de Bragança*. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. p. 1-70. Bragança.

- RODRIGUES, J.; LOURO, V.; MOURATE, J., (1977). "Instalações de castanheiros". Encontro sobre Soutos e Castiçais Castelo de Vide, Portalegre e Marão.).
- ROOS, Y. H. (1995). *Phase Transitions in Foods*. Ed. Steve L. Taylor. Academic Press. pp. 1-65; 111-133.
- ROOS, Y. & KAREL, M. (1991). Amorphous State and Delayed Ice Formation in Sucrose Solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* **26**: 553-566 (cit. Roos, 1995).
- SCHOCH, T. J. (1965). Starch in bakery products. *Bakers Digest.* **39** (2): 2 (cit. Medcalf, 1973).
- SENOUCI, A. & SMITH, A. C. (1988). An experimental study of food melt rheology. I. Shear viscosity using a slit die viscometer and a capillary rheometer. *Rheol. Acta* **27** : 546-554 (cit. Kokini, *et al.*, 1992).
- SIEVERT, D. & WÜRSCH, P. (1993). Amylose Chain Association Based on Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Food Science* **58**(6): 1332-1334.
- SINCLAIR, H. M. & HOLLINGSWORTH, D. F. (1969). *Hutchinson's Food and the Principles of Nutrition*. Publ. Edward Arnold Ltd. 12<sup>th</sup> Ed. London. p. 326 (cit. Martins, I., 1983).
- SLADE, L. & LEVINE, H. (1987a). Recent Advances in Starch Retrogradation. In: *Industrial Polysaccharides*, Ed. S. S. Stilva, V. Crescenzi and I. C. M. Dea. Gordon & Breach Science, New York. pp. 387-430 (cit. Biliaderis, 1992).
- SLADE, L. & LEVINE, H. (1987b). Influences of the glassy and rubbery states on the thermal, mechanical and structural properties of doughs and baked products. In: *Advances in meat research*. Vol 4. *Collagen as a food*. Ed. A. M. Pearson, T. Dutson e A. Bailey. AVI Pub. Co. Inc. pp. 251-266. New York (cit. Kokini, *et al.*, 1992).
- SLADE, L. & LEVINE, H. (1991). Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assesment of food quality and safety. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Ed. Fergus M. Cleydsdale. CRC Press, Inc. Vol. 30/Issues 2,3.
- SLADE, L. & LEVINE, H. (1994). Water and the glass transition - Dependence of the glass transition on composition and chemical structure: Special

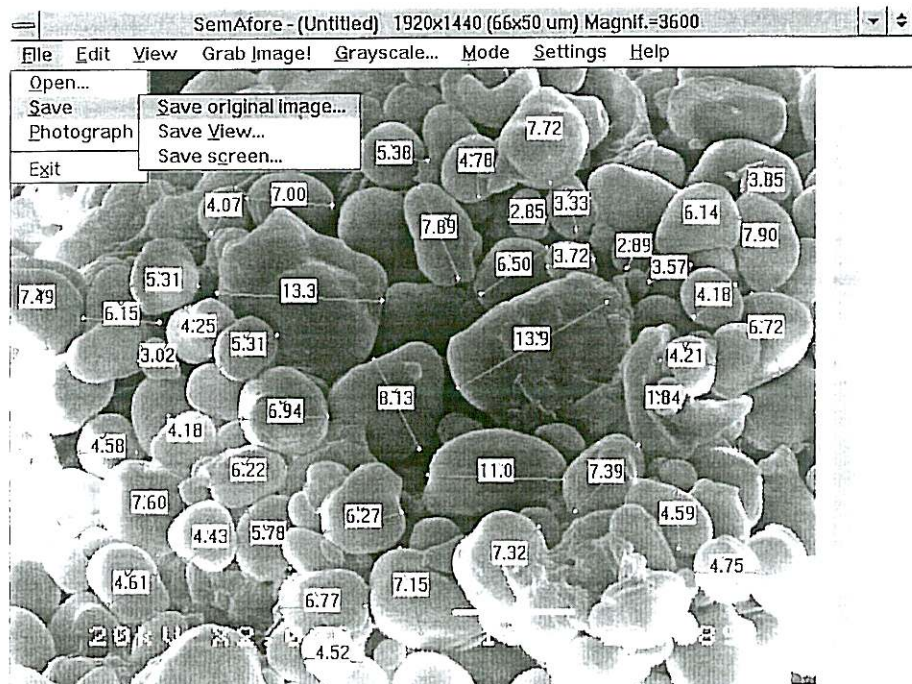
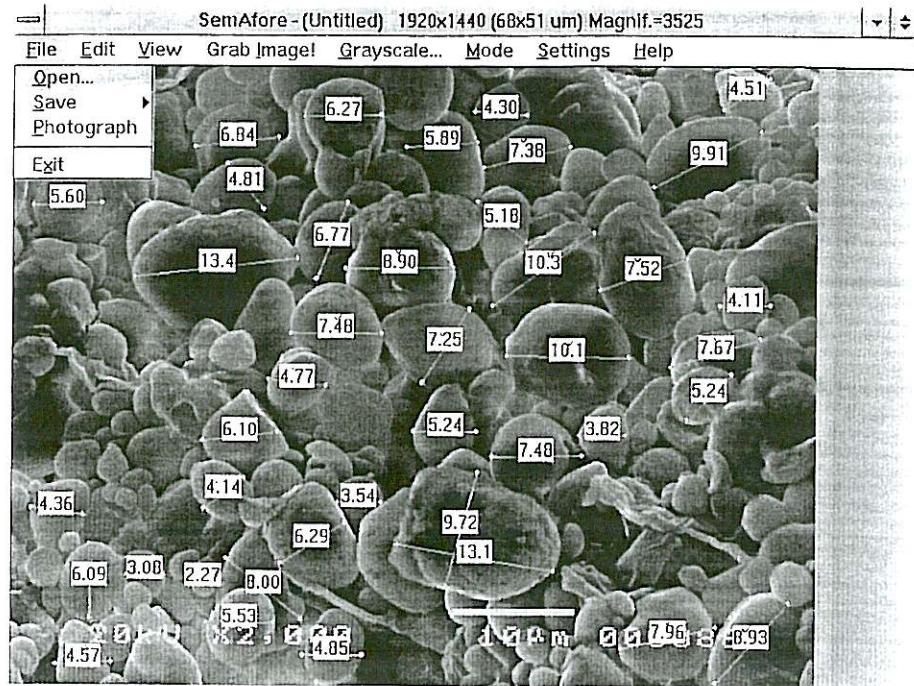
- implications for flour functionality in cookie baking. *J. Food Eng.* **22**: 143-188 (cit. Roos, 1995).
- SLADE, L. & LEVINE, H. (1995). Glass Transitions and Water-Food Structure Interactions. *Adv. Food Nutr. Res.* **38**. In press (cit. Roos, 1995).
- SLADE, L. LEVINE, H. & FINLEY, J. W. (1988). Protein-water interactions: Water as a plasticizer of gluten and other protein polymers. In: *Protein Quality and the Effects of Processing*. Ed. D. Philips and J. W. Finley, pp. 9-124. Marcel Dekker. New York (cit. Kokini, *et al.*, 1992).
- SPIES, R. D. & HOSENEY, R. C. (1982). Effects of sugar isolated from oat groats with different amounts of lipids. *Cereal Chem.* **69**: 521-527.
- SRIDHAR, R. & LAKSHMINARAYANA, G. (1994). Contents of Total Lipids and Lipid Classes and Composition of Fatty Acids in Small Millets: Foxtail (*Setaria italica*), Proso (*Panicum miliaceum*) and Finger (*Eleusine coracana*). *Cereal Chemistry* **71** (4): 355-359.
- STEVENS, D. J. & ELTON, G. A. H. (1971). Thermal properties of the starch/water system. Part 1. Measurement of heat of gelatinization by DSC. *Starch/Stärke* **23**: 8-12.
- SUZUKI, A.; KANEYANA, M.; SHIBANUMA, K.; TAKEDA, Y.; ABE, J. & HIZUKURI, S. (1992). Characterization of Lotus Starch. *Cereal Chem.* **69** (3): 309-315.
- SZCZODAK, J. & POMERANZ, Y. (1992). Starch-lipid interactions and formation of resistant-starch in high-amylose barley. *Cereal Chem.*, **69** (6): 626-632.
- TABELA DE NECESSIDADES DA POPULAÇÃO PORTUGUESA (1983). *Rev. Cen.*, **7** (1). p. 10-11 (cit. Martins, I., 1983).
- TAKAHASHI, K.; SHIRAI, K. & WADA, K. (1982). Structural changes in starch granules of low moisture content during heating. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 2505 (cit. Gomez & Aguilera, 1984).
- TAVEIRA FERNANDES, C. (1954). A Castanha. Sua Importância Económica e Valor Alimentar. *Separata das Publicações da D.G. dos Serviços Florestais e Agrícolas*. Vol. XXI. Tomo II pp. 37-53.
- TEIXEIRA, C. & PAIS, J. (1976). Introdução à Paleobotânica.: As grandes fases da evolução dos vegetais. Lisboa.

- VAVILOV (1950). The origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. *Chronic Botanic*. Waltham.
- VAZ, M. (1988). Castanha – Situação do Mercado e Perspectivas. IROMA.
- VAZ, M. (1990). Frutos Secos - Mercado Nacional e Internacional. IROMA - Serviço de Informação de Mercados Agrícolas.
- VIEIRA, J. A. B. N. (1987). Toponímia de Portugal Continental ligada ao castanheiro. Encontro sobre soutos e castiçais. Castelo de Vide. Portalegre e Marvão. 15pp.
- WANG, Y.-J.; WHITE, P. & POLLAK, L. (1993). Physiochemical properties of starches from mutant genotypes of the Oh43 inbred line. *Cereal Chemistry* **70**: 199.
- WANG; S. S.; CHIANG, W. C.; ZHAO, B.; ZHENG, X. G. & KIM, I. H. (1991). Experimental Analysis and Computer Simulation of Starch Water Interactions During Phase Transition. *Journal of Food Science*. **56** (1): 121-124.
- WANISKA, R. & GOMEZ, M. (1992). Dispersion Behavior of Starch. *Food Technology*. **46** (6) : 112-123.
- WEN, LU-FANG; RODIS, P. & WASSERMAN, B. P. (1990). Starch Fragmentation and Protein Insolubilization During Twin-Screw Extrusion of Corn Meal. *Cereal. Chem.* **67** (3) : 268-275.
- WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W.; GOATLEY, J. L. & NIKINI, Z. (1958). Effect of drying on the presence of cavities on corn starch granules. *Cereal Chem.* **35**: 331 (cit. Medcalf, 1973).
- WOLF, M. J. *et al.* (1948). Comparison of corn starch granules at various stages of kernel maturity. *Cereal Chem.* **25**: 312 (cit. Medcalf, 1973).
- WOOTTON, M. & BAMUNUARACHCHI, A. (1979). Application of DSC to starch gelatinization. I. Commercial native and modified starches. *Starch/Stärke* **6**: 201-204 (cit. Correia, 1996).
- WOOTTON, M. & BAMUNUARACHCHI, A. (1980). Application of DSC to Starch Gelatinization. III. Effect of sucrose and sodium chloride. *Starch* **32**: 126-129 (cit. Roos, 1995).

- WRIGHT, D. J. (1984). *Thermoanalytical methods in food research. Biophysical methods in food research*. Ed. H. W.-S. Chan. Blackwell Scientific. London (cit. Correia, 1996).
- YOST, D. A. & HOSENEY, R. C. (1986). Annealing and glass transition in starch. *Stärke*. **38** : 289 (cit. Zeleznak & Hoseney, 1987).
- YOUNGS, V. L. (1978). Oat Lipids. *Cereal Chemistry* **55** (5): 591-597.
- ZELEZNAK, K. J. & HOSENEY, R. C. (1987). The Glass Transition in Starch. *Cereal Chemistry* **64** (2) : 121-124.
- ZOBEL, H. F. (1988). Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch/Stärke* **40** (2) : 44-50.
- ZOBEL, H. F.; YOUNG, S. N. & ROCCA, L. A. (1988). Starch gelatinization: An X-ray diffraction study. *Cereal Chemistry* **65**: 443-446.

## ANEXO I

Figuras 1 e 2 - Fotografias digitalizadas, em SEM, usadas na determinação das dimensões dos grânulos de amido de castanha com o auxílio do programa SemAfore.



## ANEXO II

Quadro I - Dimensões de 50 grânulos de amido de castanha e respectivas média e desvio padrão.

Comprimento ( $\mu\text{m}$ )		Largura ( $\mu\text{m}$ )	
7.89	8.00	8.90	4.07
11.00	3.27	5.89	13.3
13.90	1.90	4.77	4.78
7.72	2.41	4.36	6.72
6.77	3.27	4.14	4.21
7.00	2.84	7.25	1.84
4.07	6.38	7.48	4.75
5.38	9.39	4.30	7.15
4.78	3.68	6.27	7.32
3.85	5.70	6.29	4.52
7.90	2.24	3.54	8.13
7.39	3.42	2.27	4.58
4.75	3.69	3.08	4.61
7.60	2.44	4.57	6.27
3.33	4.37	5.53	2.89
5.31	8.42	4.85	3.57
6.22	5.99	5.24	4.18
6.50	6.10	4.11	6.14
9.91	7.96	7.52	7.49
13.4	5.24	3.82	6.15
6.09	6.84	9.72	5.31
8.00	7.67	4.51	4.25
13.1	10.1	3.72	6.94
10.3	6.77	2.85	5.78
8.93	7.36	4.43	3.02
Média - 6.47 Desvio Padrão - 2.87		Média - 5.39 Desvio Padrão - 2.06	

ANEXO III

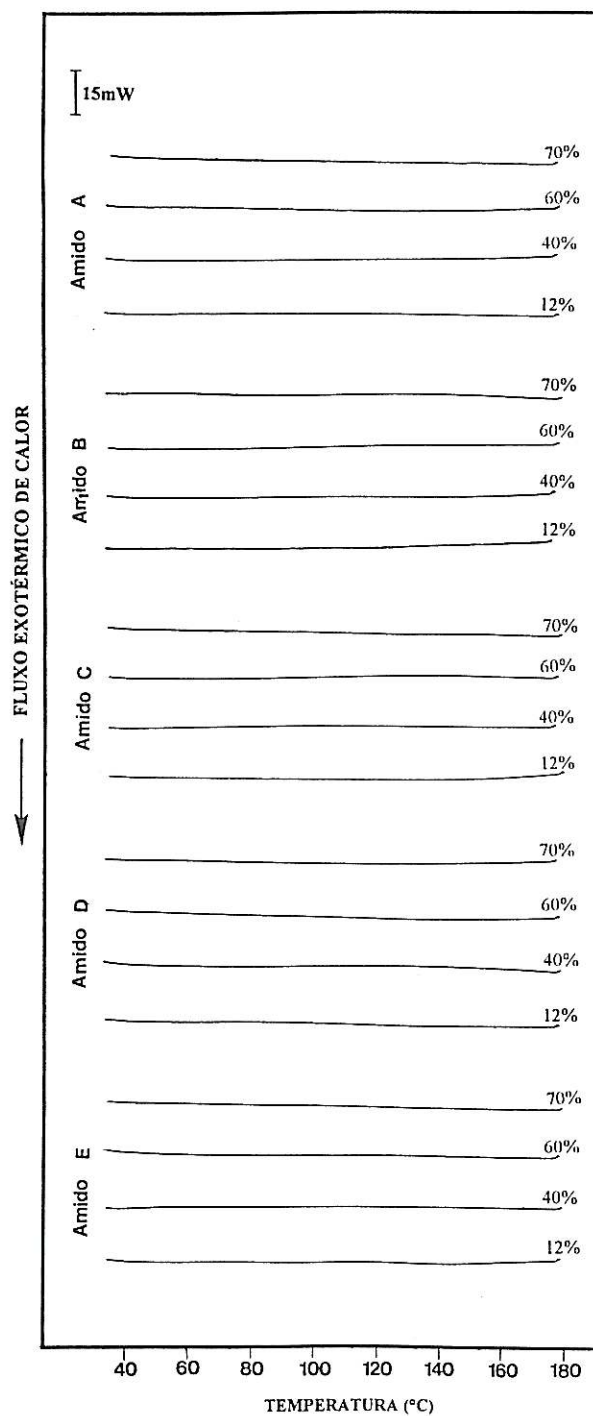


Figura 1

Termogramas DSC do **arrefecimento** (-5°C/minuto) para os cinco amidos isolados a 12, 14, 60 e 70% de humidade.

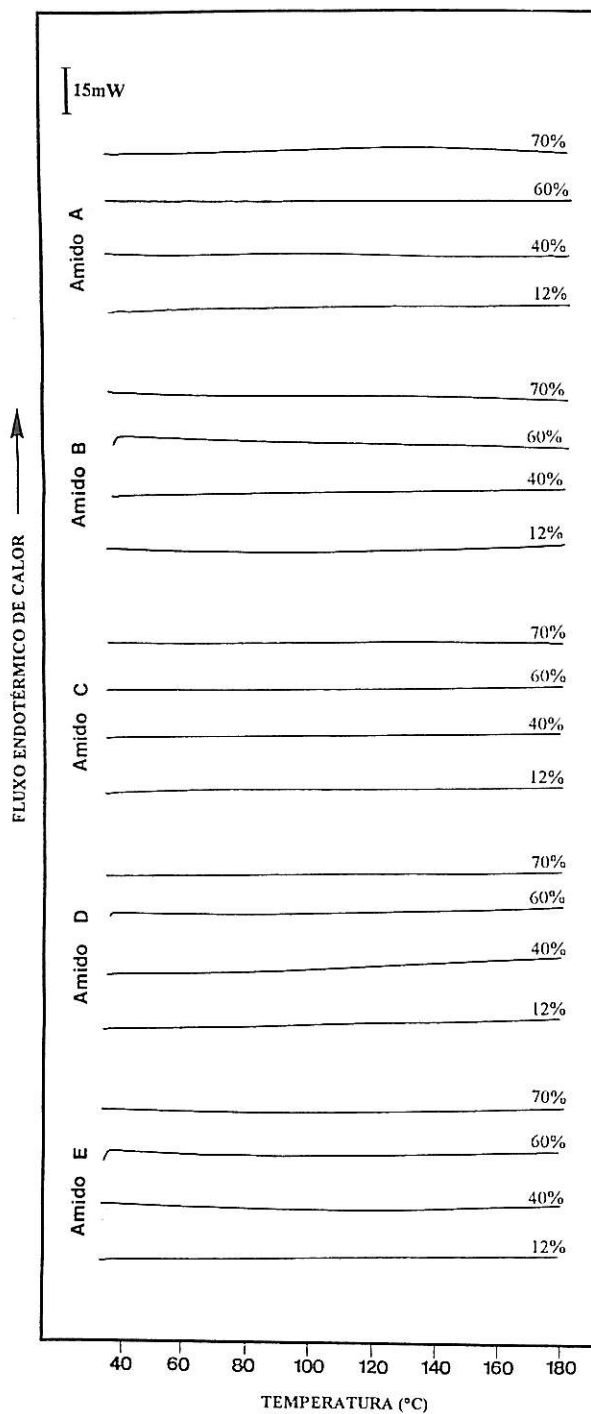


Figura 2

Termogramas DSC do **2º aquecimento** (5°C/minuto) para os cinco amidos isolados a 12, 14, 60 e 70% de humidade.