



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Jéssica Carolina Mathias

Efeito da sonicação seguida de desramificação enzimática nas
características estruturais e digestibilidade de amidos com alto teor de
amilose

São José do Rio Preto
2016

Jéssica Carolina Mathias

Efeito da sonicação seguida de desramificação enzimática nas
características estruturais e digestibilidade de amidos com alto teor de
amilose

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos: área de concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco

São José do Rio Preto
2016

Mathias, Jéssica Carolina.

Efeito da sonicação seguida de desramificação enzimática nas características estruturais e digestibilidade de amidos com alto teor de amilose / Jéssica Carolina Mathias. -- São José do Rio Preto, 2016
66 f. : il., tabs.

Orientador: Célia Maria Landi Franco

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Amido - Estrutura. 3. Alimentos - Análise. 4. Digestão. 5. Ultrassom. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 664.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Jéssica Carolina Mathias

Efeito da sonicação seguida de desramificação enzimática nas
características estruturais e digestibilidade de amidos com alto teor de
amilose

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos: área de concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Manuel Salvador Vicente Plata Oviedo
UFTPR – Campo Mourão

Prof. Dr^a. Vânia Regina Nicoletti Telis
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
Novembro de 2016

Dedico este estudo
especialmente aos meus pais
Roberto e Joelma, e minha irmã
Ana Luiza.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus,

Pelo dom da vida, bênçãos, pelo amparo nos momentos difíceis, e por guiar meu caminho me concedendo oportunidades. Agradeço por tudo que conquistei até agora, e peço sabedoria para conquistar ainda mais.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/IBILCE) e ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, sobretudo ao laboratório de cereais, raízes e tubérculos por disponibilizar suas instalações e equipamentos para realização deste projeto.

À Prof.^a Célia Maria Landi Franco, por todo empenho e dedicação.

Aos meus pais Roberto Carlos Mathias e Joelma Cristina Braga Mathias, minha irmãzinha Ana Luiza Mathias, por todo amor, carinho, incentivo, auxílio, paciência nos momentos que precisei me ausentar, e pela credibilidade no meu potencial.

Aos técnicos de laboratórios e principalmente aos amigos Jaqueline, Jefferson, Mariana, Márcia e em especial à Flávia pelos auxílios, ensinamentos, paciência, toda colaboração prestada, inúmeros momentos de descontração, além da grande amizade construída.

Ao Prof^o Javier Telis Romero, por disponibilizar o ultrassom para sonicação das amostras.

À Cargill Agrícola S/A (São Paulo, Brasil) pelo fornecimento do amido comercial de milho denominado *AmyloGel 03003*.

Agradeço também à CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

RESUMO

Amido resistente tipo 3 (AR₃) é o amido ou fração de amido que não sofre a ação das enzimas digestivas do trato gastrointestinal, sendo constituído principalmente por amilose retrogradada devido à sua forte tendência à reassociação. A sonicação é um tratamento físico capaz de quebrar as cadeias de amido em tamanhos moleculares menores por meio de cavitação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ultrassom seguido da desramificação do amido com isoamilase na formação de AR₃ e suas características estruturais a partir de amidos de ervilha rugosa (AER) e de milho com alto teor de amilose (AMAA). Suspensões de amido (6,5% m/v) foram gelatinizadas por autoclavagem (121°C/30 min), submetidas ao tratamento com ultrassom a uma frequência de 30 KHz, potência de 30 W por diferentes tempos (0, 5, 10 e 15 min), desramificados com isoamilase (3U/g amido), autoclavados (121°C/30min), resfriados (4°C/24h), precipitados com etanol e liofilizados. Os amidos nativos e modificados foram caracterizados quanto ao teor de amilose, tamanho molecular dos componentes do amido (GPC), distribuição do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina (HPAEC-PAD), padrão cristalino e cristalinidade relativa (difração de raios-X), propriedades térmicas (DSC) e teor de AR₃. Os AER e AMAA nativos tiveram 43,2 e 50,3 % de amilose, respectivamente, padrão cristalino tipo B e alta proporção de cadeias laterais longas da amilopectina (GP ≥37). A sonicação provocou, em ambos os amidos, a degradação das cadeias de maior comprimento (GP ≥37) e aumento na proporção de cadeias menores (GP 1 -5 e 6 - 12) da amilopectina, enquanto causou o rompimento das cadeias de materiais intermediários e cadeias mais longas de amilose à frações de menor massa molecular com maior capacidade de complexação com iodo. As entalpias de gelatinização e a cristalinidade relativa dos amidos modificados aumentaram com o aumento do tempo de sonicação, independente da fonte de amido. AER e AMAA gelatinizados tiveram, como esperado, baixo teor de amido resistente (1,92% e 2,57%, respectivamente). Após desramificação e retrogradação, o teor de AR₃ aumentou para 50,56% e 53,38% nos AER e AMAA, respectivamente. A sonicação precedendo a desramificação causou um aumento no teor de AR₃ em 21% e 48% para AER e AMAA, atingindo 61,15% e 79,17%, respectivamente, quando 15 min de sonicação foi usado. Esses resultados indicam que o uso de uma tecnologia limpa como o ultrassom precedendo a desramificação dos amidos é um modo eficiente para potencializar a produção de AR₃.

Palavras chave: amido resistente, ultrassom, retrogradação, estrutura.

ABSTRACT

Resistant starch type 3 (RS3) is starch or the fraction of starch that does not suffer the action of digestive enzymes from the gastrointestinal tract and is mainly composed of retrograded amylose due to its greater tendency to reassociation. Sonication is a physical treatment capable of breaking down starch chains into smaller molecular size fractions by cavitation. The aim of this study was to evaluate the effect of ultrasound followed by starch debranching with isoamylase on the formation AR₃ and their structural characteristics from wrinkled pea starch (WPS) and high amylose maize starch (HAMS). Starch suspensions (6.5% w/v) were gelatinized by autoclaving (121°C/30 min), subjected to ultrasound treatment at a frequency of 30 kHz, power of 30 W for different times (0, 5, 10 and 15 min), debranched by isoamylase (3U/g for 48 h), autoclaved (121 °C/30 min), cooled (4°C/24h), ethanol precipitated and lyophilized. The native and modified starches have been characterized as the apparent amylose content, molecular size distribution of starch components (GPC), amylopectin branched-chain length distribution (HPAEC-PAD), X-ray pattern and relative crystallinity (X-ray diffraction), thermal properties (DSC) and RS content. The native WPS and HAMS had 43,2 and 50,3% of amylose, respectively, B-type crystalline pattern and a high proportion of long branch chains of amylopectin (GP ≥37). Sonication resulted in degradation of the longer chains (DP ≥37) and increase in the proportion of smaller chains (GP 1-5 and 6-12) of amylopectin for both the starches, while caused a break of the intermediate material and longer amylose chains in smaller molecular weight amylose fractions with higher capacity of iodine complexing. The retrogradation enthalpy and relative crystallinity of the modified starches increased with increasing sonication time, independent of the starch source. Gelatinized WPS and HAMS had, as expected low SR content (1.92% and 2.57%, respectively). After debranching and retrogradation, the AR₃ content increased to 50,56% and 53,38% for the WPS and HAMS, respectively. Sonication preceding debranching caused an increase in AR₃ content of 21% and 48% WPS and HAMS reaching 61.15% and 79.17%, respectively, when 15 min sonication time was used. These results indicate that the use of a clean technology as the ultrasound preceding debranching of the starch is an effective way to enhance the production AR₃.

Keywords: resistant starch, ultrasound, retrogradation, structure.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática do processo de gelatinização e retrogradação do amido.....9
- Figura 2:** Representação esquemática do amido resistente do tipo 3 (AR₃). A) Modelo de micela. B) Modelo de lamela16
- Figura 3:** Perfis de eluição dos AER e AMAA (controle) obtidos por cromatografia de permeação em gel Sepharose CL2B. (●) Blue value; (○) carboidratos totais39
- Figura 4:** Perfis de eluição dos AER e AMAA modificados obtidos por cromatografia de permeação em Sepharose CL-2B. (○) carboidratos totais. AER0 e AMAA0 – amidos gelatinizados, desramificados e retrogradados; AER5 e AMAA5 – amidos gelatinizados, sonicados (5 min), desramificados e retrogradados; AER10 e AMAA10 – amidos gelatinizados, sonicados (10 min), desramificados e retrogradados; AER15 e AMAA15 - amidos gelatinizados, sonicados (15 min), desramificados e retrogradados.41
- Figura 5:** Distribuição do comprimento de cadeias lineares dos amidos gelatinizados e sonicados. AER0 e AMAA0 – amidos gelatinizados, desramificados e retrogradados; AER5 e AMAA5 - amidos gelatinizados, sonicados (5 min), desramificados e retrogradados; AER10 e AMAA10 - amidos gelatinizados, sonicados (10 min), desramificados e retrogradados; AER15 e AMAA15 - amidos gelatinizados, sonicados (15 min), desramificados e retrogradados.45
- Figura 6:** Difractogramas de raios-X dos AER e AMAA (a) nativos; (b) gelatinizados, desramificados e retrogradados; (c) gelatinizados, sonicados (5 min), desramificados e retrogradados; (d) gelatinizados, sonicados (10 min), desramificados e retrogradados; (e)

gelatinizados, sonificados (15 min), desramificados e retrogradados; e suas respectivas
cristalinidades relativas (%).47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química ¹ (%) dos amidos de ervilha e milho com alto teor de amilose	37
Tabela 2: Afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto dos AER e AMAA* ..	38
Tabela 3: Afinidade por iodo e teores de amilose aparente das dextranas produzidas após modificação e teor de amilose obtido pela área dos gráficos obtidos na figura 4.	43
Tabela 4: Distribuição do comprimento das cadeias lineares da amilopectina dos amidos modificados.....	46
Tabela 5: Propriedades térmicas dos AER e AMMA nativos e modificados.....	50
Tabela 6: Teor de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR) nos amidos de ervilha e milho com alto teor de amilose submetidos aos diferentes tratamentos de sonicação.....	51

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 AMIDO	4
3.1.1 Amilose e amilopectina	5
3.1.2 Gelatinização e retrogradação do amido	7
3.1.3 Amidos com alto teor de amilose	9
3.1.4 Amido de ervilha	10
3.1.5 Amido de milho com alto teor de amilose	12
3.2 AMIDO RESISTENTE	12
3.2.1 Tipos de amido resistente	14
3.3 FORMAÇÃO DE AR ₃	17
3.4 ULTRASSOM	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 MATERIAIS	27
4.2 MÉTODOS	27
4.2.1 Isolamento do amido de ervilha rugosa	27
4.2.2 Composição Química	28
4.2.3 Teor de amilose	28

4.2.3.1 Isolamento da amilopectina	28
4.2.3.2 Determinação dos teores de amilose aparente e absoluto	29
4.2.4 Tratamento dos amidos	29
4.2.4.1 Testes preliminares	29
4.2.4.2 Tratamento com ultrassom	30
4.2.4.3 Desramificação dos amidos	30
4.2.4.4 Retrogradação do amido	31
4.2.5 Distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos por cromatografia de permeação em gel (GPC).....	31
4.2.6 Distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina	32
4.2.7 Difração de Raios-X	33
4.2.8 Propriedades Térmicas	33
4.2.9 Determinação do teor de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR)	34
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 TESTES PRELIMINARES	36
5.2 ISOLAMENTO DO AMIDO	36
5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS AMIDOS	36
5.4 AFINIDADE POR IODO E TEOR DE AMILOSE APARENTE E ABSOLUTO DOS AMIDOS NATIVOS	38
5.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X E CRISTALINIDADE RELATIVA.....	46
5.7 PROPRIEDADES TÉRMICAS	49
5.8 TEORES DE AMIDO RAPIDAMENTE DIGERÍVEL (ARD), LENTAMENTE DIGERÍVEL (ALD) E RESISTENTE (AR ₃).....	51

6 CONCLUSÕES	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

Amido resistente (AR) pode ser definido como a soma do amido e dos seus produtos de degradação que não são absorvidos no intestino delgado de humanos saudáveis, apresentando comportamento fisiologicamente similar ao das fibras alimentares. A partir de sua estrutura física e de sua suscetibilidade ao ataque enzimático, o AR pode ser classificado em cinco tipos sendo: amido resistente tipo I (AR₁), o amido fisicamente inacessível como o encontrado nos grãos; amido resistente tipo II (AR₂) refere-se aos grânulos de amido naturalmente resistentes; amido resistente tipo III (AR₃) consiste no amido retrogradado formado a partir da reassociação das cadeias de amido; amido resistente tipo IV (AR₄) é o amido quimicamente modificado especialmente os com ligações cruzadas; amido resistente tipo V (AR₅), o amido complexado com lipídeos (complexo amilose-lípideo). Dentre os diferentes tipos de amidos resistentes, o AR₃ se destaca devido a sua maior estabilidade térmica resistindo à maioria das condições de processamento de alimentos, bem como preservando suas características nutricionais.

AR₃ consiste basicamente de amilose retrogradada devido a sua maior facilidade de reassociação, mas estudos têm mostrado que a desramificação do amido seguida de métodos físicos visando potencializar a retrogradação tem promovido um substancial aumento no teor de AR₃. É possível potencializar a retrogradação do amido a partir da liberação de fragmentos lineares que apresentam maior mobilidade e tendência à reassociação. Um comprimento adequado de cadeia é requerido para a recristalização (formação de duplas hélices) das moléculas de amilose e amilopectina para potencializar a formação de amido resistente. Diversas pesquisas tem mostrado que a hidrólise ácida ou enzimática precedendo a desramificação tem possibilitado a obtenção de dextrinas com tamanhos moleculares menores que apresentam tamanhos mais adequados para a retrogradação.

O tratamento físico com ultrassom também possibilita o rompimento das cadeias de amido pela quebra de suas ligações glicosídicas, resultando em dextrinas de menor tamanho molecular. Esta técnica pode ser uma alternativa aos métodos convencionais químicos e enzimáticos usados como pré-tratamento do amido precedendo a desramificação para obtenção de cadeias lineares com tamanhos mais adequados para a reassociação potencializando assim a retrogradação e formação de AR₃.

O termo ultrassom refere-se a ondas sonoras que excedem o limite da audição humana (18 kHz) criando vibrações de alta energia. Com base na capacidade do solvente para absorver e transmitir a energia de ultrassom, essas vibrações causam cavitação e, através deste processo, a técnica de ultrassom pode modificar química e fisicamente o amido. No entanto, dependendo das condições experimentais, o ultrassom pode causar tanto a cisão molecular das cadeias de amido em maior ou menor grau, como também ter pouca influência sobre as moléculas de amido. Portanto, as condições experimentais usadas durante a modificação do amido determinam a extensão da alteração molecular e degradação dessas cadeias.

Nesse sentido, a sonicação pode ser um pré-tratamento com o conceito de química e tecnologia verde para aplicações ambientalmente amigáveis, a ser usado para romper as cadeias de amido em tamanhos mais adequados à reassociação e assim potencializar a produção de AR₃.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ultrassom seguido da desramificação enzimática usando isoamilase na formação de amido resistente do tipo 3 (AR₃) e suas características estruturais a partir de amidos com altos teores de amilose.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar estrutural e físico-quimicamente os amidos nativos de ervilha rugosa (AER) e milho com alto teor de amilose (AMAA).

Modificar os amidos previamente gelatinizados usando diferentes tempos de ultrassom antes da desramificação com isoamilase para produção de AR₃.

Caracterizar estruturalmente os amidos obtidos após sonicação, desramificação e retrogradação;

Determinar a digestibilidade dos amidos obtidos após modificação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AMIDO

O amido é uma matéria-prima abundante, renovável, biodegradável e não tóxica que pode ser extraído com elevada pureza por meio de processos industriais relativamente simples e ser facilmente convertido em várias substâncias por processos químicos e bioquímicos.

De acordo com Singh et al. (2003), o amido é amplamente utilizado pela indústria de alimentos nacional e internacional como melhorador das propriedades funcionais em sistemas alimentícios, e, dependendo de sua fonte botânica e natureza (regular ou modificado), pode ser empregado para fornecer textura, servir como espessante, proteger os alimentos durante o processamento, entre outras funções.

O amido é sintetizado na forma de grânulos com forma e tamanho dependentes da fonte botânica e cujas propriedades físico-químicas e funcionais estão diretamente relacionadas às suas características estruturais (JANE, 2006).

O grânulo de amido, composto por dois polímeros de glicose, amilose e amilopectina, em proporções que variam de acordo com a fonte botânica (BILIADERIS, 1991), apresenta uma estrutura hierárquica que pode ser observada em microscopia óptica e eletrônica (COPELAND et al., 2009).

A amilose e a amilopectina estão organizadas nos grânulos na direção radial, ligadas entre si por pontes de hidrogênio formando uma estrutura semicristalina com regiões cristalinas associadas à amilopectina e regiões amorfas à amilose. Assim os grânulos são birrefringentes mostrando uma cruz de polarização bem definida (cruz de malta) quando observados sob luz polarizada (CEREDA et al., 2001).

3.1.1 Amilose e amilopectina

A amilose é um polímero essencialmente linear formado por unidades de D-glicose ligadas em α -(1→4), com poucas ramificações (0,1 a 2,2 %) nas ligações α -(1→6). Essas ramificações são separadas por grandes distâncias permitindo às moléculas agirem como sendo essencialmente lineares. Seu grau de polimerização e massa molecular são dependentes da fonte botânica e também do processamento empregado na extração do amido, podendo conter de 200 a 2000 unidades de glicose e massa molecular média variando entre $1,5 \times 10^5$ a 10^6 (BULÉON et al., 1998). Está localizada nas camadas de baixa densidade dos anéis de crescimento, embora essas moléculas também possam estar intercaladas com a amilopectina nas camadas cristalinas, interrompendo o empacotamento cristalino da amilopectina (JANE, 2006; COPELAND et al., 2009).

Normalmente a molécula de amilose se encontra na forma helicoidal, com átomos de hidrogênio no interior da hélice tornando-o hidrofóbico e permitindo a formação de complexos com ácidos graxos livres, álcoois e iodo. A complexação com iodo é uma ferramenta importante para a caracterização do amido, pois, forma uma cor azul intensa (HOOVER, 2001; THOMAS; ATWELL, 1999), desse modo, métodos colorimétricos podem ser empregados na sua determinação (COPELAND et al., 2009).

De acordo com Buléon et al. (1998), no caso de amidos de cereais, a amilose pode estar presente no grânulo de amido nativo de duas maneiras principais, isto é, como amilose livre de lipídios ou na forma de complexos amilose-lipídio. No que se refere ao complexo amilose-lipídeo, a parte alifática do ácido graxo fica no interior da hélice da amilose.

A amilopectina é uma molécula altamente ramificada composta por centenas de cadeias curtas de (1→4)- α -D-glicoses que são interligadas pelas ligações α -1,6 responsáveis pelas ramificações. Apresenta grau de polimerização da ordem de 10^4 a 10^5 , massa molecular da ordem de $(50-500) \times 10^6$, e comprimento das ramificações variável sendo comum

apresentar entre 20 e 30 unidades de glicose (CEREDA et al., 2001). A molécula é organizada em cadeias que são classificadas em A, B e C de acordo com seu padrão de substituição. A cadeia C é a principal, carrega o grupo redutor da molécula e numerosas ramificações de cadeias A e B, as quais formam duplas hélices (COPELAND et al., 2009). As cadeias A se localizam na região periférica, não são ramificadas e são conectadas às cadeias B ou C por ligações α -(1 \rightarrow 6). As cadeias B apresentam ramificações e se conectam às outras cadeias por ligações α -(1 \rightarrow 6), podendo ter uma ou mais cadeias A ou B ligadas nos pontos de ramificação (CEREDA et al., 2001; HOOVER, 2001). As cadeias B são classificadas em B1 a B4 dependendo do número de “clusters” em que a cadeia toma parte. Essas moléculas são constituídas por regiões amorfas alternando-se com regiões cristalinas, as quais formam duplas hélices na amilopectina (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

As cadeias de amilopectina com mais de 10 unidades de glicose são organizadas em duplas hélices que estão arranjadas em duas formas cristalinas, A e B, que podem ser identificadas através de padrões de raios-X (COPELAND et al., 2009). O padrão tipo A, comum em amidos de cereais, possui uma estrutura mais compacta do que o tipo B que apresenta uma estrutura mais aberta com um centro hidratado (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997). A forma polimórfica tipo C é uma mistura dos tipos A e B, podendo ser classificada em C_A e C_B, baseado na proximidade de suas semelhanças aos tipos A e B (BULÉON et al., 1998; TESTER, 1997).

Diversos modelos de estrutura para a amilopectina foram propostos com relação ao modo como as cadeias estão arranjadas para formar uma estrutura altamente ramificada. No modelo de estrutura mais aceito, *clusters* ou “cachos” associados de cadeias com DP igual a 15 passam a constituir uma camada cristalina com 60 Å de espessura na direção axial. Cada *cluster* seria formado pela associação de 2 ou 3 cadeias A e as cadeias B poderiam se estender por dois ou mais *clusters* (FRENCH, 1973; ROBIN et al., 1974). Estas estruturas são

extremamente compactas, resultando em regiões cristalinas que são resistentes à hidrólise tanto ácida quanto enzimática. Estas regiões se alternam com regiões amorfas que, por sua vez, são pouco ramificadas e menos compactas (CORDENUNSI, 2006).

Gallant, Bouchet e Baldwin (1997), sugeriram um modelo de “clusters” para a amilopectina e uma estrutura lamelar para o grânulo de amido. Esses autores sugeriram que as lamelas amorfas e cristalinas da amilopectina são organizadas em estruturas maiores, mais ou menos esféricas, denominadas de bloquetes. O diâmetro desses bloquetes depende da fonte botânica do amido e da sua localização no grânulo, de modo que sua localização parece ser um fator importante na resistência do grânulo de amido à ação enzimática, porém fatores como teor de amilose e interação com amilopectina também devem ser considerados.

3.1.2 Gelatinização e retrogradação do amido

Grânulos de amido em contato com água fria hidratam ligeiramente (10-20 %) devido à difusão e absorção de água nas regiões amorfas. No entanto, quando os grânulos são aquecidos em água a temperaturas maiores, se atinge um ponto em que os grânulos inchados apresentam um fenômeno irreversível, isto é, perdem a ordem estrutural (perde-se a birrefringência) devido à fusão dos cristais (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006).

Esse aquecimento do amido em água promove a ruptura das pontes de hidrogênio entre as cadeias poliméricas, enfraquecendo o grânulo. Acredita-se que a expansão inicial aconteça na região amorfa do grânulo onde as pontes de hidrogênio são menos numerosas e os polímeros são mais suscetíveis à dissolução. Como a estrutura começa a enfraquecer, o grânulo absorve água e incha, coexistindo graus diferentes de rompimento estrutural e inchamento devido aos grânulos não gelatinizarem simultaneamente (THOMAS; ATWELL, 1999).

Desse modo, a gelatinização do amido é geralmente definida como uma transição de ordem-desordem irreversível de grânulos de amido a partir de um estado estruturado para um estado desordenado (pastas de amido) mediante aquecimento na presença de água (ALISHAHI, 2015). O comportamento da pasta é influenciado pelo tipo de amido, concentração, taxa de cisalhamento, perfil tempo-temperatura, bem como pH e presença de outros ingredientes (THOMAS; ATWELL, 1999).

A respeito do fenômeno de transição que ocorre quando se aquecem suspensões de amido, este tem sido investigado usando-se a técnica analítica DSC - calorimetria diferencial de varredura. Quando aplicada ao amido, a calorimetria diferencial de varredura fornece medidas quantitativas do fluxo de calor associado à gelatinização. Para a detecção das fases de transição nos amidos, os métodos de DSC têm a vantagem de serem independentes da birrefringência dos grânulos (BELLO-PÉREZ; MONTEALVO; ACEVEDO, 2006; HOOVER, 2001).

No processo de retrogradação, as moléculas de amido gelatinizado, em virtude de uma forte tendência à reassociação, agregam-se formando duplas hélices cristalinas estabilizadas por pontes de hidrogênio (LOBO; SILVA, 2003).

A tendência à retrogradação é dependente do teor de amilose. Amidos de leguminosas, em geral, têm maior taxa de retrogradação em comparação com amidos de cereais devido ao seu maior teor de amilose (SINGH et al., 2012). Entre os amidos de leguminosas, a taxa de retrogradação tem sido relatada na seguinte ordem: ervilha forrageira > feijão > grão de bico > vigna mungo > feijão guandu. Esta tendência que se correlaciona diretamente com o teor de amilose desses amidos demonstra que o processo de retrogradação ocorre mais rapidamente entre as moléculas de amilose devido à sua estrutura linear, portanto, quanto maior o conteúdo de amilose maior a tendência à retrogradação do amido (SINGH et al., 2003).

Ambos os processos supracitados estão resumidos esquematicamente na Figura 1.

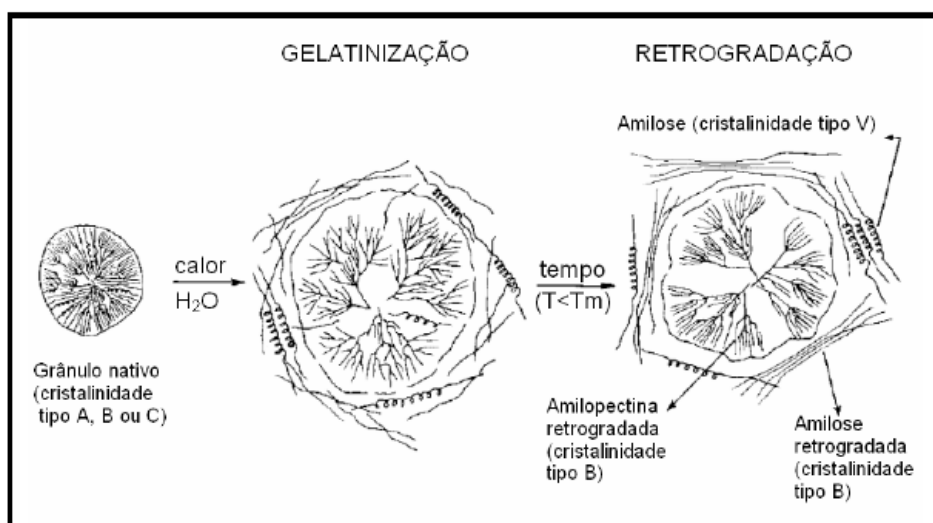


Figura 1: Representação esquemática dos processos de gelatinização e retrogradação do amido.

Fonte: Biliaderis (1991).

3.1.3 Amidos com alto teor de amilose

O teor de amilose nos grânulos de amido varia de acordo com a fonte vegetal de origem, mas, geralmente, encontra-se nos intervalos de 20-30% em amidos normais ou regulares (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009), ~1% em amidos cerosos e \geq 50% em amidos com alto teor de amilose (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

Os amidos com alto teor de amilose podem ser obtidos a partir de mutação genética e muitas variedades de cereais (milho, trigo, arroz) com elevado teor de amilose foram desenvolvidas através de mutação ou de abordagens de reprodução transgênica (HUANG, 2015). Esses amidos gelatinizam e formam filmes com facilidade devido ao alto conteúdo de amilose (BULÉON et al., 1998) e contribuem para melhorar as propriedades de resistência à tração e de barreira a gases em filmes à base de amidos. A permeabilidade muito baixa ao oxigênio em filmes de amido com alto teor de amilose torna-os muito útil para a conservação dos alimentos sensíveis ao processo de oxidação, tais como produtos de carne, peixe ou nozes (CANO et al., 2015). Esses amidos também são usados principalmente para conferir

crocância e prevenir, por exemplo, a penetração excessiva de óleo durante uma fritura. Também são muito utilizados na indústria de balas de gomas, contribuindo com 25-50% do total de amido utilizado nas formulações (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

Devido à maior facilidade das moléculas de amilose se retrogradarem, amidos com alto teor de amilose têm uma alta resistência à digestão e fornecem muitos benefícios potenciais para a saúde de seres humanos (CAI et al., 2014b; LIN et al., 2016).

O teor de amilose influencia grandemente as propriedades físico-químicas e funcionais do amido (CAI et al., 2014a). Devido à proporção de amilose e amilopectina, diferentes de amidos cerosos e amidos regulares, os de alto teor de amilose muitas vezes apresentam diferenças importantes em sua estrutura. Amidos ricos predominantemente em amilose exibem, por exemplo, uma estrutura cristalina do tipo B (TAN et al., 2015).

Amidos de legume em geral apresentam maior teor de amilose que os amidos de cereais e raízes. O teor de amilose para o amido de ervilha é elevado e varia de 24% a 65%, dependendo da variedade. A variedade de ervilha rugosa apresenta maior quantidade de amilose comparada à ervilha lisa. No entanto, na maioria dos casos, a proporção de amilose/amilopectina é maior para o amido de milho com alto teor de amilose (CANO et al., 2015).

3.1.4 Amido de ervilha

De acordo com Liu et al. (2015), as leguminosas são as sementes comestíveis de plantas pertencentes à família das *Leguminosae* que tem 16.000-19.000 espécies em aproximadamente 750 gêneros. Destas espécies, apenas 12 são amplamente utilizados pela indústria de alimentos, incluindo lentilhas, feijão, ervilha e grão de bico.

A ervilha (*Pisum sativum* L.) é uma das mais antigas culturas alimentares, considerado um legume de grão de estação fria que fornece uma boa fonte de proteína na dieta e energia para seres humanos e animais (SHI et al., 2014). Apresenta boa fonte de nutrientes, além de componentes biologicamente ativos (NGUYEN; GIDLEY; SOPADE, 2015), e elevados níveis de aminoácidos essenciais, tais como, lisina e triptofano, que são geralmente baixos em grãos de cereais (KUMARI et al., 2015). Segundo Canniatti-Brazaca (2006), a ervilha apresenta em média 22-29% de proteína, 2-4% de lipídeo, 3-4% de cinzas, 10-34% de fibra bruta e 29-53% de carboidrato.

Até a década de 80 todas as ervilhas (*Pisum sativum*) consumidas no Brasil eram importadas, porém, toda a demanda atual é atendida pela produção nacional sendo que a cultivar *Utrillo* é uma das que tem crescido no país (POLESI; SARMENTO; ANJOS, 2011).

Na espécie *P. sativum* L. há dois fenótipos de sementes diferentes: lisa (com uma superfície de semente lisa) e ervilha rugosa (semente com superfície enrugada). Os dois tipos são geneticamente diferentes e produzem amidos com diferentes morfologias granulares e características (SHI et al., 2014), sendo que amidos de ervilha são caracterizados por alto teor de amilose variando entre 30% e 60% entre as diferentes espécies (SUN; XIONG, 2014). Alguns autores citam um teor de 88% de amilose em ervilhas rugosas (BILIADERIS; GRANT, VOSE, 1979; COLLANA; MERCIER, 1984). A síntese de grânulos menores e o aumento no teor de amilose no amido de ervilha ocorrem nas fases finais do desenvolvimento da semente, sendo assim, o conteúdo de amilose é maior nos grânulos menores. Além disso, a amilose dos grânulos menores apresenta maior massa molecular (RATNAYAKE; HOOVER; WARKENTIN, 2002).

O tamanho dos grânulos do amido de ervilha é variável entre 2 e 40 μm . A grande parte da morfologia dos grânulos desse amido é oval, no entanto grânulos esféricos, elípticos, redondos e com formatos irregulares também são encontrados (DAVYDOVA et al., 1994).

3.1.5 Amido de milho com alto teor de amilose

O milho (*Zea mays* L.) é considerado uma das culturas mais antigas sendo cultivado em muitas regiões do mundo (ALVES et al., 2014), e classificado como a terceira cultura alimentar cereal mais importante do mundo após o trigo e o arroz (AYDINSAKIR et al., 2013). Segundo Aydinsakir e seus colaboradores (2013), o milho além de ser uma cultura importante para atender à crescente demanda mundial de alimentos é importante também para a produção de biocombustíveis.

No Brasil, o milho tem importância econômica e social, isto é, tanto na agricultura familiar como no agronegócio. É também considerado uma cultura de grande utilidade na sociedade moderna como um dos produtos agrícolas de maior distribuição mundial na produção e consumo (ARRUDA et al., 2013). É a fonte principal de energia na alimentação humana, principalmente nos países em desenvolvimento (ALVES et al., 2014).

De acordo com Rosas-Castor et al. (2014), o milho contém aproximadamente 72% de amido, 10% de proteína, 4% de lipídeo, e fornece ~ 365 kcal/100 g.

Ao contrário de amidos normais, o amido de milho com alto teor de amilose é um tipo de amido modificado geneticamente. Seu teor de amilose varia de aproximadamente 40-70%. Este tipo de amido apresenta características únicas, úteis para aplicações específicas, como resistência ao inchaço, geleificação rápida, dentre outras (CHUNG; JEONG; LIN, 2003).

3.2 AMIDO RESISTENTE

O amido resistente (AR) é definido como o amido ou fração de amido que resiste à digestão no intestino delgado dos humanos saudáveis e pode ser fermentado pela microflora do intestino grosso (SHU; SUN; WU, 2014) de modo que os produtos desta fermentação são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), acético, propiônico, e butírico, além de gases como hidrogênio, dióxido de carbono e metano (TOPPING; CLIFTON, 2001).

De acordo com Englyst, Kingman e Cummings (1992), dependendo da velocidade na qual o amido é digerido *in vitro*, ele pode ser classificado em três diferentes classes: amido rapidamente digerível (ARD) é aquele que ao ser submetido à incubação com amilase pancreática e amiloglucosidade em uma temperatura de 37°C converte-se em glicose em 20 minutos; amido lentamente digerível (ALD), quando submetido as condições anteriores é convertido em glicose em 120 minutos; e amido resistente (AR) que resiste à ação das enzimas digestivas após 120 minutos.

Há um número de efeitos fisiológicos potenciais que tem sido atribuído às características não digeríveis de AR com benefícios à saúde, tais como prevenção do câncer de cólon (MORALES-MEDINA et al., 2014; FUENTES-ZARAGOSA et al., 2011; LEE; MOON, 2015), efeitos de hipoglicemia e os níveis de colesterol (TOPPING; CLIFTON, 2001; ZHANG et al., 2014), substrato para o crescimento de micro-organismos probióticos (KORUS et al., 2009; ZHANG et al., 2014), redução da formação de pedra biliar, prevenção de doenças gastrointestinais (ZHANG et al., 2014; LEE; MOON, 2015), efeitos positivos em osteoporose (MORALES-MEDINA et al., 2014), aumento da absorção de minerais, assim como absorção de zinco, íons de cálcio e magnésio (BROWN, 2004; ZHOU et al., 2014), prevenção de doenças cardiovasculares (SHU; SUN; WU, 2014; ZHANG et al., 2014), obesidade (AIGSTER et al., 2011; ZHOU et al., 2014), diabetes tipo II (SANG; PRAKASH; SEIB, 2007; KIATPONGLARP et al., 2015; ZHOU et al., 2014). Desse modo, é possível constatar que o AR tem um impacto equivalente e/ou de qualidade superior para a saúde humana quando comparado a produtos tradicionalmente ricos em fibras (CHUNG; DONNER; LIU, 2011).

As formas de AR comercialmente disponíveis têm sabor insípido, cor branca, tamanho de partícula adequado e características que causam menor interferência na textura dos alimentos (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006). Em relação às fibras insolúveis

tradicionais, o AR apresenta ainda melhor aparência e textura. Quando formulado em diferentes produtos, tem uma sensação menos arenosa na boca e tem sido usado principalmente como ingrediente funcional em produtos alimentares de baixa umidade, particularmente em produtos de padaria tais como pães, *muffins*, cereais matinais (ZHANG; JIN, 2011), biscoitos e bolachas devido a menor absorção de água que as fibras (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006). De acordo com Chung, Donner e Liu (2011), o amido resistente tem um perfil de baixa caloria e pode ser usado também como um agente de volume em formulações com reduzido teor de gordura ou açúcar.

O AR pode ser encontrado naturalmente nos alimentos entre 0-4%, no entanto, uma maior quantidade na dieta é recomendada, devido aos seus efeitos preventivos e terapêuticos para a saúde (KAHRAMAN; KOKSEL; NG, 2015). Fuentes-Zaragosa et al., (2011) recomendam um mínimo de 5g por dia para que os efeitos fisiológicos possam ser constatados.

3.2.1 Tipos de amido resistente

Atualmente o AR é classificado em cinco diferentes tipos: tipo 1 (AR₁) – amido fisicamente inacessível; tipo 2 (AR₂) – grânulo de amido resistente; tipo 3 (AR₃) – amido retrogradado; tipo 4 (AR₄) – amido quimicamente modificado; e tipo 5 (AR₅) – amido complexado com lipídeos (complexos amilose-lipídeo) (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011).

A forma física do alimento pode impedir o acesso da amilase pancreática e diminuir a digestão do amido, fato que o caracteriza como amido resistente tipo 1, isto é, o amido torna-se resistente simplesmente porque as enzimas amilolíticas não têm acesso ao mesmo (NUGENT, 2005; WALTER; SILVA; EMANUELLI, 2005). O AR₁ é encontrado nas

paredes celulares de grãos e de sementes inteiras ou parcialmente moídas (AIGSTER et al., 2011; WALKER; SILVA; EMANUELLI, 2005).

O AR₂ refere-se a grânulos de amidos nativos, cuja cristalinidade os torna menos susceptíveis à hidrólise (OSORIO-DÍAZ et al., 2002). Embora o grau de resistência da estrutura dependa da fonte, geralmente grânulos dos tipos B e C tendem a ser mais resistentes à digestão enzimática que os polimorfos do tipo A (LOBO; SILVA, 2003; THEMEIER et al., 2005; WALTER; SILVA; EMANUELLI, 2005). O AR₂ pode ser encontrado em batatas cruas, bananas verdes, e amidos com alto teor de amilose (AIGSTER et al., 2011), assim como em ervilha rugosa (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; THEMEIER et al., 2005).

O processo de retrogradação caracteriza o amido resistente tipo 3 (REDDY; SURIYA; HARIPRIYA, 2013). O AR₃ é produzido pela gelatinização do amido e subsequente retrogradação, uma recristalização lenta de componentes de amido mediante arrefecimento. Esse tipo de amido resistente é composto principalmente de amilose retrogradada em virtude de sua forte tendência à reassociação. Portanto, o teor de amilose é o principal fator que rege a formação de AR₃ (LIÃO; HUNG, 2015; SHI et al., 2013). Os estudos de Zhang e Jin (2011) constataram que o amido de milho com alto teor de amilose é o mais frequentemente usado para a preparação de AR₃. Além disso, alguns estudos também reforçam que quanto maior o nível de amilose, maior a fração de AR₃ formado (LERTWANAWATANA, et al., 2015).

Vários fatores influenciam a qualidade e quantidade de amido resistente tipo 3 tais como a relação amilose e amilopectina, comprimento das cadeias do polímero ou grau de polimerização (GP), retrogradação ou recristalização da amilose, teor de água, condições de processamento, e presença de lipídio e outros componentes que influenciam a gelatinização e/ou o processo de retrogradação (LERTWANAWATANA; FRAZIER; NIRANJAN, 2015).

Processamentos de alimentos que envolvem calor e umidade, na maioria dos casos, destroem AR₁ e AR₂, mas podem formar AR₃ (FARAJ; VASANTHAN; HOOVER, 2004).

A representação esquemática do AR₃ formado em uma solução aquosa de amilose retrogradada é ilustrada na Figura 2.

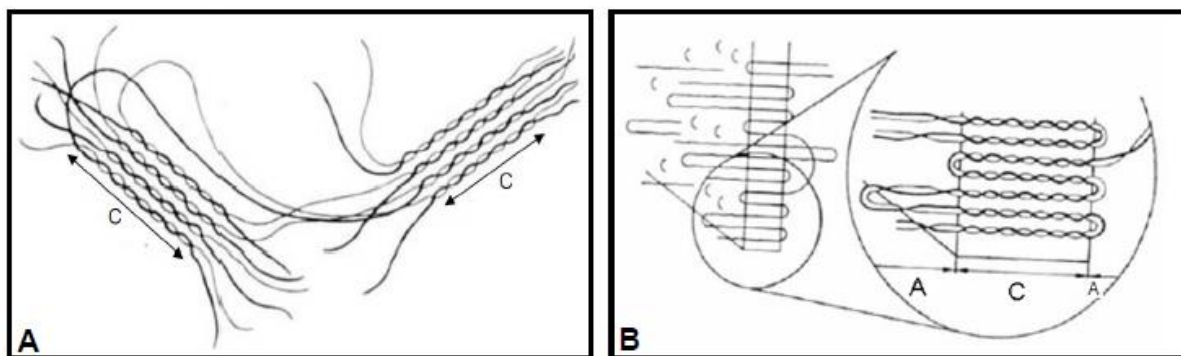


Figura 2: Representação esquemática do amido resistente tipo 3 (AR₃). A) Modelo de micela: Duplas hélices são ordenadas em estrutura cristalina (C) intercaladas com regiões amorfas suscetíveis às enzimas. B) Modelo de lamela: Estruturas lamelares são formadas por dobras das cadeias poliméricas. As zonas de dobra são amorfas (A), enquanto o centro da lamela é cristalino (C).
Fonte: Sajilata, Singhal e Kulkarni (2006).

A modificação química do amido é o que caracteriza o AR₄, incluindo os amidos substituídos quimicamente com grupamentos ésteres e éteres, bem como amidos com ligações cruzadas (SUI; SHAH, BEMILLER, 2011).

O AR₅ é o amido complexado com lipídeos (JIANG et al.; 2010; FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011). A amilose pode se complexar com lipídeos formando uma estrutura rígida que restringe a expansão dos grânulos durante o processo de cocção. O complexo amilose-lipídeo é resistente à hidrólise enzimática e sua formação ocorre mais comumente em amidos com alto teor de amilose, mais suscetíveis à retrogradação (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011).

Dentre os cinco tipos de AR, o AR₃ é de particular interesse devido à sua estabilidade térmica, e é especialmente útil como uma fonte de amido resistente termicamente estável para aplicações alimentícias comerciais, uma vez que resiste a maioria das condições de

processamento de alimentos, bem como preserva as características nutricionais (FARAJ; VASANTHAN; HOOVER, 2004).

3.3 FORMAÇÃO DE AR₃

O AR₃ é o amido retrogradado constituído principalmente de amilose ou frações lineares retrogradadas. Os métodos para sua produção se baseiam na gelatinização do amido ou dextrinas com posterior retrogradação, sendo que os métodos físicos mais empregados para potencializar a retrogradação são a autoclavagem seguida de resfriamento, a extrusão, além de forneamento, irradiação de microondas, piroconversão e parboilização (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006).

O amido, condicionado a diferentes teores de umidade que passa por tratamento de autoclavagem em diferentes temperaturas e tempos de processamento, apresenta aumento considerável no teor de AR (SILJESTROM; ASP, 1985). No entanto, segundo Dundar e Gocmen (2013), a formação de AR com autoclavagem pode ser afetada pelo teor de amilose, o tempo e a temperatura de tratamento.

Eerlingen e Delcour (1995) avaliaram o teor de AR do amido de milho com alto teor de amilose (70%) e constataram que esse teor pode ser elevado em até 40% quando submetido a 20 ciclos de autoclavagem e resfriamento.

A desramificação do amido seguida de um processo que potencialize a retrogradação é considerada um método eficiente e comum na produção de AR₃, pois esse tratamento promove principalmente a quebra das moléculas de amilopectina em fragmentos de menor massa molecular, aumentando o número de moléculas lineares menores que as de amilose, o que aumenta a tendência à retrogradação do amido gelatinizado quando o mesmo é submetido ao resfriamento e repouso (GONZÁLEZ-SOTO et al., 2004). Esses autores trabalharam com amido de banana desramificado com pululanase, autoclavado e armazenado a 4 °C por 24 h, e

obtiveram um aumento de 100% no teor de AR em relação ao controle (amido não desramificado).

O tipo de enzima utilizada no processo de desramificação também é importante. Isoamilase e pululanase são as duas enzimas desramificantes mais comumente usadas. De acordo com Li et al. (2013), a isoamilase é uma das enzimas desramificantes do amido que hidrolisa ligações α -1,6-glicosídicas da amilopectina e dextrinas limites para produzir amilose e oligossacarídeos, enquanto a pululanase hidrolisa também as ligações α -1,6 tendo como principal substrato a pululana, mas também atua sobre a amilopectina (SAID; ROSEMEIRE; PIETRO, 2004). Assim, em comparação com a pululanase, a isoamilase tem atividade superior para desramificação da amilopectina, embora haja pouca informação disponível para isoamilase em comparação com inúmeras pesquisas relativas a pululanase de várias origens (CAI et al., 2010).

A hidrólise enzimática envolve principalmente a quebra das moléculas do amido em fragmentos de baixa massa molecular, o que resulta no aumento da tendência a retrogradação sob resfriamento e repouso do amido gelatinizado (GONZÁLEZ-SOTO et al., 2004; LEONG; KARIM; NORZIAH, 2007).

Estudos tem mostrado que a hidrólise enzimática ou ácida precedendo a desramificação do amido tem potencializado a formação de AR₃ por possibilitar a formação de frações lineares com tamanhos mais adequados para a reassociação e retrogradação (HASJIM; JANE, 2009; CURTIS; WANG, 2012; SHI et al., 2013; VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016).

Em um estudo realizado com amido de milho com diferentes teores de amilose, Curtis e Wang (2012) analisaram o efeito da hidrólise com β -amilase bacteriana precedendo a desramificação com isoamilase seguido por autoclavagem. O uso da β -amilase aumentou o teor de AR₃ para todos os amidos, porém o Hylon V com 50% de amilose apresentou maiores teores de ALD e AR₃, 17% e 70,7% respectivamente.

Shi e seus colaboradores (2014) em um estudo com ervilhas observaram que a β -amilase sozinha e a combinação do tratamento de β -amilase e transglucosidase podem ser usados antes da desramificação para reduzir a digestibilidade dos amidos de ervilha. Esses autores observaram que a digestibilidade do amido tratado com a combinação de β -amilase e transglucosidase foi inferior àquela do amido tratado apenas com β -amilase, pois mostraram uma menor quantidade de cadeias mais longas e uma maior quantidade de cadeias curtas de amilopectina, além de maior fração de ramificação sugerindo que a adição de transglucosidase catalisa reações hidrolíticas e de transferência para formar novas ligações α -1,6 aumentando a densidade da ramificação o que provavelmente contribui para as propriedades de digestão lenta do amido em estudo.

Babu e Parimalavalli (2016) ao estudarem os efeitos da autoclavagem seguida da desramificação com pululanase e armazenamento em diferentes temperaturas durante 24 h na formação de amido resistente de batata doce mostraram que o maior conteúdo de AR₃ foi obtido sob armazenagem a 4 °C (28,76%), seguido pelas armazenagens a 60 °C (24,14%) e 32 °C (18,71%). Por outro lado, a amostra quando armazenada a uma temperatura moderada de 32 °C apresentou níveis mais elevados de ARD.

Villas-Boas e Franco (2016) estudaram os efeitos da β -amilase bacteriana e da α -amilase fúngica sobre amidos de batata e araruta precedendo a desramificação com pululanase e retrogradação a 4°C para produção de ALD e AR₃. Esses autores encontraram teores semelhantes de AR₃ para o amido de batata (36,5%) quando α - e β -amilases foram usadas, enquanto que para o amido de araruta esses valores alcançaram 53,4% e 47,5% quando α - e β -amilases foram usadas respectivamente. Observaram ainda que o conteúdo de ALD no amido de batata aumentou de 8,5% para 27% quando α -amilase fúngica foi utilizada precedendo a desramificação.

A hidrólise ácida também tem sido objeto de estudo na produção de AR. Hasjim e Jane (2009), ao usarem a combinação de hidrólise ácida, cozimento por extrusão e tratamento hidrotérmico a um teor de umidade abaixo de 70% para produzir AR, observaram que a hidrólise ácida foi eficiente em aumentar em até 17,4% o teor de AR nos amidos modificados.

3.4 ULTRASSOM

O ultrassom refere-se a ondas sonoras (com faixas de frequência 2×10^4 a 10^9 kHz) que excedem o limite da audição humana (18 kHz) (HU et al., 2015; JAMBRAK et al., 2010). Ele pode ser gerado tanto com transdutores piezoelétricos ou magnetostritivos que criam vibrações de alta energia. Estas vibrações são amplificadas e transferidas para um sonotrodo ou sonda que está em contato direto com o fluido (PINTO et al., 2015).

Com base na capacidade do solvente para absorver e transmitir a energia de ultrassom, essas vibrações causam cavitação (AMINI; RAZAVI; MORTAZAVI, 2015), e é através deste processo que a técnica de ultrassom pode modificar química e fisicamente o amido (KIM et al., 2013), visto que a energia acústica de ultrassons não pode ser absorvida por moléculas e, assim, é portanto transformada numa forma quimicamente utilizável, isto é, através do fenômeno de cavitação (ZHU, 2015).

A cavitação é uma série de processos dinâmicos de bolhas no líquido quando ele é exposto ao campo de ultrassom. Segundo Zhu (2015), as ondas de ultrassom passam pelo meio aquoso resultando em um movimento do tipo onda contínua. A pressão do movimento induz a uma mistura no interior do líquido. Quando a pressão local no meio durante o ciclo cai abaixo da pressão de vapor do líquido, pequenas bolhas podem ser iniciadas a partir do gás já existente no fluido e continuam a aumentar durante o ciclo de expansão. Durante o ciclo de compressão, bolhas encolhem, embora nem todas elas se dissolvam de volta para

dentro do líquido. Durante vários ciclos, as bolhas continuam a crescer até o ponto em que a oscilação da parede da bolha é igual ao da frequência aplicada pelas ondas sonoras, resultando na explosão das mesmas durante um ciclo de compressão. A explosão de bolhas produz uma força de cisalhamento muito alta e turbulência com grandes ondas de energia aumentando drasticamente a temperatura do local, modificando assim as condições físicas e químicas do sistema. No caso do amido, a cavitação induz "*micro-jets*", isto é, um colapso de bolhas que resultam em um jato de água sobre a superfície do grânulo criando "forças de cisalhamento" que são responsáveis pelos danos aos grânulos de amido.

A energia fornecida por cavitação é de aproximadamente 10-100 KJ/mol, semelhante à faixa de energia das ligações de hidrogênio (KIM et al., 2013).

De acordo com Kaci et al. (2017) as faixas de frequências de ultrassons utilizadas podem ser divididas em alta frequência (de baixa energia) e baixa frequência (de alta energia). Algumas aplicações do ultrassom de baixa frequência (20 kHz, principalmente), conhecidas no processamento de alimentos, incluem extração (libertação de material de planta), emulsificação, homogeneização, encapsulação de aroma, crio-cristalização (formação de pequenos cristais de gelo durante congelamento), filtração, separação, alteração da viscosidade, ação antiespumante, e extrusão (ASHOKKUMAR, 2015; CHANDRAPALA et al., 2012; JAMBRAK et al., 2008). Assim, o ultrassom de alta frequência é normalmente usado como uma técnica analítica não-destrutiva, não-invasiva para a garantia da qualidade, processo de acompanhamento e controle, enquanto que o ultrassom de baixa frequência é empregado para intensificação de processos (OJHA et al., 2017).

Shanmugam e Ashokkumar (2014) analisaram a incorporação de 7-21% de óleo de semente de linhaça em leite desnatado pasteurizado utilizando ultrassom a 20 kHz de frequência, entre 1 e 8 min e em diferentes níveis de potência (88 W, 132 W e 176 W). Esses autores observaram que a estabilidade da emulsão é dependente da potência e duração de

sonicação, visto que uma combinação de 5 min e 132 W e 3 min e 176 W produziu emulsões mais estáveis.

O ultrassom tem sido muito empregado no processamento de alimentos congelados incluindo o controle de tamanho de cristais de gelo, aceleração da taxa de congelamento e melhoria da qualidade em alimentos congelados. Em relação à formação de cristais de gelo por exemplo, um tamanho menor e uma distribuição uniforme dentro de amostras congeladas é requerido, no entanto, cristais de gelos grandes são desejáveis no processo de liofilização pois favorecem sublimação rápida. Através da energia de ultrassom pode-se induzir a nucleação à temperatura mais elevada no processo de congelamento, controlando assim o tamanho e distribuição desses cristais em alimentos congelados (CHENG et al., 2015).

Efeitos positivos do ultrassom têm também sido relatados para carne fresca e processada (SIRÓ et al., 2009; GOT et al., 1999; ZHAO et al., 2014; POHLAMAN, DIKEMAN, ZAYAS, 1997). Em tecnologia de processamento de carnes, o ultrassom pode tanto quebrar a integridade das células musculares ou causar reações enzimáticas através de um efeito bioquímico (CHEMAT, HUMA, KHAN, 2011). Segundo Alarcon-Rojo et al. (2015) as mudanças das membranas celulares causadas pelo efeito do ultrassom podem ajudar na cura, secagem e amaciamento do tecido.

A técnica de ultrassom também tem sido utilizada para purificação de água e tratamento de efluentes líquidos na indústria de alimentos através da filtração por membranas (CHANDRAPALA et al., 2012; CHEMAT, HUMA, KHAN, 2011).

Em virtude da cavitação e formação de radicais livres, a técnica de ultrassom também pode inativar enzimas e bactérias por quebrar as membranas celulares (HU et al., 2015; JAMBRAK et al., 2008).

De um modo geral, o ultrassom pode causar efeitos diversos no processamento de alimentos e bebidas tendo em vista que os principais objetivos do emprego dessa técnica é

reduzir o tempo de processamento, economizar energia e aumentar a vida de prateleira e a qualidade dos produtos alimentares (CHEMAT, HUMA, KHAN, 2011).

Recentemente tem-se aumentado o interesse na utilização de ultrassom para modificação de amidos (milho, batata, tapioca, batata doce) e polissacarídeos (IIDA et al., 2008). Devido à cavitação e oscilação mecânica, o ultrassom, em intensidade e frequência adequadas, pode produzir vários amidos modificados com diferentes funções (ZHU, LIU, GAO, 2016).

O uso do ultrassom como um método físico de modificação do amido, tem mostrado vantagens em termos de maior seletividade e qualidade, alta reprodutibilidade, e um menor consumo de energia (PARK; HAN, 2016), redução do uso de produtos químicos e tempo de processamento na indústria de alimentos, visto que o amido é um ingrediente amplamente utilizado, e algumas aplicações tecnológicas de amido requerem propriedades funcionais específicas, isto é, que não puderam ser satisfeitas em sua forma nativa (AMINI; RAZAVI; MORTAZAVI, 2015; ZUO et al., 2009), além de ser considerado um tratamento favorável ao meio ambiente (ALIYU; HEPHER, 2000; AMINI; RAZAVI; MORTAZAVI, 2015; BAXTER; ZIVANOVIC; WEISS, 2005; KARDOS; LUCHE, 2001; LIMA; ANDRADE, 2010).

De acordo com Kang et al. (2016), nos últimos anos, foram relatados muitos estudos sobre a degradação do amido por ultrassom embora o primeiro estudo relatando o efeito da energia de ultrassom em moléculas de amido tenha sido publicado por Szent-Györgyi, em 1933. Segundo Zhu (2015), o trabalho pioneiro sugeriu a cisão das cadeias de amido, visto que o ultrassom mudou a cor do complexo amido-iodo de azul para vermelho.

Zuo et al. (2009) estudaram o comportamento de suspensões de amido de arroz ceroso (5% p/v) sonicadas à frequência de 211 kHz e observaram que o tempo de sonicação (até 60 min) e a temperatura (de 25 °C a 70 °C) da suspensão influenciaram a funcionalidade dos

grânulos de amido, de modo que a viscosidade de pico e a viscosidade final das pastas de amido sonicado a temperaturas próximas à temperatura de início de gelatinização foram menores do que as das pastas não-sonicadas. As medições de tamanho de partículas também mostraram que o tamanho dos grânulos aquecidos a temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização e sonicados foi menor do que o dos grânulos de amido aquecidos não sonicados.

Em outro estudo Jambrak e colaboradores (2010) avaliaram o efeito do ultrassom a uma frequência de 24 kHz, com tempos de tratamento de 15 e 30 min nas propriedades físicas de suspensões de amido de milho (10% m/v). Tais autores relataram que a irradiação de ultrassom rompe mecanicamente os grânulos de amido, sendo que o tratamento provoca uma distorção da região cristalina dos grânulos antes de uma hidratação reversível da fase amorfa o que resulta na destruição da estrutura granular.

Zuo et al. (2012) analisaram os efeitos do ultrassom a baixa frequência (20 kHz), em diferentes potências (0 a 160W) com até 30 min em amidos de batata a 5°C e observaram que os tratamentos resultaram em danos na superfície dos grânulos e, em alguns casos na ruptura desses grânulos. O estudo mostrou que a extensão do dano para o grânulo de amido aumenta com a potência de ultrassom. Huang, Li, e Fu (2007) observaram uma redução da viscosidade de pastas de amido de milho devido à quebra das ligações glicosídicas e enfraquecimento da rede de biopolímero depois de submetido a sonicação com potência de 500 W por 3-15 min.

Kang et al. (2016), em um estudo com amidos de milho com diferentes teores de amilose (~2,7%, ~5,1%, ~29,6%, e ~52,7%), submetidos a 20 kHz de frequência, 13,5 e 29,9 W de potência durante 20 min, observaram uma redução da viscosidade e massa molar da amilopectina das dispersões de amidos e sugeriram que os efeitos mecânicos da cavitação são responsáveis pela despolimerização das soluções do polissacarídeo. Segundo tais autores, enquanto se espera que a ruptura ocorra mais no meio das macromoléculas gerando

fragmentos monodispersos, no caso de moléculas de amidos isso não é evidente devido à sua natureza ramificada, em particular, em amidos ricos em amilose.

Zhu et al. (2012) investigaram o efeito da sonicação de grânulos de amido de batata em excesso de água em mudanças na estrutura supramolecular. Os resultados mostraram que o tratamento ultrassônico durante 30 min a temperaturas que variavam de 20 a 30 °C e potências de 60, 105 e 155 W exerceu efeitos sobre toda a estrutura de cluster conduzindo à redução da ordem molecular sem alterar o padrão cristalino do amido. De acordo com Haaj et al (2013), o tratamento ultrassônico de suspensões de amido de milho comum e ceroso a uma temperatura baixa (8 - 10 °C), frequência de 24 kHz e alta potência de sonicação (170W) produziu significativa fragmentação dos grânulos de amido de forma que eles apresentaram tamanhos em escala nano. O estudo revelou que o tamanho dos grânulos de amido diminuiu gradativamente com o tempo de tratamento de ultrassom e chegou a estabilizar após cerca de 75 min, entre 30 e 100 nm em tamanho, e indicou ainda que a sonicação perturba gravemente a estrutura cristalina de cluster da amilopectina e parece levar à formação de nanopartículas com baixa cristalinidade ou amorfas.

Em resumo, os dados da literatura mostram que a sonicação afeta as propriedades físico-químicas do amido de diferentes maneiras, incluindo: solubilidade, poder de inchamento, temperatura de gelatinização e entalpia, viscosidade, propriedades de superfície, e especialmente despolimerização (AMINI; RAZAVI; MORTAZAVI, 2015; CHAN; BHAT; KARIM, 2010; CHUNG et al., 2002; HUANG; LI; FU, 2007, IIDA et al., 2008, ISONO et al., 1994; JAMBRAK et al., 2010, LIMA; ANDRADE, 2010; SEGUCHI; HIGASA; MORI, 1994; ZHU et al., 2012; ZUO et al., 2009 e ZUO et al., 2012).

Por outro lado, estudos têm mostrado que um adequado comprimento de cadeia das moléculas de amido é requerido para a recristalização (formação de duplas hélices) para potencializar a produção de AR₃ (HASJIM; JANE, 2009; CURTIS; WANG, 2012; SHI et al.,

2013; VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016). Contudo, os dados sobre um comprimento ótimo de cadeia ainda são contraditórios. Nesse sentido, a utilização do ultrassom a baixa frequência, visando a despolimerização das moléculas de amido com a formação de dextrinas de menor tamanho molecular poderia ser usada como um pré-tratamento do amido precedendo a desramificação na formação de AR₃.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram ervilha verde rugosa (*Pisum sativum*) adquirida junto a CEAGESP de São Paulo/SP e amido comercial de milho com alto teor de amilose (*AmyloGel 03003*) e denominado neste trabalho como AMAA, gentilmente fornecido pela Cargill Agrícola S/A (São Paulo, Brasil). As enzimas isoamilase de *Pseudomonas* (Megazyme, Wicklow, Irlanda), α -amilase pancreática (Sigma, EUA) e amiloglucosidase de *Aspergillus niger* (Sigma, EUA) foram usadas neste estudo. Os outros reagentes empregados neste estudo foram todos puros para análise.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Isolamento do amido de ervilha rugosa

O amido de ervilha rugosa, denominado neste trabalho como AER, foi extraído pelo método alcalino de Davydova et al. (1995), com modificações. Os grãos de ervilha foram debulhados e triturados em liquidificador com água destilada na proporção de 1:5. O material triturado passou pela peneira de 60 mesh (250 μ m) e posteriormente pela peneira de 325 mesh (45 μ m). O material retido pela última peneira foi ainda lavado com água destilada para recuperar o máximo de amido. O material que passou pelas peneiras teve o pH ajustado para 7,6 utilizando NaOH 0,08M para remoção das proteínas e separação do amido. Este material foi centrifugado em frascos de centrífuga de boca larga a 1120 g por 15 min. O sobrenadante do frasco foi descartado e o amido decantado re-suspendido em água destilada e passado novamente pelas peneiras de 60 e 325 mesh, respectivamente. O amido em suspensão foi re-centrifugado por 5 vezes, até estar totalmente limpo. O amido coletado foi desidratado em estufa com circulação de ar a 40 °C por 12 h. O amido seco foi moído em almofariz e passado pela peneira de 60 mesh.

4.2.2 Composição Química

Os teores de umidade, lipídeos, proteínas e cinzas dos amidos foram determinados de acordo com os *Approved Methods of Cereal Chemists* (AACC, 2000). O teor de carboidratos foi calculado por diferença. O teor de fósforo foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico de Smith e Caruso (1964). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.3 Teor de amilose

4.2.3.1 Isolamento da amilopectina

As amilopectinas dos amidos nativos foram isoladas segundo Jane e Chen (1992), com modificações. As amostras de amido (2 g) foram dispersas em 200 mL de solução de dimetil sulfóxido (DMSO) 90% e mantidas em agitação constante por 1 h em banho de água fervente e a temperatura ambiente durante 16 h. O amido foi precipitado com 400 mL de etanol anidro e centrifugado a 12000 g por 15 min. O precipitado foi suspenso em 400 mL de água deionizada e o pH ajustado entre 5,9 e 6,3 utilizando tampão fosfato (16,4% de KH_2PO_4 e 3,6% de K_2HPO_4). A suspensão foi mantida em banho de água fervente com refluxo durante 1 h seguido da adição de 15-20 % de n-butanol e a suspensão mantida em refluxo por mais 30 min. A amostra foi resfriada muito lentamente (~ 36 h) em garrafa térmica pré-aquecida. O complexo amilose-butanol foi separado por centrifugação a 12000 g por 15 min. O sobrenadante foi evaporado até a metade do volume inicial em rotoevaporador e levado novamente ao refluxo. Essa etapa foi repetida até não haver mais a formação de precipitado após a centrifugação. A amilopectina foi precipitada com etanol anidro e recuperada por centrifugação a 12000 g por 10 min. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol anidro, filtrado a vácuo e seco em estufa a 40 °C durante 24 h. A amilopectina assim purificada foi utilizada para as determinações de teor de amilose absoluto.

4.2.3.2 Determinação dos teores de amilose aparente e absoluto

Os amidos nativos foram desengordurados conforme descrito por Franco et al. (2002). Amostras de amido (0,5 g) foram dispersas em 25 mL de solução de (DMSO) 90% e mantidas sob agitação constante em banho de fervura durante 1 h e em seguida agitadas durante 16 h a temperatura ambiente. Os amidos foram precipitados com álcool etílico anidro (~75 mL), centrifugados a 4000g durante 10 min, recuperados por filtração a vácuo, e secos em estufa a 40°C por 24 h. A afinidade por iodo dos amidos e das amilopectinas isoladas como descrito no item 4.2.3.1 foi determinada em titulador potenciométrico automático (716 SM Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland) conforme descrito por Schoch (1964) e Kasemsuwan et al. (1995). O teor de amilose aparente foi calculado usando a equação 1, e o teor de amilose absoluta foi calculado usando a equação 2. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

$$AM_{ap} = 100 \times AI_A / 20\% \quad (1)$$

$$AM_{abs} = 100 \times (AI_A - AI_{AP}) / (20\% - AI_{AP}) \quad (2)$$

Onde:

AM_{ap} = teor de amilose aparente; AM_{abs} = teor de amilose absoluta; AI_A = afinidade por iodo do amido; AI_{AP} = afinidade por iodo da amilopectina isolada.

20 % = afinidade por iodo da amilose pura (TAKEDA; HIZUKURI; JULIANO, 1987).

4.2.4 Tratamento dos amidos

4.2.4.1 Testes preliminares

Testes preliminares para estabelecer as faixas de potência e tempo para o tratamento de sonicação dos amidos previamente gelatinizados foram realizados. Suspensões de amido (6,5% m/v) foram gelatinizadas e inicialmente sujeitas a sonicação a 20 kHz e potência de

1500 W durante 90 min utilizando equipamento de ultrassom de alta potência modelo Vibra-Cell VCX 1500 HV (*Sonic and Materials, EUA*) com sonda de titânio. Em um segundo teste a potencia foi reduzida para 500 W e o tempo para 30 min. Para um terceiro teste de sonicação foi utilizado um equipamento de ultrassom de baixa potência modelo UP100 (*Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemanha*), com frequência de 30 kHz, 40 W de potência por 10 min. Após os tratamentos de sonicação, os amidos modificados foram analisados quanto à distribuição do tamanho molecular dos componentes do amido por cromatografia de permeação em gel (GPC), segundo procedimento de Song e Jane (2000), como detalhado no item 4.2.5 deste trabalho.

4.2.4.2 Tratamento com ultrassom

Suspensões de amido 6,5% (m/v) foram gelatinizadas por autoclavagem (121°C / 30 min) e submetidas ao tratamento com ultrassom no equipamento modelo UP100 (*Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemanha*) empregando-se 30 kHz de frequência e 30 W de potência durante 5, 10 e 15 min. Após tratamento, as amostras foram liofilizadas para posterior utilização. Amostras de amido gelatinizado e sem tratamento de ultrassom foram também liofilizadas e usadas como amostras controle.

4.2.4.3 Desramificação dos amidos

A desramificação dos amidos gelatinizados (controle) e gelatinizados e sonicados foi realizada com isoamilase utilizando o método descrito por Polesi e Sarmiento (2011), com algumas modificações. Amostras previamente liofilizadas (20 g) foram dispersas em 200 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 3,5, e aquecidas em banho de água fervente, com agitação durante 50 min. A temperatura da solução foi então equilibrada a 40 °C e 3 U/g de amido de isoamilase (EC 3.2.1.68) obtida de *Pseudomonas sp.* (Megazyme, Wicklow,

Irlanda) foi adicionado. As amostras foram incubadas a 40 °C por 16 h com leve agitação (115 Hz), neutralizadas usando NaOH 0,1 M e fervidas durante 30 min para inativação da enzima.

4.2.4.4 Retrogradação do amido

Imediatamente após o tratamento de desramificação, as soluções de amido foram submetidas a um ciclo de autoclavagem a 121°C/30 min seguido de resfriamento a 4°C/24h para potencializar o processo de retrogradação. Após resfriamento, as amostras foram precipitadas com etanol anidro, recuperadas por filtração, liofilizadas, moídas em almofariz e mantidas em dissecadores para posterior utilização.

4.2.5 Distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos por cromatografia de permeação em gel (GPC)

As distribuições do tamanho molecular dos componentes dos amidos foram determinadas utilizando coluna empacotada com gel Sepharose CL-2B de acordo com o procedimento descrito por Song e Jane (2000).

As amostras retrogradadas e liofilizadas obtidas como descrito no item 4.2.4 foram inicialmente desengorduradas como descrito por Jane e Chen (1992). Alíquotas contendo 15 mg de amido foram dispersas em 5 mL de eluente (25 mM de NaCl e 1 mM de NaOH), e 1 mg de glicose foi adicionado. A mistura foi constantemente agitada em banho de água fervente durante 30 min e, em seguida, foi resfriada a temperatura ambiente. Alíquotas (3,0 mL) da mistura contendo 9 mg de amido foram aplicadas à coluna (1,5 cm de diâmetro e 70 cm de altura) empacotada com o gel Sepharose CL-2B e eluídas de forma ascendente com fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 2,5 mL foram coletadas a cada 5 min e submetidas às análises de carboidratos totais (CHO) e *blue value* (BV) usando os métodos de fenol-

sulfúrico (DUBOIS et al, 1956) e reação de coloração com iodo (JULIANO, 1971), respectivamente.

4.2.6 Distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina

Dispersão de 5 mL de amido (gelatinizado e modificados) em DMSO 90% (10 mg/mL) foi agitada em banho de fervura por 1 h e depois por mais 16 h à temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,5 mL da dispersão de amido foi misturada a 2 mL de etanol anidro e o amido precipitado foi recuperado por centrifugação a 12.000 g por 10 min. O amido recuperado foi suspenso em 2,0 mL de água ultra pura (18 MΩ.cm) e mantido em banho de água fervente por 30 min com agitação. Imediatamente antes da injeção no cromatógrafo as amostras foram filtradas em membranas de teflon de 0,22 µm.

A distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos foi analisada usando sistema cromatográfico HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA) equipado com amostrador automático AS40. Alíquotas de 20 µL das amostras preparadas e filtradas anteriormente foram automaticamente injetadas no equipamento constituído por uma coluna de troca aniônica CarboPac PA-200 (3 X 250 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-200 (3 X 50 mm). A forma de onda empregada foi a standard quadruple com os seguintes potenciais de pulso e durações: E1 = 0,10 V (t1 = 0,40 s); E2 = -2,00 V (t2 = 0,02 s); E3 = 0,60 V (t3 = 0,01 s); E4 = -0,10 V (t4 = 0,06 s). Os parâmetros da fase móvel utilizada para a separação foi constituída pelo eluente A (200 mM NaOH) e eluente B (1M acetato de sódio e 100 mM NaOH) com fluxo de 0,5mL/min e temperatura de 30 °C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 MΩ.cm) e degaseificados com N₂. O gradiente ótimo foi: 0 - 10 min, gradiente linear de 0 a 70 mM de acetato de sódio; 10 - 80 min, gradiente linear terminando com 350 mM de acetato de sódio. 80 a 110 min a concentração de 350 mM de acetato foi mantida. A

concentração de hidróxido de sódio foi mantida constante em 100 mM durante toda a corrida. Uma mistura de maltodextrinas (grau de polimerização 1-7) foi usada para identificação da série homóloga de comprimento de cadeias. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

4.2.7 Difração de Raios-X

As unidades dos amidos nativos e modificados foram equilibradas em dessecador contendo solução de BaCl₂ saturada (25°C, aw = 0,9) durante 10 dias. Os padrões de difração de raios-X dos amidos foram determinados utilizando-se um difractômetro de raios-X de bancada (Rigaku MiniFlex 300, Tokyo, Japan), com radiação de Cu, linha K, $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$. A velocidade de varredura foi de 1°/min e as condições de uso foram 30 kV e 10 mA. A cristalinidade relativa foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e área total dos difractogramas seguindo o método de Nara e Komiya (1983).

4.2.8 Propriedades Térmicas

Temperaturas de gelatinização, mudanças de entalpia e razões de retrogradação dos amidos nativos e modificados foram determinados utilizando-se um calorímetro explanatório diferencial (DSC) Pyris1 (Perkin Elmer, EUA) de acordo com Franco et al. (2002), com modificações. Amostras de amido (4 mg, base seca) foram pesadas em porta-amostras de aço inox, misturadas com água deionizada (12 μL) e seladas. Os porta-amostras selados foram mantidos a temperatura ambiente por 2 h para equilíbrio e aquecidos a uma razão de 10 °C/min de 30 a 180°C. Um porta-amostra vazio foi usado como referência. As análises foram feitas em triplicata. As temperaturas de gelatinização (inicial, de pico e final) e a variação de

entalpia dos amidos foram determinadas utilizando-se o software Pyris1 (PerKin Elmer, EUA).

4.2.9 Determinação do teor de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR)

Os teores de ARD, ALD, e AR dos amidos nativos e modificados foram determinados pelo método descrito por Englyst, Kingman e Cummings (1992) com modificações. Os amidos gelatinizados (controle) e modificados (0,5 g) foram transferidos para béquer de 100 mL e 20 mL de tampão acetato (0,1 M, pH 5,2) contendo 4 mM de CaCl₂ foram adicionados. As amostras foram colocadas em banho térmico a 37 °C durante 5 min e 5 mL de solução enzimática (preparada como descrito abaixo) foram adicionados. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas nos tempos 0, 20 e 120 min e colocadas em tubos de centrifuga contendo 4 mL de álcool etílico anidro. Os tubos foram centrifugados a 1500 g durante 5 min. Alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram retiradas e diluídas em 9 mL de água destilada. A glicose foi quantificada utilizando kit para determinação de glicose (Glicose Liquiform – Labtest, Brasil).

Para determinação do amido total, as amostras previamente hidrolisadas (após 120 min) foram colocadas em banho de fervura durante 30 min. Após resfriamento até temperatura ambiente, 10 mL de solução de KOH 7 M foram adicionados e as amostras foram colocadas em banho de gelo durante 30 min. Posteriormente uma alíquota de 1 mL foi retirada e colocada em um béquer contendo 10 mL de ácido acético 0,5 M, e 1 mL de solução de amiloglucosidase (50 U/ mL) foi adicionada. As amostras foram incubadas por 30 min a 60 °C. A enzima foi inativada em banho de fervura durante 10 min e 40 mL de água destilada foram adicionados. As amostras foram centrifugadas a 1500 g durante 10 min. Uma alíquota

de 1 mL do sobrenadante foi diluída em 9 mL de água destilada. A glicose foi quantificada utilizando kit para determinação glicose (Glucose Liquiform, Labtest / Brazil).

Para o preparo da solução enzimática foram pesados 1,5 g de pancreatina em um tubo de centrífuga de 50 mL, e 10 mL de água destilada foram adicionados. O tubo foi mantido sob agitação durante 10 min e então centrifugado a 1500 g durante 10 minutos. Alíquotas de 8 mL do sobrenadante foram retirados e a eles acrescentados 0,4 mL de amiloglucosidase e 5 mg de invertase.

Os valores de frações de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e AR foram obtidos a partir das definições de Englyst; Kingman e Cummings, (1992) que combinaram os valores de G0 (glicose livre), G20 (glicose liberada após 20 min), G120 (glicose liberada após 120 min), e GT (glicose total) usando as seguintes equações:

$$AT = (GT - G0) \times 0.9 \quad (3)$$

$$ARD = (G20 - G0) \times 0.9 \quad (4)$$

$$ALD = (G120 - G20) \times 0.9 \quad (5)$$

$$AR = AT - (ARD + ALD) \text{ ou } AR = (GT - G120) \times 0.9 \quad (6)$$

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por meio de gráficos, tabelas e análises estatísticas, adotando para os experimentos o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) usando o software Statistica for Windows (v. 7.0, Statsoft, Tulsa, UK) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTES PRELIMINARES

Os cromatogramas obtidos da eluição das amostras sonicadas em coluna sepharose CL2B exibiram para o primeiro e segundo testes de sonicação (20 kHz, 1500 W por 90 min e (20 kHz, 500 W durante 30 min, respectivamente) grande redução nos picos da amilose e amilopectina (dados não mostrados) indicando uma drástica despolimerização das cadeias de amido. Com a mudança do equipamento de ultrassom e grande redução da potência e tempo de tratamento (30 kHz, 40 W e 10min), uma menor degradação das cadeias de amido foi observada (dados não mostrados) e as condições de frequência e potência adotadas foram bem próximas a esse último teste para obtenção do amido modificado por ultrassom (30 kHz e 30 W), em três tempos diferentes (5, 10 e 15 min).

5.2 ISOLAMENTO DO AMIDO

Embora o isolamento do amido de leguminosas seja geralmente difícil devido à presença de proteínas floculantes insolúveis que dificultam o processo de extração (RATNAYAKE; HOOVER; WARKENTIN, 2002; WANG et al. 2014), tanto o AER como o AMAA apresentaram-se como pós brancos e aparentemente isentos de impurezas.

5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS AMIDOS

A composição química dos AER e AMAA nativos está apresentada na Tabela 1. Ambas as amostras de amidos estudadas apresentaram baixas porcentagens de constituintes menores (<1%), o que indica a eficiência do processo de extração em laboratório, no caso do AER, bem como a pureza de ambos os amidos.

O AER apresentou 0,07% de cinzas, valor este muito semelhante ao encontrado por Polesi, Sarmiento e Anjos (2011) que foi de 0,08%. Para o AMAA, este resultado foi levemente superior (0,09%).

Tabela 1: Composição química¹ (%) dos amidos de ervilha e milho com alto teor de amilose

Amido	Lipídeos	Proteínas	Cinzas	Carboidratos*	Fósforo
AER	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,07 ± 0,01	99,56	0,022 ± 0,002
AMAA	0,33 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,09 ± 0,01	98,99	0,032 ± 0,002

¹cada valor representa a média de três determinações com o respectivo desvio padrão. Resultados em base seca. *Determinado por diferença. AER: amido de ervilha rugosa; AMMA: amido de milho com alto teor de amilose

O teor de proteínas no AER foi de 0,19%, enquanto que Polesi, Sarmiento e Anjos (2011) ao também estudarem a cultivar *Utrillo* encontraram teor de 0,31%. Essa diferença pode estar associada à etapa de purificação de proteína no processo de extração do amido em laboratório. Chung e Liu (2012) ao estudarem outras três variedades de ervilha, encontraram 0,2%, 0,3% e 0,6% de proteínas em amidos de ervilha. Já o AMAA apresentou 0,56% de proteínas. Esse mesmo valor foi encontrado por Shirmer et al. (2013) ao estudar o amido de milho com alto teor de amilose Hylon VII.

O lipídeo, componente de grande importância visto que pode interferir nas propriedades funcionais do amido sendo responsável pela fixação da cor, desenvolvimento de aromas e formação de complexos em amidos de cereais, é encontrado em pequenas quantidades (traços) em amidos de raízes e tubérculos (CEREDA et al., 2001). Os teores de lipídeos no AER e AMAA foram de 0,16 e 0,33%, respectivamente, enquanto Hoover e Ratnayake (2002) e Weber, Collares-Queiroz e Chang (2009) encontraram, respectivamente, 0,30% para o amido de ervilha e 0,12% para o amido de milho com alto teor de amilose.

O fósforo também é um componente de grande relevância, pois pode influenciar as propriedades funcionais do amido. Este mineral pode ser encontrado de três formas principais

nos amidos: monoésteres de fosfato, fosfolípidos e fosfatos inorgânicos (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Para esse constituinte foi encontrado 0,022% para o AER e 0,032% para o AMAA. A maioria dos amidos de cereais regulares contém fósforo principalmente na forma de fosfolipídios (KASEMSUWAN; JANE, 1996). Segundo Singh et al. (2003), o amido de milho com alto teor de amilose apresenta 0,015% de fósforo na forma de fosfolipídios. De acordo com Kasemsuwan e Jane (1996), em amidos de leguminosas (ervilha verde, feijão lima, feijão mungo, e lentilhas) o fósforo está principalmente na forma de fosfato monoésteres. Os fosfolipídios em amidos podem se complexar com a amilose formando os complexos amilose-lipídeo, os quais limitam o inchamento do grânulo de amido resultando em pastas mais opacas, enquanto que o fosfato monoéster provoca aumento na claridade e viscosidade da pasta de amido (JANE, KASEMSUWAN E CHEN, 1996).

5.4 AFINIDADE POR IODO E TEOR DE AMILOSE APARENTE E ABSOLUTO DOS AMIDOS NATIVOS

Os valores encontrados para a afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto dos amidos nativos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto dos AER e AMAA*

Amido	Afinidade por iodo		Teor de amilose (%)	
	Amido	Amilopectina	Aparente ¹	Absoluta ²
ERA	11,21 ± 0,17 ^b	4,53 ± 0,06 ^a	56,05	43,20
AMAA	12,40 ± 0,10 ^a	4,72 ± 0,03 ^a	62,00	50,26

*Média de três determinações, com o respectivo desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ¹Calculado como: $AMap = AI_A / 0,20$ onde $AMap$ é a porcentagem de amilose aparente e AI_A é a afinidade por iodo do amido desengordurado; ²Calculado como: $AMabs = (AI_A - AI_{AP}) / [0,20 - (AI_{AP} / 100)]$ onde $AMabs$ é a porcentagem de amilose absoluto, AI_{AP} é a afinidade por iodo da amilopectina isolada.

Os teores de amilose aparente dos AER e AMAA foram 56,05 e 62%, respectivamente. Esses valores estão próximos aos encontrados na literatura para esses

amidos. Polesi, Sarmiento e Anjos (2011) encontraram 61% de amilose aparente para o amido de ervilha rugosa, enquanto Singh et al. (2003) ao estudar amido de milho com alto teor de amilose encontraram valores variando de 42,60% a 67,80%.

Como já postulado, o amido de ervilha rugosa tem mais amilose que o amido de ervilha lisa. Trabalhos na literatura mostram teores de amilose aparente variando 33,1% a 48,8% para a ervilha lisa (RATNAYAKE; HOOVER; WARKENTIN, 2002).

A afinidade com iodo da amilopectina purificada para ambos os amidos foi relativamente alta sugerindo que esses amidos têm alta proporção de cadeias ramificadas longas da amilopectina, as quais podem também se complexar com o iodo e superestimar o teor de amilose (JANE et al., 1999). Assim, o teor de amilose absoluto desses amidos ficou em torno de 43 e 50% respectivamente para AER e AMAA.

5.5 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO MOLECULAR DOS COMPONENTES DOS AMIDOS GELATINIZADOS (CONTROLE) E MODIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC)

Os perfis de distribuição do tamanho molecular dos componentes dos AER e AMAA gelatinizados (controle) estão apresentados na Figura 3.

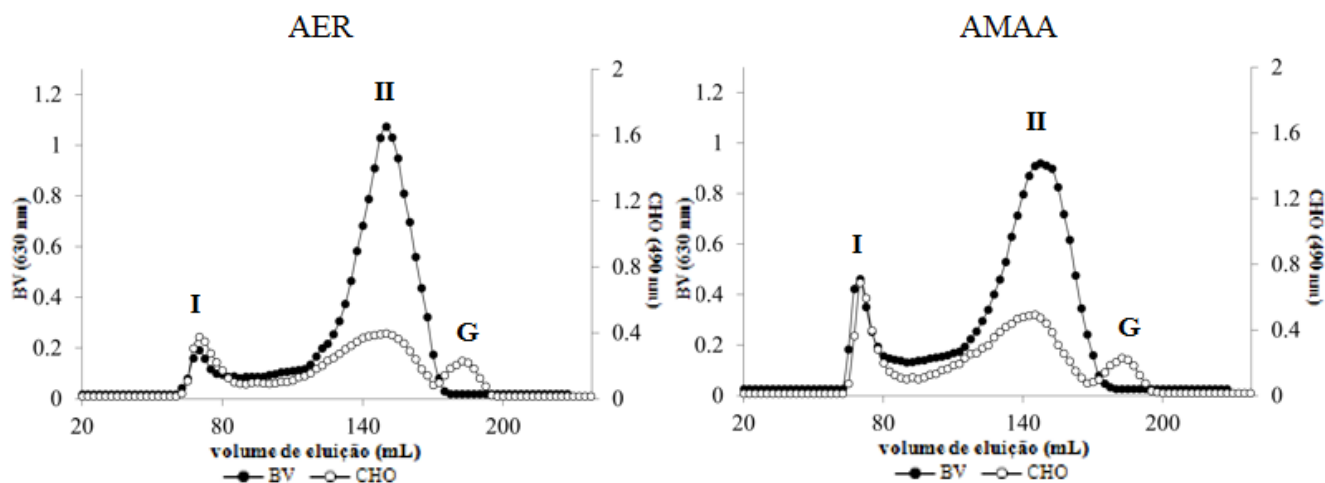


Figura 3: Perfis de eluição dos AER e AMAA (controle) obtidos por cromatografia de permeação em gel Sepharose CL2B. (●) Blue value; (○) carboidratos totais.

Os cromatogramas exibiram três picos distintos. O primeiro pico, eluído a 70 mL, correspondeu a amilopectina com grande massa molecular que eluiu no volume vazio da coluna e o segundo que apresentou uma alta resposta de *blue value* (reação com iodo) correspondeu à amilose. A glicose adicionada para marcar o final da eluição foi eluída no volume 182,5 mL. Em relação ao primeiro pico (amilopectina), o AER apresentou relação BV/CHO (0,51) quando comparado ao AMAA (0,67). Essa maior relação BV/CHO do AMAA sugere uma maior proporção de cadeias ramificadas longas da amilopectina presentes nesse amido (FRANCO et al., 2002). O AER apresentou o segundo pico eluído a 150 mL, enquanto que no AMAA este pico foi eluído em um volume levemente menor (145 mL) indicando que as moléculas de amilose desse amido apresentam massa molecular levemente superior às do AER.

Tanto o AER quanto o AMAA mostraram uma fração intermediária entre o pico I e o pico II. Lin et al. (2016b) ao realizarem cromatografia de permeação em gel Sepharose CL-2B em amidos obtidos de 4 linhagens e 2 híbridos de milho com alto teor de amilose também identificaram essa fração e observaram que a mesma possuía massa molecular intermediária entre aquelas do pico I e II e, portanto, considerado um componente intermediário. Colonna et al. (1982) relataram que o material intermediário que possui propriedades mais próximas àquelas da amilose, está presente na proporção de 30 - 35% nos amidos com alto teor de amilose. Entretanto, Colonna e Mercier (1984) também relataram a presença de uma fração intermediária ramificada (18,9%) de baixa massa molecular em ervilha rugosa. Tal fração intermediária é composta por cadeias curtas e longas como na amilopectina.

Os amidos modificados (gelatinizados, sonificados por diferentes tempos, desramificados e retrogradados) exibiram praticamente o mesmo perfil (Figura 4), independente da fonte de amido.

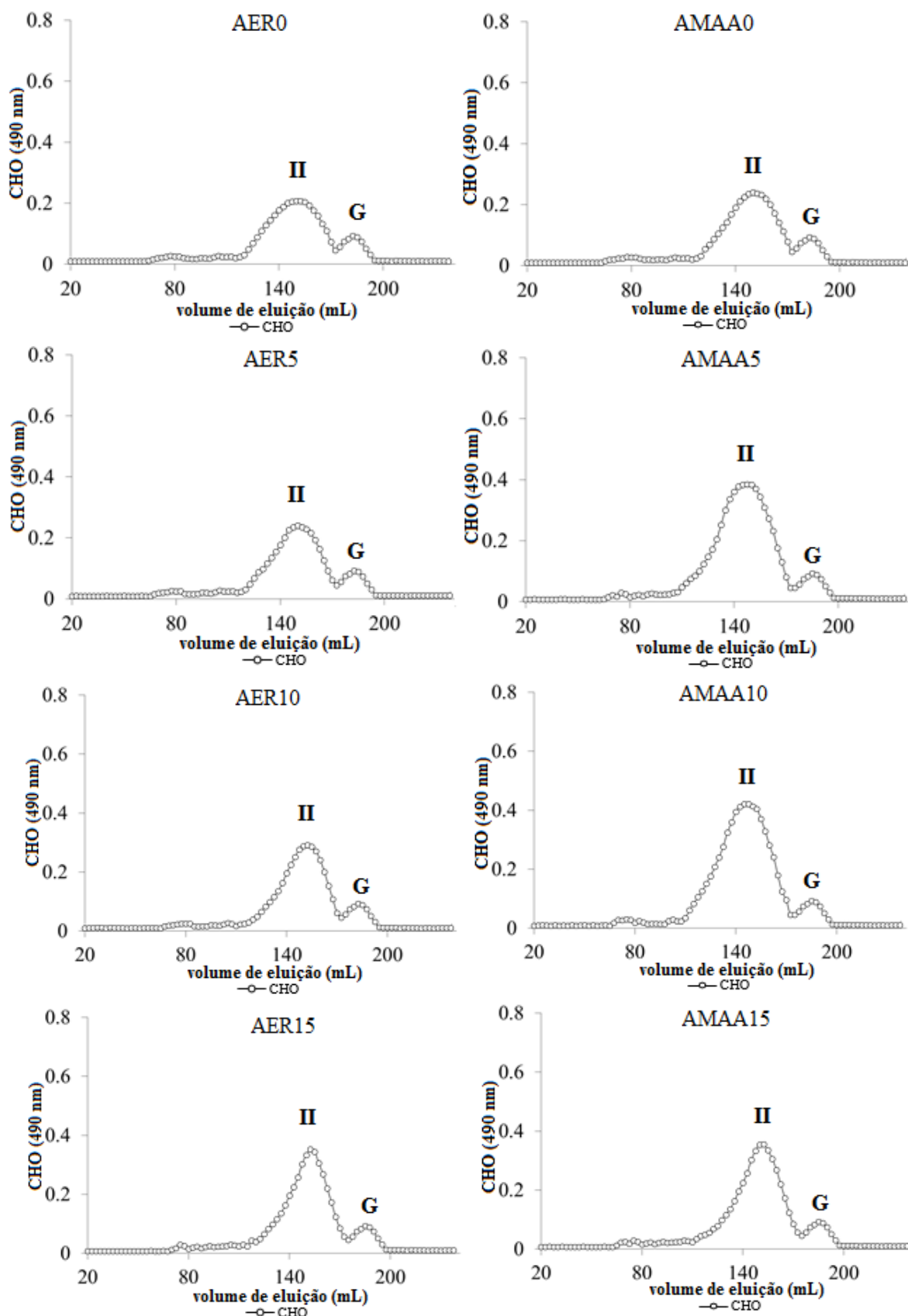


Figura 4: Perfis de eluição dos AER e AMAA modificados obtidos por cromatografia de permeação em Sepharose CL-2B. (○) CHO (carboidratos totais). AER0 e AMAA0 – amidos gelatinizados, desramificados e retrogradados; AER5 e AMAA5 – amidos gelatinizados, sonicados (5 min), desramificados e retrogradados; AER10 e AMAA10 – amidos gelatinizados, sonicados (10 min), desramificados e retrogradados; AER15 e AMAA15 - amidos gelatinizados, sonicados (15 min), desramificados e retrogradados.

O pico I e a fração intermediária praticamente desapareceram para todos os tratamentos devido à ação de desramificação da isoamilase, o que tornou lineares as cadeias do amido, as quais foram liberadas e eluídas juntamente com a amilose causando um progressivo aumento na área do pico II. Os cromatogramas dos amidos sonicados mostraram que a massa molecular das frações lineares eluídas no pico II se tornaram menos polidispersas ao longo do tratamento com ultrassom. O volume de eluição do pico II dos AER modificados, independente do tempo de sonicação, e dos AMMA0, AMMA5, AMMA10 foi praticamente o mesmo dos amidos controle (150 mL para AER e 145 mL para AMMA). No entanto, o pico II no AMMA15 foi eluído a um volume maior (152,5 mL). Com o aumento do tempo de sonicação houve menor polidispersibilidade da fração e maior resolução dos picos, que foi mais acentuada para os AMMA, com exceção do AMMA15 que eluiu a um volume maior e em menor resolução. Resultados semelhantes foram obtidos por Lorimer et al. (1994). Esses autores observaram que com o aumento do tempo de sonicação ocorreu a redução tanto da massa molecular quanto da polidispersidade das dextranas.

Há relatos de que a ocorrência da quebra do polímero seja induzida pelas forças de cisalhamento geradas no processo de cavitação que altera a cadeia do polímero tornando-as mais curtas. De acordo com Lorimer et al. (1994), a cisão das cadeias de amido causada pelo ultrassom ocorre preferencialmente nas moléculas mais longas. Acredita-se que essa quebra é um processo não-aleatório, com clivagem no centro da cadeia de polímero (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2005; PAWAR et al., 2014). No entanto, nossos resultados não puderam confirmar essa hipótese. A técnica utilizada (cromatografia de permeação em gel usando Sepharose CL2B) não permitiu a separação adequada das frações lineares de diferentes massas moleculares, o que poderia ser obtido por HPSEC (*high performance size exclusion chromatography*) (YU et al., 2017).

As afinidades por iodo das dextranas produzidas após modificação e seu teor de amilose foram calculados e comparados com os resultados obtidos para o teor de amilose obtido a partir da área das curvas de GPC da figura 4 e estão apresentadas na Tabela 3. O teor de amilose encontrado para cada amostra foi semelhante, independente do método usado. Esses resultados confirmam a boa separação das amostras obtida por cromatografia de permeação em gel.

Houve um aumento de ~26% e ~11% nas frações lineares dos AER e AMMA, respectivamente após desramificação quando comparado com o teor de amilose aparente dos amidos nativos (56,05% e 62,0%, respectivamente para AER e AMMA, tabela 2). Após o rompimento das ligações α - (1-6) pela enzima desramificante, as cadeias laterais mais longas da amilopectina ficam mais livres para se complexar com o iodo aumentando assim o teor de frações lineares na amostra. Resultados semelhantes foram obtidos por Babu e Parimalavalli (2016) ao estudarem o efeito da autoclavagem, desramificação com pululanase e armazenamento a diferentes temperaturas (4°C, 32°C e 60°C) no amido de batata doce.

Tabela 3: Afinidade por iodo e teores de amilose das dextranas obtidos pela afinidade por iodo e pela área dos gráficos na figura 4

Amido	Afinidade por iodo	Teor de frações lineares (%) ¹	Teor amilose pela área (%) ²
AER0	14,10 ± 0,14 ^c	70,50	69,57 ^g
AER5	15,04 ± 0,26 ^{bc}	75,20	74,87 ^e
AER10	15,40 ± 0,05 ^b	77,00	77,20 ^d
AER15	15,50 ± 0,40 ^b	77,50	77,38 ^d
AMAA0	14,11 ± 0,11 ^c	70,55	69,91 ^f
AMAA5	16,76 ± 0,31 ^a	83,80	83,50 ^b
AMAA10	17,10 ± 0,10 ^a	85,50	85,00 ^a
AMAA15	15,54 ± 0,50 ^b	77,70	77,78 ^c

*Média de três determinações, com o respectivo desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ¹Calculado como: $AMap = IA_s / 0,20$ onde AMap é a porcentagem de amilose aparente e IA_s é a afinidade por iodo do amido desengordurado. AER e AMAA (0, 5, 10, 15): amidos de ervilha rugosa gelatinizados, sonicados por 0, 5, 10, e 15 min, desramificados, e retrogradados. ²Valores calculados pela área do gráfico obtida por cromatografia de permeação em gel (figura 4).

Os valores de porcentagens de frações lineares obtidas por ambos os métodos foi muito semelhante indicando que o tratamento com ultrassom rompeu as cadeias de amido em tamanhos moleculares menores que foram eluídas no pico da amilose (pico II). Quanto maior o tempo de tratamento menos polidispersas e com menor tamanho molecular das cadeias lineares do amido.

5.5 DISTRIBUIÇÃO DO COMPRIMENTO DAS CADEIAS RAMIFICADAS DA AMILOPECTINA DOS AMIDOS DETERMINADA POR HPAEC-PAD

As distribuições normalizadas do comprimento de cadeias laterais resultantes da desramificação com isoamilase dos amidos gelatinizados (controle) e sonicados por diferentes tempos estão apresentadas na Figura 5 e resumidas na Tabela 4. O comprimento dessas ramificações influencia as propriedades de gelatinização e retrogradação de amidos, contribuindo para aumentar a viscosidade da pasta e tendem a um aumento no teor de amilose (JANE et al., 1999).

Os AER0 e AMAA0 apresentaram baixa proporção de cadeias curtas (grau de polimerização GP 6-12) e alta proporção de cadeias longas ($GP \geq 37$), comum em amidos do padrão cristalino tipo B. Esse resultado é similar ao encontrado por Jane et al. (1999), ao estudar o *Amylomaize VII*. Embora a coluna cromatográfica usada naquele trabalho (PA100 CarboPac) tenha sido diferente, foi usado um detector de enzima que favoreceu a detecção de picos com maiores GP. No entanto entre os amidos, o AER teve maior proporção de cadeias curtas (GP 6-12, 15,4%) que o AMMA (12,1%). Este último apresentou maior proporção de cadeias ramificadas longas ($GP \geq 37$, 29,4%) que o AER (26,3%).

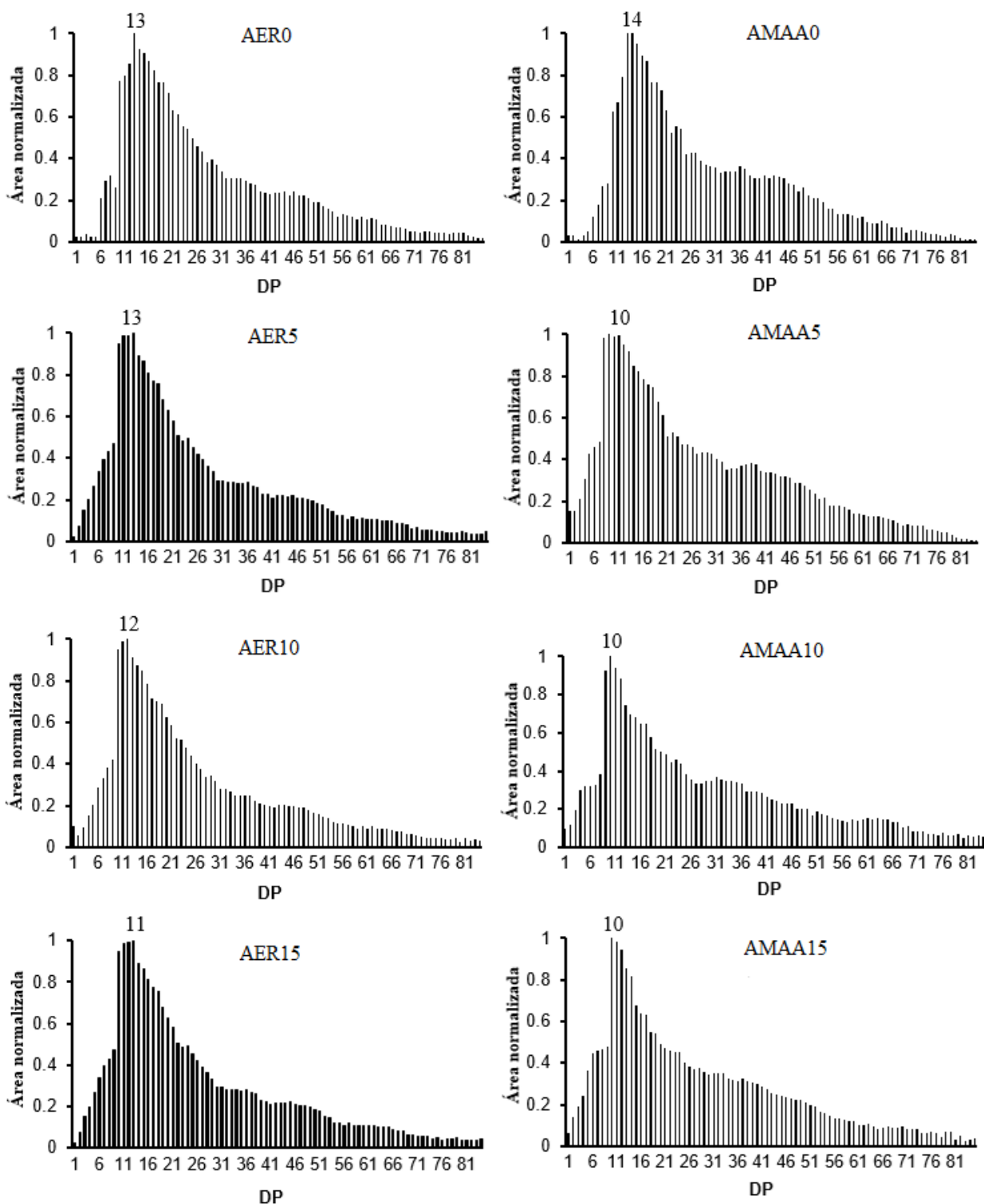


Figura 5: Distribuição do comprimento de cadeias lineares dos amidos gelatinizados e sonicados. AER0 e AMAA0 – amidos gelatinizados, desramificados e retrogradados; AER5 e AMAA5 - amidos gelatinizados, sonicados (5 min), desramificados e retrogradados; AER10 e AMAA10 - amidos gelatinizados, sonicados (10 min), desramificados e retrogradados; AER15 e AMAA15 - amidos gelatinizados, sonicados (15 min), desramificados e retrogradados.

Esses resultados confirmam aqueles obtidos para a afinidade com iodo dos amidos que mostrou um valor maior da afinidade com iodo da amilopectina para o AMMA (Tabela 2).

Tabela 4: Distribuição do comprimento das cadeias lineares da amilopectina dos amidos modificados.

	Comprimento de cadeia (%)					\overline{GP}	> GP detectado
	GP (1-5)	GP (6-12)	GP (13-24)	GP (25-36)	GP (≥ 37)		
AER0	0,6±0,0 ^c	15,4±0,5 ^d	38,7±0,7 ^a	19,0±0,1 ^a	26,3±0,2 ^{bc}	27,9	84
AER5	3,0±0,0 ^b	19,4±0,0 ^{ab}	36,0±0,1 ^b	17,0±0,3 ^{bc}	24,6±0,2 ^{bc}	26,5	85
AER10	3,3±0,7 ^{ab}	19,7±0,4 ^{ab}	36,4±0,5 ^b	16,8±0,2 ^c	23,8±0,5 ^{bc}	26,1	85
AER15	3,6±0,1 ^{ab}	20,0±0,0 ^a	36,0±0,7 ^b	16,8±0,2 ^c	23,3±0,2 ^c	25,3	85
AMAA0	0,7±0,1 ^c	12,1±0,2 ^e	38,9±0,1 ^a	18,9±0,2 ^a	29,4±0,1 ^a	28,7	84
AMAA5	3,3±0,3 ^{ab}	18,5±0,3 ^c	30,4±0,1 ^c	17,7±0,4 ^b	30,1±0,2 ^a	28,3	85
AMAA10	4,2±0,1 ^{ab}	19,5±0,6 ^{ab}	28,8±0,5 ^c	17,5±0,1 ^{bc}	30,0±0,2 ^a	25,5	85
AMAA15	4,4±0,3 ^c	19,6±0,4 ^{ab}	29,7±0,8 ^c	17,5±0,8 ^{bc}	28,8±0,5 ^{ab}	27,8	85

*Média de duas replicatas seguida do desvio-padrão; GP: grau de polimerização; AER0 e AMAA0 – amidos gelatinizados, desramificados e retrogradados; AER5 e AMAA5 - amidos gelatinizados, sonicados por 5 min, desramificados e retrogradados; AER10 e AMAA10 - amidos gelatinizados, sonicados por 10 min, desramificados e retrogradados; AER15 e AMAA15 - amidos gelatinizados, sonicados por 15 min, desramificados e retrogradados.

A sonicação em seus diferentes tratamentos alterou a distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina de modo diferente para os amidos estudados. Houve aumento das cadeias curtas (GP 1-5 e 6-12) para ambos os amidos, no entanto para o AER a redução das cadeias com GP 13-24, 25-36 e ≥ 37 foi mais ou menos semelhante, enquanto no AMMA as cadeias mais longas da amilopectina (GP ≥ 37) praticamente não foram alteradas e houve redução mais acentuada na proporção de cadeias com GP 13-24 (Tabela 4).

5.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X E CRISTALINIDADE RELATIVA

Os difratogramas de raios-X e as cristalinidades relativas das amostras de AER e AMAA nativos e modificados estão apresentados na Figura 6. Na planta, o amido é armazenado como corpos intracelulares parcialmente cristalinos (15 a 45 % de cristalinidade)

denominados grânulos. Através de difração de raios- X, podem-se distinguir três tipos de arranjos cristalinos nos grânulos de amido tais como A, B e C (CEREDA et al., 2001).

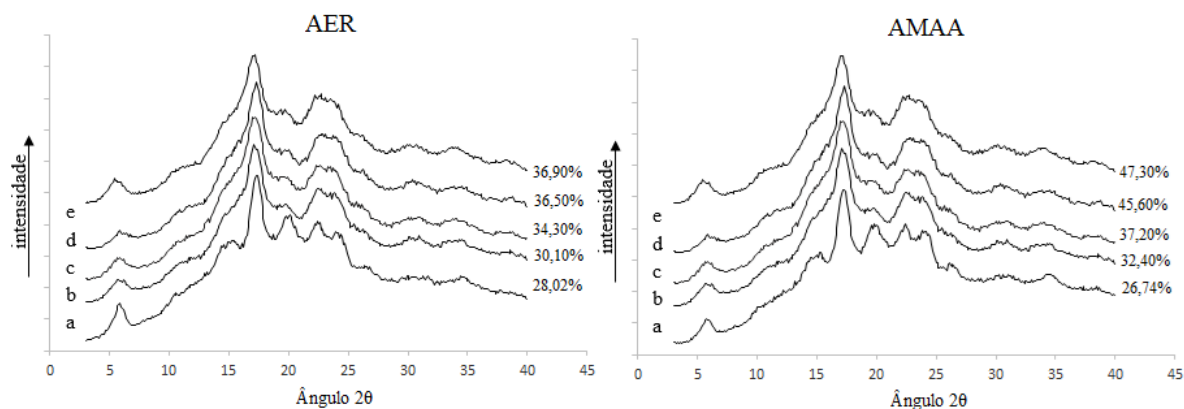


Figura 6: Difrátogramas de raios-X dos AER e AMAA (a) nativos; (b) gelatinizados, desramificados e retrogradados; (c) gelatinizados, sonicados (5 min), desramificados e retrogradados; (d) gelatinizados, sonicados (10 min), desramificados e retrogradados; (e) gelatinizados, sonicados (15 min), desramificados e retrogradados; e suas respectivas cristalinidades relativas (%).

Os tipos de polimorfismos A, B ou C são determinados principalmente pelo comprimento médio das cadeias de amilopectina. Amidos com grandes proporções de cadeias curtas (GP 6-12) normalmente são associados com o padrão A, enquanto aqueles que possuem poucas proporções de cadeias curtas e altas proporções de cadeias longas ($GP \geq 37$), como os estudados neste trabalho, estão associados ao padrão B (JANE et al., 1999).

Os AER e AMAA nativos apresentaram padrão de cristalinidade do tipo B, com pico de intensidade média no ângulo de difração $5,5^\circ$, média-forte nos ângulos $22,2^\circ$ e $24,0^\circ$, e forte no ângulo $17,1^\circ$ em 2θ (ZOBEL, 1964). Todos os amidos modificados mantiveram seu padrão de cristalinidade tipo B, visto que a retrogradação em baixas temperaturas leva à formação deste tipo de padrão cristalino, como confirmado por trabalhos anteriores (TESTER, 1997; BULÉON et al., 1998; COPELAND et al., 2009).

A cristalinidade relativa é quantificada por meio da razão entre a área dos picos e a área total dos difratogramas (XIE et al., 2014). A porcentagem de cristalinidade relativa no AER foi levemente superior quando comparado ao AMAA (Figura 6, a). Todavia, a cristalinidade relativa no AER se enquadrou dentro da faixa (17-34%) relatada para outros amidos de leguminosas (CHUNG, LIU, 2012; HOOVER, RATNAYAKE, 2002; RATNAYAKE et al., 2001), enquanto que Chang, He e Huang (2013), ao estudarem o Hylon V encontraram um valor inferior para cristalinidade relativa (22,1%). Shi e seus colaboradores (2014), em estudo com uma variedade de ervilha rugosa da China, encontrou um valor ainda superior para a cristalinidade relativa (30,7%) desse amido.

Estudos tem mostrado que o ultrassom influencia a cristalinidade dos grânulos de amido em várias extensões, dependendo das condições experimentais e do tipo de amido (HUANG; LI; FU, 2007; LUO et al., 2008; ZHENG et al., 2013; ZHU et al., 2012).

A cristalinidade relativa dos amidos aumentou com a gelatinização, desramificação e retrogradação em aproximadamente 7 e 21% para o AER e AMAA, respectivamente, resultados esperados para o AMMA em função da melhor reassociação das cadeias lineares do amido durante a retrogradação. No caso do AER, é possível que o menor teor de amilose, bem como as diferenças nos comprimentos de cadeias da amilose e amilopectina nesses amidos tenha contribuído para uma reassociação menos eficiente durante a retrogradação.

Os amidos modificados (gelatinizados, sonicados, desramificados e retrogradados) mostraram difractogramas com picos intensos e definidos o que sugere que a estrutura do amido formado apresenta cadeias de amilose recristalizadas, e talvez fragmentos de amilopectina desramificada, além de fragmentos de amilose menores que as do amido nativo que co-cristalizam durante a retrogradação (LEONG; KARIM; NORZIAH, 2007).

A cristalinidade relativa dos amidos aumentou com o tempo de tratamento, embora esse aumento não tenha sido tão expressivo, atingindo aproximadamente 37% no AER e 47%

no AMMA. Villas-Boas e Franco (2016) ao estudaram os efeitos da β -amilase bacteriana e da α -amilase fúngica em amidos de batata e araruta precedendo a desramificação com pululanase e retrogradação a 4°C para produção de AR₃, obtiveram ~ 60% de cristalinidade relativa para o amido de araruta quando hidrolisado com α -amilase.

A sonicação aumentou a cristalinidade em ambos os amidos, sendo que o tempo de 10 min parece ter sido o mais adequado para ambos os amidos. No caso do AER não houve diferença significativa entre os teores de cristalinidade relativa para os amidos submetidos a 10 ou 15 min de sonicação atingindo 36,5%, enquanto no AMMA houve um leve aumento na cristalinidade relativa de 45,6 para 47,3% de cristalinidade. Isso sugere que para ambos os amidos o tempo de 10 min foi suficiente para que houvesse redução do tamanho das cadeias de amilose e de amilopectina a tamanhos mais adequados para a formação de duplas hélices e consequente recristalização do amido, principalmente para o AMMA.

5.7 PROPRIEDADES TÉRMICAS

As temperaturas e entalpias de gelatinização dos AER e AMAA nativos e modificados estão apresentadas na Tabela 5. Apesar do alto teor de amilose em ambos os amidos estudados, o AER teve uma faixa de temperatura de gelatinização de ~58 a 87°C e uma variação de entalpia (ΔH) de ~ 4 J/g. Esses valores são relativamente baixos para amidos com alto teor de amilose, no entanto, esses valores obtidos para o AER são similares às encontradas por Polesi, Sarmiento e Anjos (2011) que obtiveram uma faixa de 56,1 a 89,7°C e entalpia de 4,2 J/g.

Os amidos modificados apresentaram temperaturas endotérmicas superiores às dos amidos nativos (120,40 a 160,59 °C), indicando diferentes temperaturas de fusão com alta estabilidade térmica decorrentes do forte empacotamento das duplas hélices recristalizadas.

Tabela 4: Propriedades térmicas dos AER e AMMA nativos e modificados.

Amidos	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	ΔH(J/g)	ΔT (°C)
ERA	57,94 ± 0,66 ^h	76,46 ± 0,01 ^f	87,02 ± 0,01	4,05 ± 0,02 ^{fg}	29,08
AER0	131,38 ± 0,66 ^c	143,07 ± 0,25 ^c	148,92 ± 0,49 ^f	2,25 ± 0,10 ^h	17,54
AER5	120,40 ± 0,01 ^f	143,01 ± 0,35 ^c	156,44 ± 0,27 ^c	4,51 ± 0,29 ^{ef}	36,04
AER10	133,44 ± 0,18 ^b	145,06 ± 0,21 ^a	160,59 ± 0,16 ^a	5,65 ± 0,64 ^{de}	27,15
AER15	128,67 ± 0,54 ^d	144,77 ± 0,52 ^b	156,87 ± 0,23 ^c	6,31 ± 0,31 ^{cd}	28,20
AMAA	70,67 ± 0,25 ^g	79,60 ± 0,30 ^e	101,86 ± 0,31 ^g	14,47 ± 0,03 ^a	31,19
AMAA0	140,76 ± 0,13 ^a	144,75 ± 0,69 ^b	150,95 ± 0,86 ^d	2,88 ± 0,10 ^{gh}	10,19
AMAA5	130,24 ± 0,37 ^{cd}	140,45 ± 0,23 ^d	150,86 ± 0,35 ^d	6,03 ± 0,20 ^d	20,62
AMAA10	130,99 ± 0,64 ^c	145,49 ± 0,35 ^a	157,21 ± 0,34 ^b	7,54 ± 0,42 ^{bc}	26,22
AMAA15	125,52 ± 0,69 ^e	143,71 ± 0,69 ^c	149,71 ± 0,27 ^e	8,06 ± 0,58 ^b	24,19

¹Média de três repetições. Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). T_o, T_p, T_c: temperatura inicial, de pico e conclusão. ΔH = variação de entalpia. AER: amido de ervilha rugosa; AMAA: amido de milho com alto teor de amilose; AER (0, 5, 10, 15) e AMMA (0, 5, 10, 15): AER e AMMA gelatinizados sonicados por 0, 5, 10 e 15 min, desramificados e retrogradados.

A ampla faixa de temperatura de gelatinização dos amidos modificados indica uma maior heterogeneidade desses cristais em relação aos amidos nativos. O tratamento com ultrassom provocou aumento significativo na entalpia quanto maior o tempo de tratamento, assim como na resistência e cristalinidade desses amidos, em virtude da formação de cristais mais fortemente ligados. Esse aumento na entalpia e cristalinidade relativa sugere o fortalecimento das duplas hélices e a formação de uma maior ordenação na estrutura cristalina, provavelmente relacionado à formação de frações lineares com tamanhos mais apropriados para a reassociação. A maior energia necessária para a gelatinização dos cristais foi observada no tratamento de 15min de ultrassom tanto para o AER, quanto para o AMAA. No entanto, o AMMA15 apresentou maior ΔH que o AER15, como também ocorreu com a cristalinidade relativa.

5.8 TEORES DE AMIDO RAPIDAMENTE DIGERÍVEL (ARD), LENTAMENTE DIGERÍVEL (ALD) E RESISTENTE (AR₃)

Os teores de ARD, ALD e AR presentes nas amostras de AER e AMAA gelatinizados e resultantes dos tratamentos de ultrassom em diferentes tempos se encontram na Tabela 6.

Os AER e AMAA quando submetidos apenas à gelatinização, mostraram uma baixa resistência às enzimas, isto é, 1,92% e 2,57%, respectivamente, por causa da desorganização nas cadeias de amido o que aumenta a sua digestibilidade. Os amidos foram autoclavados a 121°C/30min para sua completa gelatinização, portanto praticamente toda a resistência naturalmente presente nesse amidos foi perdida durante o aquecimento.

Tabela 5: Teor de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR) nos amidos de ervilha e milho com alto teor de amilose submetidos aos diferentes tratamentos de sonicação.

Tratamento ¹	ARD (%)	ALD (%)	AR (%)
AERG	80,61 ± 0,6 ^a	17,47 ± 0,6 ^b	1,92 ± 0,4 ^g
AER0	38,94 ± 0,7 ^c	10,50 ± 0,4 ^c	50,56 ± 0,9 ^e
AER5	28,83 ± 0,7 ^f	17,16 ± 0,3 ^b	54,01 ± 0,3 ^d
AER10	31,56 ± 0,5 ^e	8,32 ± 0,1 ^e	60,12 ± 0,3 ^c
AER15	35,91 ± 0,1 ^d	2,94 ± 0,5 ^g	61,15 ± 0,1 ^c
AMAAG	74,08 ± 1,1 ^b	23,35 ± 0,6 ^a	2,57 ± 0,5 ^f
AMAA0	36,78 ± 0,5 ^d	9,84 ± 0,6 ^d	53,38 ± 0,1 ^d
AMAA5	30,43 ± 0,1 ^e	8,94 ± 0,5 ^d	60,63 ± 0,1 ^c
AMAA10	19,51 ± 0,4 ^g	5,71 ± 0,1 ^f	74,78 ± 0,4 ^b
AMAA15	10,68 ± 0,1 ^h	10,15 ± 0,8 ^c	79,17 ± 0,0 ^a

¹Média de três repetições seguido de desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey (p≤0,05). AERG e AMAAG – amidos gelatinizados; AER0 e AMAA0 – amidos gelatinizados, desramificados e retrogradados; AER5 e AMAA5 – amidos gelatinizados, sonicados (5 min), desramificados e retrogradados; AER10 e AMAA10 – amidos gelatinizados, sonicados (10 min), desramificados e retrogradados; AER15 e AMAA15 - amidos gelatinizados, sonicados (15 min), desramificados e retrogradados.

O AMAA apresentou menor digestibilidade quando comparado ao AER, independentemente do tratamento realizado. Esses resultados confirmam aqueles observados para cristalinidade relativa e ΔH.

A desramificação dos amidos com isoamilase aumentou os teores de AR₃ para 50,5% e 53,4% nos AER e AMAA, respectivamente, tendo em vista que a liberação das cadeias laterais da amilopectina facilita a reassociação e retrogradação do amido. Lehmann e seus colaboradores (2003) estudaram o amido de ervilha lisa gelatinizado e desramificado com pululanase e autoclavagem durante 30 min a 121°C seguido de armazenagem sob refrigeração a 4°C por 24 h, e obtiveram 37,3% de AR, valor este bem inferior ao do presente trabalho devido ao menor teor de amilose apresentado pelo amido de ervilha lisa (31%).

Observou-se que os três tempos de sonicação a qual foram submetidos os amidos se mostraram eficientes para a formação de AR₃, no entanto, os amidos quando expostos ao tratamento de ultrassom por 15 min tiveram menor massas molecular e polidispersibilidade como observado por GPC (Figura 4), mostrando serem mais adequados para se recristalizarem e formarem AR₃. Sabe-se que a exposição de uma solução de polímero a radiação ultrassônica apresenta como efeito principal a redução da massa molecular (KIM et al., 2013). Segundo Lima e Andrade (2010), o processo é relatado como não aleatório, e a clivagem pode ocorrer, preferencialmente, perto do meio da cadeia. No entanto, de um modo geral, os efeitos do ultrassom em amido dependem fortemente dos parâmetros de processamento (tais como frequência, potência, tempo e temperatura), das propriedades do amido (tais como a composição e estado físico), bem como da concentração da suspensão (AMINI; RAZAVI; MORTAZAVI, 2015).

A maior cristalinidade e maior teor de AR₃ do AMAA, independente do tratamento, sugere que o amido de milho nativo possui comprimentos de cadeias de amilose e amilopectina mais adequados à reassociação que o amido de ervilha, e com a sonicação as frações lineares liberadas por esse amido continuaram a apresentar tamanhos mais adequados à retrogradação que o amido de ervilha. Embora tenha havido aumento da cristalinidade relativa para ambas as fontes de amido após modificação, esse aumento foi relativamente

baixo quando observa-se o alto teor de AR₃ formado. Esses resultados sugerem que os arranjos formados durante a retrogradação dos amidos gera além de uma estrutura cristalina resistente à enzima, um impedimento físico evitando a penetração da enzima e aumentando assim a resistência desses amidos.

Em relação ao ALD, uma fração importante também por seus efeitos benéficos à saúde, a desramificação desfavoreceu essa fração quando o AMAA foi sujeito a sonicação em todos os tratamentos, porém para o AER essa fração foi favorecida no tratamento com 5 min de sonicação, mas reduzida nos demais tratamentos.

Embora alguns amidos modificados apresentaram níveis de amilose semelhantes, estes diferiram a quantidade de AR₃ formado, o que indica que a formação de amido resistente não pode ser entendida somente com base no teor de amilose desses amidos. Desse modo, as diferenças encontradas para os teores de AR₃ nos diferentes amidos modificados é resultante também dos diferentes comprimentos de cadeias das moléculas de amilose e amilopectina obtidas dos diferentes tratamentos. O AMAA apresenta maior proporção de cadeias longas que o AER, por isso provavelmente foi mais degradado em tamanhos mais adequados a reassociação o que propiciou maior formação de AR₃ para todos os tratamentos em relação ao AER. Assim, um tamanho adequado de cadeia é necessário para potencializar a formação de AR₃.

6 CONCLUSÕES

O tratamento de sonicação antecedendo a desramificação com isoamilase dos amidos com alto teor de amilose é um método eficiente para a produção de AR₃. O tempo de sonicação de 10 min a uma frequência de 30 kHz e 30 W potência foi suficiente para ambos os amidos apresentarem teores muito altos de AR₃ com alta estabilidade térmica, o que os elege para serem usados em processamentos de alimentos sem perder sua resistência.

Os resultados mostraram que tamanhos adequados de frações lineares do amido são necessários para potencializar a formação de AR₃. Nas condições deste experimento, o AMMA foi mais adequado que o AER, possivelmente devido a seu maior teor de amilose e comprimentos mais adequados das cadeias de amilose e amilopectina que ao se romperem sob ação do ultrassom, nas condições deste experimento, se tornaram mais prontas à recristalização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGSTER, A.; DUNCAN, S. E.; CONFORTI, F. D.; BARBEAU, W. E. Physicochemical properties and sensory attributes of resistant starch-supplemented granola bars and cereals. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 2159-2165, 2011.

ALARCON-ROJO, A. D.; JANACUA, H.; RODRIGUEZ, J. C.; PANIWNYK, L.; MASON, T. J. Power ultrasound in meat processing. **Meat Science**, v. 107, p. 86-93, 2015.

ALISHAHI, A.; FARAHNAKY, A.; MAJZOABI, M.; BLANCHARD, C. L. Physicochemical and textural properties of corn starch gels: Effect of mixing speed and time. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 55-62, 2015.

ALIYU, M.; HEPHER, M. J. Effects of ultrasound energy on degradation of cellulose material. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 7, p. 265-268, 2000.

ALVES, B. M.; FILHO, A. C.; TOEBE, M.; BURIN, C.; SILVA, L. P. Variability of grain productivity and energy profile of maize (*Zea mays* L.) genotypes. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 164-171, 2014.

AMINI, A. M.; RAZAVI, S. M. A.; MORTAZAVI, S. A. Morphological, physicochemical, and viscoelastic properties of sonicated corn starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 282-292, 2015.

ASHOKKUMAR, M. Applications of ultrasound in food and bioprocessing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 25, p. 17-23, 2015.

AYDINSAKIR, K.; ERDAL, S.; BUYUKTAS, D.; BASTUG, R.; TOKER, R. The influence of regular deficit irrigation applications on water use, yield, and quality components of two corn (*Zea mays* L.) genotypes. **Agricultural Water Management**, v. 128, p. 65-71, 2013.

BABU, A. S.; PARIMALAVALLI, R. Effect of pullulanase debranching and storage temperatures on structural characteristics and digestibility of sweet potato starch. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2016.

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

BELLO-PÉREZ, L.A.; MONTEALVO, M.G.M.; ACEVEDO, E.A. Almidón: definición, estructura y propiedades. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carbohidratos em alimentos regionales iberoamericano**. São Paulo: Edusp, 2006. cap. 1, p. 17-46.

BERRY, C. S. Resistant Starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. **Journal of Cereal Science**, v. 4, p. 301-314, 1986.

BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food constituents. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, n.1, p. 60-78, 1991.

BILIADERIS, C. G.; GRANT, D. R.; VOSE, J. R. Molecular weight distributions of legume starches by gel chromatography, v. 56, p. 475 – 480, 1979.

BROWN, I. L. Applications and uses of resistant starch. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 87, n. 3, p. 727-732, 2004.

BROWN, I. L.; MCNAUGHT, K. J.; ANDREWS, D.; MORITA, T. Resistant starch: plant breeding, applications, development and commercial use. In: MCCLEARY, B. V.; PROSKY, L. (Ed.), **Advanced dietary fibre technology**. Oxford: Blackwell Science, 2001. chap. 34, p. 401-412.

BULEÓN, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis Mini review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

CAI, C.; ZHAO, L.; HUANG, J.; CHEN, Y.; WEI, C. Morphology, structure and gelatinization properties of heterogeneous starch granules from high-amylose maize. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 606-614, 2014.^A

CAI, J.; YANG, Y.; MAN, J.; HUANG, J.; WANG, Z.; ZHANG, C.; GU, M.; LIU, Q.; WEI, C. Structural and functional properties of alkali-treated high-amylose rice starch. **Food Chemistry**, v. 145, p. 245-253, 2014.^B

CAI, L.; SHI, Y.C.; RONG, L.; HSIAO, S.B. Debranching and crystallization of waxy maize starch in relation to enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 385-393, 2010.

CANO, A.; FORTUNATI, E.; CHÁFER, M.; KENNY, J. M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Properties and ageing behaviour of pea starch films as affected by blend with poly(vinyl alcohol). **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 84-93, 2015.

CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Valor nutricional de produtos de ervilha em comparação com a ervilha fresca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 766-771, 2006.

CEREDA, M.P (Ed.). **Propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, 2001. v. 1, 224 p. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas).

CHAN, H. T.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Effects of sodium dodecyl sulphate and sonication treatment on physicochemical properties of starch. **Food Chemistry**, v. 120, p. 703-709, 2010.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 975-983, 2012.

CHANG, F.; HE, X.; HUANG, Q. The physicochemical properties of swelled maize starch granules complexed with lauric acid. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p. 365-372, 2013.

CHEMAT, F.; HUMMA, Z. E.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 2011.

CHENG, X.; ZHANG, M.; XU, B.; ADHIKARI, B.; SUN, J. The principles of ultrasound and its application in freezing related process of food materials: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 576-585, 2015.

CHUNG, H. J.; DONNER, E.; LIU, Q. **Resistant Starches in Foods**. Food Systems, p. 527-533, 2011.

CHUNG, H. J.; JEONG, H. Y.; LIM, S. T. Effects of acid hydrolysis and defatting on crystallinity and pasting properties of freeze-thawed high amylose corn starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 449–455, 2003.

CHUNG, H. J.; LIU, Q. Physicochemical properties and in vitro digestibility of flour and starch from pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 131–137, 2012.

COLONNA, P.; BULEON, A.; LEMAGUER, M.; MERCIER, C. Pisum sativum and vicia faba carbohydrates. Part IV – Granular structure of wrinkled pea starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 2, p. 43 – 59, 1982.

COLONNA, P.; MERCIER, C. Macromolecular structure of wrinkled and smooth pea starch components. **Carbohydrate Research**, v. 126, p. 233-247, 1984.

COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1527–1534, 2009.

CORDENUNSI, B.R. Utilização de novas técnicas de microscopia na caracterização do amido. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carboidratos em alimentos regionais iberoamericano**. São Paulo: Edusp, 2006. cap. 2, p. 49-62.

CURTIS, R. L.; WANG, Y. Effects of β -amylolysis on the resistant starch formation of debranched corn starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 4751-4757, 2012.

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, 175–184, 2005.

DAVYDOVA, N.I; LEONT'EV, S.P.; GENIN, Y.V; SASO, A.Y; BOGRAHEV, T.Y. Some physico-chemical properties of smooth pea starches. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 27, p. 109-115, 1995

DONA, A. C.; PAGES, G.; GILBERT, R. G.; KUCHEL, P. W. Starch granule characterization by kinetic analysis of their stages during enzymic hydrolysis: ^1H nuclear magnetic resonance studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1775-1786, 2010.

DUNDAR, A. N.; GOCMEN, D. Effects of autoclaving temperature and storing time on resistant starch formation and its functional and physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 764-771, 2013.

EERLINGEN, R.C.; DELCOUR, J.A. Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. **Journal of Cereal Science**, London, v. 22, p. 129-38, 1995.

ENGLYST, H.N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. 33-50, 1992.

FARAJ, A.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R. The effect of extrusion cooking resistant starch formation in waxy and regular barley flours. **Food Research International**, v. 37, p. 517-525, 2004.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, A.F.; FARMENTO, S.B.S. **Propriedades Gerais Do Amido**: Fundação Cargil São Paulo, 2001.

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. **Journal of animal science**, v. 37, p. 1048-1061, 1973.

FUENTES-ZARAGOZA, E.; RIQUELME-NAVARRETE, M.J.; SÁNCHEZ ZAPATA, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Resistant starch as functional ingredient: A review. **Food Research International**, v. 43, p. 931-942, 2010.

FUENTES-ZARAGOZA, E.; SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; SENDRA, E.; SAYAS, E.; NAVARRO, C.; FERNÁNDEZLÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Resistant starch as prebiotic: a review. **Starch/Stärke**, v. 63, p. 406-415, 2011.

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BADWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, p. 177-191, 1997.

GONZÁLEZ-SOTO, R. A.; AGAMA-ACEVEDO, E.; SOLORZA-FERIA, J.; RENDÓNVILLALOBOS, R.; BELLO-PÉREZ, L. A. Resistant starch made from banana starch by autoclaving and debranching. **Starch/Stärke**, v. 56, p. 495-499, 2004.

GOT, F.; CULIOLI, J.; BERGE, P.; VIGNON, X.; ASTRUC, T.; QUIDEAU, J. M.; LETHIECQ, M. Effects of high-intensity high frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physic-chemical properties of beef. **Meat Science**, v. 51, p. 35-42, 1999.

HASJIM, J.; JANE, J. Production of resistant starch by extrusion cooking of acid-modified normal-maize starch. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 556-562, 2009.

HAAJ, S. B.; MAGNIN, A.; PÉTRIER, C.; BOUFI, S. Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p. 1625– 1632, 2013.

HIZUKURI, S.; TAKEDA, Y.; ABE, J.; HANASHIRO, I.; MATSUNOBU, G.; KIYOTA, H. Analytical developments: Molecular and microstructural characterization. In: FRAZIER, P. J.; DONALD, A. M; RICHMOND, P. **Starch: Structure and Functionality**. The Royal Society of Chemistry, p. 121–128, 1997.

HOOVER, R. Composition, molecular structure and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n.3, p. 253-267, 2001.

HOOVER, R.; RATNAYAKE, W.S. Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. **Food Chemistry**, London, v. 78, p. 489-498, 2002.

HUANG, J.; SHANG, Z.; MAN, K.; LIU, Q.; ZHU, C. Comparison of molecular structures and functional properties of high amylose starches from rice transgenic line and commercial maize. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 172-179, 2015.

HUANG, Q.; LI, L.; FU, X. Ultrasound Effects on the Structure and Chemical Reactivity of Cornstarch Granules. **Starch/Stärke**, v. 59, p. 371-378, 2007.

- HU, A.; JIAO, S.; ZHENG, J.; LI, L.; FAN, Y.; CHEN, L.; ZHANG, Z. Ultrasonic frequency effect on corn starch and its cavitation. **Food Science and Technology**, v. 60, p. 941-947, 2015.
- 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 and Emerging Technologies**, v. 9, p. 140-146, 2008.
- ISONO, Y., KUMAGAI, T., WATANABE, T. Ultrasonic degradation of waxy rice starch. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 10, p. 1799-1802, 1994.
- JACOBS, H.; DELCOUR, J.A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 2895-2905, 1998.
- JAMBRAK, A. N.; HERCEG, Z.; ŠUBARI, D.; BABIĆ, J.; BRNČIĆ, M.; BRNČIĆ, S. R.; BOSILJKOV, T.; ČVEK, D.; TRIPALO, B.; GELO, J. Ultrasound effect on physical properties of corn starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 91-100, 2010.
- JAMBRAK, A.R.; MASON, T. J.; LELAS, V.; HERCEG, Z.; HERCEG, L. J. I. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p.281–287, 2008.
- JANE, J. Current understanding on starch granule structures. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 53, p. 205-213, 2006.
- JANE, J. Starch: Structure and properties. In: TOMASIK, P. Chemical and functional properties of food saccharides, Boca Ration: CRC Press, cap.7, p. 81-102, 2003.
- JANE, J.; CHEN, Y. F.; MCPHERSON, A. E.; WONG, K. S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAM, T. 1999. Effects of amylopectin branch length and amylase content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, p. 629-637, 1999.
- JANE, J.; KASEMSUWAN, T.; CHEN, J. F. Phosphorous in rice and other starches. **Cereal Foods World**, v. 41, n. 11, p. 827-832, 1996.
- JIANG, H.; JANE, J.; ACEVEDO, D.; GREEN, A.; SHINN, G.; SCHRENKER, D.; SRICHUWONG, S.; CAMPBELL, M.; WU, Y. Variations in starch physicochemical properties from a generation-means analysis study using amylo maize V and VII parents. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 5633-5639, 2010.
- JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Plant Biotechnology**, v. 7, p. 210-218, 2004.
- JULIANO, B. O. A simplified assay for milled-rice amylose. **Cereal Science Today**, v.16, n. 10, p. 334-340, 1971.
- KACI, M.; TEHRANY-ARAB, E.; DESJARDINS, I.; DESOBRY-BANON, DESOBRY, S. Emulsifier free emulsion: Comparative study between a new high frequency ultrasound process and standard emulsification processes. **Journal of Food Engineering**, v. 194, p. 109-118, 2017.

KAHRAMAN, K.; KOKSEL, H.; NG, P. K. W. Optimisation of the reaction conditions for the production of cross-linked starch with high resistant starch content. **Food Chemistry**, v. 174, p. 173-179, 2015.

KANG, N.; ZUO, Y. J.; HILLIOU, L.; ASHOKKUMAR, M.; HEMAR, Y. Viscosity and hydrodynamic radius relationship of high-power ultrasound depolymerised starch pastes with different amylose content. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 183-191, 2016.

KARDOS, N.; LUCHE, J. L. Sonochemistry of carbohydrate compounds. **Carbohydrate Research**, v. 332, n. 2, p. 115-131, 2001.

KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Quantitative method for the survey of starch phosphate derivatives of starch phospholipids by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 702-707, 1996.

KASEMSUWAN, T., JANE J., SCHNABLE, P., STINARD, P.; ROBERTSON, D. Characterization of the dominant mutant amylose-extender (ae1-5180) maize starch. *American Association of Cereal Chemists*, v. 72, p.457-464, 1995.

KIATPONGLARP, W.; TONGTA, S.; ROLLAND-SABATÉ, A.; BULEÓN, A. Crystallization and chain reorganization of debranched rice starches in relation to resistant starch formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 108-114, 2015.

KIM, H. Y.; HAN, J. A.; KWEON, D. K.; PARK, J. D.; LIM, S. T. Effect of ultrasonic treatments on nanoparticle preparation of acid-hydrolyzed waxy maize starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 582-588, 2013.

KORUS, J.; WITCZAK, M.; ZIOBRO, R.; JUSZCZAK. The impact of resistant starch on characteristics of gluten-free dough and bread. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 988-995, 2009.

KUMARI, J.; DIKSHIT, H, K.; SINGH B.; SINGH D. Combining ability and character association of agronomic and biochemical traits in pea (*Pisum sativum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 26-33, 2015.

LE CORRE, D., BRAS, J., DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: a review. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1139-1153, 2010.

LEE, C. J.; MOON, T. W. Structural characteristics of slowly digestible starch and resistant starch isolated from heat–moisture treated waxy potato starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 200-205, 2015.

LEONG, Y. H.; KARIM, A.A.; NORZIAH, M.H. Effect of pullulanase debranching of sago (*Metroxylon sagu*) starch at subgelatinization temperature on the yield of resistant starch. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 59, n. 1, p. 21-32, 2007.

LEHMANN, U.; RÖSSLER, C.; SCHMIEDL, D.; JACOBASCH, G. Production and physicochemical characterization of resistant starch type III derived from pea starch. **Nahrung/Food**, Weinheim, v. 47, n. 1, p. 60-63, 2003.

LERTWANAWATANA, P.; FRAZIER, R. A.; NIRANJAN, K. High pressure intensification of cassava resistant starch (RS3) yields. **Food Chemistry**, v. 181, p. 85-93, 2015.

- LE, Q. T.; LEE, C. K.; KIM, Y. W.; LEE, S. J.; ZHANG, R.; WITHERS, S. G.; KIM, Y. R.; AUH, J. H.; PARK, K. W. Amylolytically-resistant tapioca starch modified by combined treatment of branching enzyme and maltogenic amylase. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 9-14, 2009.
- LI, L.; JIANG, H.; CAMPBELL, M.; BLANCO, M.; JANE, J. Characterization of maize amylose-extender (*ae*) mutant starches. Part I: Relationship between resistant starch contents and molecular structures. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 74, p. 396-404, 2008.
- LI, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI, G. Constitutive expression of a novel isoamylase from *Bacillus lentus* in *Pichia pastoris* for starch processing. **Process Biochemistry**, 48, p. 1303-1310, 2013.
- LIÃO, H. J.; HUNG, C. C. Chemical composition and in vitro starch digestibility of green banana (cv. Giant Cavendish) flour and its derived autoclaved/debranched powder. **Food Science and Technology**, v. 64, p. 639-644, 2015.
- LIMA, F. F.; ANDRADE, C. T. Effect of melt-processing and ultrasonic treatment on physical properties of high-amylose maize starch. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 637-641, 2010.
- LIN, J. H.; SINGH H.; CHEN, F. B.; CHANG, Y. H. Changes in swelling and rheological properties of corn starches after acid-methanol degradation. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 361-368, 2015.
- LIN, L.; CAI, C.; GILBERT, R. G.; LI, E.; WANG, J. Relationships between amylopectin molecular structures and functional properties of different-sized fractions of normal and high-amylose maize starches. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 359-368, 2016.
- LIN, L.; GUO, D.; HUANG, J.; ZHANG, X., ZHANG, L., WEI, C. Molecular structure and enzymatic hydrolysis properties of starches from high-amylose maize inbred lines and their hybrids. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 246 – 254, 2016.^B
- LIU, C.; WANG, S.; COPELAND, L.; WANG, S. Physicochemical properties and in vitro digestibility of starches from field peas grown in China. **Food Science and Technology**, v. 64, p. 829-836, 2015.
- LOBO, A. R.; SILVA, G.M. de L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 219-226, 2003.
- LORIMER, J. P.; MASON, T. J.; CUTHBERT, T. C.; BROOKFIELD, E. A. Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 2, p. 55-57, 1994.
- LUCKETT, R.C.; WANG, Y. Effects of β -Amylolysis on the Resistant Starch Formation of Debranched Corn Starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4751-4757, 2012.
- 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/Stärke**, v. 60, p. 646-653, 2008.
- MALI, S; GROSSMAN, M. V. E; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Ciências Agrárias**, v. 31, p. 138-140, 2010.

- MORALES-MEDINA, R.; MUÑO, M. M.; GUADIX, E. M.; GUADIX, A. Production of resistant starch by enzymatic debranching in legume flours. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1176-1183, 2015.
- NGUYEN, G. T.; GIDLEY, M. J.; SOPADE, P. A. Dependence of in-vitro starch and protein digestions on particle size of field peas (*Pisum sativum* L.). **Food Science and Technology**, v. 63, p. 541-549, 2015.
- NUGENT, A.P. Health properties of resistant starch. **British Nutrition Foundation**, v. 30, p. 27-54, 2005.
- OJHA, K. S.; MASON, T. J.; O'DONNELL, C. P.; KERRY, J. P.; TIWARI, B. K. Ultrasound technology for food fermentation applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 410-417, 2017.
- OSORIO-DÍAZ, P.; BELLO-PÉREZ, L. A.; AGAMA-ACEVEDO, E.; VARGAS-TORRES, A.; TOVAR, J.; PAREDES-LÓPEZ, O. In vitro digestibility and resistant starch content of some industrialized commercial beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 78, p. 333-337, 2002.
- PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 147-154, 2008.
- PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; DEON, V. G.; MOOMAND, K.; HALAL, S. L. M.; ZAVAREZE, E. R.; LIM, L. T.; DIAS, A. R. G. Effects of single and dual physical modifications on pinhao starch. **Food Chemistry**, v. 187, p. 98-105, 2015.
- POHLMAN, F. W.; DIKEMAN, M. E.; ZAYAS, J. F. The effect of low-intensity ultrasound treatment on shear properties, color stability and shelf-life of vacuum-packaged beef *semitendinosus* and *biceps femoris* muscles. **Meat Science**, v. 45, p. 3249-337, 1997.
- POLESI, L. F.; SARMENTO, S. B. S.; ANJOS, C. B. P. Composition and characterization of pea and chickpea starches. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 74-81, 2011.
- POLESI, L. F.; SARMENTO, S. B. S. Structural and physicochemical characterization of RS prepared using hydrolysis and heat treatments of chickpea starch. **Starch/Starke**, v. 63, p. 226-235, 2011.
- RATNAYAKE, W.S.; HOOVER, R.; SHAHIDI, F.; PERERA, C.; JANE, J. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, London, v. 74, p. 189-202, 2001.
- RATNAYAKE, W. S.; HOOVER, R.; WARKENTIN, T. Pea starch: composition, structure and properties - A review. **Starch/Stärke**, v. 54, n. 6, p. 217-234, 2002.
- REDDY, C. K.; SURIYA, M.; HARIPRIYA, S. Physico-chemical and functional properties of resistant starch prepared from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*. L) starch by enzymatic method. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 220-226, 2013.
- RICHMOND, P.; DONALD, A. M. Starch: Structure and Functionality. London: **Royal Society of Chemistry**, p. 121-128, 1997.

ROBIN, J. P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R.; GUILBOT, A. Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 389-406, 1974.

ROCHA, T. S.; CARNEIRO, A. P. A.; FRANCO, C. M. L. Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of root and tuber granular starches. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 544-551, 2010.

ROSAS-CASTOR, J. M.; GUZMÁN-MAR, J. L.; HERNANDES-RAMÍREZ, GARZAGONZÁLEZ, M. T.; HINOJOSA-REYES, L. Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review. **Science of the Total Environment**, v. 488–489, p.176–187, 2014.

SAID, S.; ROSEMEIRE C. L. R. PIETRO. Enzimas como agentes biotecnológicos. Editora Legis Summa, 2004.

SAJILATA, M.G.; SHINGAL, R.S.; KULKARNI, P.R. Resistant starch – A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 1-17, 2006.

SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; SENDRA, E.; SAYAS, E.; NAVARRO, C.; FERNÁNDEZLÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Resistant starch as prebiotic: a review. **Starch/Stärke**, v. 63, p. 406-415, 2011.

SANG, Y.; PRAKASH, O.; SEIB, P. A. Characterization of phosphorylated cross-linked resistant starch by ³¹P nuclear magnetic resonance (31P NMR) spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 201-212, 2007.

SCHIRMER, M.; HÖCHSTÖTTER, A.; JEKLE, M.; ARENDT, E.; BECKER, T. Physicochemical and morphological characterization of different starches with variable amylose/amylopectin ratio. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p.52-63, 2013.

SEGUCHI, M., HIGASA, T.; MORI, T. Study on wheat starch structures by sonication treatment. **Cereal Chemistry**, v. 71, p. 636-639, 1994.

SHANMUGAM, A.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic preparation of stable flax seed oil emulsions in dairy systems – Physicochemical characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 151-162, 2014.

SHI, M.; CHEN, Y.; YU, S.; GAO, Q. Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pululanase. **Food Hydrocolloids**, v.33, p.19-25, 2013.

SHI, M.; ZHANG, Z.; YU, S.; WANG, K.; GILBERT, R. G.; GAO, Q. Pea starch (*Pisum sativum* L.) with slow digestion property produced using b-amylase and transglucosidase. **Food Chemistry**, v. 164, p. 317-323, 2014.

SHU, X.; SUN, J.; WU, D. Effects of grain development on formation of resistant starch in rice. **Food Chemistry**, v. 164, p. 89-97, 2014.

SILJESTROM, M.; ASP, N.G. Resistant starch formation during baking. Effect of baking time and temperature and variation in the recipe. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung**, Heidelberg, v. 4, p. 1-18, 1985.

SINGH, J.; DARTOIS, A.; KAUR, L. Starch digestibility in food matrix: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 4, p. 168-180, 2010.

SINGH, N.; KAUR, S.; RANA, J. C.; NAKAURA, Y.; INOUCHI, N. Isoamylase debranched fractions and granule size in starches from kidney bean germplasm: Distribution and relationship with functional properties. **Food Research International**, v. 47, p. 174–181, 2012.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.

SIRÓ, I.; VÉN, Cs.; BALLA, Cs.; JÓNÁS, G.; ZEKE, I.; FRIEDRICH, L. Application of an ultrasonic assisted curing technique for improving the diffusion of sodium chloride in porcine meat. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 353-362, 2009.

SUI, Z.; SHAH, A.; BEMILLER, J. N. Crosslinked and stabilized in-kernel heat-moisture-treated and temperature-cycled normal maize starch and effects of reaction conditions on starch properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1461-1467, 2011.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Hidrólise do amido. In: CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, v. 3, p. 378-449, 2003.

SUN, Q.; XIONG, C. S. L. Functional and pasting properties of pea starch and peanut protein isolate blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1134-1139, 2014.

SUJKA, M.; JAMROZ, J. Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behaviour. **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 413-419, 2013.

TAKEDA, Y., HIZUKURI, S., JULIANO, B. O. Structures of rice amylopectin with low and high affinities for iodine. **Carbohydrate Research**, v. 168, p. 79 – 88, 1987.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal science**, v. 39, p. 151-165, 2004.

TESTER, R. F. Starch: the polysaccharide fractions. In: FRAZIER, P.J.; RICHMOND, P.; DONALD, A. M. (Ed.) **Starch, structure and functionality**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1997. p. 163-171.

TAN, X.; ZHANG, B.; CHEN, L.; LI, X.; LI, L.; XIE, F. Effect of planetary ball-milling on multi-scale structures and pasting properties of waxy and high-amylose corn starches. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 198–207, 2015.

THEMEIER, H.; HOLLMANN, J.; NEESE, U.; LINDHAUER, M.G. Structural and morphological factors influencing the quantification of resistant starch II in starches of different botanical origin. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 72-79, 2005.

THOMAS, D. J.; ATWEEL, W. Starches: practical guides for the food industry. Minnesota: **Eagan Press**, 94 p., 1999.

TOPPING, D.L.; CLIFTON, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 81, n. 3, p. 1031-1064, 2001.

- VILLAS-BOAS, F.; FRANCO, C. M. L. Effect of bacterial β -amylase and fungal α -amylase on the digestibility and structural characteristics of potato and arrowroot starches. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 795-803, 2016.
- WALTER, M.; SILVA, L.; EMANUELLI, T. Amido Resistente: Características Físico Químicas, Propriedades Fisiológicas e Metodologias de Quantificação. **Ciência Rural**, v. 35, p. 974-980, 2005.
- WANG, J.; JIN, Z.; YUAN, X. Preparation of resistant starch from starch–guar gum extrudates and their properties. **Food Chemistry**, v. 101, p. 20-25, 2007.
- WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 748-753, 2009.
- XIE, Y.Y.; HU, X. P.; JIM, Z.Y.; XU, X.M.; CHEN, H.Q. Effect of temperature-cycled retrogradation on in vitro digestibility and structural characteristics of waxy potato starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 79-84, 2014.
- YU, W.; TAN, X.; ZOU, W.; HU, Z.; FOX, G. P.; GIDLEY, M. J.; GILBERT, R. G. Relationships between protein content, starch molecular structure and grain size in barley. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 271-279, 2017.
- ZHANG, H.; JIN, Z. Preparation of products rich in resistant starch from maize starch by an enzymatic method. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1610-1614, 2011.
- ZHANG, Y.; ZENG, H.; WANG, Y.; ZENG, S.; ZENG, B. Structural characteristics and crystalline properties of lotus seed resistant starch and its prebiotic effects. **Food Chemistry**, v. 155, p. 311-318, 2014.
- ZHAO, Y. Y.; WANG, P.; ZOU, Y. F.; LI, K.; KANG, Z. L.; XU, X. L.; ZHOU, G. H. Effect of pre-emulsification of plant lipid treated by pulsed ultrasound on the functional properties of chicken breast myofibrillar protein. **Food Research International**, v. 58, p. 98-104, 2014.
- ZHENG, J., LI, Q., HU, A., YANG, L., LU, J., ZHANG, X. Dual frequency ultrasound effect on structure and properties of sweet potato starch. **Starch/Stärke**, v. 65, p. 621-627, 2013.
- ZHOU, Y.; MENG, S.; CHEN, D.; ZHU, H.; YUAN, H. Structure characterization and hypoglycemic effects of dual modified resistant starch from indica rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 81-86, 2014.
- ZHU, B., LIU, J.; GAO, W. Process optimization of ultrasound-assisted alcoholic-alkaline treatment for granular cold water swelling starches. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2016.
- ZHU, F. Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch: Review. **Food Science & Technology**, v. 43, p. 1-17, 2015.
- ZHU, J.; LI, L.; CHEN, L.; LI, X. Study on supramolecular structural changes of ultrasonic treated potato starch granules. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 116-122, 2012.
- ZOBEL, H.F. X-ray analysis of starch granules In: Whistler, R.L. (Ed.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, 1964. v. 4, chap. 29, p. 109- 143.

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

ZUO, Y. Y. J.; HÉBRAUD, P.; HEMAR, Y.; ASHOKKUMAR, M. Quantification of high-power ultrasound induced damage on potato starch granules using light microscopy. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 421-426, 2012.