



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALYNE FERNANDA KLESSE MINAKAWA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE AMIDO OBTIDAS POR ULTRASSONICAÇÃO**

Londrina
2017

ALYNE FERNANDA KLESSE MINAKAWA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
DE AMIDO OBTIDAS POR ULTRASSONICAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.Dr^a. Suzana Mali de Oliveira
Co-orientadora: Dra Paula C. S. Faria Tischer

Londrina
2017

ALYNE FERNANDA KLESSE MINAKAWA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
AMIDO OBTIDAS POR ULTRASSONICAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra Adelaide del Pino Beléia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alexandre Orsato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de Julho de 2017.

À Deus.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu condições para chegar até aqui. À Ele toda a honra, toda a glória e todo o louvor.

Aos meus pais, Pedro e Maria, e à minha irmã Alana, por serem meus maiores incentivadores.

Ao meu marido Daniel, por todo apoio e paciência nos momentos mais difíceis.

À professora Suzana Mali, toda a minha gratidão pela amizade e dedicação nessa trajetória.

Aos Mestres, pelos ensinamentos e desafios.

Aos colegas que me acompanharam, agradeço a amizade e o companheirismo.

À CAPES, pela bolsa de estudos e financiamento dos projetos de pesquisa.

Ao corpo docente, pesquisadores e funcionários do programa de pós-graduação em Biotecnologia/ UEL.

À Universidade Estadual de Londrina, que proporcionou várias conquistas importantes na minha vida; pela graduação e mestrado, meu muito obrigada.

MINAKAWA, Alyne Fernanda Klesse. **Produção e caracterização de nanopartículas de amido produzidas por ultrassonicação**. 2017, 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi produzir nanopartículas de amido empregando-se o processo de ultrassonicação e caracterizá-las quanto à sua morfologia, microestrutura e propriedades físico-químicas. Três tipos de amido, com diferentes teores de amilose, o amido de milho ($23 \pm 1 \%$), o amido de mandioca (18 ± 2) e o amido de inhame ($30 \pm 3 \%$) foram submetidos ao processo de ultrassonicação e foram obtidas partículas de tamanhos diferentes para cada tipo de amido: as nanopartículas (NPs) e os corpos de fundo (CFs). A morfologia e o tamanho destes materiais foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM). Comparados aos grânulos nativos, os CFs apresentaram tamanhos menores, entre 3 a 6 μm para o amido de milho, 3 a 7 μm para o amido de mandioca e 1 a 2 μm para o amido de inhame. A análise de imagem por AFM mostrou diâmetro médio de 52 nm ($\pm 16,5$) para as NPs de amido de milho, 49 nm ($\pm 14,6$) para as NPs de amido de mandioca e 20,7 nm ($\pm 12,08$) para as NPs de amido de inhame. As NPs e os CFs foram analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios-X (DRX). As NPs e os CFs apresentaram espectros de FTIR semelhantes aos amidos nativos, porém com bandas de menor intensidade e o índice de cristalinidade (IC) calculado através dos difratogramas demonstrou diminuição da cristalinidade das NPs de amido de milho e inhame, sendo que as NPs de amido de mandioca apresentaram-se totalmente amorfas. Esses resultados indicaram que a ultrassonicação causa danos a estrutura cristalina do amido, mas não afeta os grupos químicos funcionais. A fim de estudar a estabilidade térmica dos materiais obtidos foi realizada análise termogravimétrica (TGA). As amostras de NPs de amido apresentaram $T_{\text{máx}}$ entre 290 °C e 306 °C, valores menores aos encontrados para os amidos nativos e CFs, indicando uma diminuição na estabilidade térmica desses materiais. O processo de ultrassonicação foi eficaz na redução do tamanho dos grânulos de amido na produção de NPs, e pode-se observar que o amido de inhame, com maior teor de amilose, foi mais susceptível ao processo, resultando em NPs e CFs de menor tamanho.

Palavras-chave: Manopartículas. Ultrassonicação. Cristalinidade. Amilose.

MINAKAWA, Alyne Fernanda Klesse. **Production and characterization of starch nanoparticles obtained by ultrasound method.** 2017, 64p. Dissertation (Master of Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The objective of this work was to produce starch nanoparticles using the ultrasound process and characterize them in terms of their morphology, microstructure and physicochemical properties. Three types of starch with different levels of amylose, corn starch ($23 \pm 1\%$), cassava starch (18 ± 2) and yam starch ($30 \pm 3\%$) were subjected to the ultrasonication process and particles with different sizes were obtained for each type of starch: nanoparticles (NPs) and bottom particles (BPs). The morphology and size of these materials were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). Compared to native granules, BPs presented smaller sizes, ranging from 3 to 6 μm for corn starch, 3 to 7 μm for cassava starch and 1 to 2 μm for yam starch. AFM showed a mean diameter of 52 nm (± 16.5) for corn starch NPs, 49 nm (± 14.6) for cassava starch NPs and 20.7 nm ($\pm 12, 08$) for yams starch NPs. NPs and BPs were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). The NPs and the BPs presented similar FTIR spectra to the native starches, but with lower intensity bands and the crystallinity index (CI) calculated through the diffractograms showed decreased crystallinity of the NPs of corn and yam starches, NPs of cassava starch were totally amorphous. These results indicate that ultrasound causes damage to the crystalline structure of the starch, but does not affect functional chemical groups. In order to study the thermal stability of the obtained materials, thermogravimetric analysis (TGA) was performed. Samples of NPs showed T_{max} between 290 °C and 306 °C, lower values than those found for native starches and BPs, indicating a decrease in the thermal stability of these materials. The ultrasonication process was effective in reducing the size of starch granules in the production of NPs, and it can be observed that the yam starch with higher amylose content was more susceptible to the process, resulting in smaller NPs and BPs.

Key words: Nanoparticles. Starch nanoparticles. Ultrasonication.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estrutura da amilose (A) e amilopectina (B).....	18
Figura 2	– Esquema das regiões amorfas e cristalinas de um grânulo de amido.	21
Figura 3	– Representação esquemática da organização das duplas hélices da amilopectina na formação estrutural dos amidos tipo A e tipo B. Representação esquemática da disposição das frações tipo A (no centro) e tipo B (na região periférica) na formação dos grânulos de amido tipo C.....	22
Figura 4	– Imagem da suspensão de amido de milho após 30 min de ultrassonicação (A), e do corpo de fundo (B) e nanopartícula (C) obtidos após a secagem do material.....	38
Figura 5	– Fotomicrografias dos grânulos de amido nativo de milho (A), mandioca (B) e inhame (C) com aumento de 800 vezes	40
Figura 6	– Fotomicrografias dos CFs e NPs obtidos a partir do amido de milho (A), mandioca (B) e inhame (C).....	43
Figura 7	– Imagens topográficas obtidas por AFM das nanopartículas de amido de milho (A), mandioca (B) e inhame (C)	44
Figura 8	– Tamanho médio das nanopartículas de amido de milho (A), mandioca (B) e inhame (C) analisadas por AFM	45
Figura 9	– Espectros de FTIR do amido nativo (AM), corpo de fundo (CF) e nanopartículas (NP) dos tipos milho (A), mandioca (B) e inhame (C).	48
Figura 10	– Difractogramas do amido nativo (AM), corpos de fundo (CF) e nanopartículas (NP) dos tipos milho (A), mandioca (B) e inhame (C)	51
Figura 11	– Curvas de TGA do amido nativo (AM), corpo de fundo (CF) e nanopartículas (NP) dos tipos milho (A), mandioca (B) e inhame (C).	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tamanho dos grânulos de amido de milho, mandioca e inhame antes e após tratamento ultrassônico medidos através das imagens de MEV	41
Tabela 2 –	Resultados de Blue Value das amostras.....	47
Tabela 3 –	Índice de cristalinidade relativa (IC) dos amidos de milho, mandioca e inhame nativos e seus respectivos corpos de fundo e nanopartículas.....	52
Tabela 4 –	Temperatura de degradação na taxa de perda máxima ($T_{m\acute{a}x}$) dos amidos nativos, corpos de fundo e nanopartículas dos amidos de milho, mandioca e inhame	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	NANOPARTICULAS BIOPOLIMÉRICAS	15
3.2	NANOPARTÍCULAS DE AMIDO.....	16
3.2.1	Estrutura química do amido.....	17
3.2.1.1	Amilose.....	17
3.2.1.2	Amilopectina.....	18
3.2.2	Estrutura granular do amido	19
3.2.2.1	Propriedades físico-químicas do amido.....	23
3.2.2.1.1	<i>Gelatinização</i>	23
3.2.2.1.2	<i>Retrogradação</i>	24
3.3	PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO	25
3.3.1	Produção de nanopartículas de amido por ultrassonicação	27
3.4	EFEITO DA ULTRASSONICAÇÃO NA ESTRUTURA FÍSICA DOS GRÂNULOS DE AMIDO	30
3.4.1	Morfologia.....	30
3.4.2	Polimorfismo e cristalinidade dos grânulos de amidos	31
3.5	EFEITO DA ULTRASSONICAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DOS GRÂNULOS DE AMIDO.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAIS	34
4.2	MÉTODOS	34
4.2.1	Extração do amido de inhame	34
4.2.2	Obtenção de nanopartículas de amido por ultrassonicação.....	34
4.2.3	Caracterização das nanopartículas de amido obtidas por ultrassonicação	35

4.2.3.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
4.2.3.2	Microscopia de Força Atômica (AFM)	36
4.2.3.3	Determinação de Blue Value	36
4.2.3.4	Análise termogravimétrica (TGA)	36
4.2.3.5	Difração de raios-X (DRX)	36
4.2.3.6	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	37
4.2.3.7	Análise estatística.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS E CORPOS DE FUNDO.....	38
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	39
5.3	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	44
5.4	DETERMINAÇÃO DE BLUE VALUE (BV)	46
5.5	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	47
5.6	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	49
5.7	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	53
6	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO	70
	ANEXO A – Starch micro and nanoparticles obtained from cassava, corn and yam starches employing a simple ultrasound method.....	71

1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento em pesquisas relacionadas à nanociência e nanotecnologia tem influenciado diversas áreas do conhecimento (DURÁN, 2006). A nanociência é o estudo dos fenômenos naturais que regem o comportamento dos materiais em escala nanométrica, e a nanotecnologia é a aplicação da nanociência para o controle e manipulação desses materiais, que permite o desenvolvimento de dispositivos, materiais funcionais e sistemas com propriedades significativamente diferentes das observadas na escala micro ou macroscópica (ABDI, 2015).

A nanotecnologia na área da saúde tem sido aplicada no desenvolvimento de fármacos, medicamentos, matérias-primas e materiais inovadores destinados ao tratamento de câncer, doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurológicas e AIDS. Apesar de promissora, a nanotecnologia na área da saúde apresenta inúmeros desafios como estudos toxicológicos, pré-clínicos e clínicos, e falta de regulamentação específica.

Os materiais nanotecnológicos utilizados em formulações farmacêuticas devem apresentar características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação e encapsulamento (MOGHIMI, 2005). Os mecanismos de encapsulação de fármacos incluem solubilização, retenção, conjugação ou adsorção nas nanopartículas (SCHAFFAZICK, 2003). As nanopartículas devem atuar como carreadores capazes de transportar o fármaco para um receptor ou sítio ativo específico afim de exercer sua atividade terapêutica com o máximo de segurança. Os principais nanocarreadores aplicados na terapêutica são: os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as micelas e as nanopartículas poliméricas (ETHERIDGE, 2013).

As nanopartículas biopoliméricas representam uma alternativa tecnológica com excelente biocompatibilidade, não são imunogênicas, são atóxicas e biodegradáveis. Constituem uma ampla classe de nanocarreadores de polímeros sintéticos ou naturais capazes de fornecer um sistema de liberação controlada que otimiza a velocidade de cedência e o regime de dosagens. As nanopartículas biopoliméricas apresentam vantagens como baixo custo, alta estabilidade e durabilidade. (SCHAFFAZICK, 2003). Dentre as nanopartículas poliméricas de polissacarídeos naturais mais estudadas se destacam a celulose (MOON, 2011), a quitina (ZHENG, 2012) e o amido (LECORRE, 2010).

O amido é um homopolissacarídeo de glicose que se apresenta na forma de grânulos, que são compostos por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é constituída de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -(1→4), formando uma cadeia linear; enquanto a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -(1→4) e α -(1→6), formando uma estrutura ramificada. Os grânulos de amido nativo apresentam regiões mais organizadas, chamadas de regiões cristalinas, e menos organizadas, chamadas de regiões amorfas (ELIASSON, 2004; TESTER, 2004). À partir da estrutura do amido, é possível obter nanopartículas através de métodos químicos e/ou físicos, ou pela combinação de ambos. A principal abordagem relatada na literatura baseia-se na utilização de hidrólise ácida para remover as regiões amorfas dos grânulos de amido (ANGELLIER, 2005). Atualmente, não existem muitos estudos descrevendo a produção de nanopartículas de amido utilizando apenas métodos físicos.

Como contribuição para o desenvolvimento de um método simples, rápido e de baixo custo, e que não utilize reagentes químicos na obtenção de nanopartículas de amido, a proposta deste trabalho é desenvolver e caracterizar nanopartículas de amido, empregando-se três tipos de amidos (milho, mandioca e inhame) com diferentes teores de amilose, utilizando o tratamento ultrassônico como técnica principal, e estudar as propriedades destes novos materiais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir nanopartículas de amido empregando-se o processo de ultrassonicação e caracterizá-las quanto à sua morfologia, microestrutura e propriedades físico-químicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência das diferentes fontes de amido nas propriedades das nanopartículas obtidas.
- Caracterizar as nanopartículas obtidas quanto à sua estrutura e morfologia: microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), análise termogravimétrica (TGA), difração de raios-X (DRX) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 NANOPARTÍCULAS BIOPOLIMÉRICAS

O termo “nanopartícula” compreende uma partícula que, independentemente da sua constituição, forma, tipos de interações e aplicações, apresenta um tamanho nanométrico. Segundo a EFSA (European Food Safety Authority), qualquer nanomaterial é definido como um material produzido que possua mais de uma dimensão e cujo tamanho seja inferior a 100 nm (European Food Safety Authority, 2009). No entanto, para aplicações farmacêuticas, são consideradas nanopartículas qualquer material ou partícula coloidal, farmacologicamente ativo ou inerte, com a capacidade de veicular agentes terapêuticos e que se encontre em tamanhos menores que 1000 nm (1 μm) (KREUTER, 2007).

Os biopolímeros se destacam no desenvolvimento de nanopartículas para liberação controlada de fármacos por serem biocompatíveis e biotransformáveis (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; RIEUX *et al.*, 2006). A liberação de substâncias de uma matriz polimérica pode se dar por difusão através dos poros ou erosão envolvendo hidrólise das ligações entre os monômeros (RIEUX *et al.*, 2006; NAIR *et al.*, 2007).

Dentre alguns biopolímeros citados como matérias-primas para a produção de nanopartículas estão algumas proteínas, tais como a fibroína da seda, o colágeno, a gelatina, a albumina e a β -caseína, e também alguns polissacarídeos, como quitosana, alginato, pululana, heparina e amido (NITTA; NUMATA, 2013).

Os polissacarídeos são biocompatíveis, biodegradáveis e apresentam baixa imunogenicidade, e muitos de seus derivados, como as nanopartículas podem ser empregados na área médica, de alimentos e ambiental, podendo ser facilmente modificados física e quimicamente (SARAVANAKUMAR; JO; PARK, 2012, NITTA; KUMATA, 2013).

Dentre os polissacarídeos mais empregados para a produção de nanopartículas com aplicações na área farmacêutica estão a quitosana (RAJAM *et al.*, 2011, ZHAO *et al.*, 2011, KOUKARAS *et al.*, 2012, RAMPINO *et al.*, 2013) e o alginato (LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008; PAQUES *et al.*, 2014a), e a mistura destes dois biopolímeros (PAQUES *et al.*, (2014b).

Os amidos de diferentes fontes têm sido bastante estudados para a produção de nanopartículas, e dentre as suas principais vantagens estão o baixo custo,

quando comparado aos outros biopolímeros, e a sua elevada disponibilidade em todo o mundo. Além disso, o amido na sua estrutura granular nativa apresenta algumas limitações em relação às suas aplicações industriais, e dentre as modificações descritas na literatura mais recentemente está a obtenção de nanopartículas e nanocristais de amido que podem ter as mais variadas aplicações (Le CORRE; ANGELLIER-COUSSY, 2014).

3.2 NANOPARTÍCULAS DE AMIDO

Dois tipos de nanomateriais podem ser obtidos a partir dos amidos de diferentes fontes, as nanopartículas (NP), que serão produzidas neste trabalho, e os nanocristais (NC) (Le CORRE; ANGELLIER-COUSSY, 2014).

As nanopartículas de amido (NP) são descritas na literatura como partículas esféricas com tamanhos variáveis, na escala nanométrica, obtidas a partir do amido de diferentes fontes, com cristalinidade variável, podendo inclusive ser totalmente amorfas. Foram relatadas na literatura nanopartículas de amido menores que 50 nm (PARK *et al.*, 2016), entre 30–75 nm (QIN *et al.*, 2016), com médias de 96,9 nm (ZHOU *et al.*, 2014), entre 132–220 nm (HEIBEISH *et al.*, 2014), entre 249–720 nm (TANG *et al.*, 2009) ou entre 300–400 nm (CHIN *et al.*, 2011), empregando-se as mais diferentes técnicas de produção. Na área farmacêutica são consideradas nanopartículas qualquer material ou partícula coloidal que se encontre no intervalo nanométrico de 10 a 1000 nm (1 μm) (KREUTER, 2007; ZHOU *et al.*, 2014).

Diferente das NP de amido, os nanocristais de amido são estruturas cristalinas obtidas a partir da remoção das frações amorfas dos grânulos de amido, geralmente através do processo de hidrólise ácida. Na literatura são descritas estruturas com diferentes formatos, capacidades de agregação e tamanhos de partícula (entre 5 e 1000 nm), o que se explica em função das diferentes técnicas e fontes de amido empregados.

Para uma melhor compreensão dos processos de produção e modificação das propriedades das nanopartículas de amido em relação ao amido nativo, a seguir estão descritas a estrutura química e as propriedades do amido.

3.2.1 Estrutura Química do Amido

O amido é um homopolissacarídeo constituído de unidades de glicose, sintetizado em folhas de plantas superiores (DENYER; SMITH, 2003) e armazenado em amiloplastos de tubérculos, caules, raízes e sementes (SMITH, 2001, VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004, TESTER *et al.*, 2004). A conformação estrutural do amido permite o empacotamento das moléculas de glicose em estruturas muito densas, insolúveis em água fria e fisiologicamente inertes, denominados grânulos (HANNAH; JAMES, 2008). Estruturalmente, o amido é composto por cadeias de amilose e amilopectina. As proporções entre amilose e amilopectina diferem em relação às fontes botânicas de amido, variedades de uma mesma espécie e, em uma mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (ELIASSON, 2004, TESTER, 2004).

3.2.1.1 Amilose

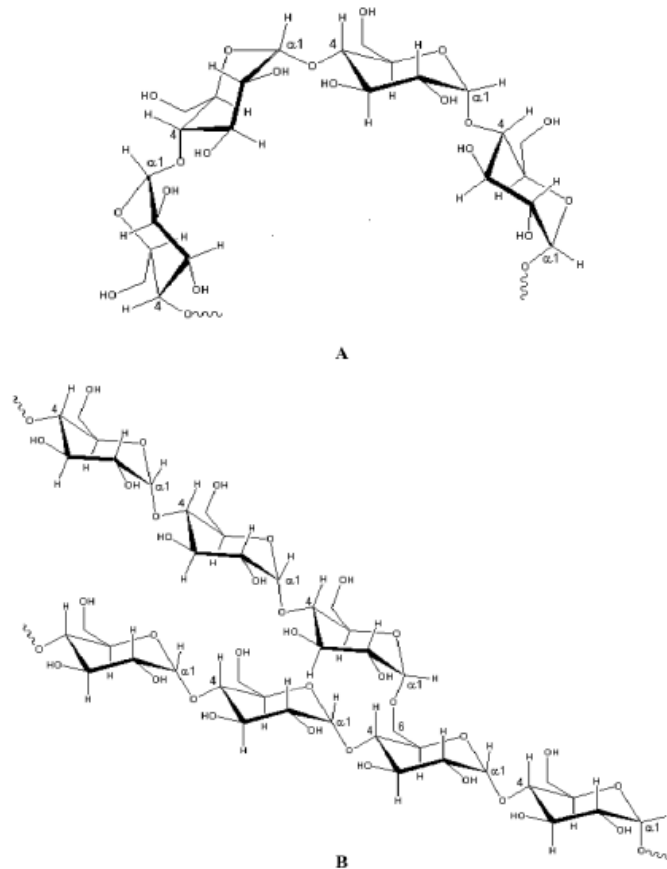
A amilose é constituída de unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas α -(1→4), sendo um polissacarídeo essencialmente linear (Figura 1A). O tamanho médio da cadeia de amilose é de aproximadamente 10^3 g.mol⁻¹ e as moléculas de amilose apresentam massa molecular da ordem de 250.000 Daltons (1500 unidades de glicose), que varia muito entre as espécies de plantas e, dentro da mesma espécie, dependendo do grau de maturação. Apesar de linear, as moléculas de amilose podem ter dez ou mais ramificações através de ligações glicosídicas α -(1→6) (entre 0,1% e 2,2%) (CURÁ *et al.*, 1995, BALL, 1996 *apud* OATES, 1997, OATES, 1997, BULEÓN *et al.*, 1998).

A amilose se acumula entre 15% – 25% na maioria dos grãos e em algumas espécies vegetais como trigo, cevada e milho, a amilose pode ainda estar presente em grande quantidade (50 a 80%) ou ausente (amidos cerosos ou *waxy*) em variedades de plantas geneticamente modificadas (ITOH *et al.*, 2003).

Muitas propriedades da amilose podem ser explicadas pela sua habilidade em formar diferentes estruturas moleculares; sua forma quase linear resulta na formação de hélices com interior hidrofóbico que podem carrear pequenas moléculas como ácidos orgânicos, alguns álcoois e iodo (ELIASSON, 1996, BULEÓN *et al.*, 1998, GÉRARD *et al.*, 2001, ELIASSON; 2004, TESTER, 2004, PÉREZ; BERTOFT, 2010).

Em soluções aquosas neutras, a estrutura helicoidal pode interagir com iodo formando complexo de inclusão com aproximadamente seis moléculas de amilose por giro. Além disso, a interação de moléculas de lipídeos nas regiões superficiais do grânulo leva à formação de complexos que podem inibir a degradação do amido por enzimas como fosforilase, α -amilase e β -amilase (ELIASSON, 1996, ELIASSON, 2004).

Figura 1 – Estrutura da amilose (A) e amilopectina (B).



Fonte: Adaptado de LAJOLO & MENEZES (2006).

3.2.1.2 Amilopectina

A amilopectina é o componente ramificado do amido e é formada por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4) na cadeia principal e aproximadamente 5% de ligações α -(1 \rightarrow 6) nas ramificações, que são formadas por 20 à 30 unidades de glicose (Figura 1B) (GÉRARD *et al.*, 2001; PÉREZ; BERTOFT, 2010). A massa molecular da amilopectina varia entre 50 e 500 x 10⁶

Daltons (BULÉON *et al.*, 1998, GÉRARD *et al.*, 2001, VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004, LAJOLO; MENEZES, 2011, PÉREZ; BERTOFT, 2010).

A amilopectina é degradada pela ação de β -amilases nas ligações α -(1 \rightarrow 4) formando as dextrinas β -limite e, posteriormente, as enzimas pululanase e isoamilase atuam nas ligações α -(1 \rightarrow 6) e produzem maltose (BULEÓN *et al.*, 1998, LAJOLO; MENEZES, 2006). Estudos propõem a existência de um terceiro componente no amido de milho normal, chamado de material intermediário (MI), com propriedades diferentes da amilose e da amilopectina (LANSKY *et al.* (1949) *apud* ELIASSON (2004)). A presença de um grande número de cadeias ramificadas curtas nesse componente confere características como menor cristalinidade granular, temperatura de gelatinização, viscosidade e grau de retrogradação e o maior digestibilidade pelas enzimas que promovem a hidrólise enzimática. Por outro lado, moléculas ramificadas que apresentam cadeias longas e poucas ramificações podem contribuir para a maior cristalinidade, temperatura de gelatinização, grau de retrogradação, viscosidade e firmeza de gel (VANDEPUTTE *et al.*, 2003a). Com base em estudos de afinidade por iodo, observou-se que 5 a 7 % do amido de milho consiste de material intermediário entre as frações estritamente lineares e altamente ramificadas (ELIASSON, 2004).

Porém, devido às dificuldades no isolamento e purificação do material intermediário e na caracterização precisa das cadeias de amilose e amilopectina, o conceito de material intermediário não pode ser definido e a classificação é feita pelo grau de ramificação e peso molecular (ELIASSON, 1996).

3.2.2 Estrutura Granular do Amido

O amido encontra-se nas plantas sob a forma de grânulos. As características dos grânulos como forma (redondo, oval, poliédrico), tamanho de partícula (2 a 100 μ m) e distribuição de tamanho da partícula (unimodal, bimodal, trimodal) variam conforme a sua origem botânica (VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004; TESTER *et al.*, 2004).

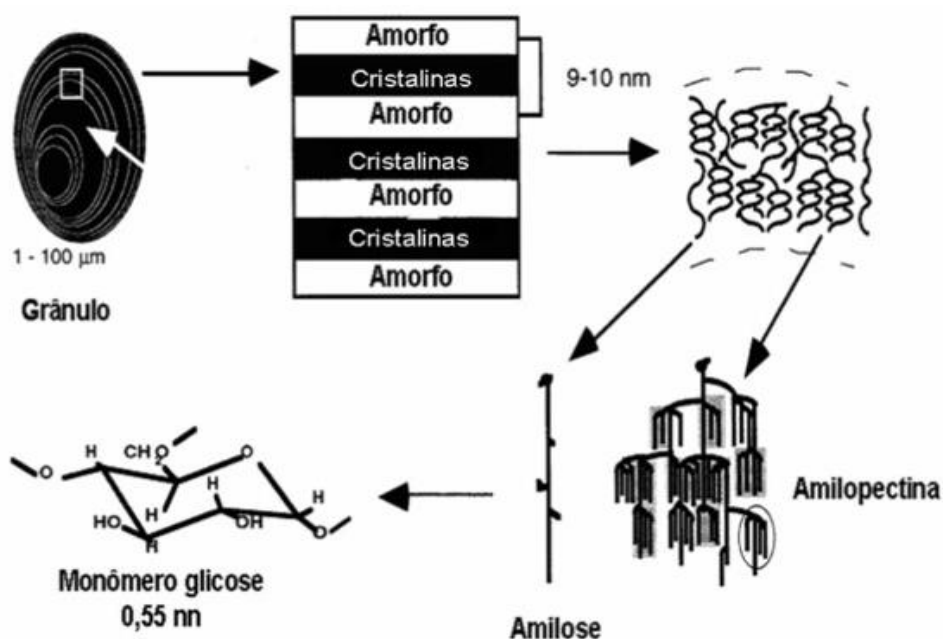
Quanto à distribuição de tamanho de partícula, a maioria dos cereais apresenta distribuição bimodal de grânulos grandes (10 a 35 μ m) e lenticulares denominados grânulos A e grânulos pequenos (1 a 10 μ m) e esféricos denominados grânulos B (ELIASSON, 1996, ELIASSON, 2004, TESTER *et al.*, 2004).

A superfície dos grânulos é plana e apresenta algumas estrias e fissuras visíveis através de microscopia eletrônica de varredura (OATES, 1997, BULEÓN *et al.*, 1998). Devido ao empacotamento denso das cadeias de amilopectina, o grânulo de amido é relativamente impermeável à moléculas grandes como amilases e enzimas hidrolíticas. A permeabilidade dos grânulos de amido à água e pequenas moléculas solúveis é devido à expansão reversível das regiões amorfas que forma uma fase contínua de gel (FRENCH, 19734, ELIASSON, 2004).

O amido e a sua organização na forma de grânulos vêm sendo estudados há muito tempo. Os amidos nativos apresentam entre 15 e 45% de cristalinidade, se apresentando na forma de grânulos (2 a 100 μm) onde as cadeias de amilose e amilopectina se organizam de forma concêntrica, com regiões amorfas (menos organizadas) e cristalinas (mais organizadas) alternadas (Figura 2) (BULEON *et al.*, 1998).

A região cristalina (lamela cristalina) é constituída pelas cadeias laterais da amilopectina, enquanto os pontos de ramificação e as cadeias de amilose são os principais componentes da região amorfa (lamela amorfa). A cristalinidade dos grânulos é descrita principalmente em função das duplas hélices formadas pelas ramificações da amilopectina. As áreas cristalinas do amido mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na água, tornando-o relativamente resistente ao ataque enzimático e químico (ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008). Estudos mais recentes mostraram evidências de que a largura das duas lamelas juntas seria de 9 a 10 nm, e que as unidades repetitivas dessas duas regiões formariam os “blocklets”, ou seja, unidades cristalinas que, embebidas em material amorfo, formariam os grânulos de amido (CORDENUNSI, 2006).

Figura 2 – Esquema das regiões amorfas e cristalinas de um grânulo de amido.



Fonte: Adaptado de BULÉON *et al.*, 1998.

Atualmente, diversos estudos sobre relação entre a estrutura molecular do amido e suas propriedades físico-químicas sugerem que as características estruturais, como teor de amilose, comprimento das cadeias de amilopectina e grau de cristalinidade no grânulo, podem influenciar nos eventos associados à gelatinização e retrogradação. Os grânulos são compostos de regiões cristalinas e amorfas, dispostas alternadamente, que apresentam uma espessura entre 120–400 nm, denominadas anéis de crescimento (Figura 2) (PÉREZ; BERTOFT, 2010; VAMADEVAN, 2013).

Os anéis de crescimento são visíveis por microscopia óptica em grânulos grandes como batata e trigo, mas raramente são visíveis em grânulos pequenos como cevada e arroz. O desenvolvimento dos anéis inicia-se no centro (*hilum*) que contém grande proporção de terminais redutores e é geralmente menos organizado que o restante do grânulo. Os terminais não redutores da amilose e amilopectina irradiam para a superfície, permitindo a adição de mais resíduos de glicose para aumentar as cadeias de amilopectina durante a formação dos grânulos (BAKER *et al.*, 2001).

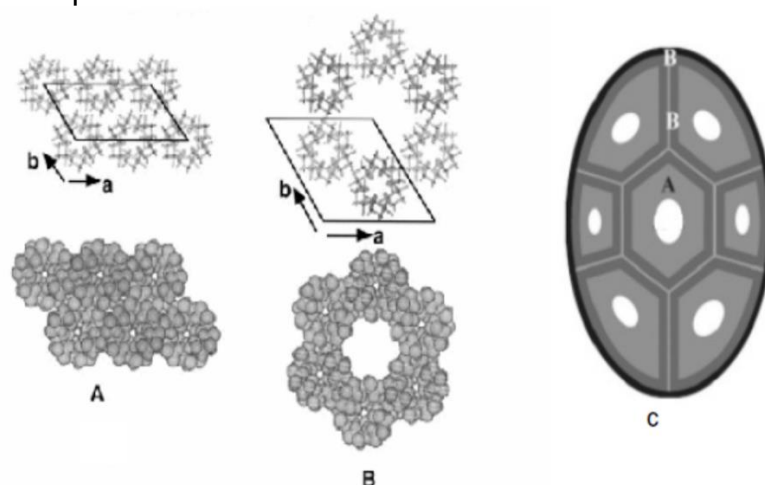
Os estudos dos grânulos em nível molecular utilizando raios-X indicaram a presença de lamelas cristalinas e amorfas periódicas (9–10 nm) que definem padrões de cristalinidade dos amidos (A, B e C) (PÉREZ; BERTOFT, 2010). A

diferença entre os amidos tipo-A e tipo-B deve-se pelo empacotamento das duplas hélices com diferentes configurações (IMBERTY; PÉREZ, 1988; IMBERTY *et al.*, 1987).

A cristalinidade tipo A ocorre na maioria dos cereais (milho, arroz, trigo, aveia) e é descrita como uma unidade celular monocíclica altamente condensada e cristalina, em que doze resíduos de glicose de duas cadeias no sentido anti-horário abrigam quatro moléculas de água entre as hélices. A estrutura de padrão tipo B presente em tubérculos, arroz com alto teor de amilose e amido retrogradado, é composta por uma unidade básica de cadeias empacotadas em um arranjo hexagonal, onde a unidade celular tem duas duplas hélices no sentido anti-horário, alinhadas e arranjadas em paralelo. Essa estrutura contém 36 moléculas de água (27%) para cada doze resíduos de glicose (Figura 3). A metade dessa água é fortemente ligada às duplas hélices, e a outra metade é concentrada em um eixo em parafuso (OATES, 1997; ELIASSON, 2004).

Certas raízes e sementes (ervilha lisa e fava) apresentam uma estrutura intermediária entre os modelos A e B, a qual é denominada de padrão C (ELIASSON, 1996; ELIASSON, 2004). O padrão de difração de raios-X do tipo-C revela uma combinação entre os tipo-A e tipo-B (CAI *et al.*, 2014).

Figura 3 – Representação esquemática da organização das duplas hélices da amilopectina na formação estrutural dos amidos tipo A e tipo B. Representação esquemática da disposição das frações tipo A (no centro) e tipo B (na região periférica) na formação dos grânulos de amido tipo C.



Em geral, a maioria dos cereais apresenta um padrão de difração de raios-X tipo A; alguns tubérculos, como batata e inhame, rizomas, como mandioca, e cereais com elevado conteúdo de amilose apresentam um padrão tipo-B e as leguminosas geralmente apresentam um padrão tipo C (PARKER; RING, 2001; PÉREZ; BERTOFT, 2010).

Estudos mostraram que durante a formação dos grânulos tipo-C dentro do amiloplasto ocorre a formação de subgrânulos (Figura 3); primeiro, são sintetizados pequenos grânulos tipo-A no centro do amiloplasto. Na sequência subgrânulos tipo-B vão aumentando de tamanho nas regiões periféricas e todos os subgrânulos aumentam de tamanho até preencher os espaços dos amiloplastos e formar os grânulos tipo-C (WEI *et al.*, 2010).

Os amidos com cristalinidade do tipo B são menos susceptíveis à hidrólise química e enzimática quando comparados aos do tipo A devido às cascas protetoras (blocos cristalinos) em sua estrutura que promovem ação protetora (OATES, 1997). Além disso, a presença de poros superficiais nos amidos com cristalinidade do tipo A facilita a ação das enzimas (LI, 2004).

3.2.2.1 Propriedades físico-químicas do amido

3.2.2.1.1 Gelatinização

O grânulo de amido, em contato com a água fria, apresenta ligeiro intumescimento (10 a 20%) pela difusão e absorção de água nas regiões amorfas; esse processo é reversível pela secagem (WHO/FAO, 1998). Quando os grânulos de amido são aquecidos em excesso de água perdem a organização estrutural (birrefringência) e os cristais fundem-se em função do rompimento das ligações de hidrogênio que mantêm a estrutura granular nativa; assim, os grânulos intumescem irreversivelmente num fenômeno denominado gelatinização. Sabe-se que a gelatinização tem início no *hilum* e se expande rapidamente para a periferia, ocorrendo inicialmente nas regiões amorfas devido à fragilidade das ligações de hidrogênio nessas áreas, ao contrário do que ocorre nas regiões cristalinas (SINGH *et al.*, 2003). À medida em que os grânulos se expandem, ocorre a lixiviação da amilose da fase intergranular para a fase aquosa, resultando no aumento substancial das propriedades reológicas do sistema. Portanto, o conjunto de

mudanças que envolvem a ruptura da estrutura granular, o intumescimento, a hidratação e a solubilização das moléculas de amido é definido como gelatinização (THARANATHAN, 2002).

A gelatinização geralmente ocorre numa ampla faixa de temperatura, variando conforme a fonte de amido (ELIASSON, 1996; SINGH *et al.*, 2003). As propriedades de intumescimento e gelatinização são controladas, em parte, pela estrutura molecular da amilopectina (comprimento de cadeia, extensão de ramificação, massa molecular), composição do amido (proporção amilose:amilopectina e teor de fósforo) e arquitetura granular (proporção de regiões cristalinas e amorfas). Geralmente, altas temperaturas de gelatinização têm sido associadas a maior cristalinidade, que fornece estabilidade estrutural e torna os grânulos mais resistentes à gelatinização (SINGH *et al.*, 2003).

A gelatinização pode ser avaliada por métodos como difração de raios-X, microscopia com luz polarizada, calorimetria diferencial de varredura, viscosímetro e viscoamilógrafos (SINGH *et al.*, 2003; ELIASSON, 2004).

3.2.2.1.2 Retrogradação

Quando é armazenado e resfriado, o amido gelatinizado pode sofrer um fenômeno denominado de retrogradação, fenômeno que envolve a reassociação entre as cadeias de amido num estado mais ordenado. Esse processo leva à formação de simples e duplas hélices, características das áreas cristalinas. Como a área cristalizada altera o índice de refração, o gel vai se tornando mais opaco à medida que a retrogradação se processa (ELIASSON, 1996).

A amilose exsudada dos grânulos intumescidos forma uma rede por meio da associação com cadeias que rodeiam os grânulos gelatinizados. Como consequência, a viscosidade da pasta aumenta, convertendo-se num sistema viscoelástico turvo, ou em concentrações de amido suficientemente altas (>6% p/p) se forma um gel elástico opaco em que, às vezes, ocorre precipitação de cristais insolúveis de amido levando à separação de fases. A forte interação das cadeias entre si promove a saída da água do sistema, sendo essa expulsão chamada de sinerese (LAJOLO; MENEZES, 2011).

As características de retrogradação da amilose e da amilopectina são cineticamente diferentes. A amilose retrograda mais rapidamente devido à formação

de ligações de hidrogênio com outras moléculas de amilose adjacentes, resultando em estruturas cristalinas de duplas hélices quando a pasta esfria. A amilose apresenta endoterma de fusão de 140°C a 180°C e a presença de ácidos graxos livres ou lipídios favorece a formação de complexos de inclusão. Já a amilopectina retrograda lentamente, sua endoterma de fusão é inferior, aproximadamente, 45°C a 60°C (WU & SARKO, 1978; PARKER & RING, 2001; THARANATHAN, 2002).

A retrogradação é um fenômeno complexo que varia de acordo com os fatores temperatura, tempo de armazenamento, pH, fonte de amido, presença de outros componentes (lipídios, eletrólitos e açúcares) e condições de processamento (ELIASSON, 1996; THARANATHAN, 2002; ELIASSON, 2004).

Alguns estudos têm mostrado que, como ocorre na gelatinização, dependendo do grau de polimerização (GP) as cadeias de amilopectina podem favorecer (GP = 12–22) ou inibir (GP = 6–9; GP > 25) a retrogradação da amilopectina devido à maior ou menor formação de duplas hélices durante a retrogradação (VANDEPUTTE & DELCOUR, 2004).

Porém, outros estudos devem ser realizados para avaliar a influência exata da amilose na retrogradação. É possível sugerir que a fração amilose apresenta um efeito sinérgico na retrogradação da amilopectina, atuando como um núcleo de recristalização no caso de baixos conteúdos de amilopectina (VANDEPUTTE *et al.*, 2003c).

3.3 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO

À partir da estrutura do amido, é possível obter-se nanopartículas através de métodos químicos, enzimáticos e físicos, ou da combinação entre eles. Dentre os métodos químicos descritos na literatura estão a hidrólise ácida (KIM *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2015) e a nanoprecipitação (TANG *et al.*, 2009; CHIN *et al.*, 2011; TEODORO *et al.*, 2015). Kim e Lim (2008) descreveram a produção de NP de amido empregando-se α -amilases e Kim e Lim (2009) relataram a produção de NP de amido através da complexação com n-butanol seguida de hidrólise enzimática com α -amilases.

Atualmente, não existem muitos estudos descrevendo a produção de nanopartículas de amido a partir de métodos físicos. Alguns métodos como homogeneização a alta pressão (LIU *et al.*, 2009) e extrusão reativa seguida de

moagem (GIEZEN *et al.*, 2000; WILDI *et al.*, 2011; SONG *et al.*, 2011) foram estudados. Bel Haaj *et al.* (2013) relatou o emprego da ultrassonicação sem o emprego de nenhum reagente químico como uma alternativa menos poluente para a obtenção de NP de amido. Kim *et al.* (2012) relataram a combinação da hidrólise ácida e da ultrassonicação para a obtenção de NP de amido, com a vantagem de diminuir a agregação das NP obtidas.

A origem botânica do amido, ou seja, o tipo de cristalinidade e a proporção relativa de amilose e amilopectina, determinam a estrutura e a morfologia das NP de amido resultantes (GÉRARD *et al.*, 2002; HOOVER, 2000; JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; JAYAKODY; LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011, 2012b; MIAO *et al.*, 2011; WANG; COPELAND, 2013).

De acordo com Kim *et al.* (2012; 2015), a hidrólise ácida tem sido a técnica mais relatada para o preparo de NC e NP de amido, pela facilidade de execução e controle do processo. Kim *et al.* (2012) obtiveram NP de amido (40 – 70 nm) utilizando amidos de diferentes fontes botânicas, relatando que a hidrólise se dá primeiramente nas regiões amorfas, e em seguida nas regiões cristalinas por erosão dos grânulos de amido e que, dependendo do padrão de cristalinidade do amido nativo, haverá uma maior ou menor susceptibilidade à hidrólise, gerando desde materiais amorfos, até materiais mais cristalinos. Resultados de difração de raios-X revelaram que os amidos tipo-A foram mais resistentes à hidrólise ácida que os amidos tipo-B. Além disso, as análises de DSC demonstraram que os cristais remanescentes das partículas tipo-B foram rapidamente rompidos na presença de água e ausência de pico endotérmico de fusão. Observou-se também que os rendimentos de produção foram baixos, que foram gerados efluentes das lavagens e os materiais obtidos tiveram uma grande tendência de formar agregados.

Uma das alternativas relatadas na literatura é a ultrassonicação, que apresenta algumas vantagens em comparação com a hidrólise ácida comum, tais como maior rapidez e facilidade de implementação, sem a necessidade de realizar repetidos tratamentos de lavagem porque não é utilizado nenhum reagente químico, no entanto, o uso da ultrassonicação resulta em uma alteração da estrutura cristalina no amido, gerando NP com uma baixa cristalinidade ou uma estrutura amorfa (BEL HAAJ *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2015).

3.3.1 Produção de Nanopartículas de Amido por Ultrassonicação

Ultrassonicação é uma técnica que tem sido relatada no preparo de nanomateriais, podendo ser branda quando realizada em um banho de ultrassom, ou severa, quando realizada em um processador ultrassônico (sonda ultrassônica), que opera geralmente com frequência de 20kHz e potência de 500 a 750 W (KORN *et al.*, 2005).

Na ultrassonicação, as partículas são formadas por ondas ultrassônicas gerando cavitação em líquidos, isto é, quando líquidos são submetidos às ondas ultrassônicas de alta potência, estas produzem intensas e sucessivas ondas de compressão e rarefação no meio, no qual, a depender da viscosidade, pode ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas durante uma fase de rarefação. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e rarefação as dimensões da cavidade vão aumentando, até que seja atingido um diâmetro crítico, quando esta finalmente sofre colapso, adicionalmente, essas ondas mecânicas, ao interagirem com a superfície de sólidos, levam a alterações significativas na morfologia da superfície de sólidos. Caso os ultrassons sejam aplicados em líquidos contendo material particulado em suspensão, as cavidades deixam de ser simétricas de forma que, quando de seu colapso, os microjatos são direcionados para o sólido (KORN *et al.*, 2005).

Durante o colapso cavitacional ocorre um forte aquecimento nas bolhas de cerca de 5000K, pressões de aproximadamente 500 atm e tempos de vida de alguns microssegundos (SUSLICK, 1990); nesse processo ocorre quebra de ligações moleculares C–C e formação de radicais com cadeias longas. A sonicação apesar de ser um processo físico pode gerar efeitos químicos através da geração de espécies reativas. A sonólise da água resulta na produção direta dos radicais livres (H• e OH•) através da hidrólise das ligações H–O e produção de peróxido de hidrogênio (KORN; ANDRADE; BORGES, 2002).

O uso de ultrassom é amplamente empregado para melhorar processos de extração e pode ser usado na separação de amido e proteínas (ADAM *et al.*, 2012; CHEMAT; ZILL–E–HUMA; KHAN, 2011; CRAVOTTO *et al.*, 2008; DA PORTO; PORRETTO; DECORTI, 2013; FENG; BARBOSA–CÁNOVAS; WEISS, 2011;

GOULA, 2013; MASON; PANIWNKY; LORIMER, 1996; PATIST; BATES, 2008; VEILLET; TOMAO; CHEMAT, 2010; ZENKER; HEINZ; KNORR, 2003).

O tratamento ultrassônico é um método ecologicamente correto utilizado em modificações químicas de polímeros (ALIYU, HEPHER, 2000; BAXTER; ZIVANOVIC; WEISS, 2005), inativação de microrganismos (CAMERON, MCMASTER, BRITZ, 2008) e ruptura de membranas fosfolipídicas (ANDRADE *et al.*, 2004; LIMA; ANDRADE, 2000).

O tratamento ultrassônico na indústria de alimentos é amplamente utilizado para emulsificação, homogeneização, cristalização (formação de pequenos cristais de gelo no congelamento), filtração, separação, alteração de viscosidade, inativação enzimática e de bactérias através da ruptura da membrana celular (MASON, 1998). Estudos realizados demonstraram que a ultrassonicação de alimentos prévia à secagem é um método eficiente para aumentar a cinética do transporte de massa e consequentemente, a eficiência no processo de secagem, especialmente em sistemas sólido-líquido (MULET *et al.*, 2003).

Ainda são restritas as pesquisas sobre o efeito do ultrassom como modificação em amidos. No entanto, estudos comprovaram que o ultrassom promove a degradação de polímeros (ALIYU; HEPHER, 2000; CZECHOWSKABISKUP *et al.*, 2005), o aumento de temperatura durante a modificação (JAMBRAK *et al.*, 2010), fissuras e rupturas nos grânulos de amido (ZUO *et al.*, 2012), formação de nanopartículas (BEL HAAJ *et al.*, 2013), redução da viscosidade de géis (CHENG *et al.*, 2010; IIDA *et al.*, 2008; JAMBRAK *et al.*, 2010), fragmentação dos grânulos associado a outros tratamentos, como hidrólise enzimática (KIM; PARK; LIM, 2008; WU *et al.*, 2011), entre outros efeitos.

O efeito de ultrassom no amido depende de vários parâmetros como potência, frequência, tempo e temperatura do tratamento e das propriedades de dispersão do amido (concentração de sólidos e origem botânica) (ZUO *et al.*, 2009). A massa molar das moléculas de amido influencia significativamente em muitas das suas propriedades como absorção de água e solubilidade. A ultrassonicação tem sido aplicada na desagregação de moléculas de amido retrogradadas (SEGUCHI, HIGASA, MORI, 1994), na hidrólise de grânulos gelatinizados (CHUNG, MOON, KIM, CHUN, 2002) e na diminuição da viscosidade (IIDA, TUZIUTI, YASUI, TOWATA, KOZUKA, 2008).

Recentemente, a ultrassonicação em suspensões de amido foi utilizada como uma técnica de produção de NP de amido (BEL HAAJ *et al.*, 2013). Neste estudo, uma suspensão aquosa de amido de milho ceroso 1,5% foi submetida ao banho de ultrassom à 8 °C por 75 min. Com base nas observações de microscopia eletrônica de varredura, os autores afirmaram que a colisão mecânica somada à alta força de cisalhamento provocou uma erosão progressiva na superfície das partículas de amido que se fragmentaram até um tamanho limite de 30–100 nm. Foi a primeira abordagem para a produção de nanopartículas de amido utilizando o método físico de ultrassom de alta intensidade; comparado à hidrólise ácida, este processo oferece vantagens de ser rápido e fácil, sem a necessidade de realizar lavagens sucessivas pois nenhum reagente químico é utilizado, no entanto, nas condições empregadas no método, a cristalinidade do amido foi gravemente prejudicada devido ao dano mecânico provocado pelo ultrassom de alta potência.

O tratamento ultrassônico afeta a estrutura supramolecular do grânulo de amido, especialmente a região cristalina, formando cavidades e poros que facilitam a difusão da água (ZHU *et al.*, 2012). Foram realizados estudos avaliando o efeito dos tratamentos ultrassônicos mais brandos sobre a produção de NP de amido de milho ceroso obtidas por hidrólise ácida. No primeiro estudo (KIM *et al.*, 2012), concluiu-se que uma leve ultrassonicação uma vez por dia durante o processo de hidrólise ácida aumentou o rendimento na produção de nanopartículas (<100 nm) e a cristalinidade do grânulo. Em outro estudo (KIM *et al.*, 2012), foi avaliado o efeito do tratamento ultrassônico após a hidrólise ácida em baixa temperatura (4°C) por 6 dias sobre o rendimento, a morfologia e a cristalinidade do amido. Os resultados apresentaram um aumento no rendimento de 80% na produção de nanopartículas e boa cristalinidade dos grânulos.

Alguns componentes presentes em pequenas quantidades nos grânulos de amido, como proteínas e lipídeos, podem afetar a sua funcionalidade. Os resíduos da proteína são fortemente ligados aos grânulos e podem prejudicar a hidrólise enzimática do amido. Em um estudo realizado, o tratamento ultrassônico (parâmetros não especificados) reduziu o teor de proteína do feijão mungo e do amido de milho, o que favorece a hidrólise enzimática do amido (CHAN *et al.*, 2010). A influência do ultrassom em outras moléculas menores (por exemplo, de lipídios) ainda não foi estudada (SRI CHUWONG & JANE, 2007). Foi observado também que o tratamento ultrassônico aumentou o teor de amilose no amido de milho, batata,

feijão mungo e sagu (quantificado por espectrofotometria de ligação de iodo), sugerindo que a cisão molecular das cadeias pelo ultrassom contribui para o aumento dos fragmentos lineares (CHAN *et al.*, 2010).

3.4 EFEITO DA ULTRASSONICAÇÃO NA ESTRUTURA FÍSICA DOS GRÂNULOS DE AMIDO

3.4.1 Morfologia

A morfologia dos grânulos de amido submetidos à ultrassonicação foi avaliada por diversas técnicas incluindo microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, e técnica de espalhamento de luz laser para avaliar a distribuição de tamanho dos grânulos. Foi observado que a ultrassonicação levou à formação de fissuras e poros, causando danos aos grânulos de amido de diferentes fontes botânicas, tanto os amidos de cristalinidade do tipo A (trigo e arroz) (SUJKA & JAMROZ, 2013) quanto do tipo B (batata) (GALLANT *et al.*, 1972). Os fatores relacionados ao efeito do ultrassom na morfologia dos grânulos incluem o tipo e a composição de amido (CHAN *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2008; SUJKA & JAMROZ, 2013), a concentração de amido no meio, (GALLANT *et al.*, 1972) o tipo de gás da atmosfera (GRAUS *et al.*, 1974; GALLANT *et al.*, 1972), a temperatura do sistema, os parâmetros de ultrassom, tais como a frequência (ZHENG *et al.*, 2013; ZUO *et al.*, 2009), a potência (JAMBRAK *et al.*, 2010; ZUO *et al.*, 2012), e a duração do tratamento (HUANG *et al.*, 2007; ZUO *et al.*, 2009) .

A suscetibilidade do amido ao tratamento ultrassônico tem sido relacionada com o tipo e a estrutura do grânulo amido e a sua concentração na suspensão. Por exemplo, nas mesmas condições, fissuras e depressões na superfície dos grânulos induzido pelo ultrassom foram mais profundas para os amidos de batata e trigo do que para os de milho e arroz (SUJKA & JAMROZ, 2013); da mesma forma, os amidos de milho normais e cerosos tornaram-se porosos, enquanto o amido com teor de 50% amilose apresentou fissuras (LUO *et al.*, 2008). Foi observado que a morfologia do amido é influenciada pelas condições e os parâmetros da ultrassonicação (frequência, potência, sonda, banho, tempo do tratamento). Por exemplo, o ultrassom com dupla frequência (25 kHz e 80 kHz) produziu mais

cavidades e poros nos grânulos do que o ultrassom de frequência única (25 kHz ou 80 kHz) (ZHENG *et al.*, 2013). O aumento na concentração do amido diminuiu os danos causados pelo ultrassom (GALLANT *et al.*, 1972). A variação no banho e na sonda do ultrassom também apresentou diferentes resultados para o mesmo amido e o aumento da potência aumenta a tendência dos grânulos aglomerarem-se (JAMBRAK *et al.*, 2010). Na ultrassonicação os grânulos sofrem influência do tipo de gás atmosférico presente (DEGROIS *et al.*, 1974; GALLANT *et al.*, 1972); a atmosfera de hidrogênio causou o maior dano para grânulos, seguido de ar, oxigênio, dióxido de carbono e vácuo (GALLANT *et al.*, 1972).

3.4.2 Polimorfismo e Cristalinidade dos Grânulos de Amidos

Sabe-se que o tratamento ultrassônico influencia a cristalinidade dos grânulos de amido em várias extensões, dependendo das condições experimentais e do tipo de amido (HUANG *et al.*, 2007; LUO *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2012).

Análises realizadas por difração de raios-X demonstraram que a ultrassonicação tem pouco efeito sobre o polimorfismo de amido de milho (tipo A) (HUANG *et al.*, 2007), amido de batata (tipo B) (ZHU *et al.*, 2012), e amidos de milho com diferentes teores de amilose (0–50 %) (tipo A e tipo B) (LUO *et al.*, 2008). Entretanto, a cristalinidade dos grânulos pode aumentar ou diminuir dependendo das condições do tratamento ultrassônico (HUANG *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2013.); o amido 30% submetido à ultrassonicação a 500 W por até 3 minutos aumentou o grau de cristalinidade, porém após 15 min, diminuiu (HUANG *et al.*, 2007). Uma explicação para esse efeito é de que ocorra uma ruptura das partes amorfas na etapa inicial do tratamento e posteriormente, induza à erosão dos cristais nos grânulos (HUANG *et al.*, 2007).

A análise por espectrofotometria no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) mostrou que a ultrassonicação causa danos a estrutura cristalina de amido de batata doce, mas não afeta os grupos químicos funcionais; além disso, a frequência dupla (25 kHz e 80 kHz) teve um efeito mais forte do que a frequência única (25 kHz ou 80 kHz) (ZHENG *et al.*, 2013). Amidos com quantidade mais elevada de amilose demonstraram ser mais sensíveis na estrutura e nas propriedades quando submetidos ao ultrassom (LUO *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2012).

3.5 EFEITO DA ULTRASSONICAÇÃO NA ESTRUTURA MOLECULAR DOS GRÂNULOS DE AMIDO

Diversos procedimentos estudados demonstraram que a ultrassonicação pode causar cisão molecular das cadeias de amido ou ter pouca influência sobre ela dependendo dos parâmetros estabelecidos no experimento (IIDA *et al.*, 2008; ISONO *et al.*, 1994; SEGUCHI *et al.*, 1994; ZHENG *et al.*, 2013).

O trabalho pioneiro realizado por Szent-Györgyi (1933) mostrou que a ultrassonicação alterou a cor do complexo amido-iodo de azul para vermelho, sugerindo a cisão da cadeia. Isto foi confirmado em estudos posteriores em que os amidos de batata, trigo, milho e arroz foram submetidos ao ultrassom e perderam sua capacidade de formar complexo com iodo, sugerindo a degradação molecular das cadeias de amido (SUJKA & JAMROZ, 2013). A ultrassonicação com dupla frequência (25 kHz e 80 kHz) mudou o espectro de absorção do complexo amido-iodo mais dramaticamente do que a frequência única (25 kHz ou 80 kHz) (ZHENG *et al.*, 2013).

A estrutura molecular das cadeias de amido tratadas por ultrassom tem sido estudada por técnicas mais precisas como a cromatografia (CHUNG *et al.*, 2002; IIDA *et al.*, 2008; ISONO *et al.*, 1994; SEGUCHI *et al.*, 1994; ZUO *et al.*, 2009). As dextrinas apresentaram tamanho molecular menor (análise em cromatografia) (IIDA *et al.*, 2008; ISONO *et al.*, 1994; SEGUCHI *et al.*, 1994) e aumentaram a ruptura das cadeias (quantificadas pelas alterações no peso molecular) (CZECHOWSKA-BISKUP *et al.*, 2005). Quando a massa molecular das dextrinas do amido tornou-se mais perto do limítrofe (por exemplo, limite para o amido de arroz de $1,1 \times 10^4$ (massa molecular utilizando pululana como padrão), a ultrassonicação tornou-se menos eficaz (ISONO *et al.*, 1994).

O processo de degradação do amido pode ser atribuído à cavitação que localmente cria alta pressão, a temperatura muito elevada e a força de cisalhamento que pode quebrar as cadeias de amido. Além disso, os radicais livres gerados pela quebra das moléculas de água podem causar a cisão de cadeias, como mostrado por Czechowska-Biskup *et al.* (2005) e Kardos & Luche (2001).

Outros estudos demonstraram que o ultrassom teve pouco efeito sobre o tamanho molecular das cadeias de amidos de diversas fontes (feijão mungo, batata e arroz) (CHUNG *et al.*, 2002; JACKSON *et al.*, 1988; ZUO *et al.*, 2009). Portanto, é

importante definir os parâmetros e as condições experimentais corretos para evitar qualquer tipo de degradação dos grânulos de amido pela ultrassonicação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Neste estudo foram utilizados amido de milho comercial da marca Maizena[®], (teor de amilose: 23 ± 1 %), amido de mandioca comercial da marca Yoki[®] (teor de amilose: 18 ± 2 %) e amido de inhame (teor de amilose: 30 ± 3 %) extraído no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina conforme metodologia descrita por Cereda *et al.* (2003).

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico (PA).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Extração do amido de inhame

O amido de inhame foi extraído conforme metodologia descrita por Cereda *et al.* (2003). O inhame (*Dioscorea alata*) obtido no mercado local foi pesado, descascado, lavado e triturado em liquidificador com solução de 10 % de oxalato de amônia/ácido oxálico (1:1); em seguida o material foi peneirado em tamis de 100 mesh. A suspensão de amido foi lavada com solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e mantida em repouso nesta solução durante 24 h. Após esse período, a suspensão foi lavada com água destilada e mantida em estufa de circulação de ar ($35 \text{ }^\circ\text{C} / 24 \text{ h}$) para secagem. O amido seco foi submetido ao moinho para obtenção de pó fino.

4.2.2 Obtenção de Nanopartículas de Amido por Ultrassonicação

Para a produção das nanopartículas, foram preparadas suspensões dos três tipos de amido em água (10 % m/v), que foram submetidas por 30 min ao processo de ultrassonicação em ultrassonicador Fisher Scientific modelo 505 (Pittsburgh, PA – USA), com potência de 500 W, empregando-se ponteira Fisher Scientific modelo FB 4219 com 1,27 cm de diâmetro. Durante esse processo a temperatura dos materiais foi controlada ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) utilizando banho de gelo e a amplitude de vibração mantida em 40 %.

Após o procedimento, as suspensões ficaram em repouso por 1 h para a decantação das partículas maiores. O material decantado foi denominado corpo de fundo (CF) e a fase líquida contendo as partículas menores em suspensão foi denominada nanopartícula (NP).

As amostras dos corpos de fundos (CFs) e das nanopartículas (NPs) foram transferidas para placas de Petri e mantidas em estufa de circulação de ar (35 °C/ 48 h) para secagem. Após a secagem, os materiais foram armazenados em frascos de vidro com tampa e sob temperatura ambiente até o momento das análises. As amostras de NPs empregadas para as análises de microscopia foram mantidas em meio líquido, sob temperatura de refrigeração (10 °C) para evitar aglomeração.

4.2.3 Caracterização das Nanopartículas de Amido obtidas por Ultrassonicação

A fim de caracterizar a estrutura e a morfologia das nanopartículas de amido foram realizadas as seguintes análises: microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, análise termogravimétrica, difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Os corpos de fundo e os amidos nativos também foram caracterizados para comparação com as NPs.

4.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de MEV foram realizadas em microscópio Philips–FEI Quanta 200 (Oregon – EUA) do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram colocadas sobre os suportes e em seguida foram secas em estufa de circulação de ar (Marconi MA 035, Piracicaba–SP) a 60°C por 3 h. Após esse período, as amostras foram recobertas por uma fina camada de ouro e foi empregada uma voltagem de aceleração de 20 kV.

O tamanho das partículas foi determinado pelo programa de análise de imagem ImageJ 1.37v®, de domínio público.

4.2.3.2 Microscopia de força atômica (AFM)

As análises por microscopia de força atômica foram realizadas em microscópio de Força Atômica NanoSurf FlexAFM (Liestal–Suíça) no Laboratório de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina. As análises foram conduzidas em ar e as imagens obtidas em modo contato intermitente, utilizando agulhas de silício (Tap150Al–G). A varredura foi feita na frequência de oscilação livre da haste e com diferentes amplitudes, dependendo da estabilidade e do contraste obtido. O *set point* foi fixado em 30–50 % da amplitude de oscilação livre. A imagem da topografia foi analisada usando o programa *Gwyddion 2.19* para obtenção dos parâmetros de altura média dos picos e rugosidade.

4.2.3.3 Determinação do blue value (BV)

O blue value (BV) das amostras foi determinado de acordo com Guilbert and Spragg (1969) como a absorvância das amostras quando solubilizadas em solução de lugol e medida em um espectrofotômetro UV/Vis. (JENWAY–6705 UV/Vis – Marconi) a 680 nm.

4.2.3.4 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas em termobalança Shimadzu TGA 50 (Japão), sob fluxo de nitrogênio (50 mL min^{-1}) no Laboratório de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram aquecidas de 25 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. A partir das curvas de porcentagem de perda de massa em função da temperatura foi calculado o parâmetro de $T_{\text{máx}}$ (temperatura de degradação na taxa de perda máxima).

4.2.3.5 Difração de raios-x (DRX)

As análises de difração de raios-X foram realizadas em difratômetro da marca Panalytical modelo X'Pert PRO MPD (Netherlands) no Laboratório de Análises por Raios-X da Universidade Estadual de Londrina. As condições de análise foram: voltagem de –40 kV, corrente de 40 mA, faixa de varredura de $2\theta = 2$ a 60°, com

passo angular de $-0,1^\circ$ e velocidade de $1^\circ/\text{min}$, dotado de monocromador de feixe secundário de grafite. O índice de cristalinidade (IC) das amostras foi calculado pela equação: $IC = (A_c / (A_c + A_a)) * 100$, onde A_c corresponde à área da região cristalina e A_a , à área da região amorfa. Foi empregado o programa computacional Origin 8.0 para o cálculo das áreas dos difratogramas.

4.2.3.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas em espectrofotômetro FT-IR da marca Shimadzu modelo IRPrestige 21 (Japão) no Laboratório de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram incorporadas ao brometo de potássio e submetidas a alta pressão para a produção de pastilhas (SKOOG; WEST; HOLER, 1999). As análises foram realizadas na região do infravermelho médio abrangendo a faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 100 varreduras de cada amostra.

4.2.3.7 Análise estatística

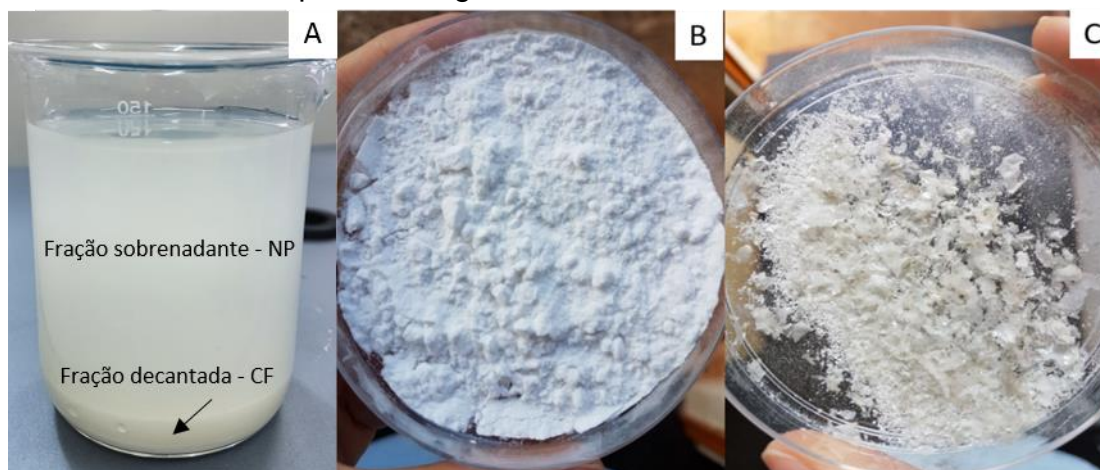
A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando o software Statistica versão 7.0 (Statsoft, Oklahoma, EUA) e para comparação de médias foi empregado teste de Tukey (nível de significância de 5%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS E CORPOS DE FUNDO

Quando as suspensões dos amidos nativos foram submetidas ao processo de ultrassonicação foram obtidas duas frações: 1) Fração sobrenadante, que foi denominada nanopartícula (NP), composta por partículas na escala nanométrica quando observadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica; 2) Fração decantada, que foi denominada corpo de fundo (CF), obtida por decantação do material após a ultrassonicação. Na Figura 4A está apresentada a imagem do amido de milho submetido à ultrassonicação, onde pode-se evidenciar a fração solúvel (NP) e a fração decantada (CF). Na Figura 4B e 4C estão demonstradas as imagens do CF e NP obtidos a partir do amido de milho após secagem em estufa. O rendimento do processo foi de 12 ± 1 % de NP e 88 ± 5 % de CF em média, para os três tipos de amido. A aparência dos CFs e NPs obtidos a partir do amido de mandioca e inhame não foram apresentadas por serem semelhantes às obtidas para o amido de milho.

Figura 4 – Imagem da suspensão de amido de milho após 30 min de ultrassonicação (A), e do corpo de fundo (B) e nanopartícula (C) obtidos após a secagem do material.



Com o tratamento ultrassônico, a superfície dos grânulos parece ter sido progressivamente quebrada e erodida, liberando partículas menores e com formatos diferentes dos seus respectivos grânulos nativos (Figura 5). De acordo com Bel Haaj *et al.* (2013), o processo de ultrassonicação causa alterações no tamanho e formato

dos grânulos de amidos nativos, e estas mudanças podem ficar mais drásticas com o aumento do tempo de sonicação.

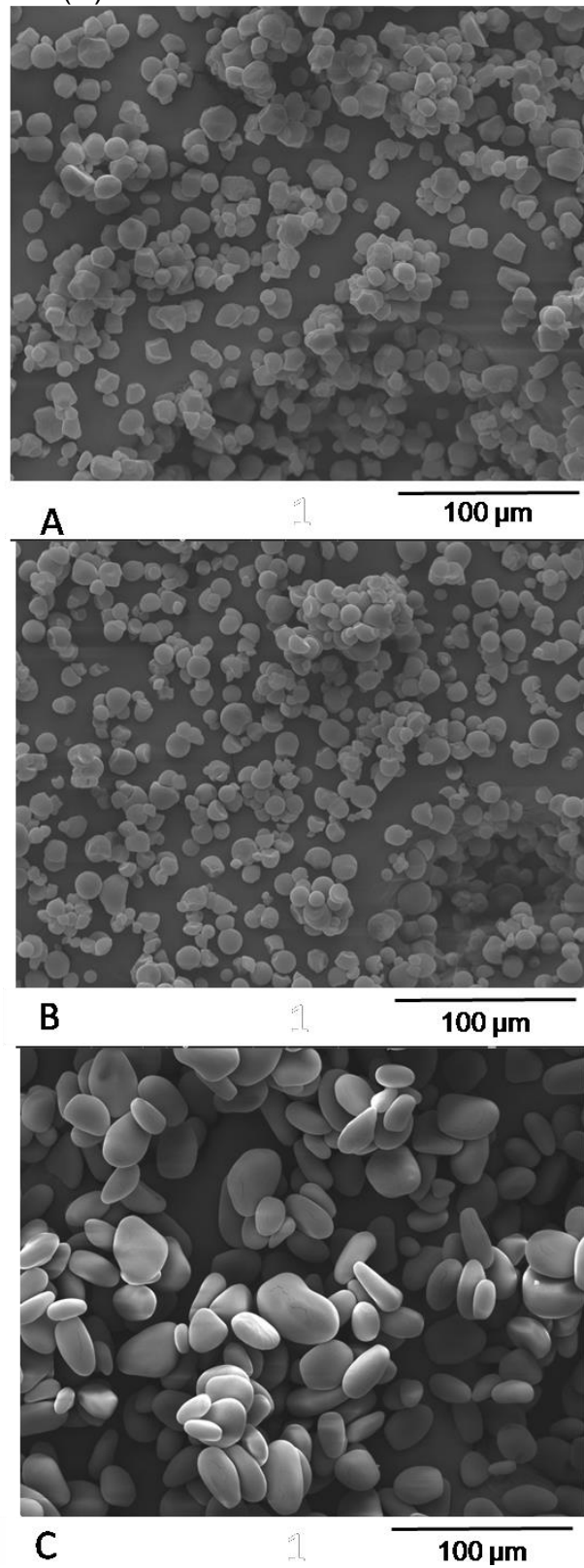
5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi avaliada a morfologia dos grânulos de amido nativo, dos CFs e NPs obtidos por ultrassonicação. A Figura 6 corresponde aos amidos nativos de milho (A), mandioca (B) e inhame (C).

Os amidos nativos de milho, mandioca e inhame apresentaram diferentes tamanhos e formas, conforme mostra a Figura 5. Os grânulos de amido de milho apresentaram formato poliédrico irregular, com superfície lisa, com cerca de 5–20 μm de diâmetro; esse resultado é coerente com outros estudos que relataram o tamanho médio de grânulos individuais de amido de milho em intervalos de 1–7 μm para grânulos menores e 15–20 μm para grânulos maiores (SINGH, N. *et al.*, 2003). Os grânulos de amido de mandioca se mostraram circulares e truncados, com diâmetros variando de 7–14 μm , valores que estão de acordo com os relatados por Defloor, Dehing e Delcour (1998). Os grânulos de amido de inhame se mostraram elípticos, com superfície lisa, com 12–37 μm de diâmetro (MALI, S. *et al.*, 2004).

Os grânulos de amido de milho, mandioca e inhame apresentaram tendência à formação de aglomerados de grânulos individuais (HOOVER, 2001).

Figura 5 – Fotomicrografias dos grânulos de amido nativo de milho (A), mandioca (B) e inhame (C) com aumento de 800 vezes.



Na Tabela 1 estão apresentados os resultados dos tamanhos dos grânulos antes e após 30 min de tratamento medidos através das imagens de MEV.

Comparados aos grânulos nativos, as partículas obtidas no CF apresentaram tamanhos menores, entre 3 a 6 μm para o amido de milho, 3 a 7 μm para o amido de mandioca e 1 a 2 μm para o amido de inhame (Tabela 1), indicando uma desassociação das cadeias de amido quando submetidos à ultrassonicação. De acordo com Jambrak *et al.* (2010) e Bel Haaj *et al.* (2013), o processo de ultrassonicação causa rupturas e danos mecânicos aos grânulos de amido, o que se explica pelo colapso causado pela cavitação das bolhas, que gera colisão mecânica e uma erosão progressiva na superfície das partículas de amido que se fragmentam até um tamanho limite de 30–100 nm.

Tabela 1 - Tamanho dos grânulos de amido de milho, mandioca e inhame antes e após tratamento ultrassônico medidos através das imagens de MEV.

Tamanho dos grânulos de amido	Milho	Mandioca	Inhame
Nativo	5 – 20 μm	7 – 14 μm	12 – 37 μm
CF	3 – 6 μm	3 – 7 μm	1 – 3 μm
NP	158 – 792 nm	158 – 287 nm	103 – 253 nm

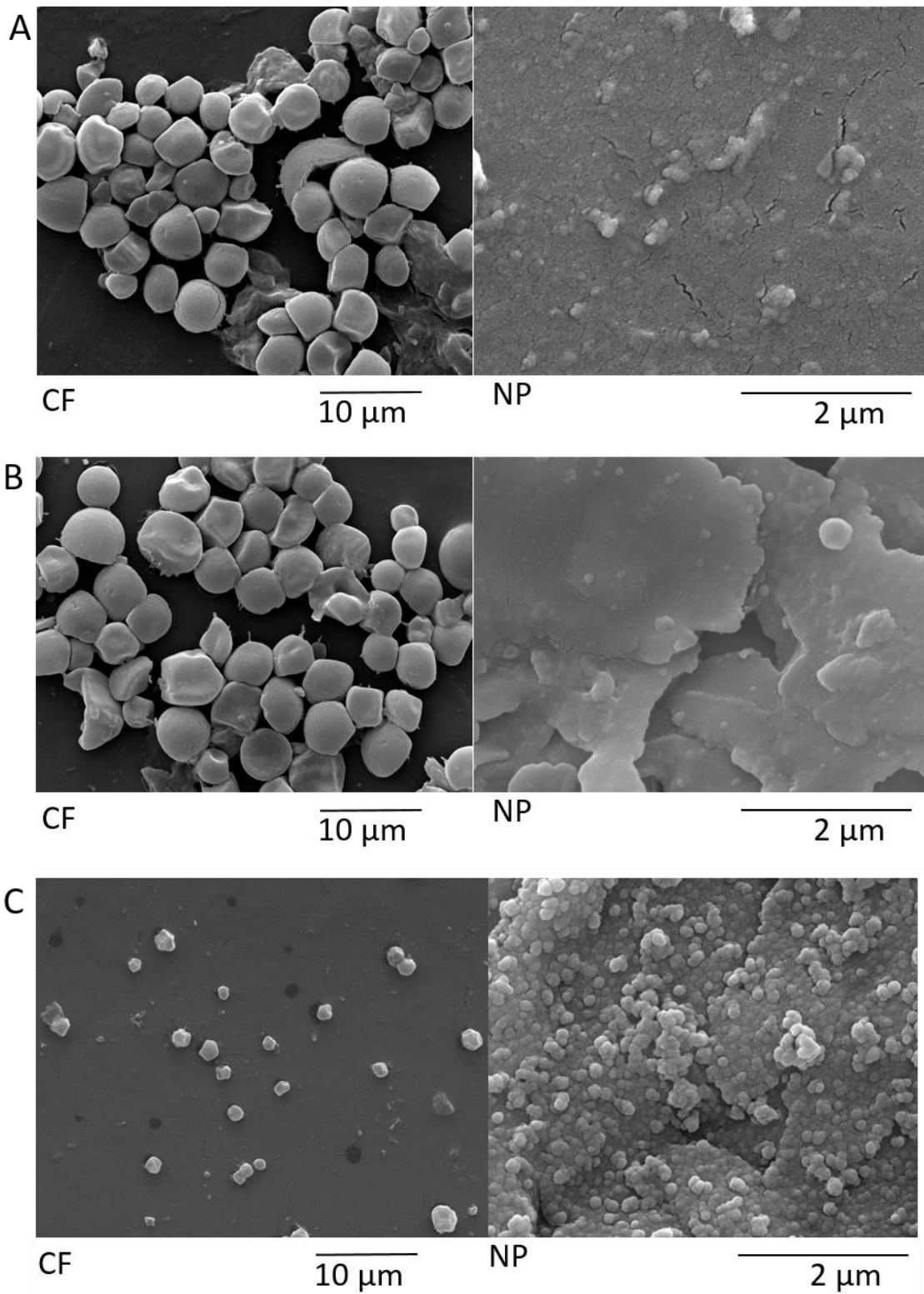
CF: corpo de fundo; NP: nanopartículas.

Algumas irregularidades e rugosidades foram observadas nas nanopartículas obtidas (Figura 6). Vale ressaltar a dificuldade em se realizar a análise de microscopia eletrônica de varredura das NPs, que apresentaram grande tendência à aglomeração, o que pode ser claramente observado em especial nas imagens das NPs de amido de milho e mandioca (Figura 6A e 6B). Para que pudessem ser medidos os tamanhos das NPs através das micrografias, conforme observado na Tabela 1, vários *stubs* foram preparados e usados na medição. Segundo Le Corre *et al.* (2010), nanopartículas e nanocristais de amido apresentam uma grande tendência de auto-aglomeração, o que pode dificultar a sua caracterização por microscopia, assim como, diminuir a superfície de interação destes materiais. Yang *et al.* (2014) também relataram que a auto-agregação dificulta a determinação do tamanho das partículas obtidas.

A redução dos grânulos à escala nanométrica foi observada no material em suspensão, com rendimento médio de 12 ± 1 % de nanopartículas a partir do amido de milho, mandioca e inhame. É importante destacar que o amido de inhame, que

apresenta o maior teor de amilose (30 %) quando comparado aos de milho (23 %) e mandioca (18 %), se mostrou mais susceptível à ação do ultrassom, resultando em CFs e NPs de menor tamanho quando comparado aos demais tipos de amido. Luo *et al.* (2008) e Zhu *et al.* (2015) relataram que grânulos de amidos com maiores teores de amilose são mais susceptíveis às alterações estruturais causadas pela ultrassonicação.

Figura 6 – Fotomicrografias dos CFs e NPs obtidos a partir do amido de milho (A), mandioca (B) e inhame (C).



5.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

As nanopartículas de milho, mandioca e inhame foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM) para caracterização topográfica desses materiais e as imagens obtidas estão apresentadas na Figura 7. Na Figura 8 estão apresentados os tamanhos médios das nanopartículas calculados a partir das imagens de AFM.

Figura 7 – Imagens topográficas obtidas por AFM das nanopartículas de amido de milho (A), mandioca (B) e inhame (C).

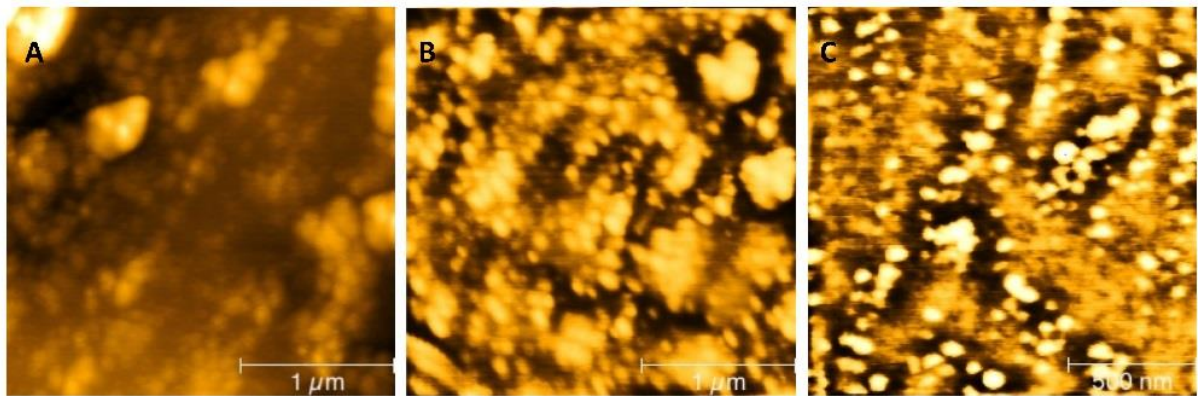
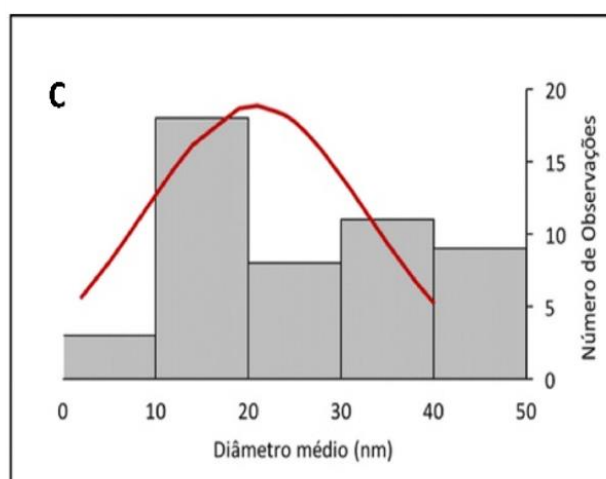
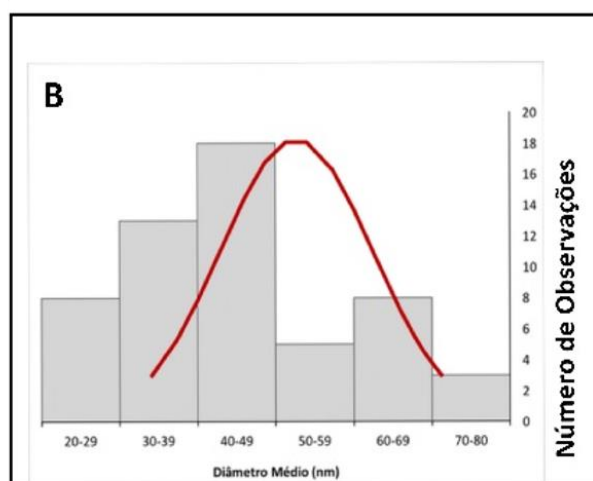
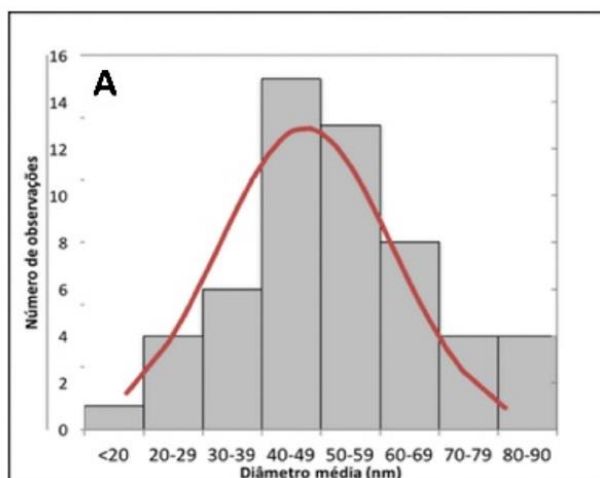


Figura 8 – Tamanho médio das nanopartículas de amido de milho (A), mandioca (B) e inhame (C) analisadas por AFM.



A análise de imagem mostrou diâmetro médio de 52 nm ($\pm 16,5$) para as NPs de amido de milho, 49 nm ($\pm 14,6$) para as NPs de amido de mandioca e 20,7 nm ($\pm 12,08$) para as NPs de amido de inhame (Figura 8). Pode-se perceber que o

tamanho médio nas NPs calculado a partir da MEV se mostrou maior que o tamanho medido por AFM, e possivelmente a aglomeração das NPs observadas por MEV pode ter levado maiores aos diâmetros obtidos. Nas análises de AFM confirmou-se a tendência das NPs de amido de inhame apresentarem os menores diâmetros (Figura 8).

Os resultados obtidos por MEV e AFM confirmaram que o método de ultrassonicação e as condições testadas foram eficazes na produção de nanopartículas de amido.

5.4 DETERMINAÇÃO DO BLUE VALUE (BV)

O resultado de BV das amostras está apresentado na Tabela 2, e pode-se observar que os maiores valores foram obtidos para os amidos nativos, seguidos pelos CFs que apresentaram valor intermediário, e os menores valores foram obtidos para as NPs. Possivelmente, a redução do tamanho das partículas levou à redução dos tamanhos das cadeias de amilose e amilopectina, gerando menores valores de BV. De acordo com Denardin e Silva (2010), a amilose possui a capacidade de interagir com iodo, produzindo complexo de inclusão helicoidal com aproximadamente seis moléculas de amilose por giro, no qual o iodo se encontra na cavidade central da hélice. Reddy *et al.* (1993) relatam que cadeias longas de amilopectina também têm a capacidade de formar complexos de inclusão com o iodo.

Segundo Sujka e Jamroz (2013), dentre as características dos amidos de diferentes fontes está a sua capacidade de formar um complexo azul quando reage com iodo, o que pode ser bem útil na análise de mudanças no seu grau de polimerização causadas por modificações físicas durante o processo de ultrassonicação do amido. Estes autores ainda relatam que a ultrassonicação do amido de diferentes fontes leva ao decréscimo do seu BV, tais como as observadas nos CFs e NPs obtidas neste trabalho, que certamente apresentavam cadeias de amilose e amilopectina com menores graus de polimerização que os seus respectivos amidos nativos, e conseqüentemente menores valores de BV (Tabela 2).

Comparando-se os três tipos de amidos (Tabela 2), os maiores valores foram obtidos para o amido de inhame, com maior teor de amilose, seguido do amido de milho e pelo amido de mandioca. Sujka e Jamroz (2013) também relataram que os

amidos com maiores teores de amilose apresentam maiores valores de BV, uma vez que a amilose é a principal responsável pela formação do complexo com iodo.

Tabela 2 – Resultado de Blue Value das amostras.

Amostra	Absorvância
Amido de milho nativo	0,317
CF amido de milho	0,300
NP amido de milho	0,120
Amido de mandioca nativo	0,259
CF amido de mandioca	0,219
NP amido de mandioca	0,099
Amido de inhame nativo	0,397
CF amido de inhame	0,322
NP amido de inhame	0,158

5.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

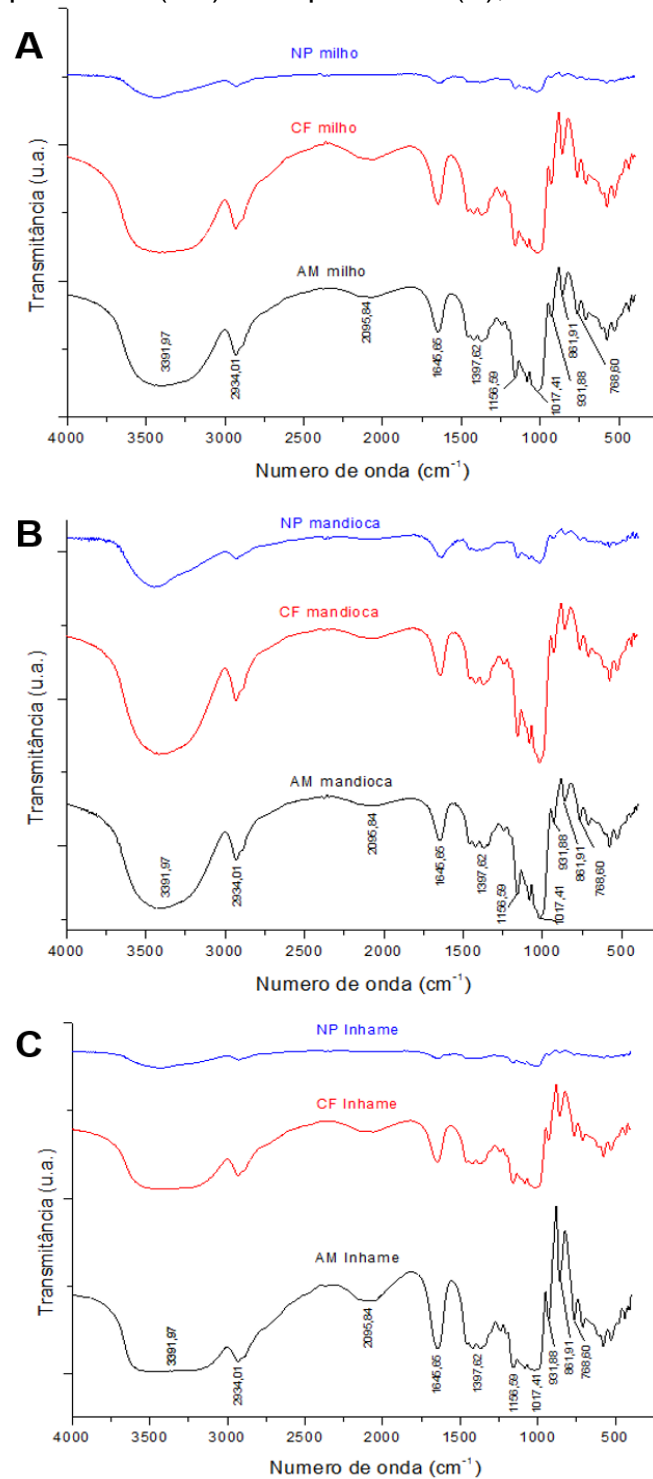
Os espectros das amostras dos amidos nativos, seus CFs e NPs obtidos através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) estão apresentados na Figura 9.

Foram observadas em todas as amostras de amidos nativos e seus CFs (Figura 9) bandas características dos grupamentos e ligações presentes no amido: uma banda larga na região de 3400cm^{-1} referente à deformação axial do grupamento hidroxila (O-H); uma banda em 2934cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações C-H; uma banda em 2095cm^{-1} correspondente à interação das ligações C-H e C-C; e uma banda em 1645cm^{-1} devido ao dobramento angular da molécula de água na estrutura interna do amido (GOHEEN; WOOL, 1991; LAMMERS *et al.*, 2009; FANG *et al.*, 2002; CHI *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; BELLO-PÉREZ *et al.*, 2010).

Foram ainda observadas nas amostras dos amidos nativos e seus CFs as seguintes bandas: uma banda em 1156cm^{-1} , associada aos estiramentos assimétricos da ligação C-O (JIVAN *et al.*, 2013); uma banda em 1017cm^{-1}

característica do estiramento C–O do anel de glicose (FANG *et al.*, 2002); e as bandas em 931 cm^{-1} e 760 cm^{-1} atribuídas às vibrações do grupo C–O–C das ligações glicosídicas α –1, 4 (JI *et al.*, 2015; CERNÁ *et al.*, 2013).

Figura 9 – Espectros de FTIR do amido nativo (AM), corpo de fundo (CF) e nanopartículas (NP) dos tipos milho (A), mandioca (B) e inhame (C).



Qualitativamente, todos os amidos nativos e seus CFs apresentaram espectros de FT-IR semelhantes, no entanto, os CFs apresentaram bandas com menor intensidade (Figura 9), enquanto as NPs apresentaram as mesmas bandas, mas com uma intensidade bastante menor que os amidos nativos e CFs.

Assim como observado para o tamanho das NPs obtidas, o espectro de FT-IR das NPs de amido de inhame foi o que mostrou as menores intensidades nas suas bandas quando comparado ao espectro do amido nativo e do CF deste amido, sugerindo que este amido foi mais afetado pelo processo de ultrassom, o que pode estar relacionado ao seu maior teor de amilose.

5.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A estrutura cristalina das amostras foi avaliada por difração de raios-X. Sabe-se que o tratamento ultrassônico influencia a cristalinidade dos grânulos de amido dependendo das condições experimentais e do tipo de amido empregado (HUANG *et al.*, 2007; LUO *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2012).

Os difractogramas dos amidos nativos, CFs e NPs dos diferentes tipos de amido – milho, mandioca e inhame – estão apresentados na Figura 10. A presença de lamelas cristalinas e amorfas nos amidos definem padrões de cristalinidade que podem ser dos tipos A, B e C (PÉREZ; BERTOFT, 2010). A diferença entre os amidos com cristalinidade tipo-A e tipo-B deve-se pelo empacotamento das duplas hélices com diferentes configurações (IMBERTY; PÉREZ, 1988; IMBERTY *et al.*, 1987) e o amido tipo-C é considerado uma combinação entre os tipos A e B (CAI *et al.*, 2014).

Considerando-se os ângulos de difração observados no seu difratograma, o amido de milho nativo apresentou padrão de cristalinidade típico do tipo A, com ângulos de difração em $2\theta = 15^\circ$, 17° , 18° e 23° (Figura 10A), resultado coerente com estudos realizados por Cai *et al.* (2010) e Zeng *et al.* (2011).

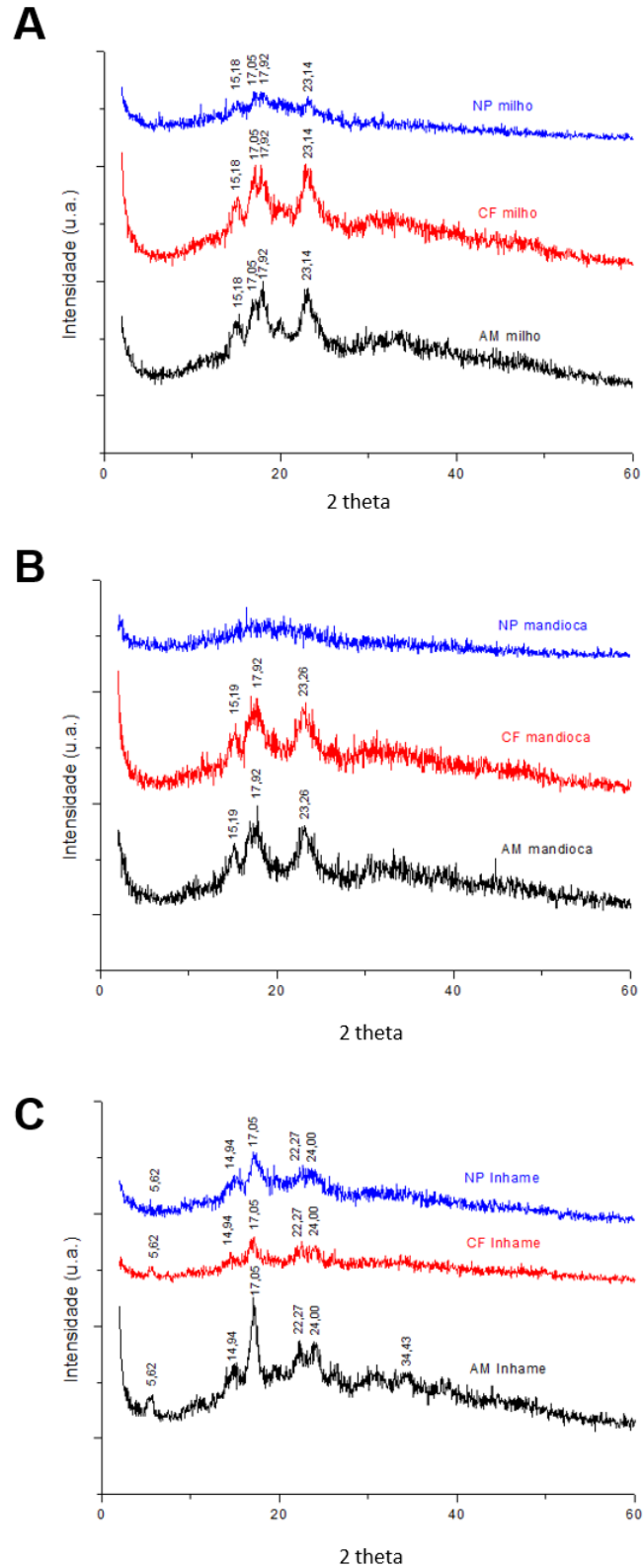
O amido de mandioca nativo também apresentou padrão de cristalinidade tipo-A, com quatro picos principais em torno dos ângulos de difração em $2\theta = 15^\circ$, 17° , 18° e 23° (Figura 10B), coerentes com os resultados encontrados por Franco, Ciacco e Tavares (1988) e Hoover (2001).

O amido de inhame apresentou ângulos de difração em $2\theta = 5,6^\circ$, $14,94^\circ$, $17,05^\circ$, $22,27^\circ$, 24° e $34,43^\circ$ (Figura 10A), característico de uma cristalinidade tipo B

conforme descrito por Lopez–Rubio *et al.* (2008) e Kim *et al.* (2012). O padrão de cristalinidade do tipo B é característico de tubérculos em geral. O padrão de raios–X tipo A é constituído pelas duplas hélices da amilopectina, empacotadas em um arranjo monoclinico. O tipo B possui maior teor de água e apresenta uma estrutura mais aberta, constituída de duplas hélices empacotadas em um arranjo hexagonal (IMBERTY *et al.*, 1997).

Foi observada uma alteração importante nos difratogramas de todos os tipos de amido submetidos ao tratamento com ultrassom (Figura 10). Os resultados para o amido de milho demonstraram uma diminuição significativa na intensidade dos picos principais na NP, enquanto o CF parece não ter sido afetado (Figura 10). Da mesma forma o CF para o amido de mandioca manteve–se inalterado, porém, para a NP houve perda de todos os picos principais, se mostrando característico de um material completamente amorfo. Os resultados para o amido de inhame indicaram diminuição da intensidade dos picos tanto para o CF quanto para a NP.

Figura 10 – Difratomogramas do amido nativo (AM), corpos de fundo (CF) e nanopartículas (NP) dos tipos milho (A), mandioca (B) e inhame (C).



Foram calculados os índices de cristalinidade relativa (IC) das amostras de amido nativo, corpo de fundo e nanopartículas, e estes estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Índice de cristalinidade relativa (IC) dos amidos de milho, mandioca e inhame nativos e seus respectivos corpos de fundo e nanopartículas.

Tipos de amido	Índice de Cristalinidade Relativa (%)		
	Amido nativo	Corpo de fundo	Nanopartícula
Amido de milho	31	29	8
Amido de mandioca	29	28	0
Amido de inhame	32	18	9

O índice de cristalinidade dos amidos nativos obtidos neste trabalho variou de 29 a 32 % (Tabela 3), o que está de acordo com dados da literatura, que relatam que os amidos nativos apresentam entre 15 e 45 % de cristalinidade (BULLEON et al., 1998; CHEETHAM; TAO, 1998).

As amostras dos CFs do amido de milho e mandioca mantiveram praticamente o mesmo IC de seus amidos nativos, enquanto o CF do amido de inhame reduziu seu IC à metade quando comparado ao amido nativo (Tabela 3).

O IC das NPs de amido de mandioca foi zero (Tabela 3), indicando que esta amostra perdeu totalmente a cristalinidade, enquanto para o amido de milho e inhame o valor de IC foi reduzido um terço em relação aos seus amidos nativos. Alguns autores relatam que a cristalinidade dos grânulos de amido pode aumentar ou diminuir dependendo das condições do tratamento ultrassônico (HUANG et al., 2007; ZHENG et al., 2013); uma explicação para esse efeito é de que ocorre uma ruptura das frações amorfas na etapa inicial do tratamento e que posteriormente, este efeito induza à erosão dos cristais nos grânulos (HUANG et al., 2007).

Aparentemente, a ultrassonicação de alta intensidade à temperatura ambiente (25°C) durante 30 minutos afetou intensamente a estrutura cristalina da amilopectina, resultando em nanopartículas com baixa cristalinidade ou amorfas, como observado para o amido de mandioca (Tabela 3). Observou-se uma relação entre o teor de amilose e o IC das NPs obtidas neste trabalho; o IC das NPs do amido de inhame (maior teor de amilose) foi maior que o IC das NPs de amido de milho (teor de amilose intermediário), enquanto as NPs obtidas a partir do amido de mandioca (menor teor de amilose) apresentaram-se totalmente amorfas (Tabela 3). Qin et al. (2016) obtiveram nanopartículas a partir de amidos com diferentes teores de amilose pelo processo de nanoprecipitação e observaram a mesma correlação

positiva entre o teor de amilose do amido nativos com o IC das nanopartículas obtidas.

Bel Haaj et al. (2013) observaram que nas nanopartículas obtidas a partir de amidos com maiores teores de amilopectina a perda dos picos de difração pode ser a consequência da diminuição excessiva do tamanho de cristalito, resultante da redução do tamanho das partículas, e os pequenos cristalitos que possuem apenas alguns planos de rede podem não produzir intensidades de reflexão suficientemente detectáveis por DRX.

5.7 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A estabilidade térmica dos amidos nativos, CFs e NPS dos amidos de milho, mandioca e inhame foi analisada por TGA. As curvas obtidas estão apresentadas na Figura 11 e o parâmetro de $T_{m\acute{a}x}$ (temperatura de degradação na taxa de perda máxima) está apresentado na Tabela 4.

A perda de massa inicial observada por volta de 100 °C em todas as curvas pode ser explicada devido à perda de água dos materiais (Figura 11).

Todas as amostras de amido nativo e CFs apresentaram $T_{m\acute{a}x}$ entre 320 °C e 327 °C; já as amostras de NPs apresentaram $T_{m\acute{a}x}$ entre 290 °C e 306 °C indicando uma diminuição na estabilidade térmica desses materiais. Qin *et al.* (2016) relataram que amidos nativos de diferentes fontes apresentam máxima degradação térmica em temperaturas entre 280 e 340 °C.

De acordo com Qin et. al. (2016) que estudou NPs de amido obtidas por nanoprecipitação, a temperatura de degradação máxima encontrada foi entre 294 °C e 303 °C, valores próximos aos encontrados neste trabalho. De acordo com Sun et. al. (2014), uma maior estabilidade térmica dos amidos nativos em relação às NPs ocorre devido a estrutura semicristalina compacta e alto grau de polimerização do amido nativo, que requer maior energia para completar sua degradação. Assim, a redução do grau de polimerização e cristalinidade nas NPs podem ser os principais fatores para diminuição da sua estabilidade térmica. Sun et. al. (2014) relataram que as NPs obtidas por hidrólise enzimática e recristalização também exibiam uma estabilidade térmica diminuída. Lamana *et al.* (2013) relataram que NPs obtidas por irradiação gama apresentaram $T_{m\acute{a}x}$ menor quando comparadas com os seus

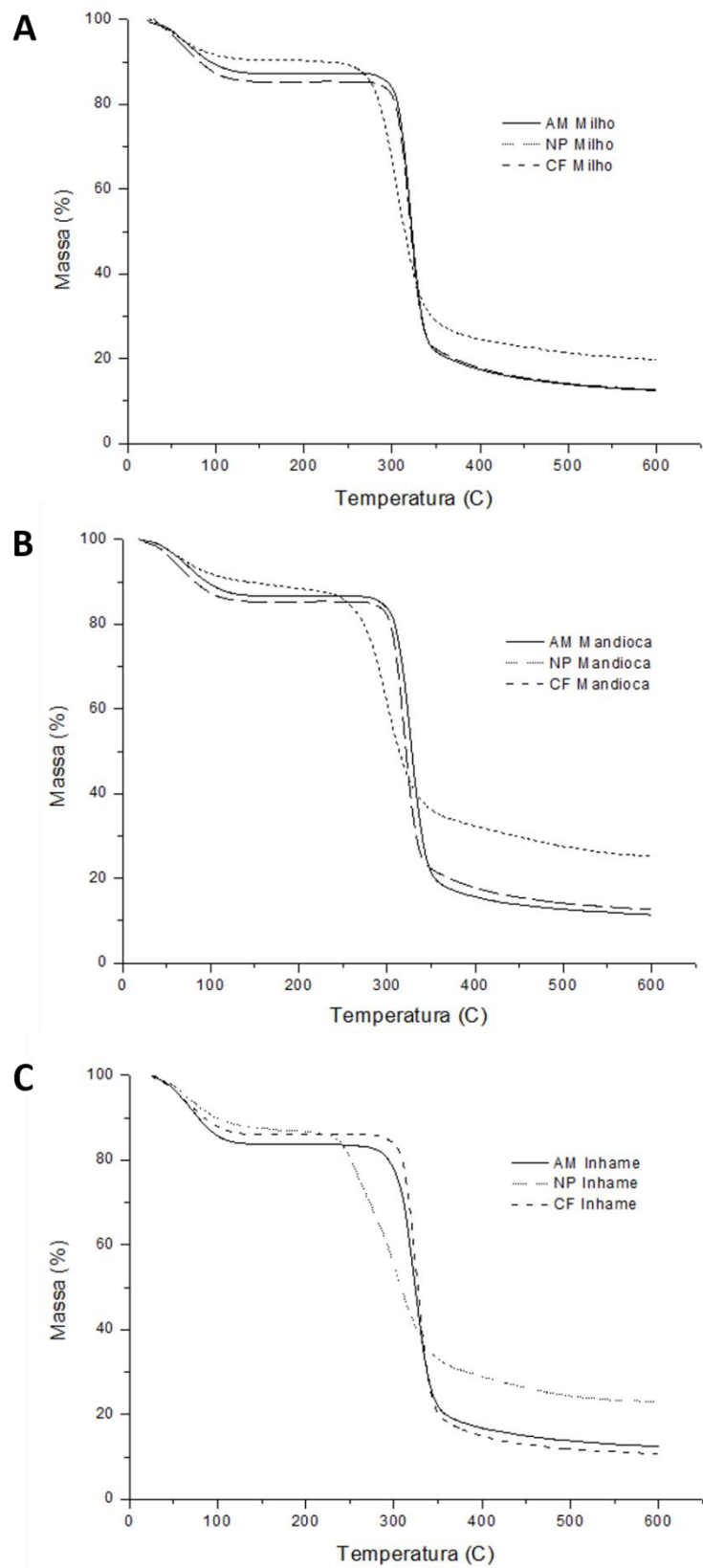
respectivos amidos, e que o aumento do número de grupamentos hidroxila na superfície das NPs pode favorecer o seu processo de degradação térmica.

Tabela 4 - Temperatura de degradação na taxa de perda máxima ($T_{\text{máx}}$) dos amidos nativos, corpos de fundo e nanopartículas dos amidos de milho, mandioca e inhame.

Amidos	$T_{\text{máx}}$ (°C)
AM milho	321,26
CF milho	320,04
NP milho	306,41
AM mandioca	327,30
CF mandioca	323,14
NP mandioca	299,71
AM inhame	324,19
CF inhame	326,12
NP inhame	290,27

AM: amido nativo; CF: corpo de fundo; NP: nanopartícula.

Figura 11 – Curvas de TGA do amido nativo (AM), corpo de fundo (CF) e nanopartículas (NP) dos tipos milho (A), mandioca (B) e inhame (C).



6 CONCLUSÕES

O método de ultrassonicação nas condições testadas permitiu obter nanopartículas dos 3 diferentes tipos de amidos utilizados. Apesar do estudo ser direcionado à produção de nanopartículas (NPs), foi obtido um material secundário em escala micrométrica com tamanhos menores que os grânulos nativos, denominado corpo de fundo (CF), que apresentou um elevado rendimento de produção e cuja aplicação deveria ser estudada em trabalhos futuros.

Os resultados da caracterização mostraram que as NPs de amido e os CFs não formaram produtos de degradação após o tratamento ultrassônico, sendo portanto, materiais seguros para veiculação de fármacos. Observou-se que as NPs e CFs do amido de inhame apresentaram tamanhos menores quando comparado aos amidos de milho e mandioca, indicando maior susceptibilidade ao tratamento ultrassônico; esse fenômeno pode estar relacionado ao maior teor de amilose nesse tipo de amido.

As NPs de amido de mandioca se tornaram amorfas após o tratamento, enquanto as NPs de amido de inhame e milho apresentaram cristalinidade relativa de 18 e 12 %, respectivamente, produzindo, portanto, materiais amorfos e materiais cristalinos que podem ter diferentes aplicações.

O rendimento da produção de NPs foi de 12 ± 1 %, demonstrando que a ultrassonicação é um método viável e promissor, uma vez que não há emprego de reagentes químicos tóxicos e nem geração de efluentes de lavagem.

Adicionalmente, visando a aplicação das NPs e CFs, sugere-se a realização de testes de carreamento de fármacos para verificar a capacidade de interação desses materiais produzidos.

REFERÊNCIAS

ABDI; Panorama nanotecnologia, disponível em <http://www.abdi.com.br/Estudo/Panorama%20de%20Nanotecnologia.pdf>, acesso: Dezembro de 2015.

ADAM, F. *et al.* **“Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process.** *Bioresource technology*, v. 114, p. 457–65, jun. 2012.

ALIYU, M.; HEPHER, M. J. **Effects of ultrasound energy on degradation of cellulose material.** *Ultrasonics sonochemistry*, Oxford, GB, v. 7, p. 265–268, out. 2000.

ANDRADE C.T., BARROS L.A.M., LIMA M.C.P., AZERDO E.G. **Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions,** *International Journal of Biological Macromolecules*, Guildford, GB, v.34, n.4, p. 233–240, ago. 2004.

ANGELLIER, H.; MOLINA-BOISSEAU, S.; DUFRESNE, A. **Mechanical properties of waxy maize starch nanocrystal reinforced natural rubber.** *Macromolecules*, v. 38, n. 22, p. 9161–9170, out. 2005.

BAKER, A.A. *et al.* **Internal structure of the starch granule revealed by AFM.** *Carbohydrate Research*, v.330, p.249–256, jan. 2001.

BAXTER S., ZIVANOVIC S., WEISS J., **Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan,** *Food Hydrocolloids*, Oxford, GB, v.19, n.5, p. 821– 830, nov. 2005

BEL HAAJ, S. *et al.* **Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication.** *Carbohydrate polymers*, v. 92, n. 2, p. 1625–32, 15 fev. 2013.

BELLO-PÉREZ, L. A.; AGAMA-ACEVEDO, E.; ZAMUDIO-FLORES, P. B.; MENDEZ-MONTEALVO, G.; RODRIGUEZ-AMBRIZ, S. L. **Effect of low and high acetylation degree in the morphological physicochemical and structural characteristics of barley starch.** *Food Science and Technology*, 43, 1434, 2010.

BERTOFT, E. *et al.* **The fine structure of cassava starch amylopectin. Part 2: building block structure of clusters.** International journal of biological macromolecules, v. 47, n. 3, p. 325–35, 1 out. 2010.

BORGES, S.S.; KORN, M. **Geração sonoquímica de oxidantes em solução aquosa saturada de tetracloreto de carbono.** Química Nova, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 558–562, 2002.

BULÉON, A *et al.* **Starch granules: structure and biosynthesis.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 23, n. 2, p. 85–112, ago. 1998.

CAI, L.; SHI, Y. C. **Structure and digestibility of crystalline short-chain amylose from debranched waxy wheat, waxy maize, and waxy potato starches.** Carbohydrate Polymers, 4, 1117–1123. 2010.

CAI, L.; SHI, Y. C.; RONG, L. X.; HSIAO, B. **Debranching and crystallization of waxy maize starch in relation to enzyme digestibility.** Carbohydrate Polymers, 2, 385e393.

CAI, J. *et al.* **Structural and functional properties of C-type starches.** Carbohydrate Polymers, v. 101, p. 289–300, jan. 2014.

CAMERON M., MCMASTER L., BRITZ T., **Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound,** Ultrasonics Sonochemistry, Oxford, GB, v.15, n.6, p. 960–964, set. 2008

CERNÁ, M.; BARROS, A.S.; NUNES, A.; ROCHA, S.L.M.; DELGADILLO, I.; COPIKOVÁ, M.A. Coimbra, Carbohydr. Polym. 51, 383, 2003.

CHAN, H. T., BHAT, R., & KARIM, A. A. **Effects of sodium dodecyl sulphate and sonication treatment on physicochemical properties of starch.** Food Chemistry, 120, 703e709. 2010.

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

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. **Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction.** *Ultrasonics sonochemistry*, v. 18, n. 4, p. 813–35, jul. 2011.

CHENG, W. *et al.* **Impact of ultrasonic treatment on properties of starch film-forming dispersion and the resulting films.** *Carbohydrate Polymers*, v. 81, n. 3, p. 707–711, jul. 2010.

CHI, H.; XU, K.; WU, X.; CHEN, Q.; XUE, D.; SONG, C.; ZHANG, W.; WANG, P. **Effect of acetylation on the proprieties of corn starch.** *Food Chemistry*, 106, 923, 2008.

CHIN, S. F.; PANG, S. C.; TAY, S. H. **Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method.** *Carbohydrate Polymers*, 86, 1817–1819. 2011.

CHUNG K.M.; MOON, T.W.; KIM, H.; CHUN, J.K. **Physicochemical properties of sonicated mung bean potato, and rice starches,** *Cereal Chemistry*, Saint Paul, Minn., US, v.79, n.5, p. 631– 633. 2002

CRAVOTTO, G. *et al.* **Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves.** *Ultrasonics sonochemistry*, v. 15, n. 5, p. 898–902, jul. 2008.

CURÁ, J.A. *et al.* **Amylose is not strictly linear.** *Starch/ Stärke*, v.47, n.6, p.207–209, 1995.

CZECHOWSKA-BISKUP, R., ROKITA, B., LOTFY, S., ULANSKI, P., & ROSIAK, J. M. **Degradation of chitosan and starch by 360– kHz ultrasound.** *Carbohydrate Polymers*, v.60, n.2, p.175–184. 2005

DA PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. **Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds.** *Ultrasonics sonochemistry*, v. 20, n. 4, p. 1076–80, jul. 2013.

DEFLOOR, I.; DEHING, I.; DELCOUR, J.A. **Physicochemical properties of cassava starch.** *Starch/Stärke* 50: 58–64. 1998.

DEGROIS, M., GALLANT, D., BALDO, P., & GUILBOT, A. **The effects of ultrasound on starch grains.** *Ultrasonics*, 12, 129–131. 1974.

DENYER, K.; SMITH, S. M. **Starch Synthesis.** In: MURPHY, D. J.; MURRAY, B. G. (Eds.). *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 3. ed. Elsevier Ltd., 2003. p. 1249–1256.

ELIASSON, A.C. **Carbohydrates in food.** New York: Marcel Dekker, 664p. 1996.

ELIASSON, A.C. **Starch in food – Structure, function and applications.** New York: Boca Raton, CRC, 605p. 2004.

ETHERIDGE, M. L.; CAMPBELL, S. A.; ERDMAN, A. G.; HAYNES, C. L.; WOLF, S. M.; McCULLOUGH, J.; **Nanomed. Nanotechnol.** *Biol. Med.*, 9, 1. 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety.** *The European Food Safety Authority Journal*. European Food Safety Authority, pp. 1–39, 2009.

FANG, J. M.; FOWLER, P. A.; TOMKINSON, J.; HILL, C. A. S. **The reparation and characterization of a series of chemically modified potato starches.** *Carbohydrate Polymers*, 47, 245–252, 2002.

FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WEISS, J. **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing.** *Food Engin ed.* Urbana: Springer London, p. 666. 2011.

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

FRENCH, D. **Chemical and Physical Properties of Starch.** *Journal of Animal Science*, v. 37, n. 4, p. 1048–1061, out. 1973.

GALLANT, D., DEGROIS, M., STERLING, C., & GUILBOT, A. **Microscopic effects of ultrasound on the structure of potato starch preliminary study.** *Starch/Starke*, 24, 116e123. 1972.

GÉRARD, C. *et al.* **Amylose determination in genetically modified starches.** Carbohydrate Polymers, v. 44, n. 1, p. 19–27, jan. 2001.

GÉRARD, C. *et al.* **Order in maize mutant starches revealed by mild acid hydrolysis.** Carbohydrate Polymers, v. 48, p. 131–141, maio 2002.

GIEZEN, F., JONGBOOM, R., GOTLIEB, K., & BOERSMA, A. Patent Wo 00/69916. 2000.

GILBERT, G.A.; SPRAGG, S.P. Iodine sorption: blue value. In: WHISTLER, R.L. *et al.* **Methods in carbohydrate chemistry.** London: Academic, 1964. p.168–169.

GOHEEN, S.M.; WOOL, R.P. J. Appl. Polym. Sci. 42, 2691, 1991.

GOULA, A. M. **Ultrasound–assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling.** Journal of Food Engineering, v. 117, n. 4, p. 492–498, ago. 2013.

HAAJ, S. B.; MAGNIN, A.; PETRIER, C.; BOUFI, S. **Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication.** Carbohydr. Polym. 92, 1625–1632, 2013.

HANNAH, L. C.; JAMES, M. **The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms.** Current opinion in biotechnology, v. 19, n. 2, p. 160–5, abr. 2008.

HEBEISH, A.; EL–RAFIE, M. H.; EL–SHEIKH, M. A.; EL–NAGGAR, M. E. **Ultra–Fine Characteristics of Starch Nanoparticles Prepared Using Native Starch With and Without Surfactant.** J Inorg Organomet Polym 24, 515–524. 2014.

HOOVER, R. **Acid–Treated Starches.** Food Reviews International, v. 16, n. 3, p. 369–392, 20 jul. 2000.

HOOVER, R. **Composition, molecular structure and physicochemical properties of tuber and root starches: a review.** Carbohydr. Polym., 45, 253–267, 2001.

HUANG, Q., LI, L., & FU, X. **Ultrasound effects on the structure and chemical reactivity of cornstarch granules.** Starch/Starke, 59, 371–378. 2007.

IIDA Y., TUZIUTI T., YASUI K., TOWATA A., KOZUKA T., **Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization.**

Innovative Food Science & Emerging Technologies, Amsterdam, NL, v.9, n.2, p. 140–146. 2008

IMBERTY, A. *et al.* **New Three–Dimensional Structure for A–Type Starch.** Macromolecular Symposia, v. 20, n. 10, p. 2634–2636, out. 1987.

IMBERTY, A.; PEREZ, S. **A Revisit to the Three–Dimensional Structure of B–Type Starch.** Biopolymers, v. 27, n. 8, p. 1205–1221, ago. 1988.

ISONO, Y., KUMAGAI, T., & WATANABE, T. **Ultrasonic degradation of waxy rice starch.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 58, 1799–1802. 1994.

JACKSON, D. S., CHOTO–OWEN, C., WANISKA, R. D., & ROONEY, L. W. **Characterization of starch cooked in alkali by aqueous high–performance size–exclusion chromatography.** Cereal Chemistry, 65, 493–496. 1988

JAMBRAK, A. R. *et al.* **Ultrasound effect on physical properties of corn starch.** Carbohydrate Polymers, v. 79, n. 1, p. 91–100, jan. 2010.

JANE, J.; WONG, K.; MCPHERSON, A. E. **Branch–structure difference in starches of A– and B–type X–ray patterns revealed by their Naegeli dextrans.** Carbohydrate Research, v. 300, n. 3, p. 219–227, maio 1997.

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

JI, N.; LI, X.; QIU, C.; LI, G.; SUN, Q.; XIONG, L. **Effects of heat moisture treatment on the physicochemical properties of starch nanoparticles.** Carbohydrate Polymers 117, 605–609, 2015.

JIVAN, M. J., MADADLOU, A., & YARMAND, M. **An attempt to cast light into starch nanocrystals preparation and cross–linking.** Carbohydrate Polymers, 141, 1661–1666, 2013.

KARDOS, N., & LUCHE, J. L. **Sonochemistry of carbohydrate compounds.** Carbohydrate Research, 332, 115–131. 2001.

KIM, J.Y.; PARK, D.J.; LIM, S.T. **Fragmentation of Waxy Rice Starch Granules by Enzymatic Hydrolysis.** Cereal Chemistry, v. 85, n. 2, p. 182–187, mar. 2008.

KIM, H.-Y. *et al.* **Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches.** *Starch – Stärke*, v. 64, n. 5, p. 367–373, 19 maio 2012.

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

KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.; BORGES, S.S. **Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom.** *Revista Analytica*, São Paulo, n.3, p. 34–39, 2003.

KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S. **Algumas aplicações analíticas dos ultra-sons.** *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, v. 96, p. 51–6, 2005.

KREUTER, J. **Nanoparticles—a historical perspective.** *International Journal of Pharmaceutics*, 331, pp. 1–10, 2007.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carboidratos em alimentos regionales Iberoamericanos.** São Paulo: Universidade de São Paulo, X 648p. 2011.

LAMANNA, M.; MORALES, N. J.; GARCIA, N. L.; GOYANES, S. **Development and characterization of starch nanoparticles by gamma radiation: Potential application as starch matrix filler.** *Carbohydrate Polymers* 97, 90– 97. 2013.

LAMMERS, K.; ARBUCKLE-KEIL, G.; DIGHTON, J. *Biochem.* 41, 340, 2009.

LECORRE, D.; ANGELLIER-COUSSY, H. **Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review.** *Reactive & Functional Polymers*. 2014.

LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. **Starch nanoparticles: A review.** *Biomacromolecules*, v. 11, n. 5, p. 1139–53, 2010.

LECORRE, D. S.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. **Influence of the Botanic Origin of Starch Nanocrystals on the Morphological and Mechanical Properties of Natural Rubber Nanocomposites.** *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 297, n. 10, p. 969–978, 13 out. 2012b.

LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUN, K.; JONGAROONNGAMSANG, N.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. **Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil.** *Carbohydr Polym*, 74, pp. 209–214, 2008.

LI, J.H. *et al.* **Starch from hull-less barley: V. *In vitro* susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidases.** Food Chemistry, v.84, p.621–632, 2004.

LIMA M.C.P., ANDRADE C.T. **Stroma-free-hemoglobin from bovine blood, Artif. Cells Blood Subst.** Biotechnology, Frankfurt, DE, v.35, n.4, p. 431–447, 2000.

LIU, D., WU, Q., CHEN, H., & CHANG, P. R. **Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro to nanometer.** Journal of Colloid and Interface Science, 339(1), 117–124. 2009.

LOPEZ-RUBIO, A.; FLANAGAN, B. M.; GILBERT, E. P.; GIDLEY, M. J. **A Novel Approach for Calculating Starch Crystallinity and Its Correlation with Double Helix Content: A Combined XRD and NMR Study.** Biopolymers 89, 761–768. 2008.

LUO, Z., FU, X., HE, X., LUO, F., GAO, Q., & YU, S. **Effect of ultrasonic treatment on the physicochemical properties of maize starches differing in amylose content.** Starch/Starke, 60, 646–653. 2008.

MALI, S.; KARAM, L. B.; RAMOS, L. P.; GROSSMANN, M. V. E. **Relationships among the Composition and Physicochemical Properties of Starches with the Characteristics of Their Films.** J. Agric. Food Chem. 52, p. 7720–7725, 2004.

MASON, T. J.; PANIWNYK, L.; LORIMER, J. P. **The uses of ultrasound in food technology.** Sonochemistry, v. 3, n 1, p. 253–269, 1996.

MASON, T. J. **Power ultrasound in food processing. The way forward.** In: POVEY, M. J. W.; MASON, T.J. (eds). Ultrasound in Food Processing. London: Chapman & Hall. p.105–126. 1998.

MIAO, M. *et al.* **Impact of mild acid hydrolysis on structure and digestion properties of waxy maize starch.** Food Chemistry, v. 126, n. 2, p. 506–513, maio 2011.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRY, J. C.; The FASEB Journal, 19, 311. 2005.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. **Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites.** Chemical Society Reviews, 40, 3941–3994. 2011.

MULET, A.; CARCEL, J. A.; SANJUAN, N.; BON, J. **New food drying Technologies – Use of ultrasound.** Food Science and Technology International, London, GB, v.9, n.3, p. 215–218, 2003.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. **Biodegradable polymers as biomaterials.** Progress in Polymer Science, v.32, n. 8–9, p.762–798, 2007.

NITTA S. K., NUMATA K. **Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering.** *Int. J. Mol. Sci.* 14 1629–1654, 2013.

OATES, C.G. **Towards and understanding of starch granule structure and hydrolysis.** Trends in Food Science & Technology, v.8, p.375–382, 1997.

PARKER, R.; RING, S. G. **Aspects of the Physical Chemistry of Starch.** Journal of Cereal Science, v. 34, n. 1, p. 1–17, jul. 2001.

PARK, D–J.; HAN, J–A. **Quality controlling of brown rice by ultrasound treatment and its effect on isolated starch.** Carbohydrate Polymers 137, 30–38. 2016.

PAQUES J.P.; SAGIS, L.M.C.; VAN RIJN, C.J.M.; VAN DER LINDEN, E. **Nanospheres of alginate prepared through w/o emulsification and internal gelation with nanoparticles of CaCO₃.** Food Hydrocolloids 40, pp. 182–188, 2014.

PATIST, A.; BATES, D. **Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production.** Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 9, n. 2, p. 147–154, abr. 2008.

PÉREZ, S.; BERTOFT, E. **The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review.** Starch – Stärke, v. 62, n. 8, p. 389–420, 5 jul. 2010.

QIN, Y.; LIU, C.; JIANG, S.; XIONG, L.; SUN, Q. **Characterization of starch nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Influence of amylose content and starch type.** *Industrial Crops and Products* 87, 182–190. 2016.

QIU, C.; YANG, J.; GE, S.; CHANG, R.; XIONG, L.; SUN, Q. **Preparation and characterization of size-controlled starch nanoparticles based on short linear chains from debranched waxy corn starch.** *LWT – Food Science and Technology* 74, 303–310, 2016.

RAJAM, M.; PULAVENDRAN, S.; ROSE, C.; MANDAL, A.B. **Chitosan nanoparticles as a dual growth factor delivery system for tissue engineering applications.** *Int. J. Pharm.*, 410, 145–152, 2011.

REDDY, K.R.; ALI, S.Z.; BHATTACHARYA, K.R. **The fine structure of rice-starch amylopectin and its relation to the texture of cooked rice.** *Carbohydrate Polymers*, v. 22, p. 267–275, 1993.

RIEUX, A. *et al.* **Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach.** *Journal of Controlled Release*, v. 116, n. 1, p. 1–27, 2006.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. **Effect of acid-methanol treatment on the physicochemical and structural characteristics of cassava and maize starches.** *Starch/Stärke* 60, 417–425. 2008.

SARAVANAKUMAR, G.; JO, D. G.; PARK, J. H.; **Polysaccharide based nanoparticles: A versatile Platform for Drug Delivery and Biomedical Imaging.** *Current Medicinal Chemistry*, 19, 3212–3219. 2012.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SEGUCHI M., HIGASA T., MORI T. **Study of wheat starch structures by sonication treatment.** *Cereal chemistry*, Saint Paul, Minn., US. v.71, n.6, p. 636–639. 1994

SINGH, N. *et al.* **Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources.** *Food Chemistry*, v.81, n.219–231, 2003.

SMITH, A. M. **The biosynthesis of starch granules.** *Biomacromolecules*, v. 2, n. 2, p. 335–41, jan. 2001.

SMITH, J.; BEDROV, D.; SMITH, G. D. **A molecular dynamics simulation study of nanoparticle interactions in a model polymer–nanoparticle composite.** *Composites Science and Technology*, v. 63, n. 11, p. 1599–1605, ago. 2003.

SONG, D., THIOC, Y. S., & DENG, Y. **Starch nanoparticle formation via reactive extrusion and related mechanism study.** *Carbohydrate Polymers*, 85, 208–214. 2011.

SUN, Q. J.; LI, G. H.; DAI, L.; JI, N.; XIONG, L. **Green preparation and characterization of waxy maize starch nanoparticles through enzymolysis and recrystallisation.** *Food Chemistry*, 162, 223–228. 2014.

SUSLICK, K. S. **Sonochemistry.** *Science*, v. 247, n. 4949, p. 1439–1445, mar. 1990.

SUJKA, M., & JAMROZ, J. **Ultrasound–treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour.** *Food Hydrocolloids*, 31, 413–419. 2013.

SZENT–GYORGYI, A. (1933). **Chemical and biological effects of ultrasonic radiation.** *Nature*, 131, 278.

TANG, H.; MITSUNAGA, T.; KAWAMURA, Y. *Carbohydr. Polym.* 63, 555–560. 2006.

THARANATHAN, R.N. **Food–derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity.** *Critical Reviews in Biotechnology*, v.22, p.65–84, 2002.

TESTER, R.F. *et al.* **Starch – composition, fine structure and architecture.** *Journal of Cereal Science*, v.39, p.151–165, 2004.

VAMADEVAN, V. *et al.* **Impact on molecular organization of amylopectin in starch granules upon annealing.** *Carbohydrate Polymers*, v. 98, n. 1, p. 1045–1055, out. 2013.

VANDEPUTTE, G.E. *et al.* **Rice** starches. I. Structural aspects provide insight into crystallinity characteristics and gelatinisation behavior of granular starch. *Journal of Cereal Science*, v.38, p.43–52, 2003a.

VANDEPUTTE, G.E. *et al.* **Rice starches. III.** Structural aspects provide insight in amylopectin retrogradation properties and gel texture. *Journal of Cereal Science*, v.38, p.61–68, 2003c.

VANDEPUTTE, G.E.; DELCOUR, J.A. **From sucrose to starch granule to starch physical behavior:** a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*, v.58, p.245–266, 2004.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. **Ultrasound assisted maceration:** An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*, v. 123, n. 3, p. 905–911, dez. 2010.

WANG, S.; COPELAND, L. **Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality:** A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, n. accept, 25 set. 2013.

WEI, C. *et al.* **Formation of semi-compound C-type starch granule in high-amylose rice developed by antisense RNA inhibition of starch-branching enzyme.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 58, n. 20, p. 11097–104, 27 out. 2010.

WHO/FAO. **Carbohydrates in human nutrition.** Rome: FAO, (FAO food and nutrition paper no. 66). 1998.

WILDI, R. H., VAN EGDOB, E., & BLOEMBERGEN, S. Patent US2011/0042841 A1. 2011.

WU, H.C.H.; SARKO, A. **The double-helical molecular structure of crystalline A-amylose.** *Carbohydrate Research*, v.61, p.27–40, 1978.

WU, Y. *et al.* **Preparation of microporous starch by glucoamylase and ultrasound.** *Starch – Stärke*, v. 63, n. 4, p. 217–225, 4 abr. 2011.

ZENKER, M.; HEINZ, V.; KNORR, D. **Application of Ultrasound–Assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods.** *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 9, p. 1642–1649, set. 2003.

ZHAO, X. H.; LIN, Y. **The impact of coupled acid or pullulanase debranching on the formation of resistant starch from maize starch with autoclaving-cooling cycles.** *European Food Research and Technology*, 1, 179–184. 2009.

ZHENG, J., LI, Q., HU, A., YANG, L., LU, J., ZHANG, X., *et al.* **Dual-frequency ultrasound effect on structure and properties of sweet potato starch.** *Starch/Starke*, 65, 621–627. 2013.

ZHOU, G.; LUO, Z. G.; FU, X. **Preparation and characterization of starch nanoparticles in ionic liquid–in–oil microemulsions system.** *Industrial Crops and Products*, 52, 105–110. 2014.

ZHU, J., LI, L., CHEN, L., & LI, X. **Study on supramolecular structural changes of ultrasonic treated potato starch granules.** *Food Hydrocolloids*, 29, 116–122. 2012.

ZUO, Y. Y. J. *et al.* **Quantification of high–power ultrasound induced damage on potato starch granules using light microscopy.** *Ultrasonics sonochemistry*, v. 19, n. 3, p. 421–6, maio 2012.

ZUO, J. Y., KNOERZER, K., MAWSON, R., KENTISH, S., & ASHOKKUMAR, M. **The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions.** *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 462–468. 2009.

ANEXOS

ANEXO A

**Starch micro and nanoparticles obtained from cassava, corn and yam starches
employing a simple ultrasound method**

*Alyne F.K. Minakawa, Paula C.S. Faria-Tischer and Suzana Mali**

Department of Biochemistry and Biotechnology, CCE, State University of Londrina, PO
BOX 6001, 86051-990, Londrina – PR, Brazil.

Abstract

Starch nanoparticles (SNP) were produced employing a simple ultrasound method without chemical additives from cassava, corn and yam starches, with 18, 25 and 30 % amylose, respectively. Simultaneously, there were obtained starch microparticles (SMP), which were significantly smaller than the native starch granules. The yield of the process was 12 % SNP and 88 % SMP, employing aqueous starch suspensions at 10 % during 30 min of sonication at room temperature. Yam starch (higher amylose content) resulted in smaller SMP (1–3 μm) and SNP (8–32 nm) than those obtained from corn (SMP = 3–6 μm ; SNP = 36–68 nm) and cassava (SMP = 3–7 μm ; SNP = 35–65 nm) starches. Nanoparticles from all starch sources presented lower crystallinity and lower thermal stability than the native starches or SMP. Ultrasonication was efficient to obtain SNP and SMP simultaneously, without addition of any chemical reagent or purification step.

Keywords: Nanoparticles; microparticles; ultrasonication; amylose.

* To whom correspondence should be addressed: Tel: +55 43 3371-4270, Fax: +55 43 3371-4054, E-mail: smali@uel.br

1. Introduction

Starch is the most abundant reserve carbohydrate in plants and it can be obtained from cereals, roots, tubers, legumes and immature fruits (Alcázar–Alay & Meireles, 2015; Tester, Karkalas, & Qi, 2004). Starch is defined as a mix of two distinct polysaccharide fractions, amylose and amylopectin. Amylose is essentially a linear polymer with a few branches and α -D-glucopyranosyl units were linked by (1→4) α -D-glycoside bonds. Amylopectin is a highly branched polymer consisting of chains of α -D-glucopyranosyl units linked mainly by (1→4) linkages with 5 – 6% of (1→6) bonds at the branch points (Buleón, Colonna, Planchot, & Ball, 1998; Tester et al., 2004).

Native starch is present in granules (2 – 100 μm) that varies in its amylose/amylopectin ratio, composition, size, shape, and functionality when obtained from different botanical sources. Native starches are semi-crystalline structures consisting of concentric alternating amorphous and semicrystalline growth rings (120 – 400 nm), composed of blocklets (20 – 50 nm) formed by a cluster structure of alternating crystalline and amorphous lamellae (9 – 10 nm) containing amylopectin and amylose chains (0.1 – 1 nm) (Le Corre & Angellier–Coussy, 2014; Le Corre, Bras, & Dufresne, 2010; Oates, 1997; Zhu, Li, Chen, & Li, 1992). The organization of amylose and amylopectin in the growth rings is still discussed and not fully understood. The crystalline regions are considered to be formed mainly by amylopectin chains packed into a crystalline lattice, and the amorphous regions contain the amylopectin branching points and amylose and amylopectin molecules in a disordered conformation (Copeland, Blazek, Salman, & Tang, 2009; Qi, Tester, Snape, & Ansell, 2003).

The production of nanomaterials from starch has attracted interest of several research groups during the last decade, and there are two types of nanomaterials recurrently reported in

literature: starch nanocrystals (SNC) and starch nanoparticles (SNP). SNC were defined by Le Corre et al. (2014) as crystalline platelets obtained from the removal of the amorphous fractions from the starch granules, generally by acid hydrolysis. SNP are described as spherical particles with variable sizes at the nanoscale and obtained from different starches sources, with variable crystallinity, and may even be totally amorphous (Bel Haaj, Thielemans, Magnin, & Boufi, 2016; Le Corre et al., 2014).

There are several chemical methods were described to obtain SNP described in literature, such acid hydrolysis (Kim, Lee, Kim, Kim, & Lim, 2012) and nanoprecipitation (Chin, Pang, & Tay, 2011; Hebeish, Rafie, El-Sheikh, & El-Naggar, 2014; Qin, Liu, Jiang, Xiong, & Sun, 2016; Saari, Fuentes, Sjöo, Rayner, & Wahlgren, 2017; Sadeghi, Daniella, Uzun, & Kokini, 2017; Tan et al., 2009; Teodoro, Mali, Romero, & Carvalho, 2015). Enzymatic hydrolysis to obtain SNP was reported by Kim & Lim (2008) and other authors reported the combination of methods to produce SNP, such as complexation with n-butanol followed by enzymatic hydrolysis with α -amylases (Kim & Lim, 2009), heat-moisture treatment under mildly acidic condition (Kim, Park, & Kim, 2017) or combination of dry heating under mildly acidic conditions and homogenization (Park, Kim, Cho, Lee, & Kim, 2016).

Currently, there are some studies describing the production of SNP by physical methods, such as high-pressure homogenization (Liu, Wu, Chen, & Chang, 2009), reactive extrusion (Song, Thio, & Deng, 2011), gamma-irradiation (Lamanna, Morales, García, & Goyanes, 2013), stirred media milling (Patel, Chakraborty, & Murthy, 2016) and ultrasonication (Bel Haaj, Magnin, Petrier, & Boufi, 2013; Bel Haaj et al., 2016). These methods are reported as promising because their simplicity, relative rapidity, higher yield, and the absence of purification steps (Bel Haaj et al., 2016), consisting of less polluting alternatives to obtaining SNP.

Ultrasonic treatment is a physical method that can be used to modify starches, and most of the ultrasonic application in starch systems is in a liquid solid bi-phase system with water as the medium. The modifications on starch structure were related to the cavitation phenomenon, which is the collapse of bubbles that propagate as an ultrasound wave passes through an aqueous medium (Zhu, 2015), resulting in two main effects, the breaking of the polymers chains, and moreover, solvent molecules may dissociate to form radicals which may induce polymer degradation (Sujika & Jamroz, 2013).

The objectives of this work were to produce SNP using a simple and rapid ultrasound method without any chemical additive and to characterize them in terms of their morphology, microstructure and thermal properties, and also to evaluate the influence of the different starch sources (corn, cassava and yam) and amylose contents on the properties of the obtained nanoparticles. During the ultrasonication process, simultaneously to the obtainment of the SNP, there were obtained starch microparticles (SMP), which were significantly smaller than the native starch granules, and these particles were also characterized.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Corn starch (25 ± 3 % amylose) was obtained from local market (Maizena Duryea®, Unilever, Brazil), cassava starch (18 ± 2 % amylose) was provided by Yoki Alimentos S.A (Paraná, Brazil) and yam starch (30 ± 3 % amylose) was extracted from fresh yam tubers (*Dioscorea alata*) according to Daiuto, Cereda, Sarmiento and Vilpoux (2005) employing oxalic acid and ammonium oxalate.

2.2. Methods

2.2.1. Nanoparticles production

For the production of the nanoparticles, 100 mL of suspensions of the three types of starch were prepared in water (10 % m/v), and were submitted for 30 min at 40% power output to the ultrasonication process using a Fisher Scientific Sonicator model 505 (Pittsburgh, PA – USA), coupled with a probe with tip diameter of 1.27 cm (Fisher Scientific model FB 4219, Pittsburgh, PA – USA). During this process, the temperature was controlled (25 °C) using a water bath. After this procedure, the suspensions were allowed to stand for 1 h for decantation of the larger particles. The decanted material was called starch microparticles (SMP) and the liquid phase containing the smaller suspended particles was called starch nanoparticle (SNP).

Samples of the starch microparticles (SMP) and nanoparticles (SNP) were transferred to Petri dishes and kept in an air circulating oven (35 °C / 48 h) for drying. The samples of SNP used for the microscopy analyzes were kept in liquid medium under refrigeration temperature (10 °C) to avoid agglomeration.

2.2.2. Nanoparticles e microparticles characterization

2.2.2.1. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM analyses were performed with a FEI Quanta 200 microscope (Oregon, USA) to observe the morphology of native starches and bottom particles (BP). The dried samples were mounted for visualization on bronze stubs using double-sided tape. The surfaces were coated

with a thin gold layer (40 – 50 nm). All samples were examined using an accelerating voltage of 20 kV. The particles sizes of native starch granules and SMP were determined using an image analysis program (ImageJ 1.37v®), and a minimum of 30 measurements were performed for this determination.

2.2.2.2. Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM was performed using a NanoSurf FlexAFM microscope (Liestal, Switzerland). The analysis was conducted in air, and the images were obtained in intermittent contact mode. The scan was performed in the free oscillation frequency with different amplitudes, depending on the stability and contrast obtained. The set point was 30 – 50 % of the amplitude.

2.2.2.3. Blue value (BV)

The BV of the samples was determined according to Guilbert and Spragg (1969) as the absorbance of the samples when solubilized in a lugol solution (2 mg I₂ and 20 mg KI mL⁻¹) and measured in a UV/Vis spectrophotometer (Jenway-6705 UV / Vis-Marconi, Brazil) at 680 nm.

2.2.2.4. X-ray diffraction (XRD)

The diffraction analysis was performed with a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer (Netherlands) using copper K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), a voltage of 40 kV and an operation current of 30 mA. Analyses were performed between $2\theta = 5^\circ$ and $2\theta = 50^\circ$. All assays were performed with ramping at 1° min^{-1} . Relative crystallinity indexes (RCI) of

samples were calculated from the relationship between the crystalline area (sum of all peaks) and the total area of the diffractograms according to Rulland (1961).

2.2.2.5. *Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy*

Dried and pulverized samples were mixed with potassium bromide and compressed into tablets, and the FT-IR analysis was performed using a Shimadzu-8400 FTIR instrument (Japan), and 100 scans were run in the spectral range of 4000–400 cm^{-1} . The spectral resolution was 4 cm^{-1} .

2.2.2.6 *Thermogravimetric analysis (TGA)*

Thermogravimetric analysis (TGA 50 – Shimadzu – Japan) was carried out under a nitrogen atmosphere (50 mL min^{-1}), and the samples (approximately 10 mg) were heated from 0 to 600 $^{\circ}\text{C}$ at a heating rate of 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

2.2.3. *Statistical analysis*

Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's mean comparison test ($p \leq 0.05$) were performed with Statistica software version 7.0 (Statsoft, Oklahoma – USA).

3. Results and discussion

3.1. Morphology of native starches, SMP and SNP

When the suspensions (10 % m/v) of the native starches were submitted to the ultrasonication process, two fractions were obtained: 1) Supernatant fraction, which was denominated nanoparticle (SNP), composed by particles in the nanometric scale when observed by atomic force microscopy; and 2) Decanted fraction, which was called starch microparticles (SMP), obtained by decanting the material after ultrasonication. The average yield of the process was 12 ± 1 % SNP and 88 ± 5 % SMP.

Le Corre et al. (2010; 2014) and Kim et al. (2015) reported that the use of acid hydrolysis to obtain SNP results in yields between 0.5 and 15 %, however large amounts of solvents are used, requiring several purification steps and long treatment times (longer than 5 days). Bel-Haaj et al. (2013; 2016) reported that the yield of SNP produced by ultrasonication (75 min/8 °C) from corn starch and waxy corn starch was close to 100 % when they used a starch suspension with a solid content of 1.5 % (m/v). In our work, the yield of SNP were comparable to the acid hydrolysis, however we used higher amounts of starch by batch (10 % solids), resulting in each batch (30 min of ultrasonication at room temperature) in 1.2 g SNP and simultaneously we obtained 8.8 g of SMP, and we also employed no chemical reagent or any purification step.

Figure 1 displays the morphology of native starch granules and SMP obtained after ultrasonication observed by SEM and Figure 2 displays the morphology of SNP obtained from corn, cassava and yam starches observed by AFM.

Native corn, cassava and yam starches presented different shapes and sizes (Figure 1). Corn starch granules had an irregular polyhedral shape with a smooth surface and about 5 –

20 μm in diameter, which is consistent with other authors (Singh et al., 2003; Qin et al., 2016). Cassava starch granules showed to be circular and truncated, with diameters varying from 7 – 14 μm , values that are in accordance with those reported by Defloor, Dehing and Delcour (1998) and Mali, Karan, & Grossmann, (2004). Yam starch granules were elliptic, with a smooth surface and 12 – 37 μm in diameter (Mali et al., 2004).

As observed by SEM, with ultrasonic treatment, the surface of the granules appears to have been progressively cracked and eroded, releasing smaller particles with different formats of their respective native granules, and in our work we obtained two groups of particles, larger particles called SMP in the micrometric scale (Figure 1) and smaller ones called SNP (Figure 2). The SMP obtained from native starches presented 3 to 6 μm for corn, 3 to 7 μm for cassava and 1 to 3 μm for yam (Table 1), and their surface presented irregularities and visible cracks and fissures (Figure 1). The ultrasound process causes changes in the size and shape of the native starch granules, and these changes may become more drastic with increasing sonication time (Bel Haaj et al., 2013). According to Zhu (2015), cavitation induces bubbles collapsing that results in a jet of water shooting onto the granule surface, which are responsible for the damages of the starch granules.

In Figure 2 it can be observed the SNP obtained by ultrasonication were spherical and it had with diameters ranging from 36 – 68 nm for corn starch, 35 – 65 nm for cassava starch and 8 – 32 nm for yam starch (Table 1). Yam starch was more susceptible to the ultrasonication process, resulting in the SNP and SMP with the lower diameter size, and probably this was related to its higher amylose content when compared with cassava and corn starches, and also this may be associated with the different crystallinity patterns of these starches, which will be discussed below.

3.2 Blue value (BV)

The BV of the samples is presented in Table 2, and it can be observed that for all starches sources, the highest values were obtained for the native starches, followed by SMP, and the lowest values were obtained for the SNP. Possibly, the reduction of particle size led to the reduction of amylose and amylopectin chain sizes, resulting in lower BV values. According to Denardin and Silva (2010), amylose has the ability to interact with iodine, producing a helical inclusion complex with approximately six molecules of amylose per spin, in which iodine is found in the central cavity of the helix. Reddy et al. (1993) report that amylopectin long chains also have the ability to form inclusion complexes with iodine.

According to Sujka and Jamroz (2013), among the characteristics of starches from different sources are their ability to form a blue complex when reacted with iodine, which can be very useful in the analysis of changes in their degree of polymerization caused by physical modifications during ultrasonication process. These authors also report that the ultrasonication of starch from different sources leads to the decrease of their BV, such as those observed in the SMP and SNP obtained in this work, which certainly had amylose and amylopectin chains with lower degrees of polymerization than their respective native starches (Table 2). Cavitation creates locally high pressure and shear force that can break the starch chains, and water is generally considered as a good medium for cavity formation as it has low viscosity and low vapor pressure in comparison to the other solvents (Sujka & Jamroz, 2013; Zhu, 2015).

Comparing the three types of starches (Table 2), the highest BV values were obtained for yam starch that had higher amylose content, followed by corn and cassava starches. Sujka and Jamroz (2013) also reported that starches with higher amylose contents present higher BV values, since amylose is the main responsible for the formation of the complex with iodine.

3.3 X-ray diffraction (XRD)

The diffractograms of the native starches, SMP and SNP are shown in Figure 3. Native corn starch presented peaks at Bragg angles (2θ) around 15.18° , 17.05° , 17.92° and 23.14° (Figure 3A), which are typical of an A-type crystalline structure (Bel-Haaj et al., 2016; Heibesh et al., 2014; Zobel, 1998). Native cassava starch also presented an A-type crystalline structure, with peaks at $2\theta = 15.19^\circ$, 17.02° , 17.92° and 23.26° , agreeing with Qin et al. (2016) reports (Figure 3B). Native yam starch presented a B-type crystalline structure with peaks at $2\theta = 5.6^\circ$, 15.00° , 17.05° , 19.30° , 22.27° , 24.00° and 34.43° (Figure 3C), which agrees with the literature (Hoover, 2001).

Native starch granules show three forms of crystalline structures, referred to as the A, B and C types according to X-ray diffractometry, and the differences between the A and B types are related to the packaging of the double helices formed by amylopectin chains. In the A-type crystalline structure the packaging of double helices is more compact than in B-type, and the C-type is a mixture of A and B patterns (Copeland et al., 2009; Le Corre et al., 2010). In native starches, the B-type crystalline packing is less dense than the A-type, and possibly the B-type crystalline arrangement of starch is more readily disrupted than A-type, which could explain the higher susceptibility of yam starch to ultrasonication process in this work, yam starch resulted in lower SMP and SNP particles sizes when compared to corn and cassava starches (Table 1).

In general, for all starch sources it was observed a decrease in the peaks intensity of SNP samples (Figure 3). For SNP obtained from corn starch it was observed a significant decrease in the intensity of the main peaks when compared to native starch, while the SMP appeared to have been unaffected (Figure 3A). The relative crystallinity index (RCI) was 31, 29 and 8 % for native corn starch, SMP and SNP, respectively (Table 2). For cassava starch

samples, the RCI of SMP (RCI = 28 %) was unaffected when compared to the native starch (RCI = 29 %) but the SNP was totally amorphous when compared to the native starch (Table 2, Figure 3B). For yam starch samples, the RCI was 32, 18 and 8 % for native yam starch, SMP and SNP, respectively (Table 2).

Apparently, high intensity sonication at room temperature (25°C) for 30 min strongly affected the crystalline structure for all starches sources, resulting in NP with low crystallinity or totally amorphous (Table 2, Figure 3), possibly the ultrasonication impacted on the arrangement of the double helical strands of the starch chains responsible to the formation of the crystalline fractions. According to Bel Haaj et al. (2013), the high ultrasonication results in disruption of the crystalline structure of starch generating nanoparticles with low crystallinity or with an amorphous character. Heibesh et al. (2014) also reported that the decrease or disappearance of the diffraction peaks may results from decrease in the crystallite size that occurs from the reduction in particle size. Starch nanoparticles obtained by different methods, such as nanoprecipitation (Teodoro et al., 2015), gamma irradiation (Lamana et al., 2013), stirred media milling (Patel et al., 2016) or reactive extrusion (Song et al., 2011) also presented lower crystallinity than their native starches. Teodoro et al. (2015) that the low crystallinity of these materials could be important for their application as carriers of several compounds, such as drugs in a drug delivery system.

A relationship was observed between the amylose content and the RCI of the NP obtained in this work; the RCI of the NP from yam starch (higher amylose content) was higher than the RCI of corn starch NP (intermediate amylose content), while the NP obtained from the cassava starch (lower amylose content) were completely amorphous (Table 2). Qin et al. (2016) obtained nanoparticles by nanoprecipitation from starches with different amylose contents process and observed the same trend of high amylose starches with resulting in nanoparticles with high RCI.

3.4 Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy

FT-IR spectra of the native starches and their SMP and SNP are shown in Figure 4. Typical FT-IR bands of starches were observed in all samples of native starches and their SMP (Figure 4): a broad band in the range of 3700 – 3200 cm^{-1} region related to the hydrogen bonded hydroxyl group stretching of starch; a band at 2934 cm^{-1} assigned to the $-\text{CH}_2$ stretching vibrational modes; a 2095 cm^{-1} band corresponding to the stretching vibration of C-H and C-C bonds; and a band at 1645 cm^{-1} due to the to the stretching and bending vibration of hydrogen bonding $-\text{OH}$ groups of the water (Lammers, Arbuckle-Keil, & Dighton, 2009; Qin et al., 2016).

The following bands were also observed in the native starch samples and their SMP: a strong absorption band at 1022 cm^{-1} is due to strengthening of the C-OH bond; bands at 1150, 1047 and 995 cm^{-1} associated to the stretching vibration of C-O bonding in C-O-H and C-O-C group in the anhydrous glucose ring, respectively (Heibesh et al., 2014); and the band at 760 cm^{-1} that was attributed to the C-O-C group vibrations of the α (1 \rightarrow 4) glycosidic bonds (Kizil, Irudayaraj, & Seetharamn, 2002).

It has been reported on literature that the FT-IR spectrum is sensitive to the short-range order of starch, and the ratio between the intensities of the bands at 1047 and 1022 cm^{-1} can indicate the amount of short-range ordering of the starch granules, since the band 1047 cm^{-1} can be associated to the ordered structure of starch and the band at 1022 cm^{-1} to the amorphous fraction (Kim et al., 2017; Park et al., 2016; Teodoro et al., 2015; Van Soest, Torunois, Wit, & Vliegthart, 1995). In this work, the ratios 1047/1022 cm^{-1} were calculated from the FT-IR spectra of the samples and were presented in Table 3, and for all starch sources, the SNP presented the lower ratios 1047/1022 cm^{-1} values, suggesting a reducing

amount of ordered fractions in SNP compared to the native starch granules and SMP. These results were consistent to DRX values.

3.5 Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermal stability of the native starches, SMP and SNP from corn, cassava and yam starches was analyzed by TGA. The obtained curves are shown in Figure 5 and the T_{\max} values (maximum thermal degradation temperature) are shown in Table 3.

All samples of native starches and their respective SMP samples showed T_{\max} values between 320 °C and 327 °C (Table 5), and the SNP samples showed T_{\max} between 290 °C and 306 °C, suggesting a decrease in the thermal stability of these materials. Possibly, the higher thermal stability of the native starches and SMP compared to the SNP occurs due to the compact semicrystalline structure and high degree of polymerization of the native starches and SMP, as observed by BV, DRX and FT-IR results, and more ordered structures require more energy to complete its degradation.

Qin et al. (2016) reported that native starches from different sources present maximum thermal degradation at temperatures between 280 and 340 °C, and their respective nanoparticles had T_{\max} between 294 °C and 303 °C, values close to those found in this work. Lamana et al. (2013) reported that NPs obtained by gamma irradiation presented lower T_{\max} when compared to their respective native starches, and that the increase in the number of hydroxyl groups on the surface of nanoparticles may favor their thermal degradation process.

4. Conclusions

It was possible to obtain starch nanoparticles (SNP) using a rapid and simple ultrasonication process, and at the same time particles in micrometric scale (SMP), which were obtained with smaller sizes than the native starch granules.

The average yield of the process was 12 ± 1 % SNP and 88 ± 5 % SMP, employing aqueous starch suspensions at 10 % (m/v) during 30 min of sonication at room temperature. It was not used any chemical reagent or any purification step was required.

Yam starch, with higher amylose content and a B-type crystallinity was more susceptible to the ultrasonication process, generating smaller SMP and SNP than those obtained from corn and cassava starches. The SNP obtained for cassava starch showed to be amorphous, whereas in the SNP obtained for yam and corn starches presented relative crystallinity indexes of 8 and 9 %, respectively, smaller values than their respective native starches. All SNP presented lower thermal stability than SMP and the native starches.

Acknowledgment

The authors wish to thank the Laboratory of Microscopy and Microanalysis (LMEM) and the Laboratory of X-Ray Diffraction (LARX), State University of Londrina, for the analyses, CNPq – Brazil (No. 479768–2012–9) and Fundação Araucária – Brazil for financial support.

References

- Alcázar–Alay, S.C., & Meireles, M.A.A. (2015). Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(2), 215–236.
- Bel Haaj, S., Magnin, A., Pétrier, C., & Boufi, S. (2013). Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1625–1632.
- Bel Haaj, S., Thielemans, W., Magnin, A., & Boufi, S. (2016). Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: A comparative study. *Carbohydrate Polymers*, 143, 310–317.
- Buleón, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: Structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(2), 85–112.
- Chang, Y., Yan, X., Wang, Q., Ren, L., Tong, J., & Zhou, J. (2017). High efficiency and low cost preparation of size controlled starch nanoparticles through ultrasonic treatment and precipitation. *Food Chemistry*, 227, 369–375.
- Chin, S.F., Pang, S.C., & Tay, S.H. (2011). Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1817–1819.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M.C. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1527–1534.
- Daiuto, E., Cereda, M., Sarmiento, S., & Vilpoux, O. (2005). Effects of extraction methods on Yam (*Dioscorea alata*) starch characteristics. *Starch/Staerke*, 57(3–4), 153–160.

- Defloor, I., Dehing, I., & Delcour, J. A. (1998). Physico–Chemical Properties of Cassava Starch. *Starch – Stärke*, 50(2–3), 58–64.
- Denardin, C. C., & Silva, L. P. Da. (2009). Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico–químicas. *Ciência Rural*, 39(3), 945–954.
- Gilbert, G. A., & Spragg, S. P. (1964). Iodometric determination of amylose. In R. L. Whistler (Ed.), *Methods in carbohydrate chemistry* (pp. 168). New York: Academic Press.
- Hebeish, A., El–Rafie, M.H., El–Sheikh, M.A., & El–Naggar, M.E. (2014). Ultra–Fine Characteristics of Starch Nanoparticles Prepared Using Native Starch With and Without Surfactant. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 24(3), 515–524.
- Hoover, R. (2001). Compositions, molecular structure, and physiochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, 45, 253–267.
- Kim, H.Y., Lee, J.H., Kim, J.Y., Lim, W.J., & Lim, S.T. (2012). Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. *Starch/Staerke*, 64(5), 367–373.
- Kim, J.Y., & Lim, S.T. (2008). Fragmentation of waxy rice starch granules by enzymatic hydrolysis. *Cereal Chemistry*, 85(2), 182–187.
- Kim, H.Y., Park, S.S., & Lim, S.T. (2015). Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 607–620. Kim, J.H., Park, D.H., & Kim, J.Y. (2017). Effect of heat–moisture treatment under mildly acidic

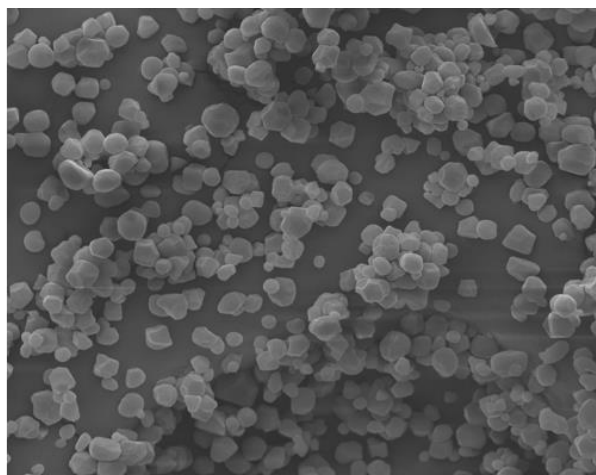
- condition on fragmentation of waxy maize starch granules into nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 63, 59–66.
- Kim, J.Y., & Lim, S.T. (2009). Preparation of nano-sized starch particles by complex formation with n-butanol. *Carbohydrate Polymers*, 76(1), 110–116.
- Kizil, R., Irudayaraj, J., & Seetharaman, K. (2002). Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3912–3918.
- Lamanna, M., Morales, N.J., Garcia, N.L., & Goyanes, S. (2013). Development and characterization of starch nanoparticles by gamma radiation: Potential application as starch matrix filler. *Carbohydrate Polymers*, 97(1), 90–97.
- Lammers, K., Arbuckle-Keil, G., & Dighton, J. (2009). FT-IR study of the changes in carbohydrate chemistry of three New Jersey pine barrens leaf litters during simulated control burning. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(2), 340–347.
- Le Corre, D., Bras, J., & Dufresne, A. (2010). Starch nanoparticles: A review. *Biomacromolecules*, 11(5), 1139–1153.
- Le Corre, D., & Angellier-Coussy, H. (2014). Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review. *Reactive and Functional Polymers*, 85, 97–120.
- Liu, D., Wu, Q., Chen, H., & Chang, P.R. (2009). Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro- to nanometer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 339(1), 117–124.

- Mali, S., Karam, L.B., Ramos, L.P. (2004). Relationships among the Composition and physicochemical properties of starches with the characteristics of their films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7720–7725.
- Oates, C. G. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science and Technology*, 8(11), 375–382.
- Park, E. Y., Kim, M. J., Cho, M., Lee, J. H., & Kim, J. Y. (2016). Production of starch nanoparticles using normal maize starch via heat–moisture treatment under mildly acidic conditions and homogenization. *Carbohydrate Polymers*, 151, 274–282.
- Patel, C.M., Chakraborty, M., & Murthy, Z.V.P. (2016). Fast and scalable preparation of starch nanoparticles by stirred media milling. *Advanced Powder Technology*, 27(4), 1287–1294.
- Qi, X., Tester, R.F., Snape, C.E., & Ansell, R. (2003). Molecular basis of the gelatinisation and swelling characteristics of waxy rice starches grown in the same location during the same season. *Journal of Cereal Science*, 37(3), 363–376.
- Qin, Y., Liu, C., Jiang, S., Xiong, L., & Sun, Q. (2016). Characterization of starch nanoparticles prepared by nanoprecipitation: influence of amylose content and starch type. *Industrial Crops and Products*, 87, 182–190.
- Reddy, K.R., Ali, S.Z., & Bhattacharya, K.R. (1993). The fine structure of rice–starch amylopectine and its relation to the texture of cooked rice. *Carbohydrate Polymers*, 22(4), 267–275.
- Ruland W. (1961). X–ray determination of crystallinity and diffuse disorder scattering. *Acta Crystallographica*, 14, 1180–1185.

- Saari, H., Fuentes, C., Sjöö, M., Rayner, M., & Wahlgren, M. (2017). Production of starch nanoparticles by dissolution and non-solvent precipitation for use in food-grade Pickering emulsions. *Carbohydrate Polymers*, *157*, 558–566.
- Sadeghi, R., Daniella, Z., Uzun, S., & Kokini, J. (2017). Effects of starch composition and type of non-solvent on the formation of starch nanoparticles and improvement of curcumin stability in aqueous media. *Journal of Cereal Science*, *76*, 122–130.
- Song, D., Thio, Y.S., & Deng, Y. (2011). Starch nanoparticle formation via reactive extrusion and related mechanism study. *Carbohydrate Polymers*, *85*(1), 208–214.
- Sujka, M., & Jamroz, J. (2013). Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour. *Food Hydrocolloids*, *31*(2), 413–419.
- Tan, Y., Xu, K., Li, L., Liu, C., Song, C., & Wang, P. (2009). Fabrication of size-controlled starch-based nanospheres by nanoprecipitation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *1*(4), 956–959.
- Teodoro, A. P., Mali, S., Romero, N., & De Carvalho, G. M. (2015). Cassava starch films containing acetylated starch nanoparticles as reinforcement: Physical and mechanical characterization. *Carbohydrate Polymers*, *126*, 9–16.
- Tester, R.F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch – Composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, *39*(2), 151–165.
- van Soest, J.J.G., Tournois, H., de Wit, D., & Vliegenthart, J.F.G. (1995). Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, *279*(C), 201–214.

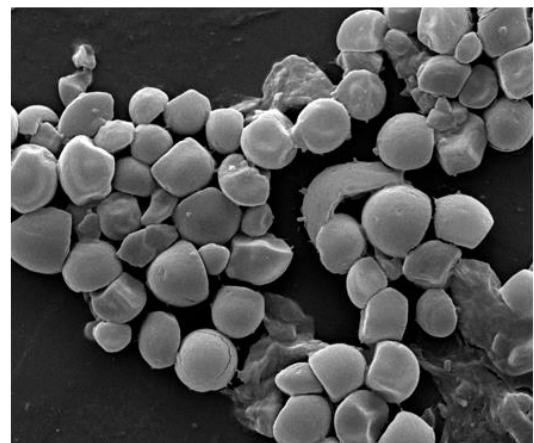
Zhu, F. (2015). Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. *Trends in Food Science and Technology*, 43(1), 1–17.

Zobel, H.F. (1988). Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch - Stärke*, 40(2), 44–50.

FIGURE CAPTIONS**Figure 1.** SEM images of native starch granules and starch microparticles (SMP).

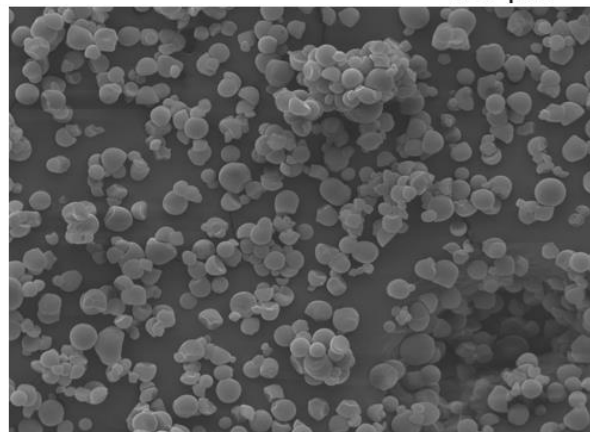
Native corn starch

100 μm



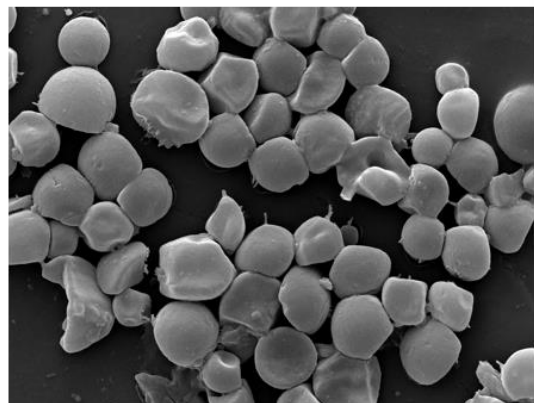
SMP corn starch

10 μm



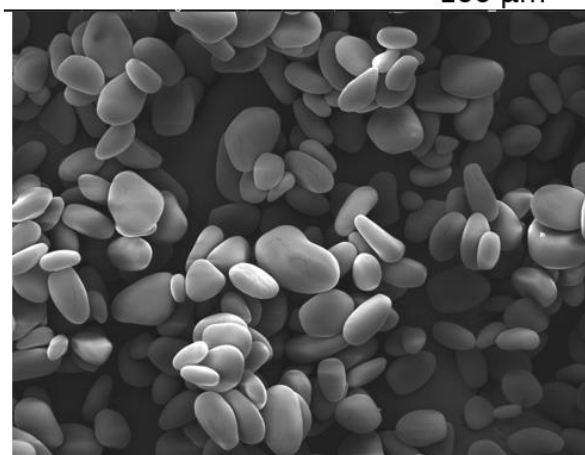
Native cassava starch

100 μm



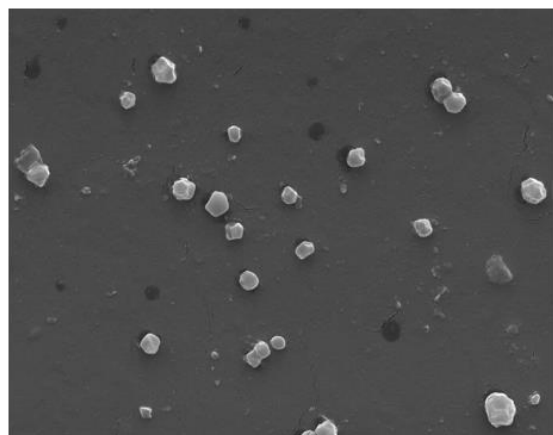
SMP cassava starch

10 μm



Native yam starch

100 μm



SMP yam starch

10 μm

Figure 2. AFM images of starch nanoparticles from corn (A), cassava (B) and yam (C) starches.

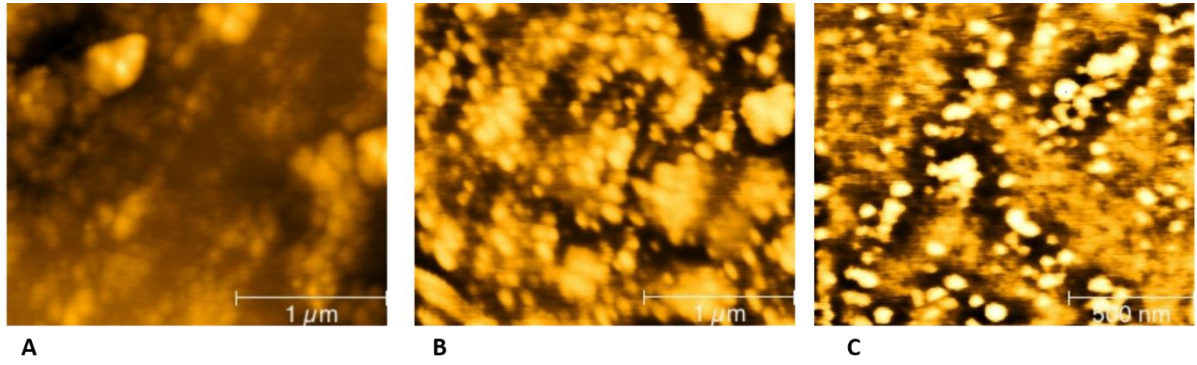


Figure 3. X-ray diffraction patterns of native starches, starch microparticles (SMP) and starch nanoparticles (SNP) from cassava, corn and yam.

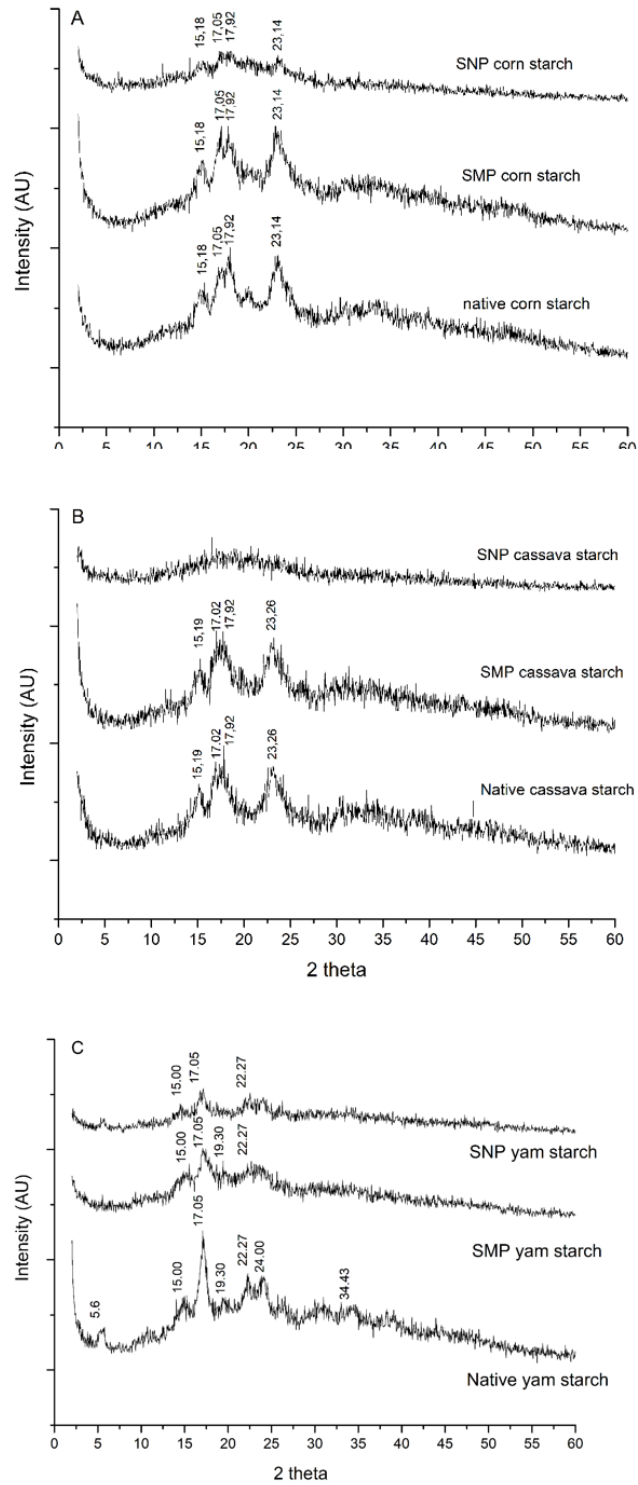


Figure 4. FT-IR spectra of native starches, starch microparticles (SMP) and starch nanoparticles (SNP) from cassava, corn and yam.

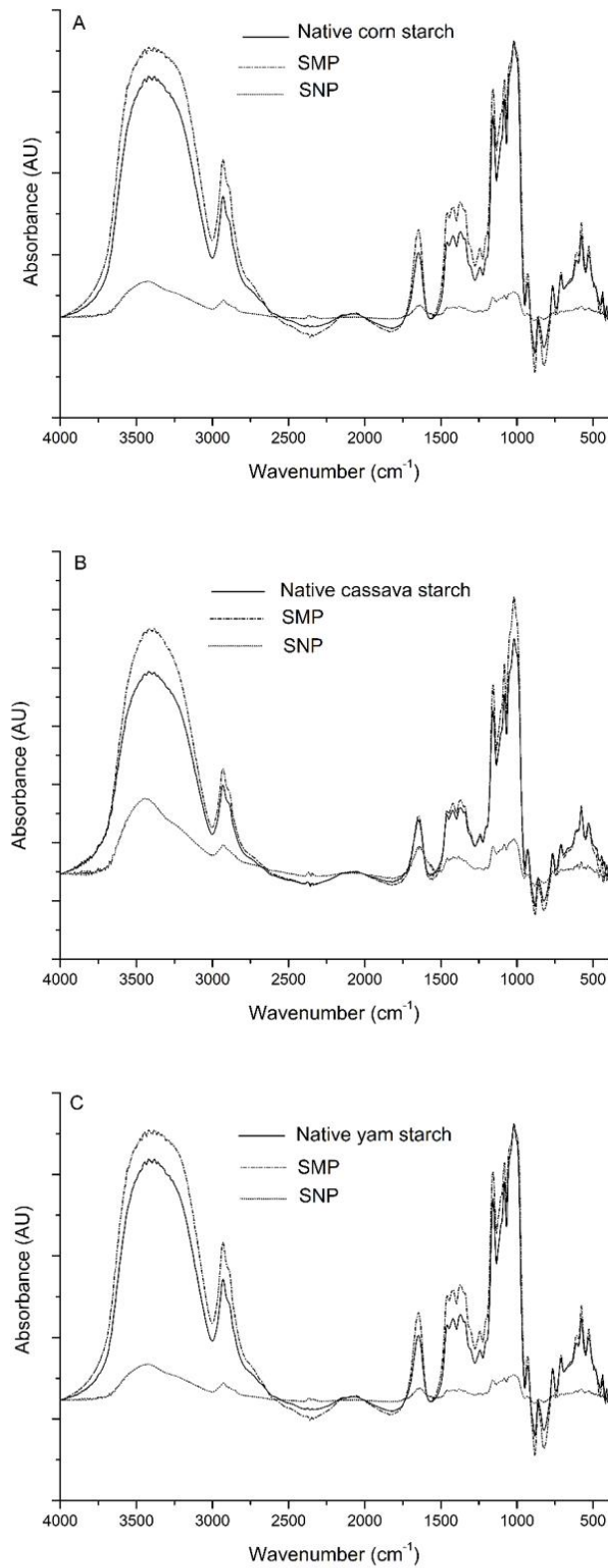


Figure 5. TGA curves of native starches, starch microparticles (SMP) and starch nanoparticles (SNP) from cassava, corn and yam.

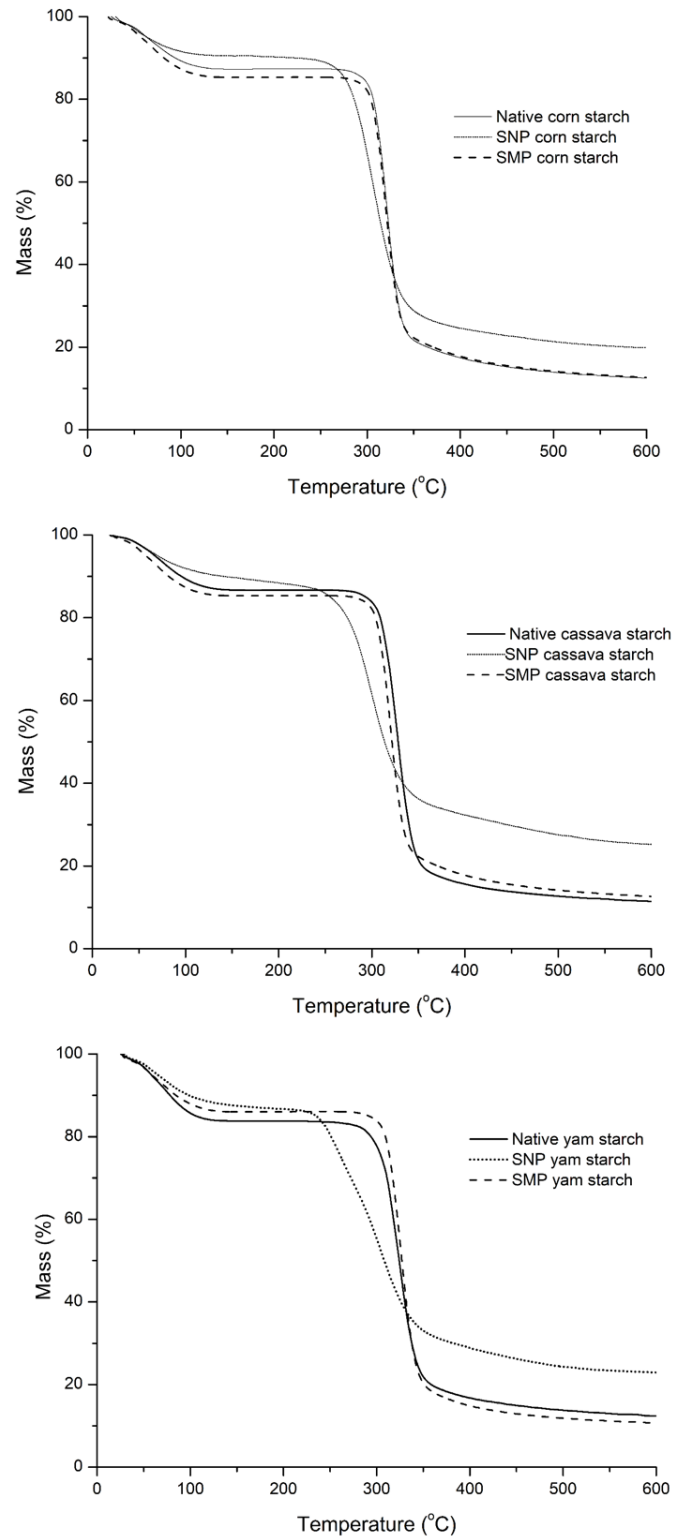


Table 1 – Particles size of native starches, microparticles and nanoparticles obtained from corn, cassava and yam starches.

Sample	Particles sizes		
	Corn	Cassava	Yam
Native starches ^a	5 – 20 μm	7 – 14 μm	12 – 37 μm
Microparticles (SMP) ^a	3 – 6 μm	3 – 7 μm	1 – 3 μm
Nanoparticles (SNP) ^b	36 – 68 nm	35 – 65 nm	8 – 32 nm

^a – Calculated from MEV images; ^b – Calculated from AFM images.

Table 2 – Blue value and relative crystallinity index (RCI) of native starches, microparticles and nanoparticles obtained from corn, cassava and yam starches.

Sample	Corn		Cassava		Yam	
	BV	RCI (%)	BV	RCI (%)	BV	RCI (%)
Native starches	0.317	31	0.259	29	0.397	32
Microparticles (SMP)	0.300	29	0.219	28	0.322	18
Nanoparticles (SNP)	0.120	8	0.099	0	0.158	9

Table 3 – Ratio 1047/1022 cm^{-1} calculated from FT-IR spectra and maximum thermal degradation temperature (T_{max}) obtained from TGA analysis of native starches, microparticles and nanoparticles obtained from corn, cassava and yam starches.

Sample	Corn		Cassava		Yam	
	Ratio	T_{max}	Ratio	T_{max}	Ratio	T_{max}
	1047/1022	($^{\circ}\text{C}$)	1047/1022	($^{\circ}\text{C}$)	1047/1022	($^{\circ}\text{C}$)
Native starches	1.06	321.26	1.04	327.30	1.06	324.19
Microparticles (SMP)	1.04	320.04	1.03	323.14	1.04	326.12
Nanoparticles (SNP)	0.80	306.41	0.95	299.71	1.00	290.27