

Flávia Villas Boas

**Efeito da β -amilase e α -amilase fúngica seguido de desramificação na
formação e características estruturais de amido resistente tipo 3 de batata e
araruta**

São José do Rio Preto - SP

2014

Flávia Villas Boas

Efeito da β -amilase e α -amilase fúngica seguido de desramificação na formação e características estruturais de amido resistente tipo 3 de batata e araruta

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 Biociência, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para a dissertação de mestrado em.

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

São José do Rio Preto - SP

2014

Villas Boas, Flávia.

Efeito da β -amilase e α -amilase fúngica seguido de desramificação na formação e características estruturais de amido resistente tipo 3 de batata e araruta / Flávia Villas Boas. -- São José do Rio Preto, 2014
75 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 - Aspectos de saúde.
3. Amilases. 4. Dieta de baixo carboidrato. I. Franco, Célia Maria Landi.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664.2

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

Efeito da β -amilase e α -amilase fúngica seguido de desramificação na formação e características estruturais de amido resistente tipo 3 de batata e araruta

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 Biociência, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para a dissertação de mestrado em.

Comissão Examinadora

Presidente:

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

UNESP – S. J. Rio Preto, SP

Orientador

Prof^a. Dr^a. Thaís de Souza Rocha

UEL – Londrina, PR

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Conti

UNESP – S. J. Rio Preto, SP

São José do Rio Preto - SP

2014

Dedico

A minha família

Agradecimentos

Agradeço primeiramente e principalmente a Deus, quem guia meus passos.

Agradeço também em especial a Prof^ª. Dr^ª Célia Maria Landi Franco, por toda a dedicação e orientação desse trabalho.

Aos meus pais, José Geraldo Villas Boas, Edna Zequine Villas Boas, que me incentivavam e apoiaram. Ao meu marido e companheiro Maicon Vicente Esteves, por toda ajuda, paciência e compreensão nos momentos difíceis além do incentivo para a realização deste trabalho.

Ao meu irmão Fernando Villas Boas, cunhada Flávia Serom Villas Boas, tios (Uderlei e “Renatinho”) e tias (Sandra e Valdireni) e a toda minha família, que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos técnicos do departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos por toda a ajuda.

Aos companheiros de laboratório Jefferson, Mariana, Marina, Ana Karla e Jaqueline pelos conselhos, ajuda e principalmente pelo companheirismo e amizade.

À CAPES pelo auxílio financeiro

A todos meus sinceros agradecimentos

“Soberano, Maravilhoso
Deus que não sabe o que é falhar
Soberano, Fiel
Sei que Ele nunca vai deixar de me amar”

RESUMO

Amido resistente (AR) é definido como a fração de amido que não sofre a ação das enzimas digestivas do trato gastrointestinal apresentando comportamento semelhante ao da fibra alimentar. AR tipo 3 é o amido retrogradado composto principalmente por amilose ou amido desramificado devido a sua maior tendência à reassociação. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da β -amilase e da α -amilase fúngica na formação de AR3 a partir de amidos de batata e araruta. Suspensões de amido (6,5% m/v) foram gelatinizadas e submetidas à hidrólise com β -amilase (400U/g) ou α -amilase fúngica (5U/g para batata e 10U/g para araruta), por 6 h. Alíquotas do sobrenadante foram coletadas e o grau de hidrólise determinado pela quantificação de açúcares totais (método fenol-sulfúrico). Os hidrolisados foram desramificados com pululanase (40U/g), por 10 h, refrigerados a 4°C por 16 h para potencializar a retrogradação, precipitados com etanol e secos. Amostras controle foram produzidas a partir da gelatinização e desramificação dos amidos sem a utilização das amilases. Os amidos retrogradados foram caracterizados quanto ao tamanho molecular dos componentes do amido (GPC), distribuição do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina (HPAEC-PAD), padrão cristalino e cristalinidade relativa (difracção de raios-X), propriedades térmicas (DSC) e teor de AR. A amilólise dos amidos de batata e araruta resultou em grau de hidrólise semelhante (~25%), independente das enzimas utilizadas. O amido nativo de batata apresentou padrão cristalino tipo B, 20,7% de amilose e alta proporção de cadeias laterais longas da amilopectina ($DP \geq 37$), enquanto o amido de araruta mostrou padrão cristalino tipo A, 19,5% de amilose, e alta proporção de cadeias laterais curtas (DP 6-12). A ação da β -amilase provocou, em ambos os amidos aumento expressivo na proporção de cadeias com GP 25-36 e expressiva redução nas cadeias com GP 13-24, enquanto a α -amilase fúngica mostrou redução nas proporções de cadeias com GP 13-24, GP 25-36 e $GP \geq 37$, e aumento expressivo nas cadeias de GP 6-12. As entalpias de gelatinização e a cristalinidade relativa dos amidos tratados enzimaticamente aumentaram e foram maiores quando a α -amilase foi usada no amido de araruta. O teor de AR3 nos amidos de batata e de araruta gelatinizados foi 8,08 e 1,1%, respectivamente. A desramificação provocou aumento desse teor para 20,2 e 21,7%, respectivamente. Com a amilólise precedendo a desramificação, o teor de AR3 no amido de batata aumentou para 36,8 e 36,3% quando α - e β -amilases foram usadas, respectivamente, enquanto no amido de araruta esses valores alcançaram 53,4 e 47,5%, respectivamente. Os resultados mostraram que a α -amilase foi mais eficiente na

formação de AR3, principalmente para o amido de araruta. Os tamanhos de cadeias formadas após ação desta enzima no amido de araruta são mais adequados para facilitar o pareamento e conseqüentemente a reassociação das cadeias. As características estruturais, principalmente o comprimento das cadeias laterais da amilopectina são os principais responsáveis na formação do AR3 quando a amilólise precede a desramificação.

PALAVRAS-CHAVE: Amido resistente, amilases, estrutura retrogradação.

ABSTRACT

Resistant starch (RS) is defined as the fraction of starch that does not suffer from the action of digestive enzymes from the gastrointestinal tract showing a similar behavior to that of dietary fiber. Retrograded starch, defined as RS3, is composed mainly of amylose and debranched starch due to its greater tendency to reassociation. In this work the effect of β -amylase and fungal α -amylase on the formation and physicochemical properties of RS3 from potato and arrowroot starches were investigated. Starch suspensions (6,5%w/v) were first gelatinized and then hydrolyzed by β -amylase (400U/g) or fungal α -amylase (5U/g potato starch, 10U/g arrowroot starch) for 6h. Aliquots of the supernatant were collected and hydrolysis degree was determined by measuring total carbohydrate content (phenol-sulfuric method). The hydrolysates were debranched by pullulanase (40U/g), for 10h, cooled to 4°C for 16h to enhance the retrogradation, precipitated using ethanol, and dried. Control samples were produced from the gelatinization and debranching of the starch without the use of amylase. The retrograded starches were characterized for molecular weight distribution of starch components (GPC), amylopectin branched-chain length distribution (HPAEC-PAD), crystalline pattern (X-ray diffraction), thermal properties (DSC) and RS content. The amylolysis of potato and arrowroot starches resulted in a similar hydrolysis degree (~25%) independent of used enzymes. Native potato starch displayed type B crystalline pattern, 10,7% of amylose, and a high proportion of long branch chains of amylopectin ($DP \geq 37$) while arrowroot starch displayed type A crystalline pattern, 19,5% of amylose, and a high proportion of short branch chains (DP 6-12). The action of β -amylase resulted in both starches significant increase in the proportion of chains with DP 25-36 and significant reduction in chains with DP 13-24, while the fungal α -amylase showed a reduction in the proportions of chains with DP 13-24 DP 25-36 and $DP \geq 37$, and a significant increase in supply chains GP 6-12. The enthalpy of gelatinization and the relative crystallinity of the treated enzymatically starches increased with the increasing of the RS3 content. RS3 contents in the gelatinized potato and arrowroot starches were 8.1% and 1.1%, respectively. Debranching of starches increased this percentage to 23.8% and 21.7%, respectively. The RS3 content in potato starch increased for 36,8 and 36,3% when α - and β -amylases were used, respectively, while in arrowroot starch, these values were higher (53,4 and 47,5% respectively). The results showed that α -amylase was more efficient than β -amylase with the formation of RS3 in arrowroot. The size of the chain formed after action of that enzyme in

arrowroot starch are most appropriate to facilitate pairing and consequently reassociating the chain. The main structural characteristics, mainly the length of the amylopectin side chain are the most important responsible in the formation of RS3 when amylase comes before the debranch.

KEYWORDS: *resistant starch, amylases , structure, retrogradation*

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Representação esquemática da estrutura de um fragmento de amilose. Fonte: Bello-Perez, Montealvo e Acevedo (2006).</i>	18
<i>Figura 2: Estrutura da molécula de amilopectina. Fonte: Denardin e Silva (2009).</i>	19
<i>Figura 3: Classificação das cadeias de amilopectina em tipo A, B e C. Fonte: Sajilata, Singhal e Kulkarni (2006).</i>	19
<i>Figura 4: Representação esquemática do modelo de ação de α- e β-amilases. Fonte: Horton et al.(1996).</i>	29
<i>Figura 5: Representação esquemática da ação da pululanase sobre o gel de amido retrogradado seco (GARS). X- indica os pontos de ramificação da amilopectina; a – cristal de amilose; b – cadeia de amilopectina linear; c- amilopectina dupla hélice; d – cristal de amilopectina; e – amilopectina residual. Adaptado de Vasanthan; Bhatti (1998).</i>	31
<i>Figura 6: Porcentagem de hidrólise em função do tempo, dos amidos de batata e araruta incubados com β-amilase durante 12 h a 40° C.</i>	47
<i>Figura 7: Perfis de eluição dos amidos nativos de batata (a) e araruta (b) obtidos por cromatografia de permeação em gel Sepharose CL2B. (●) Blue value; (○) carboidratos totais.</i>	49
<i>Figura 8: Perfis de eluição dos amidos de batata e araruta hidrolisados enzimaticamente e obtidos por cromatografia de permeação em BIO GEL P6. (○) carboidratos totais. Amidos de batata (a) e de araruta (d) gelatinizados, desramificados e retrogradados; amidos de batata (b) e de araruta (e) gelatinizados hidrolisados com β-amilase, desramificados e retrogradados; amidos de batata (c) e de araruta (f) gelatinizados hidrolisados com α-amilase, desramificados e retrogradados. G=glicose.</i>	50
<i>Figura 9: Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos de batata (a) e de araruta (b) desramificados por isoamilase.</i>	51
<i>Figura 10: Distribuição do comprimento de cadeias lineares dos produtos da hidrólise enzimática dos amidos. Amidos de batata (a) e de araruta (b) gelatinizados, desramificados e retrogradados; amidos de batata (b) e de araruta (e) gelatinizados hidrolisados com β-amilase, desramificados e retrogradados; amidos de batata (c) e de araruta (f) gelatinizados hidrolisados com α-amilase, desramificados e retrogradados.</i>	52
<i>Figura 11: Difractogramas de raios-X dos amidos de batata e araruta (a) nativo (b) gelatinizados, desramificado e retrogradado (c) gelatinizado hidrolisado com β-amilase, desramificado e retrogradado (d) gelatinizado hidrolisado com α-amilase, desramificado e retrogradado, e suas respectivas cristalinidades relativas (%).</i>	54
<i>Figura 12: Perfil endotérmico dos amidos de batata(I) e araruta (II): (a) nativos; (b) gelatinizados, desramificados e retrogradados; (c) gelatinizados, hidrolisados com β-amilase, desramificados e retrogradados; (d) gelatinizados hidrolisados com α-amilase, desramificados e retrogradados.</i>	56

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Composição química¹(em porcentagem) dos amidos de batata e araruta</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 2: Afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto dos amidos de batata e araruta*</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 3: Porcentagem de hidrólise dos amidos de batata e araruta incubados com diferentes concentrações de α-amilase a 55°C por 6 h.</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 4: Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos*</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 5: Distribuição do comprimento das cadeias lineares dos produtos da hidrólise enzimática dos amidos de batata e araruta.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 6: Teor de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR) nos amidos de batata e de araruta submetidos aos diferentes tratamentos enzimáticos.....</i>	<i>59</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	17
3.1 O AMIDO.....	17
3.1.1 Amilose e amilopectina	17
3.1.2 Gelatinização e retrogradação do amido	21
3.2 AMIDO RESISTENTE	23
3.2.1 Efeitos do amido resistente na saúde	24
3.2.2 Tipos de amido resistente.....	26
3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE AMIDO RESISTENTE.....	28
3.3.1 Amilases	28
3.4 USO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE AMIDO RESISTENTE	31
3.5 AMIDO DE BATATA	33
3.6 AMIDO DE ARARUTA	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 MATERIAIS	35
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 Isolamento dos amidos.....	35
4.2.2 Composição química	36
4.2.3 Teor de amilose.....	36
4.2.4 Tratamento enzimático dos amidos.....	37
4.2.5 Distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos por cromatografia de permeação em gel (GPC).....	39
4.2.6 Distribuição do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos nativos e modificados	40
4.2.7 Difração de raios -X e cristalinidade relativa	41
4.2.8 Propriedades térmicas	41
4.2.9 Determinação do teor de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente tipo 3 (AR3)	42
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICAS.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 ISOLAMENTO DOS AMIDOS	44
5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS AMIDOS	44
5.3 AFINIDADE POR IODO E TEOR DE AMILOSE APARENTE E ABSOLUTO	45

5.4 HIDRÓLISE DOS AMIDOS DE BATATA E ARARUTA COM AMILASES	46
5.5 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO MOLECULAR DOS COMPONENTES DOS AMIDOS NATIVOS E TRATADOS ENZIMATICAMENTE POR CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL (GPC)	48
5.6 DISTRIBUIÇÃO DO COMPRIMENTO DAS CADEIAS RAMIFICADAS DA AMILOPECTINA DOS AMIDOS NATIVOS E HIDROLISADOS	51
5.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X E CRISTALINIDADE RELATIVA	54
5.8 PROPRIEDADES TÉRMICAS	56
5.9 TEORES DE AMIDO RAPIDAMENTE DIGERÍVEL (ARD), LENTAMENTE DIGERÍVEL (ALD) E RESISTENTE (AR3)	58
6 CONCLUSÕES	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

O amido é um carboidrato encontrado em abundância na natureza só competindo em quantidade com a celulose. É composto por dois polímeros de glicose, a amilose e amilopectina, que são arranjadas em grânulos insolúveis em água.

Amidos digestíveis são hidrolisados pelas enzimas digestivas secretadas pelo intestino humano, liberando glicoses livres que são absorvidas pelo organismo. Alguns aspectos físico-químicos do amido podem afetar a sua digestibilidade em um alimento como: origem botânica, relação amilose/amilopectina, grau de cristalinidade, forma física e o tipo de processamento, assim como interações ocorridas entre esta substância e outros constituintes do alimento (LOBO; SILVA, 2003).

De acordo com a digestibilidade, o amido pode ser classificado em três diferentes classes: amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível ou parcialmente resistente (ALD) e amido resistente (AR). O ARD é convertido em glicose em até 20 minutos após o consumo. O ALD fornece glicose ao sangue durante períodos mais longos, por ser convertido em glicose em até 120 min após o consumo, e o AR é amido ou fração de amido que não é digerido por enzimas amilolíticas no trato digestivo e pode ser fermentado por bactérias no cólon produzindo ácidos graxos de cadeias curtas e outros ácidos orgânicos (ENGLYST; CUMMINGS, 1985).

O comportamento do AR é fisiologicamente similar ao das fibras solúveis e fermentescíveis. Sua ação mais comum é provocar o aumento do bolo fecal e reduzir o pH do cólon. Serve de substrato para a microbiota do cólon, produzindo metabólitos como ácidos graxos de cadeias curtas, principalmente os ácidos acético, propiônico e butírico.

O AR pode ser classificado em cinco grupos, sendo o tipo 1 o amido fisicamente inacessível, o tipo 2 consiste no grânulo resistente, o tipo 3 consiste no amido formado após a retrogradação, o tipo 4 é o amido produzido por modificações químicas e o tipo 5 é o amido complexado com lipídeos.

Técnicas de processamento que afetam a gelatinização e retrogradação do amido podem influenciar na taxa de formação de AR3, o qual é composto principalmente por amilose ou amido desramificado devido a sua maior tendência à reassociação. Processamentos térmicos como autoclavagem, aquecimento, extrusão e irradiação por microondas podem ser utilizados para a gelatinização do amido. Após tais processos, técnicas que potencializam a

retrogradação, como por exemplo, o resfriamento, ou uso de diversos ciclos de aquecimento e resfriamento pode ser utilizado.

A hidrólise enzimática envolve principalmente a quebra das moléculas de amido em fragmentos de baixa massa molecular interferindo no tamanho das cadeias lineares da amilose e nas cadeias laterais da amilopectina, potencializando a tendência à retrogradação do resíduo da hidrólise sob resfriamento e armazenamento após gelatinização. Portanto a hidrólise enzimática com α - ou β -amilase poderia ser usada como um pré-tratamento antes da desramificação do amido visando a obtenção de cadeias lineares com tamanhos adequados que facilitem o pareamento e a reassociação aumentando o teor de amido retrogradado (AR3).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito causado pela ação das enzimas β -amilase bacteriana e α -amilase fúngica na formação de amido resistente do tipo 3 (AR3) a partir de amidos de batata e araruta.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar estruturalmente e físico-quimicamente os amidos nativos de batata e araruta
- Proceder a amilólise com β -amilase bacteriana ou α -amilase fúngica antes da desramificação com pululanase para produção de AR3
- Caracterizar estruturalmente os amidos obtidos após ação enzimática e retrogradação
- Determinar os teores de amido rapidamente digerível (ARD), lentamente digerível (ALD) e resistente (AR)

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 O AMIDO

O amido é um polímero natural, a principal substância de reserva nas plantas, e a mais importante fonte de carboidratos na alimentação humana, presente em sementes, raízes, tubérculos e cereais. (FRANCO et al., 2001; LEHMANN; ROBIN, 2007; ZANG;HAMAKER, 2009).

É definido como um polissacarídeo composto unicamente de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 (BULEÓN et al., 1998). Apresenta-se naturalmente 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 (JACOBS; DELCOUR, 1998; JANE, 2003).

O grânulo de amido é composto por dois polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina em proporções que variam de acordo com a fonte botânica, o que irá conferir características específicas à pasta de amido. A maioria dos amidos possui de 70-80% de amilopectina. Um material intermediário tem sido encontrado em alguns amidos, o qual consiste de uma estrutura bastante heterogênea com cadeias lineares e grau de polimerização (GP) variando entre 50 a 200, e moléculas levemente ramificadas de baixo peso molecular e com cadeias mais extensas que as da amilopectina, com quantidade e estrutura diferindo de acordo com o tipo e o grau de maturação do grânulo de amido (BILIADERIS, 1991).

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 (JACOBS; DELCOUR, 1998; FRANCO et al., 2001). Assim os grânulos são birrefringentes mostrando uma cruz de polarização bem definida (cruz de malta) quando observados sob luz polarizada (FRANCO et al., 2001).

3.1.1 Amilose e amilopectina

A amilose (Figura 1) é uma molécula essencialmente linear, formada por unidades de glicose ligadas em α -1,4, contendo algumas moléculas ligeiramente ramificadas ligadas em α -

1,6 (JANE, 2003; BEMILLER; WHISTLER, 2009). Essas ramificações são separadas por grandes distâncias, permitindo às moléculas agirem como se fossem essencialmente lineares. Seu GP 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).

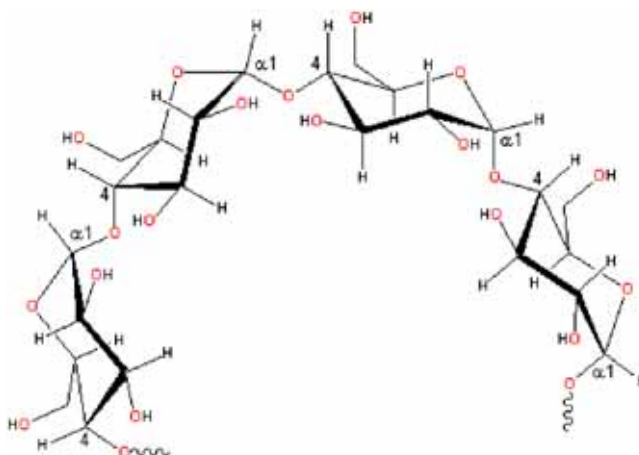


Figura 1: Representação esquemática da estrutura de um fragmento de amilose. Fonte: Bello-Perez, Montevalvo e Acevedo (2006).

A molécula de amilose apresenta-se na forma helicoidal, com átomos de hidrogênio no interior da hélice, tornando-a lipofílica, enquanto as hidroxilas permanecem na parte externa da mesma (SINGH et al., 2003).

A amilose permite a formação de complexos com ácidos graxos livres, alcoóis e iodo. A complexação com iodo é uma ferramenta utilizada para a determinação do teor de amilose presente no grânulo de amido, pois forma uma cor azul intensa (IMBERTY; CHANZY; PÉRES, 1988, HOOVER, 2001). No caso do complexo amilose-lipídeo acredita-se que a parte alifática do ácido graxo fica no interior da hélice da amilose (FRANCO et al., 2001). A presença desses complexos nos grânulos de amido afeta as suas propriedades tecnológicas, assim como torna a amilose menos suscetível à hidrólise por α-amilase (DENARDIN; SILVA, 2009).

Não está ainda bem estabelecida a localização exata da amilose no interior do grânulo, porém segundo Jane (2006), essa molécula concentra-se nas regiões periféricas do grânulo, onde estão fortemente associadas às moléculas de amilopectina.

A amilopectina é uma molécula altamente ramificada, composta por centenas de cadeias curtas de (1→4)- α -D-glucanas que são interligadas pelas ligações α -1,6 responsáveis pelas ramificações (Figura 2). Apresenta GP 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 (BULÉON et al., 1998).

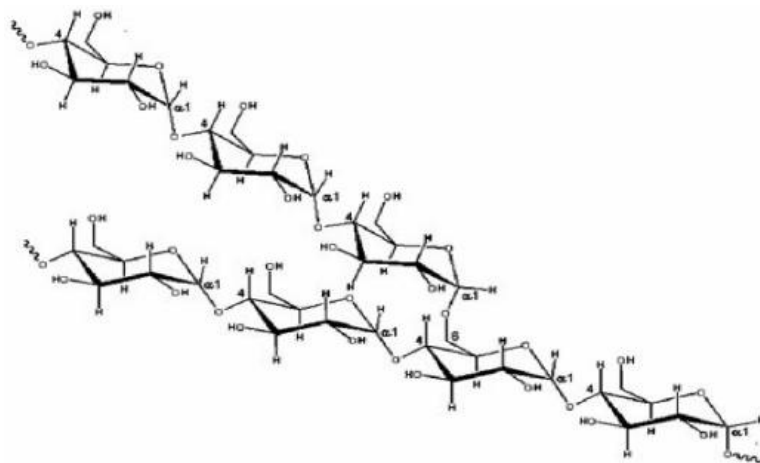


Figura 2: Estrutura da molécula de amilopectina. Fonte: Denardin e Silva (2009)

As cadeias da amilopectina são denominadas de A, B e C (Figura 3). A cadeia principal C carrega o grupo redutor da molécula, e várias cadeias ramificadas A e B. As cadeias A, são as cadeias exteriores que não carregam qualquer ramificação. As cadeias B são as que possuem uma ou mais cadeias A ou B, ligadas a ela, por meio de ligações α (1-6) (BULÉON et al., 1998; HOOVER, 2001).

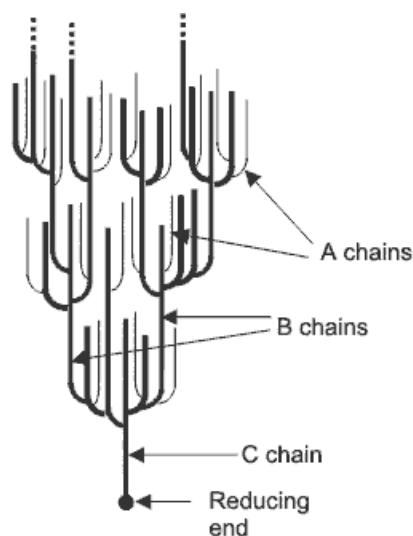


Figura 3: Classificação das cadeias de amilopectina em tipo A, B e C. Fonte: Sajilata, Singhal e Kulkarni (2006)

Os grânulos de amido estão organizados em regiões cristalinas e amorfas, sendo que as ligações ramificadas da amilopectina formam duplas hélices fortemente empacotadas que são arranjadas em domínios cristalinos (BULÉON et al., 1998), enquanto os pontos de ramificação e a amilose ficam nas áreas amorfas (JACOBS; DELCOUR, 1998). Dessa forma, o grânulo de amido tem regiões alternadas de alto e baixo índice de refração, densidade, cristalinidade e resistência ao ácido e enzimas. A região onde se concentra a amilopectina é mais densa ou cristalina, sendo mais compactada, dificultando a entrada de moléculas como água e enzimas (FRANCO et al., 2001)

Grânulos de amido apresentam estruturas cristalinas com padrões de difração de raios-X específicos, denominados A, B e C, dependendo da origem botânica, em função do empacotamento das duplas hélices da amilopectina (SINGH et al., 2003; JANE, 2006; BEMILLER; WHISTLER, 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, presente em amidos de tubérculos e raízes, amidos com alto teor de amilose, e amidos retrogradados (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997; BLENNOW et al., 2000; PARKER; RING, 2001; CROCHET et al., 2005). Esses dois polimorfismos apresentam conformação idêntica das duplas hélices, diferindo entre si pelo modo de empacotamento cristalino e pelo teor de água no interior da estrutura (IMBERTY; CHANZY; PÉRES, 1988). A forma polimórfica tipo C é uma mistura dos tipos A e B, podendo ser classificado em C_A e C_B , baseado na proximidade de suas semelhanças aos tipos A e B, sendo característico da maioria dos amidos de leguminosas (BULÉON et al., 1998).

Há também a cristalinidade do tipo V, que pode aparecer quando a amilose estiver complexada com compostos orgânicos ou iodo. O padrão cristalino tipo V pode existir na forma anidra (V_a) e na forma hidratada (V_h) (BULÉON et al., 1998).

Nos últimos anos vários modelos têm sido propostos para explicar o modo como a amilopectina está arranjada no interior do grânulo. Até hoje, o modelo mais aceito é o proposto por French (1973) e Robin et al. (1974) denominado de *clusters*, no qual *cluster* ou “cachos” associados de cadeias A, com comprimento 60Å e GP igual a 15, formariam uma camada cristalina com 60 Å de espessura na direção do eixo da cadeia. Essa fração do grânulo constituiria a fração resistente a hidrólise ácida. Por outro lado, nas áreas intercristalinas entre os sucessivos *clusters* ou camadas cristalinas, conteriam a maior parte das ligações α -1,6 bem

mais suscetíveis ao ácido. Cada *cluster* seria formado pela associação de 2 ou 3 cadeias A e as cadeias B poderiam se estender por dois ou mais *clusters*. O sucesso desse modelo é explicado por sua habilidade em considerar a maior viscosidade da amilopectina quando comparada ao glicogênio e o envolvimento da cadeia de amilopectina na cristalinidade para o padrão de degradação mostrado pelas α -amilases (FRANCO et al., 2001).

Gallant, Bouchet e Baldwin (1997) sugeriram um novo modelo de “clusters” para a amilopectina e uma estrutura lamelar para o grânulo de amido, esses autores sugeriram que as camadas amorfas e cristalinas da amilopectina são organizadas dentro de estruturas chamadas bloquetes. O tamanho desses bloquetes assim como sua localização nos grânulos 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. Dessa forma, a amilopectina se encontraria localizada no grânulo em regiões cristalinas e semicristalinas. As regiões semicristalinas seriam formadas por bloquetes menores, e a cristalinidade da amilopectina seria reduzida, principalmente devido a seu maior envolvimento com a amilose.

3.1.2 Gelatinização e retrogradação do amido

O aquecimento de suspensões de amido em excesso de água causa uma transição irreversível denominada gelatinização (FRANCO et al., 2001). Grânulos de amido são insolúveis em água fria, no entanto devido à difusão e absorção de água nas regiões amorfas, ocorre um pequeno inchamento (10-20%) (MUNHOZ; WEBER; CHANG, 2004). Quando a temperatura aumenta acima de uma temperatura crítica (temperatura de gelatinização) o grânulo absorve uma quantidade maior de água e incha rapidamente (JACOBS; DELCOUR, 1998). O inchamento predomina até uma temperatura determinada, causando o aumento da viscosidade e formação da pasta de amido. Após algum tempo os grânulos começam a se romper provocando a dispersão de suas macromoléculas e componentes (JACOBS; DELCOUR, 1998; SHING et al., 2003).

A penetração da água no interior do grânulo ocorre inicialmente pelas regiões amorfas, onde as pontes de hidrogênio são mais fracas e mais suscetíveis à dissolução, permitindo o inchamento e a hidratação dos grânulos de amido. Com o aumento da temperatura, o inchamento do grânulo aumenta, assim como a absorção de água, o que resulta na perda da

birrefringência devido à perda da ordem cristalina, pois há a dissociação das duplas hélices e também a lixiviação da amilose (HOOVER, 2001; SHING et al., 2003).

Assim, a gelatinização é o rompimento da ordem molecular no interior do grânulo provocando mudanças irreversíveis nas propriedades do amido, tais como fusão dos cristais, aumento do tamanho granular, perda da birrefringência, desenvolvimento da viscosidade e aumento na solubilidade (SHING et al., 2003). Com a gelatinização o amido se torna mais facilmente acessível às enzimas digestivas (LOBO; SILVA, 2003). Esse processo ocorre em faixas de temperatura, pois os grânulos não começam a gelatinizar simultaneamente, sendo a temperatura na qual essas alterações se iniciam denominada de temperatura inicial, e a temperatura onde a maioria dos grânulos se encontra em seu estado gelatinizado é chamada de temperatura final (FRANCO et al., 2001). As temperaturas de gelatinização estão diretamente relacionadas com o tamanho do grânulo, proporção amilose/amilopectina, tipo de cristalinidade e estrutura do grânulo de amido (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004). Altas temperaturas de transição têm sido relatadas como resultado de um elevado grau de cristalinidade, assim a intensidade da perfeição cristalina é refletida na temperatura de gelatinização (SINGH et al., 2003).

Após a gelatinização, com o resfriamento e armazenamento do gel, ocorre um processo denominado retrogradação (SINGH et al., 2003). Nesse processo as moléculas de amido, devido a forte tendência à reassociação, agregam-se formando duplas hélices cristalinas estabilizadas por pontes de hidrogênio (LOBO; SILVA, 2003). O processo de retrogradação ocorre mais rapidamente entre as moléculas de amilose devido à sua estrutura linear, assim quanto maior o conteúdo de amilose maior a tendência à retrogradação do amido (LOBO; SILVA, 2003; SINGH et al., 2003). Fatores como fonte botânica, condições de aquecimento e resfriamento, presença de solutos como lipídeos e açúcares, e pH também influenciam o processo de retrogradação (JANE et al., 1999).

Com a retrogradação o amido se torna mais resistente à ação das enzimas digestivas, devido à recristalização (BUTTERWORTH et al., 2011). Os polímeros da amilopectina retrogradada, limitados pela sua estrutura ramificada, são menos firmemente ligados que os da amilose retrogradada, conferindo a esta última, uma maior resistência à hidrólise enzimática (LOBO; SILVA, 2003).

Com o envelhecimento do gel, este se torna gomoso e as cadeias de amido tem uma tendência para interagir fortemente entre si, expulsando assim a água para fora do sistema. Esta liberação de água é conhecida como sinérese (HOOVER, 2001).

3.2 AMIDO RESISTENTE

Polissacarídeos, como os amidos, são formados somente por ligações α -glicosídicas, portanto são potencialmente digeríveis pelas enzimas digestivas secretadas pelo intestino humano (ENGLYST; HUDSON, 1996). A digestão dos amidos acontece em etapas, iniciando-se na boca, pela ação da α -amilase, enzima liberada pelas glândulas salivares. No estômago, o bolo alimentar ainda impregnado de saliva, sofre a ação da ptialina, hidrolisando de 30 a 40% do amido. Entretanto, com a acidificação do meio pelo ácido clorídrico do suco gástrico, a amilase salivar é rapidamente inativada inibindo a hidrólise do amido. Quando o bolo alimentar, contendo o amido que escapou da digestão bucal e gástrica, chega ao duodeno, parte superior do intestino delgado, sofre a ação do suco pancreático, que, assim como a secreção salivar, contém um grande teor de α -amilase. Na sequência as enzimas presentes na superfície das células epiteliais do intestino delgado continuam a digestão até a obtenção de monossacarídeos. Sob a forma desses monossacarídeos é que os carboidratos são absorvidos e passam para o sangue fazendo com que ocorra o aumento da glicemia, ou seja, da concentração de glicose no sangue (SMITH et al., 2007).

Sabe-se hoje que o amido possui digestibilidade variada, e até mesmo pode não ser digerido no organismo. Alguns aspectos físico-químicos e estruturais relacionados ao grânulo de amido podem afetar a taxa na qual o amido é digerido e absorvido, entre eles: origem botânica e relação amilose/amilopectina (WOLF et al., 1999; RATNAYAKE; JACKSON, 2008, ALSAFFAR, 2011), padrão cristalino, tamanho dos bloquetes que contém a lamela cristalina e a região amorfa (SYAHARIZA et al., 2013; CAI; SHI, 2014), tipo de processamento, presença de complexos amilose-lipídeos, existência de outros materiais na matriz do alimento (açúcar, proteína, etc.) e inibidores enzimáticos (ALSAFFAR, 2011).

Segundo Englyst, Kingman e Cummings (1992), dependendo da velocidade na qual o alimento é digerido *in vitro*, o amido pode ser classificado em três diferentes classes: amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR), e sua classificação nutricional pode ser baseada nas medidas *in vitro* para prever como seria sua resposta glicêmica a um alimento. ARD é definido como aquele que é convertido em glicose

em até 20 minutos após incubação com α -amilase pancreática e amiloglicosidase à temperatura de 37°C. ALD ou amido parcialmente resistente (APR) é aquele que é convertido em glicose em até 120 minutos quando submetido às mesmas condições anteriores, e AR é definido como o amido ou fração de amido que não é digerido por enzimas amilolíticas no trato digestivo, e pode ser fermentado por bactérias no colón, produzindo ácidos graxos de cadeias curtas e outros ácidos orgânicos (ENGLYST; CUMMINGS, 1985; ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992).

Uma lenta taxa de digestão e absorção de amidos é favorável em dietas para organismos vivos que apresentem quadro de diabetes e hiperlipidemia. A digestibilidade está diretamente relacionada com o grau de gelatinização do amido e também com a conformação molecular das amiloses e amilopectinas dos amidos presentes (GONI et al., 1997).

Para propósitos nutricionais, o amido pode ser classificado como glicêmico e não glicêmico, sendo as frações de ARD e ALD agrupadas como carboidratos glicêmicos. O ALD é considerado de baixo índice glicêmico, sendo de grande interesse na produção de alimentos destinados aos portadores de diabetes do tipo II, enquanto o AR é considerado um carboidrato não glicêmico (CUMMINGS; STEPHENS, 2007).

A digestibilidade do amido também pode ser afetada por fatores intrínsecos bem como por fatores extrínsecos como tempo de mastigação (determina a acessibilidade física do amido contido em estruturas rígidas), tempo de trânsito do alimento da boca até o íleo terminal, concentração de amilase no intestino, quantidade de amido presente no alimento e a presença de outros componentes que podem retardar a hidrólise enzimática (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992; THARANATHAN, 2002).

3.2.1 Efeitos do amido resistente na saúde

O principal interesse em torno da utilização de AR em alimentos é devido aos benefícios que ele apresenta à saúde. É uma fonte importante de carboidratos não digeríveis na dieta (NUGENT, 2005) e pode ser tão importante quanto os polissacarídeos não amiláceos na promoção da saúde do intestino grosso e prevenção das doenças intestinais inflamatórias e câncer colorretal, além de ter um menor impacto no metabolismo lipídico e de glicose (FUENTES-ZARAGOSA et al., 2010).

Inúmeros estudos têm relatado os efeitos benéficos do AR na saúde (WOLF et al., 1999; MORITA et al., 2005; SANG; PRAKASH; SEIB, 2006; SHARMA et al., 2008; FUENTES-ZARAGOSA et al., 2010; ZHOU et al., 2014).

Por não ser digerido no intestino delgado a ação mais comum do AR é provocar o aumento do bolo fecal e reduzir o pH do cólon (FUENTES-ZARAGOSA et al., 2011). Ao chegar ao cólon o AR pode se tornar disponível como substrato para fermentação pelas bactérias anaeróbicas (JENKINS et al., 1998). Os produtos dessa fermentação são ácidos graxos de cadeia curta como os ácidos acético, propiônico e butírico (LOBO; SILVA, 2003; WALTER et al., 2005; FUENTES-ZARAGOSA et al., 2010). Estudos apontam como consequência, dos efeitos da redução com pH e produção desses ácidos, a redução do risco de doenças do cólon (FUENTES-ZARAGOSA et al., 2010; FUENTES-ZARAGOSA et al., 2011). Em adição, é atribuído ao butirato a supressão do desenvolvimento de células cancerígenas e o aumento na proliferação de células da mucosa intestinal, o que pode diminuir o risco de câncer de cólon, visto que pacientes com este tipo de doença apresentaram taxas reduzidas de butirato durante a investigação inicial (JENKINS et al., 1998; YUE; WARING, 1998; WALTER et al., 2005).

O AR apresenta um nível de digestibilidade muito baixo e pode ser usado como um veículo para a lenta liberação de glicose causando redução do índice glicêmico e redução dos níveis de colesterol no sangue (FUENTES-ZARAGOSA et al., 2010). Este efeito tem implicações significativas para o uso de AR em formulações de alimentos para pessoas com diabetes (ZHOU et al., 2014).

As formas de AR comercialmente disponíveis têm sabor insípido, cor branca e tamanho de partícula adequado, características que causam menor interferência na textura dos alimentos. Além disso, eles apresentam elevadas temperaturas de gelatinização, e tem propriedades de absorção de água inferiores às da fibra tradicional. Deste modo, as qualidades sensoriais de produtos adicionados de AR são melhoradas quando comparadas àquelas de produtos tradicionalmente ricos em fibras (SAJILATA; SHINGAL; KULKARNI, 2006). O AR pode, então, ser usado como um ingrediente na produção de pães, bolos, biscoitos, cereais matinais, *snacks*, massas, bebidas e iogurtes (NUGENT, 2005), sendo particularmente vantajoso na produção de produtos de baixo teor de umidade, como biscoitos e bolachas, por absorver menos água que as fibras (SAJILATA; SHINGAL; KULKARNI, 2006). Em relação

à quantidade as indicações podem variar de 5g (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011) a 20g (ALSAFFAR, 2011) por dia para que os efeitos fisiológicos possam ser observados.

3.2.2 Tipos de amido resistente

O amido resistente é constituído por compostos heterogêneos, cuja classificação depende de sua estrutura física e da susceptibilidade ao ataque enzimático, sendo assim o AR atualmente 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 AR1, ou seja, o amido se torna resistente, simplesmente por que as enzimas digestivas não têm acesso ao mesmo (WALTER et al., 2005). Esta resistência à digestão pode ocorrer se o amido estiver contido em uma estrutura inteira ou parcialmente rompida da planta, como nos grãos, ou no caso da parede celular rígida inibir o intumescimento e dispersão, como no caso das leguminosas (NUGENT, 2005). A este grupo pertencem os grãos de cereais e de leguminosas inteiros ou parcialmente moídos (LOBO; SILVA, 2003). O AR1 tem sua resistência minimizada pela moagem e pela mastigação, e é quimicamente calculado como a diferença entre a glicose liberada pela digestão enzimática de uma amostra homogeneizada e a liberada de uma amostra não homogeneizada (SAJILATA; SHINGAL; KULKARNI, 2006; PERERA; MEDA; TYLER, 2010).

O AR2 refere-se aos grânulos de amido nativo que apresentam lenta digestibilidade devido às características intrínsecas de sua estrutura cristalina (LOBO; SILVA, 2003). Os grânulos de amido nativo são firmemente empacotados em um padrão radial e relativamente desidratados. Esta estrutura compactada limita a acessibilidade enzimática na digestão (SAJILATA; SHINGAL; KULKARNI, 2006). O AR2 é encontrado, por exemplo, em batatas cruas, bananas verdes e amidos com “alto teor de amilose” (NUGENT, 2005; JIANG et al., 2010). O grau de resistência desse tipo de AR depende da fonte botânica e do tipo polimórfico, sendo que grânulos com padrão cristalino tipo A tendem a ser menos resistentes do que os dos tipos B e C. Esse tipo de AR pode ter seus teores reduzidos durante o

processamento de alimentos como é o caso, por exemplo, do cozimento (WALTER et al., 2005). É analiticamente medido como a diferença entre a glicose liberada pela digestão enzimática de uma amostra homogeneizada e fervida e uma amostra não homogeneizada e não fervida (SAJILATA; SHINGAL; KULKARNI, 2006; PERERA; MEDA; TYLER, 2010).

O AR3 é formado após o resfriamento do amido gelatinizado (amido retrogradado) (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992; PERERA; MEDA; TYLER, 2010). Consiste de polímeros de amido retrogradado, principalmente de amilose, produzidos quando o amido é resfriado após gelatinização. Na formação de AR3, o grânulo de amido é completamente hidratado. A reestruturação proveniente do processo de retrogradação dificulta o acesso enzimático, prejudicando a digestibilidade do amido. O reaquecimento reduz o conteúdo deste tipo de amido em batatas, sugerindo que a retrogradação é um fenômeno reversível (LOBO; SILVA, 2003; SAJILATA; SHINGAL; KULKARNI, 2006). Embora a formação desse tipo de AR encontre-se associada à gelatinização seguida de retrogradação, outros fatores como Teor e grau de polimerização da amilose, tempo/temperatura de armazenagem, origem botânica do amido, assim como a quantidade de água utilizada durante a gelatinização podem afetar o teor desse constituinte, (ESCARPA et al., 1997; GONZÁLEZ-SOTO, 2006; SAJILATA; SHINGAL; KULKARNI, 2006). O AR3 é composto principalmente por amilose retrogradada devido à sua forte tendência para reassociar, tornando assim o teor de amilose o principal fator que rege a formação desse tipo de AR (CURTS; WANG, 2012; SHI et al., 2013). O processamento de alimentos que envolve aquecimento e umidade, na maioria das vezes pode destruir o AR1 e AR2, mas pode formar o AR3 devido a retrogradação da amilose (GONZÁLEZ-SOTO; 2006).

A modificação química do amido também conduz à produção de amido resistente, fato que o caracteriza como AR4. Esses produtos incluem os amidos substituídos quimicamente com grupamentos ésteres, fosfatos e éteres, bem como amidos com ligações cruzadas, sendo estes também resistentes à digestão no intestino delgado (HAN; BEMILLER, 2007; RATNAYAKE; JACKSON, 2008; SANZ et al., 2009; SUI et al., 2011; ZIEBA; KAPELKO; SZUMNY, 2013). O AR4 é considerado o amido mais resistente a hidrólise enzimática, devido ao volume dos grupos substituintes que dificulta a formação de complexos enzima-substrato e torna as ligações mais resistentes à hidrólise (ALSAFFAR, 2011).

O AR5 consiste em um amido complexado com lipídeos (JIANG et al., 2010; FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011). Esses complexos apresentam maiores temperaturas de

gelatinização e tendência a retrogradação. 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 a hidrólise enzimática. Em geral, a quantidade de complexo amido-lipídeo e sua estrutura depende da fonte botânica do amido e sua formação ocorre mais comumente em amidos com alto teor de amilose, mais suscetíveis a retrogradação (HASJIM et al., 2010; FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011).

Dentre os cinco tipos de AR, o AR3 é de grande interesse, devido à estabilidade térmica dos cristais retrogradados, a qual permite que o amido seja estável na maioria das operações de cozimento convencionais, dessa forma, permite o uso como ingrediente em uma grande variedade de alimentos, sem perder sua resistência a digestão enzimática (FARAJ; VASANTHAN; HOOVER, 2004; PONGJANTA et al., 2009). A estabilidade do AR3 se deve ao fato da amilose retrograda ser estável a altas temperaturas (ZHANG et al., 2013). Do ponto de vista tecnológico o AR3 é também importante já que sua formação é resultante do processamento do alimento (WALTER et al., 2005).

3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE AMIDO RESISTENTE

3.3.1 Amilases

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. São catalisadores de extraordinária eficiência e especificidade capazes de acelerar uma reação de 10^3 a 10^{17} vezes mais rápido do que as reações correspondentes não catalisadas (HORTON et al., 1996).

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam. As amilases (EC 3.2.1) hidrolisam amidos e derivados de polissacarídeos (SAID et al., 2004) liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Estas enzimas são derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos (SARIKAYA et al., 2000; GUPTA et al., 2003).

As amilases são classificadas a partir de seu modo de ação em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de oligossacarídeos com cadeias

de vários comprimentos. As exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos (GUPTA et al., 2003).

As enzimas desramificantes que hidrolisam exclusivamente ligações α -(1,6), e as enzimas transferases que são enzimas que quebram as ligações glicosídicas α -(1,4) da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com formação de uma nova ligação glicosídica também são incluídas no grupo das amilases (SAID et al., 2004)

3.3.1.1 β -amilase

A 1,4- α -D-glucano-maltohidrolase (E.C. 3.2.1.2) é uma exoenzima que hidrolisa exclusivamente as ligações α -(1,4) a partir das extremidades não redutoras da molécula (SANTOS et al., 2010; CURTS;WANG, 2012), como pode ser visto na Figura 4. Esta exoenzima age sobre as moléculas de amilose e de amilopectina produzindo sucessivas maltose (um dissacarídeo) e β -dextrinas limites (SAID et al., 2004). Essa enzima hidrolisa tanto a amilose quanto a amilopectina, porém exclusivamente as ligações α -(1,4), ou seja, as ligações α -(1,6) não são hidrolisadas por essa enzima, dessa forma quando a enzima se aproxima de um ponto de ramificação sua ação cessa. O núcleo condensado e ramificado resistente à ação da enzima é chamado β -dextrina limite (HORTON et al., 1996). A β -amilase também converte a configuração do carbono anomérico da maltose liberada de α para β (SAID et al., 2004). A β -amilase é considerada uma enzima sacarificante, por produzir rápido aumento no teor de açúcares redutores (HORTON et al., 1996).

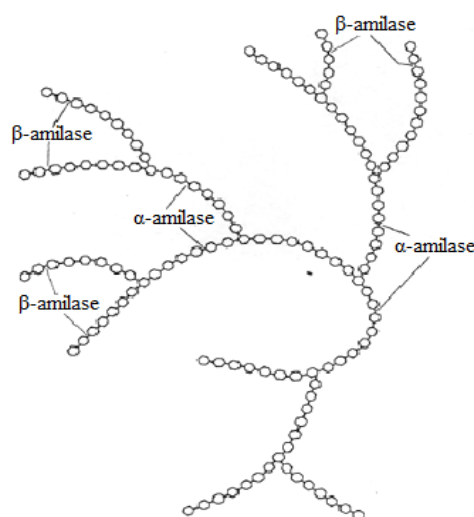


Figura 4: Representação esquemática do modelo de ação de α - e β -amilases. Fonte: Horton et al.(1996).

As β -amilases são abundantemente encontradas em plantas, especialmente em trigo, soja, batata doce e algumas culturas de micro-organismos (*Bacillus polymyxa*, *B. cereuse*, *B. megaterium*). Essa enzima tem pH ótimo na faixa de 4,0 a 6,0 e temperatura ótima na faixa de 30°C a 50°C. O peso molecular destas enzimas está compreendido entre 150 KDa e 200 KDa (HIZUKURI, 1996).

3.3.1.2 α -amilase fúngica

A α -amilase (1,4- α -D-glucano-glucanohidrolase, E.C. 3.2.1.1) ocorre naturalmente em bactérias, fungos, plantas e animais, entretanto, não necessariamente com a mesma estrutura e padrão de ação sobre o amido (ROBERTSON et al., 2006). Pertencente ao grupo das endoamilases, a α -amilase quebra as ligações glicosídicas α -(1,4) presentes na parte interna das cadeias de amilose ou amilopectina, aleatoriamente sobre vários pontos da cadeia simultaneamente (Figura 4) (SAID et al., 2004). Desta maneira, qualquer ligação α -(1-4) na molécula de amido, exceto aquelas próximas de uma ligação α -(1-6) em um ponto de ramificação, pode sofrer hidrólise (HIZUKURI, 1996).

Os produtos finais, da hidrólise por α -amilase fúngica, são maltose, maltotriose e outros malto-oligossacarídeos de maiores GP (SAHNOUN et al., 2012). Dessa forma a α -amilase fúngica também tem uma ação sacarificante sobre o amido (SOUZA et al., 1996).

De acordo com Pandey et al. (2005) o peso molecular das α -amilase fúngica varia de 41 a 69 KDa. O pH ótimo para essa enzima está entre 5,0 e 6,0, possui caráter ácido e é solúvel em água, e sua temperatura ótima de atuação é de 50 a 60°C (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2007).

3.3.1.3 Pululanase

A pululanase (pululana 6-glucanohidrolase, E.C.2.3.1.41,) é uma enzima denominada de desramificante, pois hidrolisa as ligações α -(1,6). Esta enzima além de ter atividade sobre a amilopectina e dextrinas limites, ataca fortemente a pululana (Figura 5) (SAID et al., 2004).

Enzimas desramificantes, tais como a pululanase, hidrolisam rapidamente apenas as ligações α -(1,6) liberando uma mistura de cadeias longas e curtas da molécula de amilopectina original. Estes fragmentos são polímeros lineares que contém cerca de 10 a 65 unidades de anidroglicose unidas por ligações glicosídicas α -(1,4) (LEONG et al., 2007).

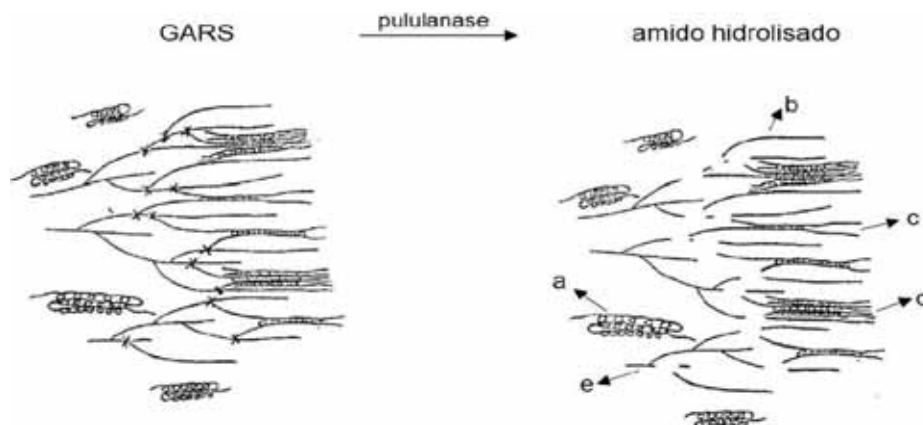


Figura 5: Representação esquemática da ação da pululanase sobre o gel de amido retrogradado seco (GARS). X- indica os pontos de ramificação da amilopectina; a – cristal de amilose; b – cadeia de amilopectina linear; c- amilopectina dupla hélice; d – cristal de amilopectina; e – amilopectina residual. Adaptado de Vasanthan; Bhatta (1998).

A desramificação do amido utilizando a pululanase tem sido aplicada para produção de cadeias poliméricas lineares com baixa massa molecular e recristalizáveis (POLESI; SARMENTO, 2011).

3.4 USO DA HIDROLISE ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE AMIDO RESISTENTE

O amido pode ser submetido a tratamentos químicos ou físicos para alterar o nível de resistência em um alimento ou ingrediente (THOMPSON, 2000). Muitos estudos têm mostrado que a retrogradação do amido gelatinizado induz a formação de AR, sendo este processo essencial para o desenvolvimento de AR3 (WANG et al., 2007).

Os métodos para produção de AR3 se baseiam na gelatinização do amido com posterior retrogradação (SAJILATA; SHINGAL; KULKARNI, 2006). Portanto, o conteúdo de amilose é o principal fator que rege a formação de AR3, devido a sua forte tendência a reassociação (CURTIS; WANG, 2012; SHI et al., 2013). Segundo Berry (1986) é possível aumentar o rendimento do amido retrogradado pela quebra e posterior desramificação da amilopectina.

A desramificação do amido seguido de um processo que potencialize a retrogradação é considerada um método eficiente e comum na produção de AR3, podendo resultar em um aumento da resistência do amido à digestão (SONG et al., 2011; CURTIS; WANG, 2012). 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. Portanto, a desramificação consiste em um pré-tratamento que visa aumentar as possibilidades de se obter AR3 com a posterior retrogradação do amido (GONZÁLEZ-SOTO et al., 2004).

O uso de enzimas apresenta vantagem sobre a hidrólise ácida devido à especificidade das mesmas na quebra das moléculas de amido, permitindo maior controle sobre os produtos obtidos. Por outro lado, o custo é elevado e o processo exige condições específicas, como pH e temperatura (SUMERLY et al., 2003).

Reddy, Suriya e Haripriya (2013) avaliaram a produção e as propriedades físico-químicas e funcionais do amido resistente a partir da desramificação do amido de feijão. Amidos nativos gelatinizados foram submetidos à hidrólise com pululanase (40U/g por 10 h), autoclavados a 121°C durante 30 min, armazenados sob refrigeração (4°C/24 h), e liofilizados. A desramificação seguida de tratamento térmico do amido aumentou o conteúdo de AR3 de 21,27% para 42,34%.

O uso de outras amilases antes ou em combinação com as enzimas desramificantes têm sido usadas com a intenção de aumentar o teor de AR3 produzido. A redução do comprimento das cadeias do amido por meio enzimático pode aumentar a formação de AR3, visto que cadeias de menor comprimento apresentam maior mobilidade e maior tendência a retrogradação (CURTIS; WANG, 2012).

Diferentes fontes de enzima conduzem a diferentes perfis de hidrólise, no entanto, de forma geral, na hidrólise enzimática deve ser considerada a quantidade de enzimas presentes, assim como sua atividade por unidade de massa de amido (TESTAR; QI; KARKALAS, 2006).

Curtis e Wang (2012) investigaram o efeito da hidrólise, de amidos de milho com diferentes teores de amilose, com β -amilase seguida de desramificação com isoamilase antes da retrogradação que foi potencializada usando ciclos de autoclavagem a 135°C seguido de equilíbrio da temperatura a 95°C por três vezes. O uso da β -amilase aumentou o teor de AR3 para todos os amidos estudados, porém o Hylon V com 50% de amilose apresentou o maior teor de AR3, (70,7% após 4 h de hidrólise com β -amilase).

Zhang e Jin (2011) estudaram a produção de AR3 a partir de amido de milho usando combinações de α -amilase bacteriana e pululanase em diferentes concentrações de α -amilase e condições de temperatura, pH e tempo. Os autores observaram que a produção de AR3

aumentou significativamente quando a combinação de enzimas foi usada e as melhores condições de reação foram: 90°C, pH de 5,5, 15 min e 4 u/g de amido de α -amilase. Zhou et al. (2014) também estudaram o efeito da combinação de α -amilase bacteriana e pululanase seguido de dois ciclos de aquecimento e resfriamento no amido de arroz e observaram aumento significativo no teor de AR3 de 2,5% para 47%.

Mião et al. (2014), estudaram a utilização da α -amilase maltogênica na produção de amido lentamente digerível (ALD) e AR3 a partir de amido de milho. Esses autores observaram que o aumento na quantidade de cadeias curtas aumentou os teores de ALD de 11,1% para 19,6% e os teores de AR3 de 5,4% para aproximadamente 18% após 6 h de hidrólise.

Outros estudos também mostraram a eficiência do processo de hidrólise enzimática na formação de amido resistente (POLESI; SARMENTO, 2011; LI et al., 2013; SHI et al., 2013; ZANG et al., 2013).

A maioria dos estudos tem usado combinações de α -amilase bacteriana e pululanase para obtenção de AR3. Curtis e Wang, 2012 usaram a β -amilase antes da desramificação do amido de milho com diferentes teores de amilose com isoamilase e observaram aumentos significativos de AR3 que chegou a 70%. Considerando o efeito sacarificante da α -amilase fúngica que também produz quantidades significativas de maltose como produto principal, neste trabalho estamos propondo o estudo destas enzimas antes da desramificação com pululanase para aumentar a produção de AR3

3.5 AMIDO DE BATATA

A batata (*Solanum tuberosum*), de origem andina, é o quarto alimento mais importante do mundo depois do trigo, milho e arroz. Sua maior produção concentra-se na Ásia, África e América Latina, onde é uma das principais fontes de carboidratos (amido) presente nas dietas de centenas de milhões de pessoas (BRADSHAW; RAMSAY, 2009).

O amido da batata é conhecido por conter uma grande quantidade de grupos fosfato covalentemente ligados aos seus componentes. Em média, um a cada 200-500 resíduos de glicose é fosforilado. Os grupos fosfato se ligam aos carbonos C6 e C3 dos resíduos de glicose e são localizados principalmente nas cadeias B da amilopectina (ABSAR et al., 2009). A presença de grupos fosfato esterificados à fração da amilopectina no amido de batata contribui para a alta viscosidade, transparência de pasta, capacidade de ligação com a água, estabilidade ao congelamento e descongelamento, e alta capacidade de expansão apresentados

por esse amido (SHING et al., 2003), além de lenta taxa de retrogradação (HOOVER, 2000). O amido de batata apresenta teor de amilose aparente variando de 25 a 29% (ALVANI et al., 2011) e padrão de difração de raios-X tipo B (YOO et al., 2009), além de ser naturalmente resistente à ação das enzimas amilolíticas (JIANG et al., 2010).

3.6 AMIDO DE ARARUTA

A araruta (*Maranta arundinacea*) é uma planta herbácea que possui caule articulado de 1,20 m de altura e rizoma fusiforme com casca escamosa. Originária da América do Sul pode ser encontrada desde as regiões sudeste do Brasil até as Guianas. A produção mundial é pequena, encontrando-se plantios comerciais em Barbados e Saint Vicent, no Caribe. Atualmente encontra-se na lista de espécies em risco de extinção (MONTEIRO; PERESSIN, 2002).

A araruta é fonte potencial de amido apresentando em torno de 23% de amido em base seca (FERRARI; LEONEL; SARMENTO, 2005). Seu amido tem recebido pouca atenção, apesar do seu potencial em diferentes áreas industriais. Devido à sua grande digestibilidade é valorizado como alimento especialmente para lactantes, podendo ser utilizado em uma série de produtos de panificação e confeitos como géis e pastas especiais, estabilizantes de sorvete entre outros (PÉREZ; LARES, 2005)

Segundo Moorthy (2002), o amido de araruta apresenta um padrão de raios-X tipo A, com grânulos de forma arredondada e oval com tamanho que varia de 5 a 50µm. É um amido que possui baixo teor de amilose (entre 18% e 20%), alta massa molecular e baixa tendência a retrogradação (PERONI; ROCHA; FRANCO, 2006) com faixa de temperatura de gelatinização de 70,3 a 77,6°C (JOHN et al., 2002).

Nesse sentido, estudos que viabilizem e aumentem o valor agregado dos rizomas de araruta e seu amido, podem contribuir para a manutenção desta importante cultura no Brasil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os amidos utilizados neste trabalho foram isolados de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) da variedade Monalisa e de rizomas de araruta (*Maranta arundinacea*) da variedade comum. As enzimas utilizadas nesse trabalho foram β -amilase de *Bacillus cereus* (Megazyme International, Ireland), α -amilase de *Aspergillus oryzae* (Sigma, EUA), pululanase de *Bacillus acido pullulyticus* (Promozyme 400L, Novozyme, Dinamarca). As atividades da β - e da α -amilase utilizadas neste trabalho foram 1000 U e 53 U, respectivamente declaradas nos rótulos dos frascos das mesmas. Todos os outros reagentes empregados neste estudo foram puros para análise.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Isolamento dos amidos

Os amidos de batata e araruta foram isolados a partir de moagem úmida dos tubérculos e rizomas de acordo com Peroni, Rocha e Franco (2006). Os tubérculos e rizomas foram lavados para retirada das impurezas. Em seguida, foram descascados e cortados em cubos pequenos, moídos com água na proporção de 1:1 (v:v), num liquidificador industrial de aço inox com capacidade para 4 L. O tempo de moagem foi de 60 s. Para a remoção do bagaço, a suspensão obtida com a moagem foi passada através de peneiras de abertura de 80 *mesh* (0,177 mm) e 150 *mesh* (0,105 mm), para os rizomas de araruta e de 80 e 100 *mesh* (0,149 mm) para os tubérculos de batata. O bagaço retido na peneira de 80 *mesh* foi misturado com água destilada, na proporção de 1:1 (v:v), e moído por 20 s para retirada do amido residual. A suspensão de amido recuperada do bagaço foi misturada à primeira suspensão e mantida em câmara fria a 5°C durante 12 h, para decantação do amido. Com o objetivo de se retirar maior quantidade de impurezas, o amido foi lavado com água destilada, até que o sobrenadante estivesse limpo. Então, foi recuperado por centrifugação e seco em estufa com circulação de ar e temperatura de 40 °C, por 8 a 12 h.

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 fósforo foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico de Smith e Caruso (1964). O teor de carboidratos totais foi calculado por diferença. 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 1h 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 5,9-6,3 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 lentamente (24-36 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.

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 4000 *g* durante 10 min, recuperados por filtração à vácuo e secos em estufa a 40°C por 24 h.

A afinidade por iodo dos amidos e das amilopectinas isoladas foi determinada em titulador potenciométrico automático (716 SM Titrino, Metrohm, Herisau, Switzerland). Os teores de amilose aparente e absoluta foram obtidos conforme descrito por Schoch (1964) e Kasemsuwan et al. (1995). Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O teor de amilose aparente foi calculado usando a equação 1, e o teor de amilose absoluta usando a equação 2.

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

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

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 enzimático dos amidos

4.2.4.1 Tratamento com β -amilase

O tratamento dos amidos com β -amilase foi realizado utilizando o método descrito por Curtis e Wang (2012), com algumas modificações. Amostras de 25 g de amido nativos de batata e araruta foram suspensas em 400 mL de tampão acetato 0,1M (pH 6,5), aquecidas em banho de água fervente durante 30 min, e autoclavadas a 122°C durante 30 min para total gelatinização do amido. A temperatura das soluções de amido foi equilibrada em banho de água a 40°C, antes da adição da β -amilase (400 U/g de amido). Em seguida as soluções foram incubadas durante 0, 6 e 12 h para obtenção de diferentes graus de hidrólise. Após incubação, a solução foi colocada em banho de fervura por 30 min para inativação da enzima e em seguida o amido foi precipitado com 2 L de etanol e centrifugado a 7000*g* por 20 min. O sobrenadante foi então recolhido para determinação do grau de hidrólise por meio da quantificação do teor de carboidratos totais utilizando o método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956). O precipitado foi mantido à temperatura de 40°C durante 40 min para

evaporar qualquer resíduo de etanol. As amostras foram então congeladas a -38°C e liofilizadas para facilitar a dispersão no tampão durante o subsequente tratamento de desramificação.

4.2.4.2 Tratamento com α -amilase fúngica

Para o tratamento dos amidos com α -amilase fúngica, amostras de 25 g de amido nativos de batata e araruta foram suspensas em 400 mL de tampão acetato 0.1 M (pH 5,0), aquecidas em banho de água fervente durante 30 min, e autoclavadas a 121°C durante 30 min para total gelatinização do amido. A temperatura das soluções de amido foi equilibrada em banho de água a 55°C , antes da adição de α -amilase (10 U/g de amido e 5 U/g de amido, respectivamente para a araruta e para a batata). Essas concentrações foram obtidas após testes preliminares (40, 20, 10 e 5 U/g de amido) com o objetivo de obtenção de graus de hidrólise semelhantes aos obtidos com os amidos tratados por β -amilase. Em seguida as soluções foram incubadas durante 0 e 6 h. Após a incubação, a solução foi colocada em banho de fervura por 30 min para inativação da enzima. Em seguida o amido foi precipitado com 2 L de etanol e centrifugado a 7000 *g* por 20 min. O sobrenadante foi então recolhido para a determinação do grau de hidrólise por meio da quantificação do teor de carboidratos totais utilizando o método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al.(1956). O precipitado foi mantido à temperatura de 40°C durante 40 min para evaporar qualquer resíduo de etanol. As amostras foram então congeladas a -38°C e liofilizadas para facilitar a dispersão no tampão durante o subsequente tratamento de desramificação.

4.2.4.3 Desramificação do amido

4.2.4.3.1 Atividade da pululanase

A atividade da pululanase foi determinada utilizando-se o método descrito por Noda et al. (2001), com algumas modificações. Aliquotas de 0,25mL de solução de pululanase 0,5% v/v foram colocadas em tubo de vidro de 50 mL. Após adição de 0,5 mL de solução de pululana 1% p/v (0,25g de pululana em 25 mL) e 0,25 mL de tampão acetato (0,1 M, pH 6,0), a mistura foi incubada a 40°C durante 19 min. Transcorrido esse tempo, foram adicionados 2 mL de solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), e a mistura foi aquecida em banho de água fervente por 5 min, para interromper a reação. Após o resfriamento foram adicionados 10 mL de água destilada e feita a leitura em espectrofotômetro a 540 nm para a determinação

do teor de açúcares expresso como maltose. Cada unidade da enzima foi definida como a quantidade capaz de liberar 1 μmol de maltose por min sob as condições do experimento.

4.2.4.3.2 Desramificação do amido

A desramificação dos amidos submetidos ou não à amilólise foi realizada com a enzima pululanase (Pomozyme 400L) utilizando o método descrito por Polesi e Sarmiento (2011), com algumas modificações. Esta enzima apresentou atividade de 664 U/mL^{-1} .

Os amidos gelatinizados (tempo 0 de hidrólise) e os amidos tratados com β -amilase e α -amilase, previamente liofilizados, foram dispersos em 250 mL (10% m/v) de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,3, e colocados em banho de água fervente, com agitação durante 50 min. A temperatura foi equilibrada a 60°C , e pululanase foi então adicionada (40 U/g amido). As amostras foram incubadas a 60°C por 10 h com leve agitação (95 Hz) e aquecidas por 20 min em banho de água fervente para inativação da enzima.

4.2.4.4 Retrogradação do amido

Após o tratamento de desramificação as soluções de amido foram mantidas a temperatura ambiente por 20 min e armazenadas a 4°C por 16 h, para potencializar o processo de retrogradação. As amostras foram precipitadas com 1 L de etanol, filtradas, secas a 40°C durante 24 h, 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)

Os amidos foram inicialmente desengordurados como descrito no método de Jane e Chen (1992). Ao amido desengordurado (15 mg) foram adicionados 1 mg de glicose e 5 mL de eluente (NaCl 25 mM e NaOH 1 mM). A mistura foi mantida sob constante agitação em banho de fervura por 30 min e então resfriada a temperatura ambiente antes de ser aplicada na coluna empacotada com Sepharose CL-2B no caso dos amidos nativos, e na coluna de Bio-Gel P6 no caso dos amidos hidrolisados.

Para os amidos nativos uma alíquota (3,0 mL) da mistura contendo 9 mg de amido foi aplicada em uma coluna (1,5 cm de diâmetro e 70 cm de altura) empacotada com o gel Sepharose CL-2B, seguindo procedimento de Wang et al. (1993). As amostras foram eluídas de forma ascendente. O eluente consistia de NaCl (25mM) e NaOH (1mM) com um fluxo de

0,5 mL/min. No caso dos amidos hidrolisados, uma alíquota de 3,6 mL da amostra, contendo 11 mg de amido, foi aplicada ao topo de uma coluna de 100 cm de altura e 1,0 cm diâmetro empacotada com Bio-Gel P-6 e eluída de forma descendente, com fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 2,5 mL cada foram coletadas de cada coluna a cada 5 min e submetidas às análises de carboidratos totais e teor de amilose usando o método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al, 1956) e reação de coloração com iodo (JULIANO, 1971), respectivamente, para as frações obtidas da coluna de Sepharose CL-2B e às análises de carboidratos totais e redutores usando os métodos de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e de Park-Johnson modificado (HIZUKURI et al, 1981), respectivamente, para as frações obtidas da coluna de Bio-Gel P6.

4.2.6 Distribuição do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina dos amidos nativos e modificados

Os amidos nativos de batata e araruta, previamente desengordurados de acordo com Jane e Chen (1992), foram desramificados usando a enzima isoamilase (Megazyme, 3U) segundo procedimento descrito por Wong e Jane (1995).

A distribuição do comprimento das cadeias ramificadas da amilopectina foi analisada usando o HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40. Alíquotas das amostras preparadas e filtradas foram automaticamente injetadas no sistema HPAEC-PAD constituído por uma coluna de troca aniônica CarboPac PA-100 (250x4 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-100. A forma de onda empregada foi a *standardquadruple* com os seguintes potenciais de pulso e durações: E1 = 0,10 V (t_1 = 0,40 s); E2 = -2,00 V (t_2 = 0,02 s); E3 = 0,60 V (t_3 = 0,01 s); E4 = -0,10 V (t_4 = 0,06 s). Seguindo-se o procedimento descrito por Moraes, Alves e Franco (2013), os parâmetros da fase móvel utilizada para a separação foi constituída pelo eluente A (150 mM NaOH) e eluente B (500 mM acetato de sódio e 150 mM NaOH) com fluxo de 0,8 mL/min e temperatura de 40 °C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 M Ω .cm) e degaseificados com N₂. O gradiente ótimo foi: 0 - 15 min, gradiente linear de 28 a 40 % de eluente B; e 15 - 95 min, gradiente linear terminando com 72 % de eluente B. Uma mistura de maltodextrinas (GP 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, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

Os amidos hidrolisados e retrogradados obtidos no item 4.2.5.4 foram previamente desengordurados de acordo com Jane e Chen (1992). A distribuição do comprimento das cadeias laterais da amilopectina foi analisada usando cromatografia de troca aniônica, utilizando o HPAEC-PAD (*Thermo Scientific* (Dionex) ICS-5000) com coluna de troca aniônica CarboPac PA-100 a 35°C. Os parâmetros da fase móvel utilizada para a separação foi constituída pelo eluente A (água ultra pura), B (500mM de NaOH) e C (150mM de NaOH e 500 mM de acetato de sódio). Os eluentes B e C foram preparados com água deionizada ultra pura 18 MΩ e degaseificada com N₂ e o fluxo utilizado foi de 1 mL/min. O gradiente de eluição utilizado foi: 0-5 min, gradiente linear e 65% de eluente A, 15% de eluente B e 20% de eluente C, 5-75 min, 20% do eluente B e 80% de eluente C, finalizando 75-80 min com 65% de eluente A, 15% de eluente B e 20% de eluente C. Uma mistura de maltodextrinas (GP 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, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

4.2.7 Difração de raios -X e cristalinidade relativa

Os amidos nativos e tratados foram mantidos em dessecador contendo solução de BaCl₂ saturada (25°C, aw = 0,9) durante 10 dias para equilíbrio da umidade. Os padrões de difração de raios-X dos amidos foram determinados, utilizando-se um difrattômetro de bancada (Rigaku MiniFlex 300, Tokyo, Japan), com radiação de Cu, linha K, L= 1,542 Å. A velocidade de varredura foi de 2° por min e as condições de uso foram de 50 kV e 100 mA. A cristalinidade relativa foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e área total seguindo o método de Nara e Komiya (1983) utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA).

4.2.8 Propriedades térmicas

As temperaturas de gelatinização e mudanças de entalpia dos amidos nativos e modificados foram determinadas utilizando um calorímetro diferencial de varredura (DSC) Pyris 1 (Perkin Elmer, EUA) de acordo com Franco et al. (2002). Amostras de amido (2 mg, b.s.) foram pesadas em porta amostras de alumínio, misturadas com água deionizada (6 µL) e hermeticamente selados em prensa universal. Os porta amostras selados foram mantidos a

temperatura ambiente por 24h para equilíbrio e aquecidos a uma razão de 10°C/ min de 25 a 125°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 o *software* Pyris 1 (PerKin Elmer, EUA).

4.2.9 Determinação do teor de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente tipo 3 (AR3)

Os teores de ARD, ALD e AR3 dos amidos nativos e modificados foram determinados pelo método descrito por Englyst, Kingman e Cummings (1992), com modificações. Amostras de 0,5 g de amido foram transferidas para bquer de 100 mL. Aliquotas de 20 mL de tampão acetato (0,1 M, pH 5,2) contendo 4 mM de CaCl₂ foram adicionados. As amostras foram incubadas em banho maria a 37 °C por 5 min e 5mL de solução enzimática (preparada como descrito a baixo) foram adicionados. Aliquotas 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. Aliquotas 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).

Para o preparo da solução enzimática, foram pesados 1,5 g de pancreatina (500 U/mg Sigma, EUA) em um tubo de centrifuga 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 min. Aliquotas de 8 mL do sobrenadante foram retirados e a eles acrescentados 0,4 mL de amiloglicosidase de *Aspergillus Níger* (300U/mL, Sigma, EUA) e 5 mg de invertase de *S. cerevisiae* (300 U/mg, Sigma, EUA).

Para determinação do ter de amido total (AT), as amostras previamente hidrolisadas (após 120 min) foram colocadas em banho de fervura durante 30 min. Após o resfriamento até temperatura ambiente foram adicionados 10 mL de solução de KOH 7 M e as amostras foram colocadas em banho de gelo durante 30 min. Posteriormente uma alíquota de 1 mL foi retirada e colocada em um bquer contendo 10 mL de ácido acético 0,5 M, e 1 mL de solução de amiloglicosidase (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.

Os valores das frações ARD, ALD e AR3 foram obtidos baseados nas definições de Englyst; Kingman; Cummings, (1992) que combinou os valores de G_0 (glicose livre), G_{20} (glicose liberada após 20 min), G_{120} (glicose liberada após 120 min), e GT (glicose total) usando as equações 3, 4, 5, e 6:

$$AT = (GT - G_0) \times 0.9 \quad (3)$$

$$ARD = (G_{20} - G_0) \times 0.9 \quad (4)$$

$$ALD = (G_{120} - G_{20}) \times 0.9 \quad (5)$$

$$AR = AT - (ARD + ALD) \text{ ou } AR = (GT - G_{120}) \times 0.9 \quad (6)$$

4.3 ANALISE ESTATISTICAS

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por duas ou três repetições. Os dados foram avaliados usando o programa Statistica. 7.0 abrangendo Análise de Variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DOS AMIDOS

Os amidos obtidos apresentaram-se como pós brancos e sem qualquer impureza aparente.

5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS AMIDOS

A composição química dos amidos 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 e a pureza dos amidos.

Tabela 1: Composição química¹ (em porcentagem) dos amidos de batata e araruta

Amido	Lipídeos	Proteínas	Cinzas	Carboidratos Totais*	Fósforo
Batata	0,12(0,01)	0,12(0,02)	0,26(0,02)	99,50	0,097(0,003)
Araruta	0,13(0,02)	0,10(0,01)	0,17(0,02)	99,60	0,034(0,001)

¹cada valor representa a média de três determinações, com o respectivo desvio padrão. Resultados em base seca. *Determinação por diferença.

Amidos são constituídos praticamente por carboidratos, no entanto, estão presentes em pequenas proporções constituintes menores como lipídeos, fibras e sais minerais. A quantidade destas substâncias no amido é dependente da planta e também do processo de extração. Baixos teores de lipídeos, cinzas e ausência de proteína aderida ao grânulo são desejáveis.

As frações de lipídeos e fósforo são consideradas as mais importantes, por influenciar as propriedades funcionais no amido.

Segundo Franco et al. (2001) em amidos de raízes e tubérculos, o fósforo está presente principalmente na forma de monoéster fosfato, que por sua vez tem papel importante na claridade, viscosidade, consistência e estabilidade da pasta. Em raízes e tubérculos, o monoéster fosfato encontra-se ligado covalentemente ao amido (KASEMSUWAN; JANE, 1994; HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003), principalmente às moléculas de amilopectina (JANE; KASEMSUWAN; CHEN, 1996).

O amido que apresentou maior teor de fósforo foi o de batata como já esperado, pois esse amido é um amido naturalmente fosfatado. No entanto, os valores de fósforo encontrados neste trabalho foram superiores ao encontrado na literatura. Para o amido de batata o valor foi superior ao encontrado por Yoo et al. (2009), que encontraram teores entre 0,042 e 0,083%. O amido de araruta apresentou 0,034% de fósforo, valor superior ao encontrado por Peroni, Rocha e Franco (2006). Essas diferenças podem ser atribuídas às diferentes variedades, assim como às características ambientais e de solo onde a planta foi desenvolvida. Segundo Tester et al. (1999), para amidos de batata, o teor de fósforo aumenta conforme diminui a temperatura ambiente durante o desenvolvimento da planta.

O lipídeo é outro componente de grande importância, pois pode interferir nas propriedades funcionais do amido, sendo responsável pela fixação da cor, desenvolvimento de aromas e formação de complexos. É encontrado em pequenas quantidades (traços) em amidos de raízes e tubérculos, tornando esses amidos mais neutros e menos sujeitos a formação de complexos (FRANCO et al., 2001; HOOVER, 2001). O teor de lipídeo encontrado nos amidos estudados está em conformidade com essa informação, pois para ambos os amidos os valores foram bem abaixo de 1%, não havendo diferença significativa entre as quantidades nos dois amidos.

5.3 AFINIDADE POR IODO E TEOR DE AMILOSE APARENTE E ABSOLUTO

O teor de amilose afeta as propriedades de gelatinização e retrogradação do amido e sua susceptibilidade ao ataque enzimático (GERARD et al., 2001; PERONI; ROCHA; FRANCO, 2006). Segundo Buléon et al. (1998), amidos com alto teores de amilose são mais resistentes a ação enzimática. Os valores encontrados para a afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto dos amidos nativos são apresentados na Tabela 2. A molécula de amilose é capaz de formar complexo com diversos compostos como, ácidos graxos livres, alcoóis e iodo. Quando complexada com iodo, a amilose apresenta coloração azul intensa. Porém as cadeias longas da amilopectina também podem se complexar com iodo desenvolvendo coloração azul, o que aumenta o valor de afinidade por iodo superestimando o teor de amilose dos amidos (JANE et al., 1999) e então denominado teor de amilose aparente. Por esse motivo, a fração de amilopectina foi isolada dos amidos para a determinação do teor de amilose absoluto.

O amido de batata apresentou maior teor de amilose aparente quando comparado com o amido de araruta devido à maior proporção de cadeias laterais da amilopectina muito longas, característica deste amido (MCPHERSON; JANE, 1999).

Tabela 2: Afinidade por iodo e teores de amilose aparente e absoluto dos amidos de batata e araruta*

Fonte	Afinidade por iodo		Teor de Amilose (%)	
	Amido	Amilopectina	Aparente ¹	Absoluta ²
Batata	5,96(0,11)	2,3(0,11)	29,8	20,7
Araruta	5,02(0,02)	1,4(0,03)	25,1	19,5

* Media 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: $AM_{ap} = IA_S/0,20$ onde AM_{ap} é a porcentagem de amilose aparente e IA_S é a afinidade por iodo do amido desengordurado; ²Calculado como: $AM_{abs} = (AI_a - AI_{AP})/[0,20-(AI_{AP}/100)]$ onde AM_{abs} é a porcentagem de amilose absoluto, AI_a é a afinidade por iodo do amido desengordurado e AI_{AP} é a afinidade por iodo da amilopectina isolada.

Esse resultado é semelhante aos apresentados por Tester et al. (1999) e Rocha, Carneiro e Franco (2010) que encontraram 32,7 e 28,9% de amilose aparente, respectivamente, em amidos de batata. No caso do amido de araruta, Peroni, Rocha e Franco (2006) e Jyothi, Sajeev e Sreekumar (2010) encontraram valores inferiores (20,8% e 19,8%, respectivamente) aos encontrados neste trabalho. As afinidades por iodo das amilopectinas isoladas confirmaram a maior interação das cadeias laterais mais longas do amido de batata com o iodo, em função da maior proporção de cadeias longas na amilopectina deste amido. Assim, ao se calcular os valores de amilose absoluta, observa-se valores próximos aos encontrados por Mcpheson e Jane (1999) para o amido de batata (18,9%), e aos citados por Hoover (2001) para o amido de araruta (19,4%).

5.4 HIDRÓLISE DOS AMIDOS DE BATATA E ARARUTA COM AMILASES

As porcentagens de hidrólise dos amidos de batata e araruta submetidos à ação da β -amilase estão apresentadas na Figura 6. Ambos os amidos tiveram perfil de hidrólise semelhante, sendo que após 6 h de incubação a taxa de hidrólise praticamente se tornou constante, com 25,8% para o amido de batata e 27,6% para o amido de araruta. Houve um aumento na taxa de hidrólise nas primeiras 6 h de tratamento.

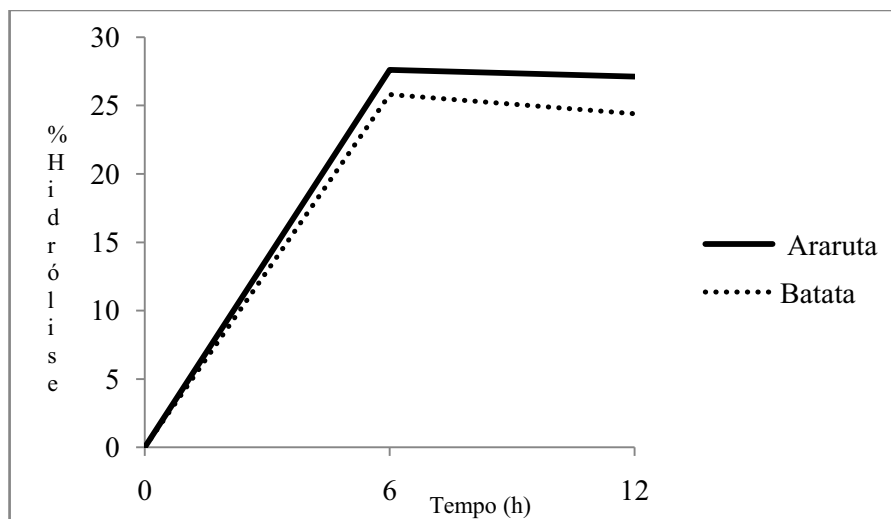


Figura 6: Porcentagem de hidrólise em função do tempo, dos amidos de batata e araruta incubados com β -amilase durante 12 h a 40° C.

O amido de batata apresentou resistência levemente superior à ação da enzima que o amido de araruta. O teor de amilose absoluta no amido de batata foi levemente superior àquela do amido de araruta. É possível que a menor proporção de amilopectina, no amido de batata tenha contribuído para essa pequena diferença. Maior quantidade de amilopectina no amido significa mais extremidades não redutoras para a β -amilase hidrolisar (CURTS; WANG, 2012). Outro fator que pode ter contribuído para essa diferença provavelmente está relacionado ao fato do amido de batata ser naturalmente fosfatado (Tabela 1), apresentando grupamentos ésteres de fosfato ligados às cadeias de amilopectina (ALVANI, 2011). A presença desses grupos pode ter aumentado a resistência do amido de batata frente a ação desta enzima devido ao impedimento estérico.

Como o objetivo do trabalho era comparar o efeito das duas enzimas (β -amilase e α -amilase) na produção de AR3, utilizando-as como um pré-tratamento antes da desramificação dos amidos, testes com diferentes concentrações de α -amilase (10 e 5U/g de amido), para se conseguir porcentagens de hidrólise semelhantes àquelas obtidas com a β -amilase (aproximadamente 25%), foram realizados. A Tabela 3 apresenta as porcentagens de hidrólise utilizando as diferentes concentrações de α -amilase. Nas concentrações de 10 e 5U/g de amido, respectivamente para os amidos de araruta e batata, valores próximos aos 25% de hidrólise foram encontrados.

Ao contrário do apresentado para a β -amilase, o amido de batata se mostrou bem mais suscetível à ação da α -amilase que o amido de araruta. Então a concentração usada na

hidrólise do amido de batata foi metade daquela usada para o amido de araruta para que as porcentagens de hidrólise fossem próximas a 25%.

Tabela 3: Porcentagem de hidrólise dos amidos de batata e araruta incubados com diferentes concentrações de α -amilase a 55°C por 6 h.

Concentração enzima (U/g deamido)	Amido	% de hidrolise
10	Batata	40,1
5	Batata	22,6
10	Araruta	25,1
5	Araruta	nd*

* nd: não determinado

A maior proporção de cadeias longas da amilopectina presente no amido de batata pode ter contribuído para esses resultados. Segundo Goesert, Bijttebier e Delcour (2010), endoamilases hidrolisam as cadeias B (cadeias de maior comprimento) mais rapidamente e extensivamente quando comparado a exoamilases. Cadeias mais longas da amilopectina podem ter sido hidrolisadas a fragmentos menores que posteriormente sofreram ação sacarificante da enzima.

5.5 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO MOLECULAR DOS COMPONENTES DOS AMIDOS NATIVOS E TRATADOS ENZIMATICAMENTE POR CROMATOGRÁFICA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC)

Os perfis de distribuição do tamanho molecular dos componentes dos amidos nativos estão apresentados na Figura 7. Os amidos nativos de batata e araruta apresentaram dois picos distintos. O primeiro pico, eluído a 62,5mL, corresponde a amilopectina com grande massa molecular que eluiu no volume vazio da coluna e o segundo que apresentou uma alta resposta de *blue value* corresponde a amilose. O terceiro pico corresponde a glicose adicionada para marcar o final da eluição.

Em relação ao primeiro pico (amilopectina), o amido de batata apresentou maior relação BV/CHO (0,31) quando comparado ao amido de araruta (0,24). Quanto maior a relação BV/CHO no pico da amilopectina, maior a proporção de cadeias ramificadas longas da amilopectinano amido (FRANCO et al., 2002), o que também pode ser observado pela diferença entre os teores de amilose aparente dos dois amidos (Tabela 2).

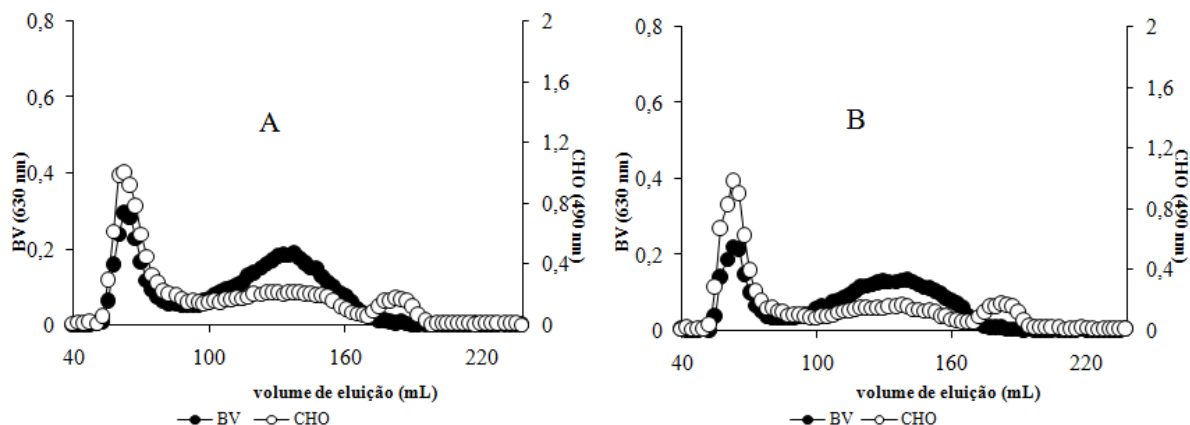


Figura 7: Perfis de eluição dos amidos nativos de batata (a) e araruta (b) obtidos por cromatografia de permeação em gel Sepharose CL2B. (●) *Blue value*; (○) carboidratos totais.

O amido de batata apresentou o segundo pico (amilose) eluído a 132,5mL. Este pico que foi eluído em um volume menor que aquele no amido de araruta (140 mL) mostrou-se mais resolvido indicando que a fração amilose no amido de batata é mais homogênea e apresenta maior massa molecular que a amilose na araruta (SONG; JANE, 2000). Resultados semelhantes foram observados por Peroni, Rocha e Franco (2006) para o amido de araruta e por Rocha (2010) para o amido de batata, os quais foram analisados em condições semelhantes às deste trabalho.

Os amidos hidrolisados foram analisados em coluna de Bio-Gel P6, cujos resultados estão apresentados na Figura 8.

Os perfis dos amidos tratados enzimaticamente exibiram picos distintos. Os amidos de batata e araruta gelatinizados e desramificados com pululanase (Figuras 8, a, d) exibiram praticamente o mesmo perfil com o primeiro pico (I) correspondendo às moléculas de amilose e cadeias muito longas de amilopectina, cadeias essas de maior massa molecular que foram eluídas no volume vazio da coluna (55 mL). O segundo pico (II) eluído a 75mL, corresponde as cadeias intermediárias de amilopectina com GP médio de 30, seguido por um terceiro pico (III) eluído a 105 mL que corresponde as cadeias curtas A de amilopectina (KASENSUWAN et al., 1995; FRANCO et al., 2010) com GP médio de 12. O último pico corresponde à glicose (G) que foi adicionada para marcar o final da eluição. Segundo Hizukuri (1986), a molécula de amilopectina é constituída de cadeias A, B (B1-B4) e C. As frações com GP < 13 e GP 13-30 compõem as cadeias curtas (A) e intermediarias (B1), respectivamente, e as cadeias com DP > 30 correspondem às cadeias mais longas (B2-B4).

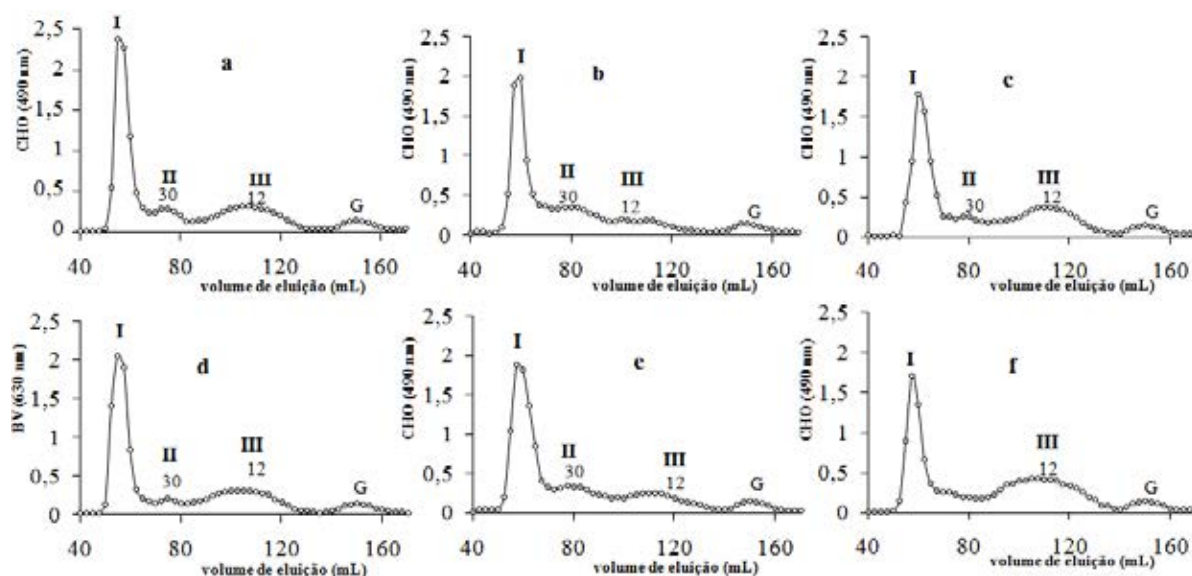


Figura 8: Perfis de eluição dos amidos de batata e araruta hidrolisados enzimaticamente e obtidos por cromatografia de permeação em BIO GEL P6. (○) carboidratos totais. Amidos de batata (a) e de araruta (d) gelatinizados, desramificados e retrogradados; amidos de batata (b) e de araruta (e) gelatinizados hidrolisados com β -amilase, desramificados e retrogradados; amidos de batata (c) e de araruta (f) gelatinizados hidrolisados com α -amilase, desramificados e retrogradados. G=glicose.

Quando os amidos foram tratados com amilases antes da desramificação com pululanase houve de maneira geral redução no primeiro pico correspondente à amilose e às cadeias muito longas da amilopectina, seguido de um aumento nas cadeias de menor comprimento.

Os amidos hidrolisados com β -amilase antes da desramificação (Figuras 8, b, e) mostraram redução do pico I, alargamento do pico II, correspondente a cadeias intermediárias e longas de amilopectina (B1, B2), e redução do pico III. Esses resultados sugeriram que algumas cadeias de amilose e cadeias mais longas de amilopectina (B2-B4) foram sendo lentamente quebradas a fragmentos menores que foram eluídas juntamente com o pico II. Da mesma maneira as cadeias com GP próximo a 12 (cadeias A) foram sendo hidrolisadas a oligossacarídeos menores e mais solúveis. Por outro lado, a ação da α -amilase fúngica (Figuras 8, c, f) proporcionou redução mais significativa no pico I e principalmente no pico II, o qual praticamente desapareceu no amido de araruta, aumentando a liberação de cadeias com GP próximo a 12, o que foi mais expressivo no amido de araruta. Resultados semelhantes foram encontrados por Bijttebier, Goesart e Delcour (2010), para amidos de milho ceroso tratados com α -amilase fúngica.

Esses resultados podem ser justificados devido à diferença no modo de ação de ambas as enzimas. A β -amilase, por ser uma exoenzima, hidrolisa preferencialmente as cadeias de menor comprimento (A+B1), liberando maltose. Diferentemente, a α -amilase, uma endoenzima, hidrolisa em maior extensão as cadeias de maior comprimento (B2-B4) (BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2010). Endoamilases são capazes de hidrolisar mais rapidamente e extensivamente as ligações internas das cadeias B (PARK; ROLLINGS, 1994)

Segundo Goesaert, Bijttebier e Delcour (2010) a α -amilase fúngica hidrolisa primeiramente as cadeias mais longas de amilopectina que se conectam a diferentes clusters liberando assim clusters individuais, e em seguida ocorre a desagregação das cadeias mais curtas dentro desses clusters, justificando assim os resultados encontrados na Figura 8.

5.6 DISTRIBUIÇÃO DO COMPRIMENTO DAS CADEIAS RAMIFICADAS DA AMILOPECTINA DOS AMIDOS NATIVOS E HIDROLISADOS

As distribuições normalizadas do comprimento de cadeias laterais resultantes da desramificação com isoamilase dos amidos nativos estão apresentadas na Figura 9 e os resultados resumidos na Tabela 4. Os amidos de raízes e tubérculos apresentaram distribuição bimodal e dois picos puderam ser observados, o primeiro pico observado nos GP 13 e 12 para os amidos de batata e araruta, respectivamente e o segundo pico nos GP 44 e 37, respectivamente para os amidos de batata e araruta.

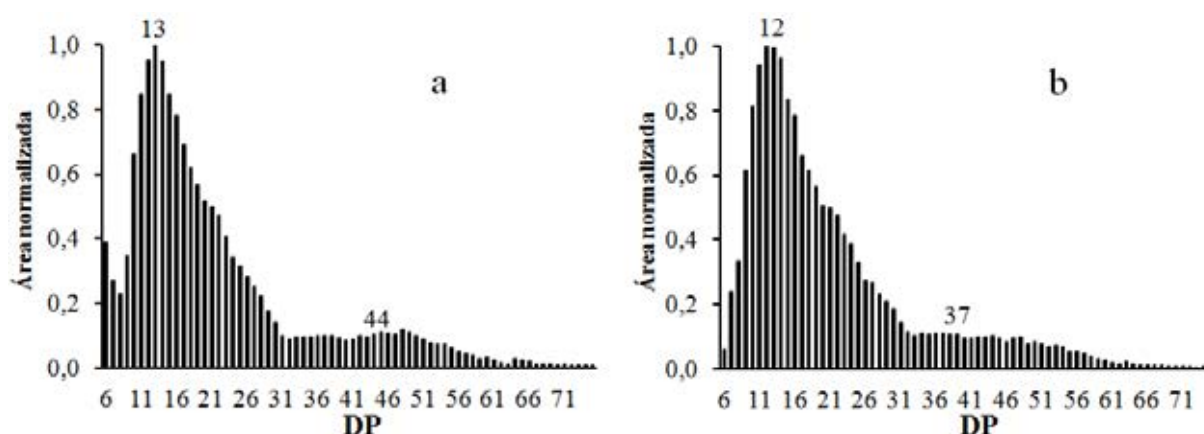


Figura 9: Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos de batata (a) e de araruta (b) desramificados por isoamilase.

O amido de batata que apresenta um padrão cristalino característico do tipo B apresentou menor proporção (23,9%) de cadeias curtas (GP 6-12) e maior quantidade de cadeias longas, quando comparado ao amido de araruta, cujo padrão cristalino é tipo A. Isso favoreceu também o maior comprimento médio de cadeia (GP 21,3) para o amido de batata. Esses resultados são similares àqueles observados por Jane et al. (1999) e Yoo et al. (2009) ao comparar amidos desses tipos cristalinos. Amidos do tipo B geralmente apresentam menores porcentagens de cadeias curtas (GP 6-12) e maiores de cadeias longas ($GP \geq 37$) (ALVANI et al.; 2011).

Tabela 4: Distribuição do comprimento de cadeias ramificadas das amilopectinas dos amidos nativos*

	Comprimento de cadeia (%)				GP	Maior GP detectado
	GP (6-12)	GP (13-24)	GP (25-36)	GP (≥ 37)		
Batata	23,9(0,0)	49,8(0,1)	12,5(0,1)	13,7(0,0)	21,3	80
Araruta	25,2(0,0)	48,5(0,0)	13,6(0,1)	12,6(0,1)	20,7	80

*Média de duas replicatas seguida do desvio-padrão. GP: grau de polimerização.

Os resultados das distribuições normalizadas do comprimento de cadeias laterais da amilopectina dos amidos tratados enzimaticamente estão apresentados na Figura 10 e resumidos na Tabela 5.

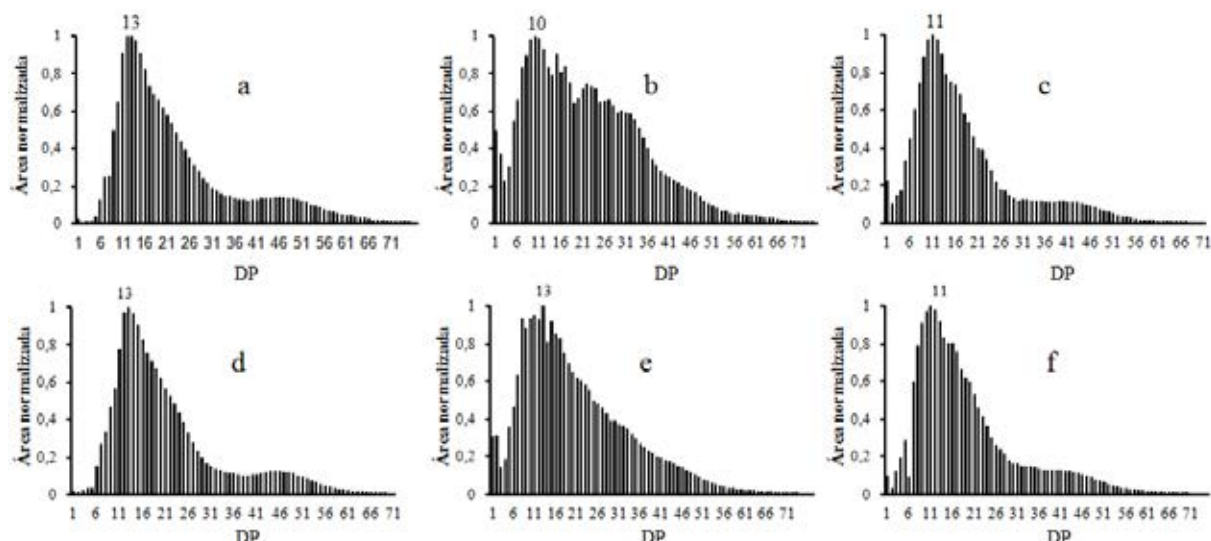


Figura10: Distribuição do comprimento de cadeias lineares dos produtos da hidrólise enzimática dos amidos. Amidos de batata (a) e de araruta (b) gelatinizados, desramificados e retrogradados; amidos de batata (b) e de araruta (e) gelatinizados hidrolisados com β -amilase, desramificados e retrogradados; amidos de batata (c) e de araruta (f) gelatinizados hidrolisados com α -amilase, desramificados e retrogradados.

Os amidos desramificados com pululanase (Figura 10, a, d) apresentaram perfis cromatográficos semelhantes àqueles dos amidos nativos em que a desramificação foi realizada com isoamilase (Figura 9, a, b).

A hidrólise com ambas as enzimas alterou a distribuição dos comprimentos de cadeias ramificadas da amilopectina em ambos os amidos. De maneira geral, a degradação das cadeias de maior comprimento com aumento na proporção de cadeias menores foi observada após amilólise, embora o comportamento entre a ação da α - e β -amilase foram diferentes. Houve mudanças em cada uma das frações para cada amido e enzima utilizada (Tabela 5).

Os amidos tratados com β -amilase mostraram expressivo aumento na proporção de cadeias com GP 25-36 e aumento menos expressivo na proporção das cadeias curtas (GP 6-12). Houve também expressiva redução nas cadeias com GP 13-24 e redução menos acentuada nas cadeias com GP >37.

Já a ação da α -amilase fúngica provocou, em ambos os amidos, redução nas proporções de cadeias com GP 13-24, GP 25-36 e GP > 37 e aumento expressivo nas cadeias de GP 6-12. Ambos os amidos tratados com ambas as enzimas apresentaram proporções significativas de cadeias muito curtas. Essas diferenças são explicadas pelo modo de ação das enzimas e pelas diferenças estruturais dos amidos envolvidos, concordando com o observado na distribuição do tamanho molecular por GPC (Figura 8).

Tabela 5: Distribuição do comprimento das cadeias lineares dos produtos da hidrólise enzimática dos amidos de batata e araruta.

	Comprimento de cadeia					GP	Maior GP detectado
	GP 1-5	GP 6-12	GP13-24	GP25-36	GP $\geq$ 37		
BP	0,5(0,1)	20,6(0,2)	47,4(0,4)	15,3(0,1)	16,3(0,4)	22,9	80
B β P	6,9(0,3)	22,4(0,1)	32,6(0,3)	24,5(0,2)	13,6(0,3)	21,8	77
B α P	5,9(0,2)	34,0(0,3)	40,1(0,5)	10,1(0,1)	9,9(0,2)	17,9	77
AP	0,7(0,1)	21,2(0,3)	50,8(0,3)	14,0(0,1)	13,2(0,3)	21,5	80
A β P	5,6(0,3)	24,5(0,4)	37,9(0,1)	19,6(0,5)	12,4(0,2)	20,9	77
A α P	4,0(0,1)	29,6(0,3)	43,0(0,2)	12,3(0,3)	11,0(0,1)	19,2	77

*Média de duas replicatas seguida do desvio-padrão; GP: grau de polimerização, BP e AP – Amidos de batata(b) e de araruta (A) gelatinizados, desramificados com pululanase e retrogradados; B α P e A α P – Amidos de batata (B) e de araruta (A) gelatinizados, hidrolisados com α -amilase, desramificados com pululanase e retrogradados ; B β P e A β P – Amidos de batata (B) e de araruta (A) gelatinizados, hidrolisados com β -amilase, desramificados com pululanase e retrogradados.

A β -amilase, uma exoenzima, hidrolisa as ligações α -1,4 a partir da extremidade não redutora até os pontos de ramificação (ligações α -1,6) produzindo uma série de oligossacarídeos menores como maltose, maltotriose e maltotetose (HICKMAN; JANASWAMY; YAO, 2009; BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2010; MIÃO et al., 2014). Esses resultados estão em concordância com os observados nesse trabalho, pois como pode ser observado na Tabela 5, independente da fonte de amido utilizada, a β -amilase produz maior quantidade de cadeias curtas (GP 1-5), quando comparada à α -amilase que por sua vez hidrolisa mais facilmente cadeias mais longas de amilopectina liberando oligossacarídeos de maior comprimento, principalmente com GP 6-12.

5.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X E CRISTALINIDADE RELATIVA

As moléculas de amido estão organizadas em regiões cristalinas e amorfas no grânulo de amido. Os padrões de difração de raios-X e as porcentagens de cristalinidade dos amidos de batata e araruta estão apresentados na Figura 11.

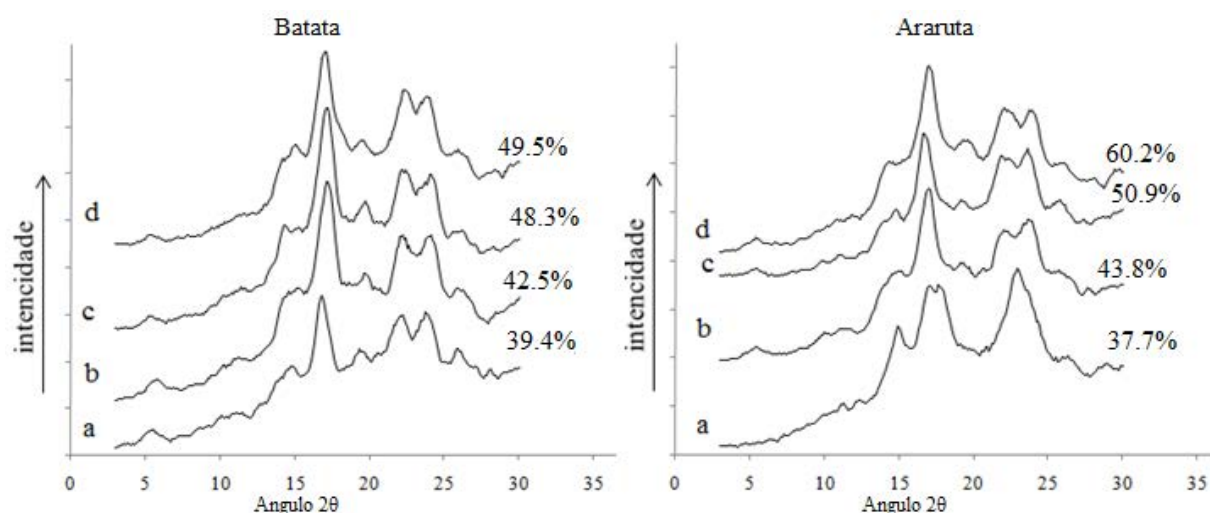


Figura 11: Difractogramas de raios-X dos amidos de batata e araruta (a) nativo (b) gelatinizados, desramificado e retrogradado (c) gelatinizado hidrolisado com β -amilase, desramificado e retrogradado (d) gelatinizado hidrolisado com α -amilase, desramificado e retrogradado, e suas respectivas cristalinidades relativas (%)

O amido nativo de batata apresentou padrão cristalino do tipo B, característico de amidos de tubérculos, com pico de intensidade média no ângulo de difração 2θ $5,5^\circ$, média-forte nos ângulos $22,2^\circ$ e $24,0^\circ$, e forte no ângulo de $17,1^\circ$ concordando com o observado por outros

autores (VASANTHAN et al., 1999; YUSUPH et al., 2003; YOO et al., 2009; ALVANI et al., 2011). Já o amido nativo de araruta apresentou padrão cristalino tipo A caracterizado por pico dubleto em 17° e 18° e um pico singleto em 23° (BULEON et al., 1998). Esse tipo de padrão cristalino também foi observado por Moorthy (2002) para o amido de araruta.

A cristalinidade relativa é quantificada por meio da razão entre a área dos picos e a área total dos difractogramas (NARA; KOMIYA, 1983; XIE et al., 2014). A porcentagem de cristalinidade relativa foi maior para o amido de batata nativo (39,4%) quando comparado ao amido de araruta (37,7%), concordando com os resultados encontrados por Srichuwong et al. (2005).

Os amidos de batata e araruta gelatinizados, tratados enzimaticamente e retrogradados apresentaram padrão de cristalinidade tipo B, como esperado pois retrogradaação em baixas temperaturas leva a formação de padrão cristalino tipo B (SIEVERT et al., 1991; CAI et al., 2010). Resultados semelhantes foram encontrados por Mun e Shin (2006); Polesi e Sarmento (2010); Simsek e El (2012) e Zhou et al. (2014) que encontraram padrões cristalinos tipo B para AR3 a partir de amidos de milho normal, de grão de bico, de inhame e de arroz, respectivamente.

Tanto os amidos de batata quanto os amidos de araruta tratados enzimaticamente e retrogradados mostraram difractogramas com picos mais intensos e definidos quando comparados com os respectivos amidos nativos. Picos mais definidos e intensos sugerem que a estrutura do amido formado compreende cadeias de amilose recristalizadas, e talvez fragmentos de amilopectina desramificada e fragmentos de amilose menores que as do amido nativo que co-cristalizam durante a retrogradaação (LEONG; KARIM; NORZIAH, 2007), tornando os amidos mais cristalinos e resistentes às enzimas.

A cristalinidade relativa dos amidos aumentou com a desramificação de 39,4% para 42,5% e de 37,7 para 43,8 % para os amidos de batata e araruta, respectivamente, resultados esperados em função da melhor reassociação das cadeias lineares do amido. Quando a amilólise precedeu a desramificação houve um aumento ainda maior na cristalinidade dos dois amidos estudados, as quais atingiram 48,3% e 49,5% no amido de batata quando β -amilase e α -amilase foram usadas respectivamente e 50,9% e 60,2% quando β -amilase e α -amilase foram usadas respectivamente, no amido de araruta. Resultados semelhantes foram encontrados por Shi e Gao (2011) e por Zhou et al. (2014). De acordo com esses mesmos autores, as diferenças no grau de cristalinidade entre os amidos podem ser atribuídas ao

tamanho do cristal, quantidade de cristais (influenciada pelo comprimento das cadeias de amilopectina), orientação das duplas hélices organizadas em domínios cristalinos e extensão das interações entre as duplas hélices. A ação de ambas as enzimas provocou a redução no tamanho das cadeias de amilose e cadeias longas de amilopectina a serem liberadas após desramificação (tabela 5), o que aumentou a mobilidade das mesmas favorecendo sua cristalização. A distribuição de comprimentos de cadeias da amilopectina do amido de araruta bem como o tamanho molecular da amilose neste amido favoreceu a ação da α -amilase resultando, após desramificação, na formação de cadeias lineares com tamanhos mais adequados à reassociação e cristalização.

5.8 PROPRIEDADES TÉRMICAS

Os perfis endotérmicos e as temperaturas e entalpias de gelatinização dos amidos nativos de batata e araruta estão apresentados na Figura 12.

Os amidos nativos de batata e araruta apresentam um único pico endotérmico bem definido, o que já era esperado, pois amidos de raízes e tubérculos não apresentam quantidades suficientes de lipídeos que permitam a formação de complexos. Os resultados encontrados são semelhantes aos obtidos por Alvani et al. (2011) para o amido de batata e John et al. (2002) e Pérez e Lares (2005), para o amido de araruta.

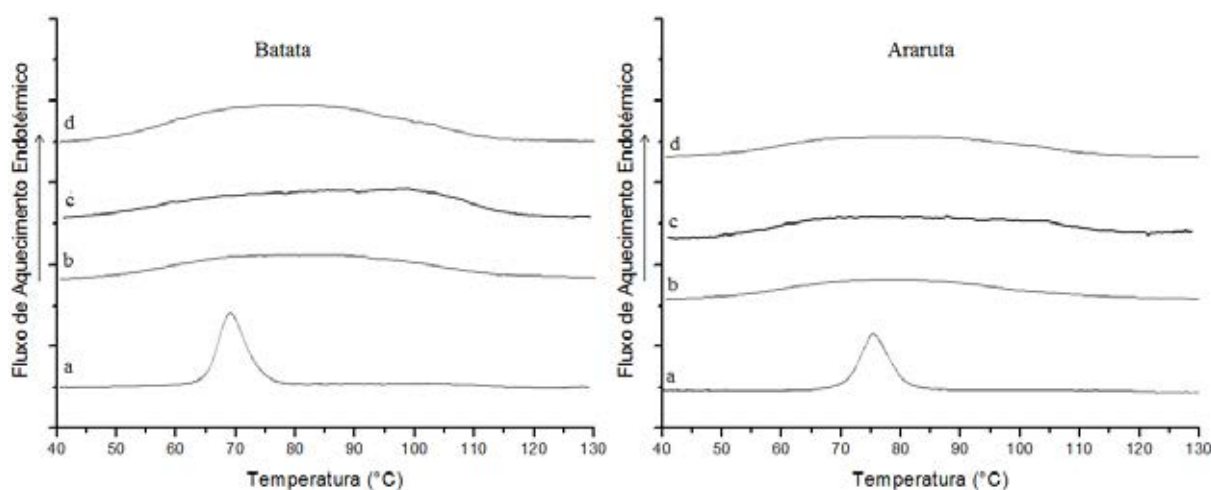


Figura 12: Perfil endotérmico dos amidos de batata(I) e araruta (II): (a) nativos; (b) gelatinizados, desramificados e retrogradados; (c) gelatinizados, hidrolisados com β -amilase, desramificados e retrogradados; (d) gelatinizados hidrolisados com α -amilase, desramificados e retrogradados.

Segundo Gunarantne e Hoover (2002) as propriedades térmicas dos amidos nativos podem ser influenciadas por fatores tais como: estrutura molecular da amilopectina (tamanho das cadeias e grau de ramificação), composição dos grânulos de amido (razão amilose e amilopectina e teor de fósforo) e a arquitetura granular (razão entre região amorfa e cristalina).

O amido de araruta apresentou maior temperatura inicial (71,8°C) temperatura de pico (75,27°C) e temperatura final (79,5°C) quando comparado ao amido de batata. Altas temperaturas de gelatinização estão relacionadas a estruturas cristalinas mais fortes e maior ordem molecular (SRICHUWONG et al., 2005). O amido de batata apresenta elevado teor de fósforo (Tabela 1), o que possivelmente pode ter contribuído para as menores temperaturas de gelatinização observadas (ALVANI et al., 2011).

O ΔH é a energia necessária para o rompimento das ligações de hidrogênio das regiões amorfas e das duplas hélices da amilopectina (TESTER; KARKALAS, 2006). O amido de batata apresentou maior entalpia (16,5J/g) quando comparado ao amido de araruta (13,7 J/g), e por outro lado apresentou menor faixa de temperatura de gelatinização sugerindo uma maior perfeição e homogeneidade dos cristais. Esse amido também apresentou maiores proporções de cadeias longas (Tabela 4) que formam hélices mais longas. A maior proporção dessas cadeias requer maior quantidade de energia para gelatinização dos cristais (SHING et al., 2003) justificando o maior valor no ΔH do amido de batata.

Os amidos gelatinizados resultantes dos tratamentos enzimáticos com pululanase precedido ou não da amilólise e retrogradados apresentaram uma ampla faixa endotérmica entre 50 e 100°C. Essa grande amplitude, que foi mais pronunciada nos amidos submetidos à amilólise, indica a heterogeneidade dos cristais formados após a retrogradação, devido à presença de populações com diferentes tamanhos de cadeia formados após ação das enzimas, que apresentam diferentes temperaturas de fusão e estabilidades (MOATES et al., 1997).

Os amidos desramificados apresentaram altas entalpias (10,2 e 11,1 J/g, para amidos de batata e araruta, respectivamente). A entalpia de gelatinização (ΔH) aumentou para 13,3J/g e 14,4J/g no amido de batata e para 15,4 J/g e 19,5 J/g no amido de araruta quando β -amilase e α -amilase foram usadas, respectivamente, concordando com os resultados de cristalinidade relativa (Figura 11). Isso aconteceu provavelmente porque após a ação dessas enzimas a proporção de cadeias mais curtas que têm maior mobilidade para reassociação aumentou potencializando a formação de duplas hélices mais fortemente ligadas e cristais mais

resistentes ou aumentando a força de interação entre as cadeias do amido dentro das áreas cristalinas. O mesmo foi observado por outros autores (ZHANG; JIN, 2011; CURTIS; WANG, 2012; ZHOU et al., 2014).

Quanto maior o ΔH nos amidos gelatinizados, hidrolisados e retrogradados maior a cristalinidade relativa. O aumento na entalpia e cristalinidade relativa sugerem o fortalecimento das duplas hélices com a formação de uma estrutura cristalina mais ordenada. Esse aumento provavelmente está relacionado ao aumento na proporção de cadeias curtas, mais especificamente da fração de cadeias com DP 6-12 e a redução na proporção de cadeias muito longas (Tabela 5). Segundo Genkina et al. (2007) a presença de cadeias muito longas dificulta a cristalização e pode diminuir a densidade e a estabilidade dos cristais.

Os produtos formados da ação da α -amilase no amido de araruta foram mais adequados a esta reassociação, concordando com os resultados de cristalinidade observados na Figura 11.

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

Os teores de amidos com diferentes graus de digestibilidade presentes nas amostras de amidos de batata e araruta resultantes dos diferentes tratamentos enzimáticos se encontram na Tabela 6.

Os amidos de batata e araruta gelatinizados apresentaram baixa resistência à ação das enzimas digestivas (8,1 e 1,1% respectivamente) como era esperado, pois a gelatinização aumenta a digestibilidade do amido, presumivelmente devido à desorganização granular (RING et al., 1988). O teor de AR no amido de batata gelatinizado foi maior quando comparado ao amido de araruta. O arranjo cristalino no amido nativo afeta sua resistência às enzimas. Amidos com padrão cristalino tipo A são menos resistentes à hidrólise quando comparado aos do tipo B mesmo após a gelatinização. As curtas duplas hélices de amilopectina presentes no interior do padrão cristalino A são mais suscetíveis do que as cadeias longas que formam duplas hélices mais estáveis, estabilizadas por pontes de hidrogênio e distribuídas por toda a região cristalina no padrão tipo B (LEHMANN; ROBIN, 2007; SINGH, DARTOIS; KAUR, 2010). Assim, os grânulos do amido de batata nativo são considerados como AR2. A gelatinização degrada esse amido resistente, porém certa quantidade ainda é preservada no amido de batata. Além disso, o amido de batata é um amido naturalmente fosfatado (Tabela 1), que apresenta grupamentos ésteres de fosfato ligados às

cadeias de amilopectina (ALVANI, 2011). A presença desses grupos fosfatos aumenta a resistência do amido devido ao impedimento estérico que oferece, dificultando o acesso das enzimas (BAO et al., 2003; KHONDKAR, TESTER; KARKALAS, 2009).

Tabela 6: Teor de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR) nos amidos de batata e de araruta submetidos aos diferentes tratamentos enzimáticos.

Tratamento ¹	ARD (%)	ALD (%)	AR (%)
BG	72,9 (0,8) ^b	18,0 (0,6) ^c	8,1 (0,5) ^e
BP	70,1 (0,7) ^c	8,5 (1,2) ^f	20,2 (0,6) ^d
BβP	51,5 (0,4) ^e	11,3 (1,1) ^e	36,3 (0,7) ^c
BαP	34,5 (1,1) ^g	27,8 (0,9) ^a	36,8 (0,5) ^c
AG	93,1 (0,9) ^a	4,7 (0,9) ^g	1,10 (0,5) ^f
AP	53,9 (1,1) ^d	23,3 (0,6) ^b	21,7 (0,6) ^d
AβP	37,8 (1,3) ^f	13,7 (0,7) ^d	47,5 (0,4) ^b
AαP	34,1(1,0) ^g	11,3 (0,9) ^e	53,4 (0,5) ^a

¹Média de três repetições seguido de desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). BG e AG – Amidos de batata (B) e de araruta (A) gelatinizados; BP e AP – Amidos gelatinizados, desramificados com pululanase e retrogradados; BαP e AαP – Amidos gelatinizados, hidrolisados com α-amilase, desramificados e retrogradados ; BβP e AβP – Amidos gelatinizados, hidrolisados com β-amilase, desramificados e retrogradados.

A desramificação dos amidos com pululanase aumentou os teores de AR3 para 20,2% e 21,7% nos amidos de batata e araruta, respectivamente, uma vez que a liberação das cadeias laterais da amilopectina favorece a reassociação e retrogradação das mesmas. O amido de araruta desramificado apresentou maior teor de AR3 quando comparado ao amido de batata. Essa diferença provavelmente está relacionada a maior proporção de cadeias curtas e menor proporção de cadeias muito longas desse amido, que favorece a formação de duplas hélices cristalinas, e portanto mais resistentes à digestão (LEHMANN; ROBIN, 2007; SHI et al., 2013). A ação das enzimas amilolíticas provocou um aumento considerável no teor de AR3 desses amidos. A quebra das moléculas do amido em fragmentos de menor massa molecular aumenta o número de moléculas lineares menores com maior mobilidade e maior tendência a retrogradação (CURTIS; WANG, 2012).

O amido de araruta apresentou maiores teores de AR3 nos tratamentos com ambas as enzimas quando comparado ao amido de batata que por sua vez não apresentou diferença

significativa entre eles. Esses resultados mostram que embora o teor de amilose seja um dos fatores importantes para a formação de AR3, outros aspectos relacionados à estrutura do amido também se mostram de grande importância (CURTIS; WANG, 2012). Essa diferença também está relacionada com a massa molecular dos componentes do amido e diferença nos comprimentos das cadeias laterais das amilopectinas dos diferentes amidos. Outro fator que provavelmente tenha contribuído para o menor teor de AR3 formado pela ação de ambas as enzimas no amido de batata é a maior quantidade de fósforo apresentada por esse amido (Tabela 1). No amido de batata grupos fosfatos se encontram ligados covalentemente aos resíduos de glicose localizados principalmente nas cadeias B da amilopectina (ABSAR et al., 2009). A presença desses grupos pode ter limitado o acesso tanto da β -amilase quanto da α -amilase fúngica, quando comparado ao amido de araruta, dificultando assim a quebra das cadeias com produção de tamanhos mais adequados para, após o resfriamento, se retrogradarem e conseqüentemente formarem maiores teores de AR.

O AR3 é formado após o processo de retrogradação do amido e a velocidade de retrogradação é dependente do comprimento das cadeias, assim o GP afeta a formação de AR3 (EERLINGEN, DECEUNINCK, DELCOUR, 1993). Então um comprimento de cadeia adequado é necessário para a cristalização e formação de duplas hélices adequadas para formar AR3. No entanto a recristalização também é muito afetada pela temperatura de retrogradação.

Eerlingen, Deceuninck e Delcour (1993) observaram que o AR3 pode ser formado pela agregação das duplas hélices ao longo de uma região de cadeias em torno de 24 unidades de glicose, uma vez que proporções de cadeias com GP 14-24 favorecem a retrogradação (SHI; SEIB, 1992 SILVERIO et al., 2000). Jane et al. (1999) mostrou que o comprimento das cadeias GP 18-21 representariam a total extensão da lamela cristalina.

Gidley e Bulpin (1987) e Kohyam et al. (2004), ao estudarem a relação entre a retrogradação e o comprimento de cadeia, observaram que oligossacarídeos com $GP > 6$, quando na presença de cadeias mais longas, podem participar de maneira positiva na retrogradação e formar duplas hélices. Casarrubias-Castillo et al. (2012), que estudaram o efeito da β -amilase na formação de AR3 em amidos de banana e manga, observaram que o aumento na proporção de cadeias curtas $GP < 13$ está relacionado à redução da digestibilidade do amido.

Com base nessas informações é possível que o aumento no teor de AR3 nos amidos hidrolisados pelas amilases, seja em parte justificado pelo o aumento na proporção de cadeias curtas formadas após a ação das enzimas (Tabela 5), principalmente na faixa de GP 6-12. Essas cadeias podem ter influenciado de maneira positiva a retrogradação favorecendo a formação de cristais mais fortemente ligados e, portanto mais resistentes às enzimas digestivas. Além disso, outro fator que contribuiu para esse aumento foi a redução na proporção de cadeias muito longas, cadeias essas que são mais susceptíveis a formar redes mais sensíveis a ação das enzimas digestivas (GIDLEY et al., 1995).

Ambas as enzimas foram eficientes na formação de AR3, porém a α -amilase se mostrou mais eficiente do que a β -amilase, principalmente para o amido de araruta, indicando que, provavelmente, os produtos liberados pela ação desta enzima que também depende das características estruturais de cada amido estudado, apresentam tamanhos mais adequados para, após desramificação, se reassociarem facilitando seu pareamento e recristalização, dificultando assim o acesso das enzimas digestivas.

Segundo Jane et al. (1999), a faixa de comprimento das cadeias com GP 18-21 seria próxima à espessura da lamela cristalina da amilopectina, portanto essa faixa de comprimento de cadeia representariam a total extensão da lamela cristalina

O amido de araruta hidrolisado pela α -amilase que apresentou maior teor de AR3 apresentou significativa quantidade de cadeias com GP 6-12, e embora a ação da alfa amilase tenha provocado redução na proporção de cadeias com GP 13-24 (tabela 5) esse amido apresentou maior proporção de cadeias com GP 7-24 (72,3%). Baseados nas informações de Gidely e Bulpin (1997), Shi e Seib, (1992) e Silverio et al. (2000), pode se dizer que essa faixa de comprimento de cadeia apresenta tamanhos mais adequados para se movimentarem, e se reassociarem formando duplas hélices mais fortemente ligadas quando sob as condições de retrogradação utilizadas nesse trabalho. Por outro lado a presença de menores proporções de cadeias muito longas (Tabela 5 e figura 8) contribuiu para potencializar a retrogradação.

Quanto maior a cristalinidade relativa nos amidos e maior o ΔH maior também foi o teor de AR3 indicando uma forte relação entre a cristalinidade, força de interação entre as cadeias que formam as duplas helices e resistência às enzimas digestivas.

A desramificação favoreceu a formação do ALD no amido de araruta, porém reduziu esta fração no amido de batata, enquanto a ação da α -amilase também foi eficiente para potencializar a formação de ALD no amido de batata. Segundo Guraya et al. (2001), a

formação de ALD pode resultar na formação de cristais imperfeitos com baixa densidade que são mais propensos à digestão. O ALD é importante por apresentar baixos níveis de glicose pós-prandial e manter os níveis de glicose no sangue por maiores períodos de tempo comparado ao ARD que apresenta rápida resposta glicêmica com picos e quedas (LEHMANN; ROBIN, 2007). O ALD é considerado de baixo índice glicêmico, que resulta em menores riscos de diabetes e doenças cardiovasculares (CUMMIGS; STEPHENS, 2007).

6 CONCLUSÕES

A amilólise antes da desramificação com pululanase é eficiente na formação de AR3 mostrando que um conjunto de comprimentos de cadeias adequado é necessário para a cristalização e formação de duplas hélices adequadas para a obtenção de maiores teores de AR3.

A fonte botânica dos amidos e consequentemente suas características estruturais principalmente o comprimento das cadeias laterais da amilopectina são as principais responsáveis pela formação do AR3 quando a amilólise antecede a desramificação uma vez que comprimento dessas cadeias influencia nos comprimento de cadeias a serem liberados após ação das enzimas

A α -amilase se mostrou mais eficiente na formação de AR3, principalmente no amido de araruta, indicando e o conjunto de fragmentos liberados pela ação desta enzima possuem tamanhos moleculares mais adequados a reassociação após a retrogradação nas condições testadas.

O ΔH , cristalinidade relativa e teor de AR foram diretamente proporcionais mostrando uma forte relação entre a cristalinidade, força de interação entre as cadeias que formam as duplas helices e resistência às enzimas digestivas. A interação entre as cadeias bem como o teor de AR3 são aumentados à medida que ocorre a diminuição na proporção de cadeias muito longas e aumenta a proporção de cadeias com GP 7-24.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. Sant Paul, MN: **American Association of Cereal Chemists**, 2000

ABSAR, N.; ZAIDUL, I.S.M.; TAKIGAWA, S.; HASHIMOTO, N.; MATSUURA-ENDO, C.; YAMAUCH, H.; NODA, T. Enzymatic hydrolysis of potato starches containing different amounts of phosphorus. **Food Chemistry**, v. 112, p. 57-62, 2009.

ALSAFFAR, A.A. Effect of food processing on the resistant starch content of cereals and cereal products – a review. **Food Science and Technology International**, v. 46, p. 455-462, 2011.

ALVANI, K.; QI, X.; TESTER, R.F.; SNAPE, C.E. Physico-chemical properties of potato starches. **Food Chemistry**. v. 125, p.958-965, 2011.

BEMILLER, J.; WHISTLER, R. Starch: chemistry and technology, in: **Food Science and Technology, International Series**. Third Edition, p. 149-188, 2009.

BAO, J.; XING, J.; PHILLIPS, D.L.; CORKE, H. Physical Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Rice, Wheat, and Potato Starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2283-2287, 2003

BELLO-PÉREZ, L. A.; MONTEALVO, M. G. M.; ACEVEDO, E. A. Almidón: definicion, estructura y propiedades. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E. W. **Carboidratos 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.

BIJTTEBIER, A.; GOESAERT, H.; DELCOUR, J. A.; Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: structural analysis of the residual amylopectin population. **Carbohydrate Research**. v. 345, p. 235-242, 2010.

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

BLENNOW, A.; BAY-SMIDT A. M.; OLSEN, C. E.; MOLLER, B. L. The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to starch crystallinity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 211-218, 2000.

BRADSHAW, J. E.; RAMSAY, G. Advances in Potato Chemistry and Technology Copyright 2009 Elsevier Inc. All rights reserved *Edited by: Jaspreet Singh and Lovedeep Kaur*. Capter 1. p. 01-26, 2009.

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.

BUTTERWORTH, P.J.; WARREN, F.J.; ELLIS, P.R. Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage: a review. **Starch/Starke**, v.63, p.395–405, 2011.

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.

CAI, L.; SHI, Y. C. Preparation, structure, and digestibility of crystalline A- and B-type aggregates from debranched waxy. **Carbohydrate Polymers**, v.105, p.341-350, 2014.

CROCHET, P.; BEAUXIS-LAGRAVE, T.; NOEL, T. R.; PARKER, R.; RING, S. G. Starch crystal solubility and starch granule gelatinization. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 107–113, 2005.

CASARRUBIAS-CASTILLO, M. G.; HAMAKER, B. R.; RODRIGUEZ-AMBRIZ, S. L.; BELLO-PEREZ, L. A. Physicochemical, structural, and digestibility properties of enzymatic modified plantain and mango starches. **Starch/Starke**, v. 64, p. 304-312, 2012.

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.

CUMMINS, J.H.; STEPHENS, A.M.; Carbohydrate terminology and classification. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 278-284, 2007.

DENARDIN, C.C.; SILVA, L.P. Starch granules structure and its regards with physicochemical properties: a review. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p. 350-353, 1956.

EERLINGEN, R.C.; DECEUNINCK, M.; DELCOUR, J.A. Enzyme-Resistant starch.II. Influence of amylose chain length on resistant starch formation. **Cereal Chemistry**, v. 70, p. 345-350, 1993.

ENGLYST, H.N.; CUMMINGS, J.H.; Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 42, p. 778–787, 1985.

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.

ENGLYST, H.N.; HUDSON, G.J. The classification and measurement of dietary carbohydrates. **Food Chemistry**, London, v. 57, n. 1, p. 15-21, 1996.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M.C. Tecnologia Del almidón resistente. **Food Science and Technology International**, London, v. 3, p. 149-161, 1997.

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.

FERRARI, T.B.; LEONEL, M.; SARMENTO, S.B.S. Characteristics of the rhizomes and starch of arrowroot (*Maranta arundinacea*) harvested at different stages of development. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 2, p. 93-98, 2005.

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.

FRANCO, C. M. L.; WONG, K.; YOO, S.; JANE, J. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 243-248, 2002.

FRANCO, C. M. L.; OGAWA, C.; RABACHINI, T.; ROCHA, T. S.; CEREDA, M. P. Effect of Lactic Acid and UV Irradiation on the Cassava and Corn Starches. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.v.53, p.443-454, 2010.

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-ÁLVAREZ, 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.

GENKINA, N. K.; WIKMAN, J.; BERTOFT, E.; YURYEV, V. P. Effects of structural imperfection on gelatinization characteristics of amylopectin starches with A- and B-type crystallinity. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2329-2335, 2007.

GÉRARD, C.; BARRON, P.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V. Amylose determination in genetically modified starches. **Carbohydrate Polymers**, v.44, p.19-27, 2001.

GIDLEY, M. J.; BULPIN, P. V. Crystallisation of Malto-Oligosaccharides as Models of the Crystalline Forms of Starch: Minimum Chain-Length requirement for the Formation of Double Helices. **Carbohydrate Research**.v.161, p.291-300, 1987.

GIDLEY, M. J.; COOKE, D.; DARKE, A.H.; HOFFMANN, R.A.; RUSSELL, A.L.; GREENWELL,P. Molecular order and structure in enzyme-resistant retrograded starch. **Carbohydrate Polymers**, v.28, p.23-31, 1995.

GOESAERT, H.; BIJTTEBIER, A.; DELCOUR, J.V. Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: level of inner chain attack as an important analytical differentiation criterion. **Carbohydrate Research**. v.345, p.397-401, 2010.

GOÑI, I.; GARCIA-DIAZ, L.; MAÑAS, E.; SAURA-CALIXTO, F. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. **Food Chemistry**, London, v.56, p. 445-449, 1996.

GOÑI, I.; GARCIA-ALONSO, A.; SAURA-CALIXTO, F.A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index.**Nutrition Research**, v. 17, n. 3, p. 427-437, 1997.

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

GONZALEZ-SOTO, R.A.; SANCHEZ-HERNANDEZ, L.; SOLORZA-FERIA, J.; NUNEZSANTIAGO, C.; FLORES-HUICOCHEA, E.; BELLO-PEREZ, L. A. Resistant starch production from non-conventional starch sources by extrusion. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 5-11, 2006.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599 – 1616, 2003

GUNARATNE, A.; HOOVER, R. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches.**Carbohydrate Polymers**.v.49, p.425-437, 2002.

GURAYA, H. S.; JAMES, G.; CHAMPAGNE, E. T. Effect of Enzyme Concentration and Storage Temperature on the Formation of Slowly Digestible Starch from Cooked Debranched Rice Starch.**Starch/Stärke**, v. 53, p. 131–139, 2001.

HASJIM, J.; LEE, S.O.; HENDRICH, S.; SETIAWAN, S.; AI, Y.; JANE, J.L. Characterization of a novel resistant-starch and its effects on postprandial plasma-glucose and insulin responses. **Cereal Chemistry**, v. 87, p. 257-262, 2010.

HAN, J; BEMILLER, J.N. Preparation and physical characteristics of slowly digestion modified food starches.**Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 366-374, 2007.

HICKMAN, B. E.; JANASWAMY, S.; YAO, Y. Autoclave and β -Amylolysis Lead to Reduced in Vitro Digestibility of Starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.57, p.7005-7012, 2009.

HIZUKURI, S.; TAKEDA, Y.; YASUDA, M. Multi-Branched nature of amylase and the action of debranching enzymes.**Carbohydrate Research**.v.94, p.205-213, 1981.

HIZUKURI, S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectin and its significance.**Carbohydrate Research**.v.147, p.342-347, 1986.

HIZUKURI, S. Starch: analytical aspects. In: Eliasson, A.-C., Editor, 1996. **Carbohydrates in Food**.Marcel Dekker, New York, p. 347–429, 1996.

HORTON, H. R.; MORAN, L.A.; OCHS, R.S.; RAWN, J.D.; SCRIMGEOUR, K.R. **Fundamento de Bioquímica**. Ed. Prentice-Hall do Brasil LTDA. Rio de Janeiro, Capitulo 8, 1996.

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

IMBERTY, A.; CHANZY, H.; PÉREZ, S.The double-helical nature of the crystalline part of A-starch.**Journal Molecular of Biology**, v. 201, n. 2, p. 365-378, 1988.

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.

JANE, J.; CHEN, J. F. Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch.**Cereal Chemistry**, v. 69, p. 60-65, 1992.

JANE, J.; SHEN, L.; CHEN, J.; LIM, S.; KASEMSUWAN, T.; NIP, K. Physical and chemical studies of taro starches and flours. **Cereal Chemistry**, v. 69, p. 528-535, 1992.

JANE; J.; KASEMSUWAN, T.; CHEN, J. F. Phosphorous in rice and other starches.**Cereal Foods World**, v.41, n. 11, p. 827-832, 1996.

JANE, J.; CHEN, Y. F.; MCPHERSON, A. E.; WONG, K. S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAM, T. Effects of amylopectin branch length and amylase contet on the gelatinization and pasting properties of starch.**Cereal Chemistry**, v. 76, p. 629-637, 1999.

JANE, J. Starch: Structure and properties. In: TOMASIK, P. Chemichal and functional properties of food saccharides, Boca Ration: CRC Press, cap. 7, p. 81-102, 2003.

JANE, J. Current understanding on starch granule structures. **Journal of Applied Glycoscience**.v.53, p.205-213, 2006.

JENKINS, D.J.A.; VUKSAN, V.; KENDALL, C.W.C.; WURSCH, P.; JEFFCOAT, R.; WARING, S.; MEHLING, C.C.; VIDGEN, E.; AUGUSTIN, L.S.A.; WONG, E.

Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 17, n. 6, p. 609-616, 1998.

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 amylomaize v and VII parents. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 5633-5639, 2010.

JOHN, J.K.; RAJA, K.C.M.; RANI, S.; MOORTHY, S.N.; ELIASSON, A. Properties of arrowroot starch treated with aqueous HCl at ambient temperature. **Journal of Food Science**. V. 67, n.1, p.10-14, 2002.

JYOTHI, A.N.; SAJEEV, M.S.; SREEKUMAR, J. N. Hydrothermal Modifications of Tropical Tuber Starches. 1. Effect of Heat-Moisture Treatment on the Physicochemical, Rheological and Gelatinization Characteristics. **Starck/Starke**. V. 62, p.28-40, 2010

KASEMSUWAN, T. ; JANE, J. Location of amylase in normal starch granules. II. Location of phosphodiester cross-linking revealed by phosphorous-31 nuclear magnetic resonance. **Cereal chemistry**, v. 71, n.3, p. 282-287, 1994.

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.

KHONDKAR, D.; TESTER, R. F.; KARKALAS, J. Effect of cross-linking on the resistance to enzymatic hydrolysis of waxy maize starch and low-methoxy pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 387-393, 2009.

KOHYAMA, K.; MATSUKI, J.; YASUI, T., SASAKI, T. A differential thermal analysis of the gelatinization and retrogradation of wheat starches with different amylopectin chain lengths. **Carbohydrate polymers**. v. 58, p. 71-77, 2004.

LEHMANN, U.; ROBIN, F. Slowly digestible starch – its structure and health implications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 7, p. 346-355, 2007.

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. **Satarch/Starke**, v. 59, n. 1, p. 21-32, 2007.

LI, H.; ZHU, Y.; JIAO, A.; ZHAO, J.; CHEN, X.; WEI, B.; HU, X.; WU, C.; JIN, Z.; TIAN, Y. Impact of α -amylase combined with hydrochloric acid hydrolysis on structure and digestion of waxy rice starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 276– 281, 2013.

LINDEBOOM, N.; CHANG, P.R.; TYLER, R.T. Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: a review, **Department of Applied Microbiology and Food Science**, v. 87-101, 2004.

LOBO, A.R.; SILVA, G.M.L. Resistant starch and its physicochemical properties. **Revista de Nutrição**. v. 16, p. 1-10, 2003.

MCPHERSON, A. E.; JANE, J. Comparison of waxy potato with other root and tuber starches. **Carbohydrate Polymers**, v.40, n.1, p.57-70, 1999.

MIÃO, M.; XIONG, S.; YE, F.; JIANG, B.; CUI, S.W.; SHANG, T. Development of maize starch with a slow digestion property using maltogenic α -amylase. **Carbohydrate Polymers**. V. 103, p. 164-169, 2014.

MONTEIRO, D.A.; PERESSIN, V. A. **Cultura da araruta**, In: CEREDA, M.P. Agricultura: tuberosas amiláceas latino-americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 440-447.

MOATES, G.K.; NOEL, T.R.; PARKER, R.; RING, S.G. The effect of chain length and solvent interactions on the dissolution of the B-type crystalline polymorph of amylase in water. **Carbohydrate Research**, v.298, p.327-333, 1997.

MOORTHY S. N. Physicochemical and function properties of tropical tuber starches: a review. **Starch/Starke**, n. 54, p. 559-592, 2002.

MORAES, J.; ALVES, F.S.; FRANCO, C.M.L. Effect of milling on structural and physicochemical characteristics of cassava and Peruvian carrot starches. **Sarch/Starke**. v.65, p.200-209, 2013.

MORITA, T.; HAYASHI, J.; MOTOI, H.; YAGISHITA, T.; TAKEYA, K.; SUGIYAMA, K. In vitro and in vivo digestibility of recrystallized amylose and its application for low glycemic foods. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 179–185, 2005.

MUN, S. H.; SHIN, M. Mild hydrolysis of resistant starde from maize. **Food Chemistry**.v.96, p.115-121, 2006.

MUNHOZ, M.P.; WEBER, F.H.; CHANG, Y.K. Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 3, p. 403-406, 2004.

NARA, S.; KOMIYA, T. Studies on the relationship between wather-satured state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch/Starke**, v.35, n.12, p.407-410, 1983.

NODA, T.; FURUTA, S.; SUDA, I. Sweet potato β -amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-cotinuuous production of maltose. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 3, p. 189-195, 2001

NUGENT, A.P. Health properties of resistant starch. **British Nutrition Foundation**. v. 30, p. 27–54, 2005.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1^aed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, p. 760, 2005.

PARK, J.T.; ROLLINGS, J.E. Effects of substrate branching characteristics on kinetics of enzymatic depolymerization of mixed linear and branched polysaccharides: I. amylase/amylopectin α -amylolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p.792-800, 1994.

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

PEREIRA, K.D. Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 88-92, 2007.

PÉREZ, E.; LARES, M. Mineral profile, and functional properties of canna (*Canna edulis*) and arrowroot (*Maranta spp*) starches. **Plant Foods for Human Nutrition**, n. 60, p. 113-116, 2005.

PERERA, A.; MEDA, V.; TYLER, R.T. Resistant starch, Analytical protocols for determining resistant starch and of factors affecting the resistant starch content of foods: a review, **Food Research International**, v. 43, p. 1959-1974, 2010.

PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO, C. M. L. Some Structural and physicochemical characteristics of tuber and root starches. **Food Science and Technology international**, v.12, p. 505 – 513, 2006.

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.

PONGJANTA, J., UTAIPATTANICEEP, A., NAIVIKUL, O., PIYACHOMKWAN, K. Effects of preheated treatments on physicochemical properties of resistant starch type III from pullulanase hydrolysis of high amylose Rice starch. **American Journal of Food Technology**, v. 4, p. 76-89, 2009.

RATNAYAKE, W. S.; JACKSON, D. S. Thermal behavior of resistant starches RS 2, RS 3, and RS 4. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. 356–366, 2008.

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.

RING, S.G.; GEE, J.M.; WHITTAM, M.; ORFORD, P.; JOHNSON, I.T. Resistant starch: its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility in vitro. **Food Chemistry**, v. 28, p. 97-109, 1988

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.

ROBERTSON, G. H.; WONG, D. W. S.; LEE, C. C.; WAGSCHAL, K.; SMITH, M. R.; ORTS, W. J. Native or Raw Starch Digestion: A Key Step in Energy Efficient Biorefining of Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 353-365, 2006.

ROCHA, T. S. **Estudo das características estruturais de amidos: efeito do “annealing”, da hidrólise ácida e da hidrólise enzimática**. São José do Rio Preto, 2010. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), IBILCE – UNESP.

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.

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.

SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; SAYARI, A.; TRIKI, M.A.; KRIAA, M.; KAMMOUN, R. Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 18–25, 2012.

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

SANTOS, I. J.; SANTOS, Y. L.; OLIVEIRA, M. G. A.; SILVA, P. H. A.; Expressão da alfa e beta amilase durante a germinação de cevada. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**.v.12, p.67-73, 2010.

SANG, Y, PRAKASH, O.; SEIB, P.A. Characterization of phosphorylated cross-linked resistant starch by ^{31}P nuclear magnetic resonance (^{31}P NMR) spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 201-212, 2006.

SANZ, T.; SALVADOR, A.; BAIXAULI, R.; FISZMAN, S. M. Evaluation of four types of resistant starch in muffins. II. Effects in texture, colour and consumer response. **European Food Research & Technology**, v. 229, p. 197–204, 2009.

SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 711–715, 2000.

SHARMA, A.; YADAV, B.S.; RITIKA. Resistant Starch: Physiological roles and food applications. **Food Reviews International**, v. 24, p. 193-234, 2008.

SHI, M.; GAO, Q. Y. Physicochemical properties, structure and in vitro digestion of resistant starch from waxy rice starch. **Carbohydrate Polymers**. v. 84, p.1151-1157, 2011.

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

SHI, Y.; SEIB, P. A.; The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. *Carbohydrate Research*. v. 227, p. 131-145, 1992.

SIEVERT, D.; CZUCHAJOWSKA, Z.; POMERANZ, Y. Enzyme-resistant starch. III. X-ray diffraction of autoclaved amylomaize VII starch and enzyme-resistant starch residues. **Cereal Chemistry**, v.68, n.1, p.86-91, 1991.

SILVERIO, J.; FREDRIKSSON, H.; ANDERSSON, R.; ELIASSON, A. C.; AMAN, P. The affect of temperature cycling on the amylopectin retrogradation of starches with different amylopectin unit-chain length distribution. *Carbohydrate Polymers*, v. 42, p. 175-184, 2000.

SIMSEK, S.; EL, S.N. Production of resistant starch from taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) corm and determination of its effects on health by in vitro methods. **Carbohydrate Polymers**.v.90, p.1204-1209, 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.

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.

SIVARAMAKRISHNAN, S. S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, M.; SOCCOL C.R.; PANDEY, A. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. **Journal of Scientific & Industrial Research**.v.66, p.621-626, 2007.

SMITH, A. R.; CARUSO, T. E. Determination of phosphorous content. In: R.L. WHISTLER, R. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, Starch. Ed., Academic Press, v. 4, p. 43-47, 1964.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica**; 2ª edição, Ed: Porto Alegre artmed, p. 493-496, 2007.

SONG, Y., JANE, J. Characterization of barley starches of waxy, normal, and high amylose varieties. **Carbohydrate Research**, v. 41, p. 365-377, 2000.

SONG, J. Y.; PARK, J.H.; SHIN, M. The effects of annealing and acid hydrolysis on resistant starch level and the properties of cross-linked RS4 rice starch. **Starch/Starke**, v. 63, p.147-153, 2011.

SOUZA, E. L.; HOFFMANN, E. H. E.; CASTILHO, V. M.; LIMA, V. A.; BELLINI, M. Z.; CRUZ, V. D. ; CRUZ, R. **Produção e Caracterização de α -Amilase Produzida por *Rhizopus* sp.** In: Arq. Biol. Tecnol. v.39, p. 831-839, 1996

SRICHUWONG, S.; SUNARTI, T. C.; MISHIMA, T.; ISONO. N.; HISAMATSU, M. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 529-538, 2005.

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

SYAHARIZA, Z. A.; SAR, S.; HASJIN, J.; TIZZOTTI, M. J.; GILBERT, R. G. The importance of amylose and amylopectin fine structures for starch digestibility in cooked rice grains. **Food Chemistry**, v.136, p.742-749, 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.; DEBON, S. J.; DAVIES, H. V. Effect of temperature on the synthesis composition and physical properties of potato starch, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 14, p. 2045-2051, 1999.

TESTER, R. F.; QI, X.; KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases, Review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 130, p. 39–54, 2006.

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

THOMPSON, D. B.; Strategies for the manufacture of resistant starch. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v.11, p.245-253, 2000.

VASATHANA, T.; BATTHY, S. Enhancement of resistant starch (RS3) in amylomaize, barley, field pea and lentil starches. **Starch/Stark**, v. 50, n. 7, p. 286-291, 1998.

VASANTHAN, T.; BERGTHALLER, W.; DRIEDGER, D.; YEUNG, J.; SPORNS, P. Starch from Alberta potatoes: wet-isolation and some physicochemical properties. **Food Research International**, v.32, p.355-365, 1999.

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, Y. J.; WHITE, P.; POLLAK, L.; JANE, J. Amylopectin and intermediate materials in starches from mutant genotypes of inbred line. **Cereal Chemistry**, v. 70, p. 521-525, 1993.

WANG, J.; JIN, Z.; YUAN, X. Preparation of resistant starch from starch-guar gum extrudates and their properties. **Food Chemistry**, London, v. 101, p. 20-25, 2007.

WOLF, B.W.; BAUER, L.L.; FAHEY Jr, G.C. Effects of chemical modification on in vitro rate and extent of food starch digestion: an attempt to discover a slowly digested starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4178-4183, 1999.

WONG, K. S.; JANE, J. Effects of pushing agents on the separation and detection of debranched amylopectin by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.18, p. 63-80, 1995.

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.

YOO, S.H.; PERERA, C.; SHEN, J.; YE, L.; SUH, D. S.; JANE, J. L. Molecular structure of selected tuber and root starches and effect of amylopectin structure on their physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1556 - 1564, 2009.

YUE, P.; WARING, S. Resistant starch in food applications. **Cereal Food World**, v.43, n.9, p.690-695, 1998.

YUSUPH, M.; TESTERA, R.; ANSELLA, R.; SNAPEB, C. Composition and properties of starches extracted from tubers of different potato varieties grown under the same environmental conditions. **Food Chemistry**. v.82, p.283-289, 2003

ZHANG, G.; HAMAKER, B. Slowly digestible starch: concept mechanism, and proposed extended glycemic index. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**.v.49, p.852-867, 2009.

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, H.; TIAN, B. Y.; BAI, Y.; XU, X.; JIN, Z. Structure and properties of maize starch processed with a combination of α -amylase and pullulanase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.52, p.38-44, 2013.

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

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.

ZEEMAN, S.C.; KOSMANN, J.; SMITH, A.M. Starch: Its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. **Annual Review of Plant Biology**. V. 61, P. 209-234, 2010.

ZIEBA, T.; KAPELKO, M.; SZUMNY, A. Effect of preparation method on the properties of potato starch acetates with an equal degree of substitution. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 193-198, 2013.