



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

Flávia Villas-Boas

EFEITO DE TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS E FÍSICO SOBRE A
FORMAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE AMIDOS
RETROGRADADOS

São José do Rio Preto
2019

Flávia Villas-Boas

**EFEITO DE TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS E FÍSICO SOBRE A
FORMAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE AMIDOS RETROGRADADOS**

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/19521-1
CAPES

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

São José do Rio Preto
2019

B662e Boas, Flavia Villas
Efeito de tratamentos enzimáticos e físicos sobre a formação e características de amidos retrogradados / Flavia Villas Boas.
-- São José do Rio Preto, 2019
158 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Célia Maria Landi Franco

1. Tecnologia de alimentos. 2. Amidos. 3. Enzimas. 4. Ultrassom. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Flávia Villas-Boas

**EFEITO DE TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS E FÍSICO SOBRE A
FORMAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE AMIDOS RETROGRADADOS**

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/19521-1
CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi Franco
UNESP – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP
Orientador

Prof^a. Dr^a. Thaís de Souza Rocha
UEL - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate
UEPG - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP

Prof. Dr^a Ana Carolina Conti e Silva
UNESP – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto
06 de Setembro de 2019

Dedico este trabalho aos meus pais José Geraldo e Edna que são a minha base e ao meu marido Maicon pela paciência, companheirismo e apoio em todos os sentidos. Esses ajudaram a tornar isso possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por me dar forças durante toda essa caminhada.

Aos meus pais José Geraldo e Edna que nunca mediram esforços em apoiar e incentivar meu crescimento pessoal e profissional

Ao meu marido Maicon por todo suporte, paciência, incentivo, por sempre acreditar em mim e me apoiar nessa trajetória.

Ao meu irmão e cunhada, Fernando e Flavia, aos primos irmãos, Bruna e Fellipe, aos tios Sandra, Uder, Renato, Valdireni, aos priminhos, Joao e Pedro, às minhas avós Aparecia e Luzia, pelos socorros prestados, pelos almoços e/ou jantas naqueles dias em que eu não tinha tempo para isso, todas essas pessoas de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui. Agradeço também as minhas sobrinhas, Valentina, Ma Ju e Alicia, por terem me dado forças com sorriso e amor puros e verdadeiros. Aos meu sobrinho-anjo, Miguel, a que recorri sempre em minhas orações. À Professora Dr^a. Célia Maria Land Franco, pela confiança, oportunidade, por todo ensinamento e dedicação ao longo desses anos.

À Professora Dr^a Ana Lucia Barreto Pena pela disponibilidade do laboratório para realização das análises.

À Professora Dr^a Ana Carolina Conti e Silva pelo auxílio com toda a estatística desse trabalho e também pelos conselhos.

Ao professor Dr Javier Telis Romero, por disponibilizar o ultrassom para realização desse trabalho

Ao professor Dr. Diogo Paschoalini Volanti pela ajuda nas análises de tamanho do cristalito

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

Aos funcionários Alana, Tânia, Luiz, Anieli e Suely pelo auxílio nas atividades diárias do laboratório.

Às amigas Jéssica, Tatiane, Vivian, Marilia, Elisa e especialmente à Márcia e Taís por todos os conselhos e auxílio na realização desse trabalho. Essas amigas conquistei ao longo dessa caminhada e levarei para sempre comigo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001*, à qual agradeço. À FAPESP pelo apoio financeiro à pesquisa (Processo Fapesp: 2017/19521-1)

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein - Pensador

RESUMO

Amido desramificado e retrogradado é resistente à ação das enzimas digestivas, sendo denominado amido resistente tipo 3 (AR3), enquanto amido lentamente digerido (ALD) é a fração digerida lentamente no intestino delgado resultando na liberação prolongada de glicose na corrente sanguínea. Ambos apresentam inúmeros benefícios à saúde, os quais têm sido amplamente relatados. O uso de diferentes técnicas que potencializem a formação do amido retrogradado conduz a diferentes características estruturais e físico-químicas do amido, bem como à sua digestibilidade. O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar o efeito de diferentes tratamentos (enzimáticos e físico) precedendo a desramificação de amidos na formação de AR3 e ALD, bem como em suas características moleculares, cristalinas e físico-químicas. Para isso, amidos de batata-doce (SPS), mandioca (CAS) e milho com alto teor de amilose (HAS) foram submetidos à ação da α -amilase fúngica, α -amilase maltogênica, ou ultrassom em diferentes condições de tratamento. A cinética das hidrólises enzimáticas dos amidos foi estudada. Após tratamentos, os amidos foram desramificados com pululanase, autoclavados (121°C/30 min) e resfriados (4°C /24h) para potencializar a retrogradação. Os amidos modificados foram analisados quanto a digestibilidade in vitro e caracterizados estrutural e físico-quimicamente a partir de cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance, difracção de raios-X, ressonância magnética do ^{13}C , e calorimetria exploratória diferencial. Os dados de cinética de hidrólise foram bem ajustados para os modelos LOS e NLLS. O CAS foi o mais suscetível às enzimas, enquanto HAS, o mais resistente. Os tratamentos enzimáticos levaram à formação de até 65, 60,4 e 68% de AR3, enquanto o tratamento com ultrassom a teores de até 64,1, 62 e 69,5%, para SPS, CAS, e HAS, respectivamente. Ambos os tratamentos também levaram à formação de quantidades significativas de ALD. A redução do GP e proporção das cadeias longas da amilose

aliada ao aumento na proporção de cadeias intermediárias (GP 13-30) potencializou a formação de AR3 cujo teor foi altamente correlacionado com a proporção de cadeias com GP 13-30, independentemente do amido ou tratamento. Para o HAS a força motriz na formação de AR3 foi a redução do GP das cadeias mais longas de amilose, enquanto para os amidos de raízes, a contribuição das cadeias intermediárias foi mais significativo. Altos coeficientes de correlação também foram encontrados entre AR3, cristalinidade relativa e mudança de entalpia (ΔH). Os amidos que tiveram maiores níveis de AR3 também tiveram maiores proporções de duplas hélices. Os resultados obtidos com este trabalho poderão nortear caminhos para o desenvolvimento de tecnologias viáveis para obtenção de amidos resistentes e sua aplicação em diferentes produtos alimentícios.

Palavras-chave: Amido, amilólise, digestibilidade, estruturas molecular e cristalina, ultrassom

ABSTRACT

Debranched and retrograded starch is resistant to the action of digestive enzymes, being called resistant starch type 3 (RS3), while slowly digested starch (SDS) is the slowly digested fraction in the small intestine resulting in prolonged glucose release into the bloodstream. Both starches present numerous health benefits, which have been widely reported. The use of different techniques that enhance the formation of retrograded starch leads to different structural and physicochemical characteristics of starch, as well as its digestibility. The objective of the present work was to evaluate and compare the effect of different treatments (enzymatic and physical) preceding starch debranching on the formation of RS3 and SDS, as well as their molecular, crystalline and physicochemical characteristics. For this purpose, sweet potato (SPS), cassava (CAS), and high amylose maize (HAS) starches were subjected to the action of fungal α -amylase, maltogenic α -amylase, or ultrasound, under different treatment conditions. The enzymatic hydrolysis kinetic of the starches was studied. After the treatments, these starches were debranched with pullulanase, autoclaved (122°C/30 min), and cooled (4°C/24 h) in order to enhance the retrogradation. Modified starches were analysed regarding to in vitro digestibility and structurally characterized by high performance size exclusion chromatography, X-ray diffraction, ^{13}C magnetic resonance, and differential scanning calorimetry. Hydrolysis kinetic data were well adjusted for the LOS and NLLS models. CAS was the most susceptible to enzymes, while HAS was the most resistant. Enzymatic treatments led to the formation of up to 65, 60.4 and 68% of RS3, while ultrasound treatment led to contents up to 64.1, 62 and 69.5% for SPS, CAS, and HAS, respectively. Both treatments also led to formation of significant amount of SDS. The DP reduction and amylose long chains proportion combined with the increase in intermediate chain amount (DP 13-30) potentiated RS3

formation, whose content was highly correlated with the proportion of DP 13-30 chains, regardless of starch or treatment. For HAS, the driving force in the formation of RS3 was the DP reduction of longer amylose chains, while for root starches the contribution of intermediate chains was more significant. High correlation coefficients were also found among RS3, crystallinity, and enthalpy change (ΔH). Starches that had higher levels of RS3 also had higher proportion of double helices. The results obtained with this work may guide ways for the development of viable technologies to obtain resistant starches and their application in different products.

Keyword: Starch, amylolysis, digestibility, molecular and crystalline structures, ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Estrutura da amilopectina identificando as cadeias A, B e C. Fonte: Hizukuri (1986). Linha contínua: Unidades glicosídicas ligadas em α -1,4; Setas: Ligações α -1,6; Ø: extremidade redutora.....	24
Figura 2 - Configuração da estrutura cristalina tipo A e tipo B.....	26
Figura 3 - Estrutura dos amidos resistentes tipo 1 (A) e tipo 2 (B).....	35
Figura 4 - Representação esquemática dos padrões de ação de α -amilases em fragmentos de amido a) padrão de ataque em cadeia simples; b) padrão de múltiplo ataque; c) padrão de ataque em multi cadeias.....	45
Figura 5 - Representação esquemática da ação da α -amilase fúngica nas cadeias de amilopectina. MOS – malto-oligossacarídeos de GPs variados.....	47
Figura 6 - Representação esquemática da ação da α -amilase maltogênica nas cadeias de amilopectina.....	48
Figura 7 - Representação esquemática da ação de enzimas desramificantes sobre as cadeias de amido.....	49

CAPÍTULO II

Artigo I

Figure 1 - Kinetics of hydrolysis of SPS, CAS and HAS by fungal α -amylase (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f) using the logarithm of slope fit (LOS) (a1 – f1) and the non-linear least-squares fit (NLLS) (a - f), with both as a linear and logarithmic representation.....	72
Figure 2 - Percentage of glucose (G 1), maltose (G 2), maltotriose (G 3), maltotetraose (G 4), maltopentose (G 5), maltohexaose (G 6), maltoheptose (G 7), produced by hydrolysis of SPS, CAS and HAS by fungal α -amylase (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f).....	76
Figure 3 - Elution profiles of the hydrolysis residues of SPS, CAS and HAS by fungal α -amylase (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f) after 0, 180 and 720 min obtained by Bio-Gel P6 permeation chromatography: CHO : total carbohydrate; (G) = Glucose.....	78

Artigo II

Figure 1 - Hydrolysis percentage of starches subjected to (a) fungal α -amylase and (b) maltogenic α -amylase as a function of time.....	100
Figure 2 - Molecular size distribution, obtained by HPSEC-RI, of SPS (a, d), CAS (b, e) and HAS (c, f) after fungal α -amylase hydrolysis (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f) at different times and debranching.....	105
Figure 3 - X-ray diffractograms of native SPS, CAS and HAS, and treated with fungal α -amylase (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f) for 0 h, 3 h, 6 h, 9 h and 12 h, de-branched and retrograded.....	109
Figure 4 - ^{13}C CPMAS spectra obtained at 10 kHz from SPS (A), CAS (B) e HAS (C) treated with fungal α -amylase (FP) and maltogenic α -amylase (MP). Amorphous (G), de-branched and retrograded (P).....	115

CAPÍTULO III

Figura 1 - Distribuição do tamanho molecular, obtidos por HPSEC-RI, dos SPS, CAS e HAS.....	135
Figura 2 - Difratogramas de raios-X e cristalinidade relativa (%) dos SPS (A), CAS (B) e HAS (C) desramificados e retrogradados.....	141

Figura 3 - Espectros ^{13}C CPMAS obtidos a 10 kHz das amostras de amido SPS (A), CAS (B) e HAS (C); amorfos (a), desramificados e retrogradados (b) sonificados, desramificados e retrogradados (c)..... 149

Lista de tabelas

CAPÍTULO II

Artigo I

Table 1 - Branch-chain length distribution of amylopectin and amylose content of CAS, SPS, and HAS.....	70
---	----

Table 2 - Values of starch degradation rate coefficient ($k \cdot \text{min}^{-1}$) and percentage of residual starch ($C_{\text{res}} \%$) calculated by NLLS method for SPS, CAS, and HAS.....	73
--	----

Artigo II

Table 1 - Rapidly digestible starch (RDS), slowly digestible starch (SDS) and resistant starch (RS) contents in SPS, CAS and HAS submitted to amylolysis for different times.....	102
---	-----

Table 2 - Relative area (%) and DP_{peak} of the different fractions of starches obtained from chromatograms HPSEC-RI of the enzyme-treated starches.....	107
--	-----

Table 3 - Crystallite size of retrograded SPS, CAS and HAS.....	111
---	-----

Table 4 - Thermal properties of native and retrograded SPS, CAS and HA.....	113
---	-----

Table 5 - Relative crystallinity (RC) calculated from X-ray standards (XRD) and CPMAS spectra; and relative double helix content calculated using the CPMAS spectra.....	116
--	-----

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Delineamento experimental utilizado na modificação dos amidos por ultrassom.....	130
---	-----

Tabela 2 - Área e GP_{pico} das frações de amidos desramificados e daqueles sonicados e desramificados obtidos por HPSEC-RI.....	137
---	-----

Tabela 3 - Coeficientes de regressão linear estimados para as variáveis de HPSEC e teor de AR3.....	139
---	-----

Tabela 4 - Tamanho dos cristalitos dos SPS, CAS e HAS retrogradados.....	143
--	-----

Tabela 5 - Propriedades térmicas dos SPS, CAS e HAS retrogradados.....	145
--	-----

Tabela 6 - Digestibilidade dos SPS, CAS e HAS submetidos à sonicação.....	147
---	-----

Tabela 7 - Cristalinidade relativa dos amidos calculada a partir dos padrões de raios-X e espectros CPMAS, conteúdo relativo de duplas hélices calculado a partir dos espectros CPMAS e teor de AR3 dos SPS, CAS e HAS.....	150
---	-----

SUMÁRIO

Introdução geral.....	16
Objetivo geral.....	20
Objetivo específicos.....	20
CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica.....	22
1. AMIDO	23
1.1. Composição e estrutura.....	23
1.2. Propriedades do amido.....	27
1.3. Digestibilidade do amido.....	29
1.3.1. Amido lentamente digerível.....	31
1.3.2. Amido resistente (AR).....	33
1.3.3. Amido resistente tipo 3 (AR3).....	37
1.3.4. Formação de AR3.....	39
2. AMILASE	42
2.1. α -amilases.....	44
2.1.1. α -amilase fúngica.....	46
2.1.2. α -amilase maltogênica.....	47
2.2. Enzimas desramificantes.....	48
3. ULTRASSOM	49
4. REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO II: Pré-tratamentos enzimáticos: Efeito das α -amilases fúngica e maltogênica precedendo a desramificação na cinética enzimática e na formação, estrutura molecular, cristalina, térmica e digestibilidade de amidos retrogradados.....	61
ARTIGO I: Influence of molecular structure on the susceptibility of starch to α -amylase.....	62
Abstract.....	62
1. INTRODUCTION	63
2. MATERIAL AND METHODS	66
2.1. Material.....	66
2.2. Amylose content and distribution of branch-chain length of amylopectin.....	66
2.3. Starch hydrolyses.....	67
2.4. Determination of malto-oligosaccharides (DP 1-7) released by action of amylases.....	68
2.5. Distribution of molecular components of hydrolysis residues.....	68
2.6. Statistical analysis.....	69
3. RESULTS AND DISCUSSION	69
3.1. Amylose content of the starches and distribution of amylopectin branch-chain length.....	69
3.2. Starch hydrolysis.....	71
3.3. Identification of malto-oligosaccharides released by amylases action.....	75
3.4. Molecular size distribution of the hydrolysis residue components.....	77
4. CONCLUSION	80
5. REFERENCES	81
ANEXO 1	88
ARTIGO II: Effect of amylolysis on the formation, the molecular, crystalline and thermal characteristics and digestibility of retrograded starches	88
ABSTRACT.....	90
1. INTRODUCTION	91
2. MATERIAL AND METHODS	94
2.1. Material.....	94

2.2. Obtaining retrograded starches.....	95
2.3. Digestibility of starches.....	95
2.4. Molecular weight distribution by high-performance size exclusion chromatography coupled with refractive index (HPSEC-RI).....	96
2.5. X-ray diffraction and relative crystallinity.....	97
2.6. Thermal properties.....	97
2.7. Solid-state ¹³ C nuclear magnetic resonance.....	98
2.8. Statistical analysis.....	99
3. RESULTS AND DISCUSSION	99
3.1. Hydrolysis of starches with α-amylases	99
3.2. Digestibility of starches.....	100
3.3. Molecular weight distribution by HPSEC-RI.....	103
3.4. X-ray diffraction and relative crystallinity.....	108
3.5. Thermal properties.....	112
3.6. Solid-state ¹³ C nuclear magnetic resonance.....	114
4. CONCLUSION.....	117
5. REFERENCES.....	118
CAPÍTULO III: Pré-tratamento com ultrassom: Efeito do ultrassom sobre a formação de amidos resistente e suas características estruturais.....	122
RESUMO.....	123
ABSTRACT.....	123
1. INTRODUÇÃO.....	125
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	129
2.1. Material.....	129
2.2. Modificação do amido por ultrassom.....	129
2.3. Distribuição do peso molecular por cromatografia de exclusão por tamanho com detector de índice de refração (HPSEC-RI).....	130
2.4. Difração de raios-X, cristalinidade relativa e tamanho do cristalito.....	131
2.5. Propriedades térmicas.....	132
2.6. Digestibilidade dos amidos.....	132
2.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do ¹³ C em estado sólido.....	133
2.8. Análise estatística.....	133
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	134
3.1. Distribuição do peso molecular dos amidos por HPSEC-RI.....	134
3.2. Difração de raios-X, cristalinidade relativa e tamanho do cristalito.....	140
3.3. Propriedades térmicas.....	144
3.4. Digestibilidade dos amidos.....	146
3.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do ¹³ C em estado sólido.....	149
4. CONCLUSÃO.....	151
5. REFERÊNCIAS.....	152
CONCLUSÃO GERAL.....	157

INTRODUÇÃO GERAL

A preocupação crescente dos consumidores com a qualidade nutricional e funcional dos alimentos tem impulsionado a pesquisa e desenvolvimento de produtos que auxiliem na manutenção da saúde dos indivíduos. O amido resistente, aquele que não é digerido pelas enzimas digestivas no trato intestinal, apresenta efeitos fisiológicos similares aos da fibra dietética, atuando positivamente no aumento do bolo fecal e redução do pH do cólon, na redução do colesterol sérico e de triglicerídeo, enquanto o amido lentamente digerível, fração do amido que possibilita uma lenta e prolongada liberação de glicose na corrente sanguínea é útil no controle e prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes tipo II bem como obesidade. Dentre os diferentes tipos de amido resistente, o tipo 3 (AR3) que é o amido retrogradado, se destaca entre os demais por ser formado por processos naturais que envolvem calor e umidade, além de ser altamente estável em etapas do processamento de alimentos podendo então ser utilizado na produção de alimentos sem perder a sua resistência. A estabilidade térmica dos cristais retrogradados no amido permite que o mesmo seja estável na maioria das operações de cozimento normais, ou seja, permite seu uso como ingrediente em uma ampla variedade de alimentos convencionais, mantendo sua resistência à digestão (PONGJANTA et al., 2009; FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011). Além disso, quando comparado às fibras alimentares, o amido retrogradado possui vantagens tais como coloração branca, sabor neutro e menor tamanho de partícula, interferindo menos nas características do alimento.

A principal matéria prima para obtenção de AR3 é a amilose devido a sua grande tendência a se reassociar. No entanto, amidos desramificados também têm se mostrado muito eficientes na formação de amidos retrogradados, pois os fragmentos lineares liberados com a desramificação apresentam maior mobilidade e tendência à recristalização. No entanto, um tamanho ideal de comprimento de cadeia é necessário para a formação de duplas hélices e redução da digestibilidade do amido. Berry (1986)

relatou que a desramificação do amido de batata seguida de ciclos de aquecimento e resfriamento reduziu substancialmente sua digestibilidade mostrando ser possível potencializar a retrogradação do amido desramificando a amilopectina e liberando fragmentos lineares com maior mobilidade e tendência à reassociação.

O uso da amilólise ou mesmo da hidrólise ácida branda precedendo o uso de enzimas desramificantes em conjunto com um método que potencialize a retrogradação tem se mostrado eficiente na formação de AR3 (LUCKETT; WANG, 2012; ZHANG et al., 2013; ZHOU et al., 2014; ZENG et al., 2015; VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016). A hidrólise do amido usando ácido, alfa ou beta-amilase antes da desramificação envolve principalmente a quebra das moléculas de amido em fragmentos de baixa massa molecular aumentando o número de moléculas lineares menores que a amilose do amido original, o que resulta no aumento da tendência à retrogradação do amido gelatinizado. Nesse sentido, o ultrassom também pode ser usado como um tratamento físico do amido que, dependendo das condições do experimento, provoca a depolimerização das suas moléculas formando dextrinas de menor massa molecular (SUJKA; JAMROZ, 2013; ZHU, 2015).

A velocidade de retrogradação depende do comprimento das cadeias do amido (EERLINGEN et al., 1993), então o grau de polimerização (GP) das moléculas afeta a formação do amido resistente retrogradado. Portanto, a hidrólise enzimática e o tratamento com ultrassom podem servir como pré-tratamentos que visam diminuir a digestibilidade do amido a partir da obtenção de um maior número de cadeias lineares que facilite o pareamento levando a um maior teor de amido retrogradado após resfriamento.

Tanto a β -amilase quanto a α -amilase hidrolisam as ligações α -1,4 das cadeias de amido, mas seus mecanismos de ação são diferentes. β -amilase é uma exoenzima que quebra as cadeias de amido das extremidades não redutoras produzindo maltose (LUCKETT; WANG, 2012), enquanto o mecanismo de ação da α -amilase é

dependente da fonte de enzima e substratos (ROBYT, 2009). A α -amilase de *Aspergillus oryzae* quebra as ligações α -1,4 presentes no interior das cadeias de amido e tem uma pequena, mas mensurável ação de múltiplo ataque na degradação de malto-oligossacarídeos (ALLEN; THOMAS, 1978). A α -amilase maltogênica é conhecida por hidrolisar as ligações α -1,4 das cadeias de amido aleatoriamente em um mecanismo de exo-ação liberando sucessivas maltoses a partir das extremidades não redutoras, no entanto essa enzima também é capaz de hidrolisar a parte interna das cadeias de amido em um mecanismo de endo-ação (GOESAERT et al., 2009; MIÃO et al., 2014). O ultrassom de baixa frequência, uma tecnologia simples e limpa, em condições adequadas, também rompe as cadeias de amido por um mecanismo de cavitação, que cria alta pressão, elevação da temperatura e alta força de atrito no sistema (SUJKA; JAMROZ, 2013). Pré-tratamentos com ultrassom para a obtenção de AR3 ou ALD são ainda escassos e devem ser melhor elucidados.

Um comprimento de cadeia linear adequado é requerido para a recristalização (formação de duplas hélices) e redução da digestibilidade do amido. Contudo, dados do comprimento de cadeia ideal ainda são contraditórios. Lockett e Wang (2012) observaram que a amilose (GP > 100) e as cadeias longas da amilopectina (GP 21-26) contribuíram na formação do AR3 de amidos de milho com diferentes teores de amilose quando β -amilase foi usada antes da desramificação, Villas-Boas e Franco (2016) reportaram que a α -amilase fúngica foi mais eficiente que a β -amilase bacteriana na formação de AR3 de amidos de araruta e batata. No entanto, houve aumento significativo no teor de ALD do amido de batata quando ambas as enzimas foram utilizadas. A redução da digestibilidade do amido foi potencializada quando houve redução na proporção e GP das cadeias longas da amilopectina e aumento na proporção de cadeias curtas especialmente com GP~15. Trabalhos utilizando o ultrassom com essa finalidade são ainda muito escassos. Zeng et al. (2015) estudaram o efeito do ultrassom de baixa frequência (40 kHz) em amido nativo de

semente de flor de lótus na formação de AR3. E observaram teores acima de 56%. No entanto, nenhum dado sobre o tamanho das cadeias obtidas após tratamento foi verificado.

O uso de diferentes técnicas que potencializem a formação do amido retrogradado conduz a diferentes características estruturais e físico-químicas do amido, bem como a sua digestibilidade. O estudo e comparação desses pré-tratamentos na formação de AR3 e /ou ALD contribuirá com importantes subsídios para um melhor entendimento sobre como o tamanho das cadeias influencia na interação das mesmas para a melhor reassociação e formação de duplas hélices mais estáveis e mais resistentes à ação das enzimas digestivas.

OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi investigar e comparar diferentes pré-tratamentos utilizando α -amilase fúngica, α -amilase maltogênica, e ultrassom precedendo a desramificação de amidos na formação de amido lentamente digerível e amido resistente tipo 3, bem como suas características moleculares, cristalinas, físico-químicas e funcionais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a cinética de hidrólise dos amidos de batata-doce, mandioca e milho com alto teor de amilose utilizando o método do logaritmo da inclinação (gráfico de LOS) e método dos mínimos quadrados não lineares (NLLS);
- Avaliar a influência da estrutura molecular dos amidos de batata-doce, mandioca e milho com alto teor de amilose sobre o mecanismo de ação da α -amilase fúngica e α -amilase maltogênica;
- Avaliar a influência da amilólise na formação, digestibilidade e características moleculares, cristalinas e térmicas de amidos retrogradados;
- Avaliar o efeito do tempo e potência de sonicação na formação, digestibilidade, estrutura molecular, cristalina e térmica de amidos retrogradados.

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho foi organizado em três capítulos para melhor distribuição e compreensão dos assuntos abordados. O Capítulo I compreende a revisão bibliográfica. O Capítulo II refere-se ao estudo da cinética enzimática dos amidos submetidos à ação das alfa-amilases fúngica ou maltogênica, bem como ao uso da amilólise na formação e caracterização molecular, cristalina e térmica dos amidos retrogradados. O Capítulo III compreende o estudo do tempo e potência do ultrassom de alta intensidade na formação e características estruturais e físico-químicas dos amidos retrogradados.

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

1. AMIDO

1.1. Composição e estrutura

O amido, encontrado em abundância na natureza, é a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80 a 90% das calorias consumidas na dieta. Esse carboidrato de reserva se encontra distribuído em diversos vegetais tais como: grãos de cereais, leguminosas, raízes, tubérculos e frutas imaturas (FRANCO et al., 2001). Estruturalmente esse polissacarídeo é composto por dois polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina.

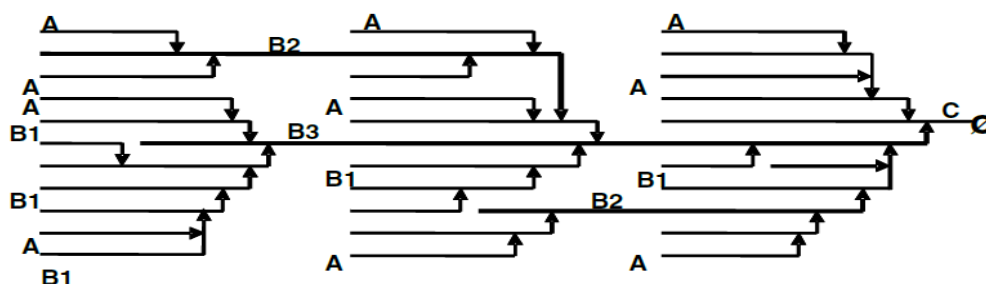
A amilose é uma molécula essencialmente linear, formada por unidades de glicose ligadas em α -1,4 com um pequeno número de ramificações ligadas em α -1,6. Essas ramificações são separadas por grandes distâncias, permitindo às moléculas agirem como se fossem essencialmente lineares (BEMILLER; WHISTLER, 2009). O grau de polimerização e a massa molecular da amilose são dependentes da origem botânica, e podem variar de 200 a 2000 unidades de glicose e de 1×10^5 a 1×10^6 g/mol, respectivamente (BULÉON et al., 1998). Essa molécula possui uma estrutura helicoidal, onde o interior das hélices contém átomos de hidrogênio, enquanto as hidroxilas permanecem no exterior (BULÉON et al., 1998). A presença de átomos de hidrogênio no interior da hélice torna a amilose hidrofóbica e permite a formação de complexos com ácidos graxos livres, álcoois 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). Os complexos de amilose com lipídeos podem alterar a temperatura de gelatinização e o perfil de viscosidade da pasta de amido, além de diminuir a susceptibilidade à hidrólise por α -amilase (DENARDIN; SILVA, 2009).

A amilopectina é uma macromolécula altamente ramificada com cadeias lineares curtas ligadas por ligações glicosídicas α -1,4, as quais são interligadas pelas ligações α -1,6, responsáveis pelos pontos de ramificação. A molécula de amilopectina

possui em torno de 5% de pontos de ramificação, mas esse valor varia com a origem botânica (MARC et al., 2002). A massa molecular da amilopectina varia de 1×10^7 a 5×10^8 g / mol (BULÉON et al., 1998; ZAVAREZE; DIAS, 2011).

As cadeias de amilose e amilopectina estão organizadas na direção radial no interior dos grânulos, com as extremidades não redutoras orientadas para a superfície, formando uma estrutura semicristalina com regiões cristalinas associadas à amilopectina (duplas hélices) e regiões amorfas associadas à amilose e aos pontos de ramificação da amilopectina (BULÉON et al., 1998; ZAVAREZE; DIAS, 2011). As cadeias da amilopectina são denominadas de A, B e C (Figura 1), baseado no modelo de cluster.

Figura 1- Estrutura da amilopectina identificando as cadeias A, B e C. Fonte: Hizukuri (1986). Linha contínua: Unidades glicosídicas ligadas em α -1,4; Setas: Ligações α -1,6; Ø: extremidade redutora.



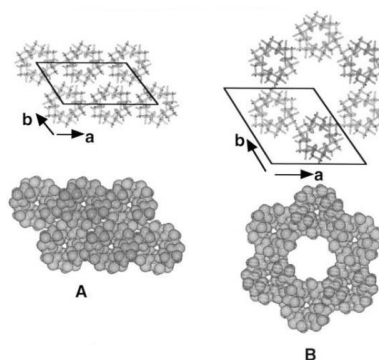
A cadeia principal C carrega o grupo redutor da molécula, e várias cadeias ramificadas A e B. As cadeias A são as cadeias mais externas que não carregam qualquer ramificação, enquanto as cadeias B são as que possuem uma ou mais cadeias A ou B ligadas a ela por meio de ligações α (1-6) (BULÉON et al., 1998; HOOVER, 2001). As cadeias B podem ser divididas em B1-B4 dependendo do seu grau de polimerização e número de clusters a que pertencem.

A funcionalidade do amido se deve à organização física dessas duas macromoléculas dentro da estrutura granular, bem como à razão entre elas, o que varia com a origem botânica. A estrutura semicristalina dos grânulos de amido é

composta por macromoléculas lineares e ramificadas dispostas na direção radial e ligadas entre si por ligações de hidrogênio, o que resulta no aparecimento de regiões cristalinas (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997). As regiões cristalinas são formadas pelas cadeias ramificadas da amilopectina e são alternadas com camadas amorfas. As áreas cristalinas mantêm a estrutura do grânulo, controlam seu comportamento na presença de água e os tornam mais ou menos resistentes a enzimas e ácidos (BILIADERIS, 1991). A zona amorfa é a menos densa, a mais susceptível ao ataque enzimático e absorve mais água a temperaturas inferiores à temperatura de gelatinização (ZAVAREZE; DIAS, 2011). Os diferentes graus de ordenação estrutural dos grânulos são responsáveis pela cristalinidade dos mesmos que é descrita principalmente como uma função das duplas hélices formadas pelas ramificações da amilopectina e varia entre 15 e 45% (HOOVER, 2001; ZAVAREZE; DIAS, 2011). Essa estrutura cristalina é classificada de acordo com seu padrão de difração de raios-X, os quais são denominados A, B e C dependendo do comprimento de cadeia da amilopectina (SINGH et al., 2003; JANE, 2006; BEMILLER; WHISTLER, 2009). O padrão de cristalinidade é definido com base em espaços interplanares e a intensidade relativa das linhas de difração dos raios-X (ZAVAREZE; DIAS, 2011). O padrão tipo A, comum em amidos de cereais, apresenta em sua estrutura uma célula unitária monocíclica com empacotamento fechado. O padrão tipo B, geralmente presente em amidos de tubérculos e raízes, amidos com alto teor de amilose, e amidos retrogradados, apresenta uma célula unitária hexagonal, com uma cavidade no seu eixo central quando projetada no plano (IMBERTY et al., 1991; GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997; BLENNOW et al., 2000; PARKER; RING, 2001; CROCHET et al., 2005). No padrão tipo A, as duplas hélices formadas pelas cadeias laterais da amilopectina são empacotadas em uma estrutura formada por célula monocíclica unitária contendo 8 moléculas de água para cada célula unitária, enquanto no padrão tipo B, as duplas hélices são empacotadas em uma estrutura formada por

uma célula unitária hexagonal com 36 moléculas de água por célula unitária, como apresentado na Figura 2 (BULÉON et al., 1998). A forma polimórfica tipo C é uma mistura das células unitárias dos tipos A e B, podendo ser classificada em C_A e C_B , baseado na proximidade de suas semelhanças aos tipos A e B, sendo característica da maioria dos amidos de leguminosas (BULÉON et al., 1998).

Figura 2 - Configuração da estrutura cristalina tipo A e tipo B. Fonte: Buléon et al. (1998).



Os amidos com polimorfismo tipo A apresentam maiores proporções de cadeias ramificadas curtas e aqueles com tipo B maiores proporções de cadeias ramificadas longas com extensão em dois ou mais *clusters*. O padrão tipo C é uma mistura das estruturas A e B, portanto o amido com esse padrão apresenta em sua estrutura cadeias curtas e longas (JANE, 2006). Devido à proporção de cadeias curtas e longas, o amido com padrão tipo A apresenta maior número de ramificações que aqueles com o padrão tipo B (HIZUKURI, 1985). No entanto, as ramificações são mais dispersas, e algumas estão localizadas na região cristalina. Com as ramificações dispersas, o amido com padrão tipo A apresenta distância mais curta entre os pontos de ramificação do que o amido com padrão tipo B. Este fato sugere que a estrutura tipo A possua cadeias mais curtas, formando uma estrutura cristalina inferior. Essa estrutura, contendo os pontos de ramificações e duplas hélices de cadeias curtas, é, portanto, mais susceptível à hidrólise enzimática devido aos “pontos fracos” dos grânulos de amido com padrão tipo A (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997;

JANE,2006). Nos amidos com padrão tipo B a maioria das ramificações estão aglomeradas na região amorfa. Essas estruturas, com ramificações aglomeradas e relativamente menos cadeias curtas, podem desenvolver uma estrutura cristalina mais estável, semelhante à estrutura derivada das moléculas de amilose retrogradada (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997; JANE, 2006).

1.2. Propriedades do amido

O amido puro tem coloração branca, é insípido e ao ser adicionado em água fria e mantido sob agitação forma uma suspensão de aspecto leitoso, separando-se após repouso, assim, o amido é praticamente insolúvel em água fria. O processo de extração do amido é baseado na sua insolubilidade em água fria (FRANCO et al., 2001), a qual se deve às fortes ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias de amido. Em certas concentrações, os grânulos de amido em suspensão tornam-se um fluido dilatante, onde o fluxo é inversamente proporcional à pressão exercida, quanto maior a pressão, menor a fluidez (ZAVAREZE; DIAS, 2011).

Uma propriedade importante do amido é a gelatinização, processo irreversível que ocorre quando o amido é aquecido em excesso de água. Acima de uma temperatura crítica (temperatura de gelatinização), os grânulos absorvem uma quantidade maior de água e incham rapidamente. O inchamento predomina até uma temperatura determinada causando o aumento da viscosidade e formação da pasta de amido. Após atingir um inchamento máximo, 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 ligações de hidrogênio são mais fracas e mais suscetíveis à dissolução, permitindo o inchamento e a hidratação dos grânulos de amido através da interação entre as moléculas de água com os grupos hidroxilas das cadeias de amido.

O processo de gelatinização pode ser caracterizado por uma endoterma obtida por calorimetria exploratória diferencial, pela perda de birrefringência observada através de microscopia de luz polarizada e pelo desaparecimento da cristalinidade evidenciado por difração de raios-X (GARCIA et al., 1997; ZAVAREZE; DIAS, 2011). Assim, a gelatinização resulta no 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 de gelatinização, e a temperatura onde a maioria dos grânulos se encontra em seu estado gelatinizado é chamada de temperatura final de gelatinização (FRANCO et al., 2001).

Com o resfriamento e armazenamento do gel de amido, ocorre o processo de retrogradação, fenômeno pelo qual as moléculas de amido, principalmente a amilose e as frações lineares da amilopectina solubilizadas, são reassociadas formando duplas hélices cristalinas estabilizadas por ligações de hidrogênio (SINGH et al., 2003; ZAVAREZE; DIAS, 2011). 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). Porém, a retrogradação da amilopectina não pode ser excluída da fração total de amido retrogradado (ZAVAREZE; DIAS, 2011). 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 de suas cadeias (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). O processo de retrogradação é acompanhado pela perda de água do gel e é chamado de sinérese. As alterações que ocorrem nos grânulos de amido durante a gelatinização e/ou retrogradação são determinantes no comportamento da pasta de amido e influenciam as propriedades físico-químicas e fisiológicas, principalmente, a digestibilidade do amido.

1.3. Digestibilidade do amido

O amido é a principal fonte de carboidrato da dieta humana, pois está presente em alimentos básicos tradicionais como cereais, raízes, tubérculos, além de ser incorporado como ingrediente básico em inúmeros produtos alimentícios. A liberação de glicose como fonte de energia e a velocidade da digestão são as principais propriedades fisiológicas do amido. Segundo Englyst; Kingman; Cummings (1992), o amido possui digestibilidade variada de acordo com a velocidade na qual ele é digerido podendo ser classificado em:

- Amido Rapidamente Digerível (ARD): definido como o amido ou a fração de amido que é convertido em glicose em até 20 minutos quando incubado com α -amilase pancreática e amiloglicosidase à temperatura de 37 °C (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992). Este amido é rapidamente digerido e absorvido na boca e no intestino delgado, aumentando imediatamente a resposta glicêmica (IG) podendo induzir a uma série de complicações à saúde, como diabetes e doenças cardiovasculares (ZHANG; HAMAKER, 2009; 2014; LIU et al., 2017).
- Amido Lentamente Digerível (ALD): definido como a fração de amido que é convertida em glicose em até 120 minutos quando incubado a 37 °C com amilase

pancreática e amiloglucosidase (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992). Essa fração é completamente, mas lentamente digerida no intestino delgado, apresentando baixa resposta glicêmica e contribuindo para o controle de doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e obesidade (HAN; BEMILLER, 2007; LIU et al., 2017).

- Amido Resistente (AR): é o amido ou fração de amido que não é digerido por enzimas amilolíticas no trato digestivo, podendo ser fermentado por bactérias no cólon e produzir ácidos graxos de cadeias curtas e outros ácidos orgânicos.

De acordo com a legislação, Resolução RDC 40/2001 da ANVISA/MS, "fibra é qualquer material comestível que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano, determinado segundo os métodos publicados pela AOAC em sua edição mais atual". Nesse sentido, o AR pode ser considerado uma fibra dietética que também tem sido relacionado a efeitos benéficos locais e sistêmicos por meio de uma série de mecanismos semelhantes ao da fibra alimentar. Contudo, a digestibilidade e as diferentes velocidades na qual acontece o processo de digestão podem ser influenciadas por diferentes fatores. De um modo geral, os principais fatores que podem interferir na digestibilidade deste polissacarídeo incluem: a extensão da mastigação que irá determinar a suscetibilidade física do amido; o tempo de transição do alimento da boca até o íleo terminal; a concentração de amilases no intestino; as interações ocorridas entre o amido e outros constituintes do alimento. A digestibilidade dos amidos também pode ser influenciada por fatores como origem botânica; morfologia, grau e organização cristalina, bem como a relação amilose/amilopectina (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992; LOBO; SILVA, 2003; LEHMANN; ROBIN, 2007). Amidos com proporções de amilose muito altas apresentam menor digestibilidade e são comumente utilizados como fonte na produção de AR, enquanto amidos com baixos teores de amilose são fonte de ARD (NUGENT, 2005; LEHMANN; ROBIN, 2007; LI et al., 2008). Porém, a digestibilidade

de amidos das mais variadas fontes pode ser alterada por métodos físicos, químicos e/ou enzimáticos aumentando os teores de ALD e AR e reduzindo o teor de ARD.

1.3.1. Amido Lentamente Digerível

Conforme descrito anteriormente, a digestibilidade do amido pode variar desde uma digestão rápida, como é o caso do amido no seu estado gelatinizado, o qual é considerado um ARD até a indigestibilidade, como no caso do AR. Nesse contexto, o conceito de ALD, fração do amido com lenta digestibilidade, é baseado na dificuldade das enzimas digestivas em hidrolisar os amidos *in vivo* ou *in vitro*. Essa dificuldade é decorrente da estrutura física do amido que diminui a acessibilidade enzimática e/ou da estrutura química que limita a taxa de ação das enzimas (ZHANG; HAMAKER, 2009).

Essa fração de amido é lentamente digerida ao longo do intestino delgado proporcionando uma liberação lenta e prolongada de glicose para a corrente sanguínea, resultando em uma baixa resposta glicêmica ao longo do processo de digestão. Diferentemente da fração ARD, a fração de ALD não é hidrolisada pela α -amilase salivar, assim o processo de digestão não se inicia na boca. O ALD só começará a ser hidrolisado no intestino delgado pela ação da α -amilase pancreática, liberando como produto final maltose e dextrinas ramificadas, as quais serão posteriormente convertidas em glicose pelas enzimas maltose-glucoamilase e sucrase-isomaltase. Assim, o ALD, da mesma forma que o ARD, é totalmente digerido pelo sistema digestivo, porém, de forma mais lenta (MIAO et al., 2014).

A digestibilidade dos amidos depende de inúmeros fatores, como mencionado anteriormente. Os amidos nativos com padrão cristalino tipo B são mais resistentes à digestão pelas enzimas, enquanto os amidos com padrão tipo A são mais suscetíveis, porém são digeridos lentamente (LEHMANN; ROBIN, 2007; ZHANG; HAMAKER, 2009). A maioria dos amidos de cereais nativos possui elevada proporção de ALD,

como, por exemplo, o amido nativo de milho normal que apresenta liberação lenta e prolongada de glicose (ZHANG; HAMAKER, 2009). De um modo geral, para o preparo de produtos amiláceos, o amido é gelatinizado e perde sua estrutura cristalina devido à aplicação de calor e umidade, resultando na redução ou perda das propriedades de digestão lenta desses amidos nativos. Modificações químicas, físicas e enzimáticas do amido, ou a combinação delas, podem ser utilizadas para aumentar a resistência dos amidos às enzimas amilolíticas, mantendo-a mesmo após processamento. Estas modificações incluem, mas não estão limitadas, a tratamentos hidrotérmicos (LIU et al., 2015; WANG et al., 2017), ciclos de autoclavagem e resfriamento (ZHANG et al., 2011) modificação com ácido (HUNG; VIEN; PHI, 2016), uso de enzimas desramificantes (GURAYA; JAMES; CHAMPAGNE, 2001; ZHANG et al., 2013; LIU et al., 2017) uso de enzimas ramificantes (JIANG et al., 2014). Contudo o mecanismo de formação da fração de ALD ainda não é claro e alguns autores relatam que essa fração de amido é constituída de cristais imperfeitos formados durante o processo de retrogradação do amido (GURAYA; JAMES; CHAMPAGNE, 2001).

Os benefícios à saúde do ALD estão ligados a um metabolismo estável da glicose. Essa fração de amido apresenta baixos níveis de glicose pós-prandial, e mantém os níveis de glicose no sangue por maiores períodos de tempo comparado ao ARD que apresenta rápida resposta glicêmica apresentando picos de glicose. Como o ALD é um produto com baixo IG (LEHMANN; ROBIN, 2007), ele está associado a efeitos positivos para a saúde, incluindo o controle e prevenção de doenças relacionadas a hiperglicemia (GURAYA; JAMES; CHAMPAGNE, 2001), controle e prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade (HAN; BEMILLER, 2007). Além disso, as respostas metabólicas e hormonais relativas à glicemia pós-prandial diferem quando comparadas ao ARD. Esses fatores têm implicação no desempenho físico e mental (HAN; BEMILLER, 2007; LEHMANN; ROBIN, 2007; ZANG; HAMAKER, 2009). Como o ALD fornece glicose por tempos mais prolongados,

prolonga também a sensação de saciedade. Assim o ALD é um importante componente funcional com grande potencial para ser utilizado como ingrediente em alimentos.

1.3.2. Amido resistente (AR)

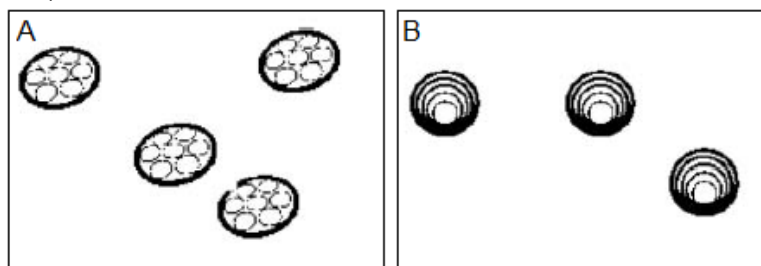
A hipótese de que o amido pode não ser completamente hidrolisado no sistema digestivo foi inicialmente proposta por Englyst; Kingman e Cummings (1982) que observaram que certa quantidade de amido de batata retrogradado resistia à digestão enzimática (GIUBERTI et al., 2015). Assim, o AR foi definido como a soma do amido e/ou produtos de degradação do amido que não são absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992). Os constituintes do AR são heterogêneos e uma série de fatores pode afetar a susceptibilidade do amido à hidrólise enzimática, como a relação amilose/amilopectina, o tipo e arranjo das estruturas cristalinas, o comprimento das cadeias de amilose e amilopectina, o tamanho de partícula alimentar, os complexos amilose-lipídeo, a existência de outros materiais na matriz alimentar (açúcar, proteína, etc.) e inibidores enzimáticos (TESTER et al., 2006; ALSAFFAR, 2011). De acordo com as características físicas e químicas, bem como a susceptibilidade às enzimas, o AR é classificado em cinco diferentes tipos:

- Amido resistente tipo 1 (AR1): é o amido fisicamente inacessível que se encontra em grão inteiros e moídos ou em sementes onde os grânulos de amido são protegidos por uma matriz de proteína ou material de parede celular, o que previne ou retarda o acesso enzimático (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010; ALSAFFAR, 2011). A resistência desse tipo de amido é minimizada ou até perdida pelas etapas de processamento de alimentos e pela própria mastigação (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006). A moagem, por exemplo, é um processo que envolve altas taxas de cisalhamento e por isso danifica as regiões cristalinas dos grânulos de amido, além

de romper a estrutura dos grânulos aumentando a suscetibilidade enzimática. O processo de moagem também remove a proteção que a estrutura dos grãos oferece aos grânulos de amido danificando-os e aumentando a susceptibilidade dos mesmos às enzimas. Por esses motivos, os teores de AR1 são baixos em farinhas (ALSAFFAR, 2011).

- Amido resistente tipo 2 (AR2): é o amido que resiste à digestão devido à conformação ou estrutura dos seus grânulos. Por exemplo, amidos nativos de batata, banana e milho com alto teor de amilose são naturalmente resistentes (ALSAFFAR, 2011). O modo como as cadeias de amilose e amilopectina empacotam-se radialmente dentro do grânulo forma uma estrutura compacta que limita a acessibilidade das enzimas digestivas. O grau de resistência, nesse caso, depende da fonte botânica e principalmente do tipo polimórfico sendo que amidos do tipo B tendem a ser mais resistentes do que os do tipo A e os do tipo C tendem a ter uma resistência intermediária. A resistência às enzimas do AR2 pode ser reduzida durante as etapas do processamento como, por exemplo, durante o cozimento (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006). Com base no teor de amilose, o AR2 pode ainda ser dividido em duas classes distintas, definidas como AR2_a e AR2_b. O AR2_a refere-se aos amidos nativos que possuem teor de amilose normal, ou seja amidos com até 30% de amilose e que, após o cozimento perdem drasticamente sua resistência, como por exemplo o amido de batata, enquanto que o AR2_b refere-se aos amidos nativos que possuem altos teores de amilose (> 30%), como por exemplo o amido de milho com alta amilose. O AR2_b mantém sua estrutura e parte de sua resistência, mesmo após o processamento (ALSAFFAR, 2011). Tanto o AR1 quanto o AR2 apresentam certas quantidades de ALD (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006). A Figura 3 mostra esquematicamente a estrutura dos amidos AR1 e AR2, respectivamente.

Figura 3 - Estrutura dos amidos resistentes tipo 1 (A) e tipo 2 (B). Fonte: Sajilata; Singhal; Kulkarni, 2006.



- Amido resistente tipo 3 (AR3): trata-se do amido retrogradado, formado após o processo de retrogradação do amido gelatinizado. A retrogradação envolve a reassociação das cadeias de amilose e amilopectina por meio da formação de duplas hélices estáveis estabilizadas por ligações de hidrogênio, e formação de uma estrutura cristalina mais ordenada, a qual dificulta o acesso das enzimas amilolíticas. O processamento de alimentos, que envolve aquecimento e umidade, pode destruir os AR1 e AR2, mas pode formar o AR3 (ESCARPA; GONZÁLES, 1997).

- Amido resistente tipo 4 (AR4): refere-se ao amido modificado quimicamente. Amidos substituídos quimicamente com grupamentos ésteres, fosfatos e éteres, bem como amidos com ligações cruzadas (HAN; BeMILLER, 2007; SUI; SHAH; BeMILLER, 2011) são exemplos de AR4. Esse tipo de AR é considerado o mais resistente à hidrólise enzimática devido ao volume dos grupos substituintes que dificulta a ligação entre a enzima-substrato e torna as ligações mais resistentes à hidrólise (ALSAFFA, 2011). Contudo, a utilização de AR4 em produtos alimentícios é restrita devido às questões de segurança alimentar.

- Amido resistente tipo 5 (AR5): consiste no amido complexado com lipídeo. Um exemplo de AR5 é o amido de milho com alta amilose complexado com ácidos graxos livres (HASJIM et al., 2010). Esses complexos apresentam maiores temperaturas de gelatinização. A formação do complexo amilose-lipídeo afeta a suscetibilidade enzimática de duas maneiras: diminui o inchamento do grânulo e assim a enzima tem

menos oportunidade para atingir o interior do grânulo; e os complexos amilose-lipídeo são mais resistentes às enzimas digestivas do que a amilose livre, pois com a formação do complexo, a amilose não fica dispersa o que diminui a chance de ligação entre a enzima e o amido (HASJIM et al., 2010).

O AR tem recebido muita atenção devido aos benefícios que ele apresenta à saúde. Possui benefícios fisiológicos semelhantes aos das fibras alimentares, incluindo, redução do risco de doenças gastrointestinais e doenças cardiovasculares (ZENG et al., 2015; CHRISTINE et al 2017). Por não ser digerido no intestino delgado o AR chega até o cólon provocando aumento do bolo fecal e redução do pH, reduzindo assim o risco de doenças do cólon (FUENTES-ZARAGOSA et al 2011). Ele pode ser fermentado pelas bactérias intestinais, especialmente as anaeróbicas estritas (bacteróides, eubactérias, bifidobactérias e *Clostridium*) que constituem 99% da microbiota intestinal humana. O consumo de AR ajuda a modular a microbiota intestinal mostrando aumentar o crescimento dessas bactérias, atendendo assim a definição de prebiótico (TOPPING; FUKUSHIMA; BIRD, 2003; ALFA et al., 2017). Os produtos da fermentação do AR pelas bactérias são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o acético, propiônico e butírico e gases como hidrogênio, dióxido de carbono e metano dos quais cerca de 20% são excretados pela respiração (TOPPING, FUKUSHIMA; BIRD, 2003). O consumo de AR também fornece menos calorias por grama quando comparado ao ARD, podendo então contribuir em dietas de perda de peso (CHRISTINE et al., 2017). Apresenta também 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, sendo útil no controle dessa doença (ZHOU et al., 2014). Assim o AR é relatado por apresentar efeitos benéficos em casos de obesidade, diabetes e hiperlipidemia (FUENTES-ZARAGOSA et al 2011). Como resultado disso o

AR tem atraído cada vez mais a atenção de profissionais da área de saúde (LI et al., 2017).

Outra vantagem do uso do AR é que, ao contrário da fibra dietética, esse carboidrato não tem um efeito prejudicial sobre a qualidade dos produtos possuindo propriedades físico-químicas desejáveis, como cor branca, sabor suave, pequeno tamanho de partícula, formação de gel, capacidade de ligação com a água. (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011; ALSAFFAR 2011; LI et al., 2017), podendo ser usado como ingrediente em uma série de produtos sem afetar características importantes como cor, sabor, textura etc. Em termos quantitativos, as recomendações variam de 4g/dia a 20g/dia como suficiente para que o organismo possa se beneficiar dos efeitos relatados do AR (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011; ALSAFFAR, 2011). No entanto, de acordo com Dupuis et al. (2014), para que o corpo humano perceba os benefícios fisiológicos do AR, estima-se que 10% a 20% da ingestão diária de carboidratos resistentes seja necessário.

1.3.3. Amido resistente tipo 3 (AR3)

Entre os diferentes tipos de AR, o amido retrogradado (AR3) é o que mais se destaca em escala industrial, sendo o mais produzido (LI et al., 2017). O aquecimento do amido nativo em excesso de água leva à gelatinização que é caracterizada por uma desorganização granular e mudanças físicas que ocorrem durante o processo como inchamento dos grânulos e lixiviação das moléculas causando a perda da estrutura cristalina (PATEL et al., 2017). Esse processo aumenta expressivamente a susceptibilidade do amido à ação amilolítica. Amidos de diferentes fontes botânicas apresentam diferentes comportamentos durante a gelatinização, e nem todos são completamente gelatinizados durante o processamento hidrotérmico, amidos com alta amilose só são completamente gelatinizados a temperaturas superiores a 120°C (HARALAMPU, 2000; PATEL et al., 2017). No entanto, a estrutura do material amorfo

obtido após gelatinização não é estável e ao resfriar, o amido gelatinizado sofre um processo de reassociação e recristalização das cadeias de amilose e amilopectina formando uma estrutura ordenada, esse processo é denominado retrogradação (HARALAMPU, 2000) e torna o amido resistente às enzimas. A retrogradação envolve a reassociação das cadeias de amilose e amilopectina através da formação de duplas hélices estáveis estabilizadas por ligações de hidrogênio e formação de uma estrutura cristalina mais ordenada, a qual dificulta o acesso das enzimas amilolíticas.

A retrogradação da amilose ocorre muito mais rapidamente do que a da amilopectina devido a sua estrutura essencialmente linear (HARALAMPU, 2000). A amilose retrogradada foi, portanto, identificada como o principal fator envolvido na formação de AR3. Alguns processamentos que envolvem calor e umidade, que na maioria dos casos destrói AR1 e AR2, podem formar AR3 (GONZÁLEZ-STO, 2006). Por isso, o AR3 é normalmente encontrado em pequenas quantidades em produtos como crosta de pão e flocos de milho (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2011).

A razão pela qual o AR3 é resistente a ação das enzimas digestivas, é que com a reassociação das cadeias de amido, durante a retrogradação (principalmente amilose), uma estrutura de duplas hélices densamente empacotada é formada, tornando as ligações glicosídicas (α -1,4) inacessíveis às amilases (ZHANG; JOM 2011).

Embora a formação de AR3 encontre-se associada à gelatinização seguida da retrogradação, outros fatores como as condições de gelatinização e retrogradação, fonte botânica do amido, relação amilose/amilopectina, distribuição do comprimento das cadeias, grau de associação entre as cadeias ou a combinação desses fatores podem influenciar no grau de resistência desses amidos, pois esses fatores influenciam na estrutura cristalina formada (HARALAMPU, 2000; KIATPONGLARP et al., 2015).

O AR3 é tecnologicamente interessante porque é também um amido termicamente estável (HARALAMPU, 2000) e, portanto, pode ser utilizado durante o processamento de alimentos sem perder sua resistência (FUENTE-ZARAGOZA et al., 2011). Outra vantagem do uso do AR3 é que, por ser um amido fisicamente modificado, o mesmo não possui limitação de uso como ingrediente quando comparado ao AR4, por exemplo.

1.3.4. Formação de AR3

Devido aos inúmeros benefícios tecnológicos do AR3, bem como aos seus efeitos fisiológicos e prebióticos é crescente o interesse em torno da utilização desse tipo de AR. Nesse sentido, estudos que visem potencializar a formação de maiores níveis de resistência dessa fração do amido se tornam importantes. O AR3 é formado a partir da retrogradação do amido gelatinizado, portanto a redução da digestibilidade, ou seja, o aumento da resistência enzimática desse tipo de amido baseia-se no aumento da retrogradação com formação de uma estrutura cristalina mais densamente empacotada. Contudo, o processo de retrogradação pode ser influenciado por inúmeros fatores, como as condições na qual ele ocorre, onde incluem a quantidade de água (concentração), temperatura de gelatinização e de retrogradação, além das características estruturais do amido, como, proporção amilose/amilopectina, comprimento de cadeias dos polímeros e presença de lipídeos ou outros componentes que influenciem a gelatinização e/ou processo de retrogradação (EERLINGEN; DELCOUR, 1993; LERTWANAWATANA; FRAZIER; NIRANJAN, 2015).

O teor de AR3 pode ser aumentado por modificações físicas do amido, como tratamento térmico de baixa umidade (CHUNG; LIU; HOOVER, 2009), autoclavagem incluindo ciclos de aquecimento e resfriamento (LEEMAN et al., 2006; SIMSEK; EL, 2012), extrusão termoplástica (GONZÁLEZ-SOTO et al., 2006) e tratamentos com micro-ondas (ZENG et al., 2015; MUTLU; KAHRAMAN; ORTURK, 2017). Esses

tratamentos provocam uma melhor reorganização das cadeias de amido para amidos de diferentes fontes botânicas. O uso de diferentes técnicas que potencialize a formação de AR3 conduz a diferentes características estruturais e propriedades físico-químicas, bem como digestibilidade do amido.

A modificação do amido por método enzimático, precedido ou não por enzima desramificante antes da retrogradação pode potencializar ainda mais a formação de AR3 visto que a ação das enzimas amilolíticas promove a quebra das cadeias de amido e pode aumentar a tendência dessas cadeias a se retrogradarem (LUCKET; WANG, 2012; REDDY; SURIYA; HARIPRIA 2013, VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016).

Berry (1986) relatou que a desramificação, com pululanase, de amido de milho com alta amilose seguido de autoclavagem e retrogradação a 4°C aumentou significativamente o teor de AR3. Com a mesma finalidade Reddy, Suriya e Haripriya (2013) avaliaram a produção de AR3 a partir da desramificação do amido de feijão com pululanase. Os amidos foram gelatinizados e submetidos à hidrólise com pululanase, autoclavados a 121°C durante 30 min, armazenados sob refrigeração (4°C/24 h), e liofilizados. Esse processo aumentou o conteúdo de AR3 de 21,27% para 42,34%. Reddy et al. (2017) utilizaram amido de banana desramificado com pululanase seguido de autoclavagem e retrogradação a 4°C por 24 h e avaliaram a produção de AR3 bem como seus efeitos benéficos sobre a diabetes tipo 2. Os autores relataram aumento significativo nos teores de AR3 sendo este indicado para a alimentação de pessoas portadoras de diabetes. Huang et al. (2015) relataram significativa redução na digestibilidade de amido de batata-doce desramificado com isoamilase seguido por tratamento térmico de baixa umidade (TTBU). O tratamento do amido com isoamilase ou pululanase promove a hidrólise das ligações α -1,6, resultando na liberação das cadeias ramificadas da amilopectina em fragmentos lineares, aumentando o número de moléculas lineares menores que as moléculas de

amilose e aumentando a tendência à retrogradação do amido gelatinizado quando o mesmo é submetido ao resfriamento e repouso (REDDY et al., 2017; LIU et al., 2017).

Outro fator que influencia a retrogradação é o grau de polimerização (GP) das cadeias de amido. O uso da amilólise, ou mesmo da hidrólise ácida precedendo a desramificação do amido em conjunto com um método que potencialize a retrogradação tem se mostrado eficiente na formação de AR3 (ZHANG; JIN, 2011; LUCKETT; WANG, 2012; ZHANG et al., 2013; ZHOU et al., 2014; CHEN et al., 2017; VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016). A hidrólise do amido usando ácido ou diferentes amilases, ou qualquer outra técnica que promova a depolimerização das cadeias de amido como o ultrassom, envolve principalmente a quebra das moléculas em fragmentos de menor massa molecular que ao serem desramificadas aumentam o número de moléculas lineares menores que podem apresentar maior mobilidade e facilidade de reassociação resultando no aumento da retrogradação do amido gelatinizado. A velocidade de retrogradação depende do comprimento das cadeias do amido, então o grau de polimerização (GP) das moléculas afeta a formação do AR3 (EERLINGEN et al., 1993). Portanto, técnicas de modificação que promovam a quebra das cadeias de amido podem servir como pré-tratamentos para aumentar a formação de AR3 a partir da obtenção de um maior número de cadeias lineares com tamanhos mais adequados ao pareamento.

Um comprimento de cadeia linear adequado é requerido para a recristalização (formação de duplas hélices) e aumento do teor de AR3. Contudo, dados do comprimento de cadeia ideal ainda não são bem estabelecidos. Zhou et al. (2014) reportaram que a redução nos comprimentos das cadeias de amilose e amilopectina aumentou o teor de AR3 quando α -amilase bacteriana precedendo a desramificação com pululanase foi usada na formação de AR3 de amido de arroz. Luckett e Wang (2012) observaram que a amilose e as cadeias da amilopectina com um GP 21-26 contribuíram na formação do AR3 de amido de milho com diferentes teores de amilose

quando β -amilase foi usada antes da desramificação, enquanto Hasjim e Jane (2009) reportaram que cadeias menores obtidas da hidrólise ácida branda do amido de milho contribuíram para aumentar o teor de AR3. Li et al. (2017) utilizaram α -amilase bacteriana simultaneamente com isoamilase, seguido de dois ciclos de autoclavagem e retrogradação a 4°C para a formação de AR3 a partir de amidos cerosos de batata, milho e arroz. Os autores observaram que a redução do comprimento das cadeias de amilose e amilopectina é um fator fundamental que influencia a retrogradação do amido, visto que as cadeias mais curtas facilitam o contato das moléculas para formar uma estrutura cristalina. No entanto a condição de retrogradação também é um interferente.

Villas-Boas e Franco (2016) reportaram que a α -amilase fúngica foi mais eficiente que a β -amilase bacteriana na formação de AR3 de amidos de araruta e batata sendo que os maiores teores de AR3 foram obtidos no amido de araruta. No entanto, houve aumento significativo no teor de ALD do amido de batata quando ambas as enzimas foram utilizadas. A formação de AR3 foi potencializada quando houve redução na proporção e grau de polimerização (GP) das cadeias longas da amilopectina e aumento na proporção de cadeias curtas especialmente com GP ~ 15.

2. AMILASES

As enzimas amilolíticas ou amilases são as hidrolases glicosídicas (GHs) e são definidas como um grupo de enzimas que atuam sobre as ligações glicosídicas α -1,4 e/ou α -1,6 presentes no amido (GOESAERT et al., 2009; TANIGUCHI; HONNDA, 2017). As enzimas são classificadas conforme as classes de reações que catalisam tais como substrato e especificidades do produto. As amilases se enquadram principalmente em duas classes: transferases (EC2) e as hidrolases (EC3) (TANIGUCHI; HONNDA, 2017). Todas as amilases pertencem à família das hidrolases de glicosídeo (GHs).

De acordo com Maarel et al. (2002) as amilases são divididas em quatro grupos: as endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e as transferases. As endoamilases são as enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna (endo-) da cadeia de amilose ou amilopectina, enquanto as exoamilases rompem essas ligações partindo da extremidade não redutora da cadeia (GUPTA et al., 2003). As enzimas desramificantes são as que hidrolisam exclusivamente as ligações glicosídicas α -1,6. Pertencem a esse grupo a isoamilase (EC 3.2.1.68) e a pululanase (EC3.2.1.41). Já as transferases são capazes de clivarem uma ligação glicosídica α -1,4 de uma molécula doadora e transferirem parte da mesma para um aceptor glicosídico formando uma nova ligação glicosídica (MAAREL et al., 2002). Outro critério utilizado para caracterizar as amilases é com base no seu mecanismo de ação, onde pode ser dividida em dois grupos, sendo elas, as de retenção e as de inversão. A configuração anomérica no substrato é mantida após a ação catalítica de enzimas de retenção, enquanto ela é invertida após a ação catalítica de enzimas inversoras. A β -amilase (EC 3.2.1.2) e a glucoamilase (EC 3.2.1.3), por exemplo, são enzimas inversoras, enquanto que todas as outras α -amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas de retenção (TANIGUCHI; HONNDA, 2017).

A hidrólise do amido catalisada por amilases está entre as mais importantes reações enzimáticas aplicadas industrialmente. As amilases podem ser derivadas de várias fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos e têm substituído quase que completamente a hidrólise química de amido (GUPTA et al., 2003). Uma das grandes vantagens que a hidrólise enzimática possui sobre a hidrólise ácida é que, graças a sua estrutura complexa, as enzimas apresentam alto grau de especificidade pelo substrato, propriedade essa que é ausente em ácidos (MAAREL et al., 2002).

As amilases, pertencentes à classe das hidrolases (EC3) como as α -amilases, β -amilases ou mesmo a amiloglucosidase, são enzimas que hidrolisam as moléculas de amido para obter diversos produtos que incluem oligossacarídeos com

comprimento de cadeia variável, formados por unidades de glicose e dextrinas limites contendo ligações α -1,6 (GUPTA et al., 2003; BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2008). Contudo amilases de diferentes fontes degradam o amido de maneira diferente, originando produtos diferentes (BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2008).

2.1. α -amilases

Presentes em animais, vegetais, fungos e bactérias, as α -amilases pertencem à família das hidrolases glicosídicas GH13, a maior família de hidrolases glicosídicas, a qual é classificada por similaridade na sequência de aminoácidos. (GUPTA et al., 2003). As α -amilases atuam sobre as ligações α -1,4 no interior da cadeia glicosídica, mantendo a configuração α -anomérica (GUPTA et al., 2003).

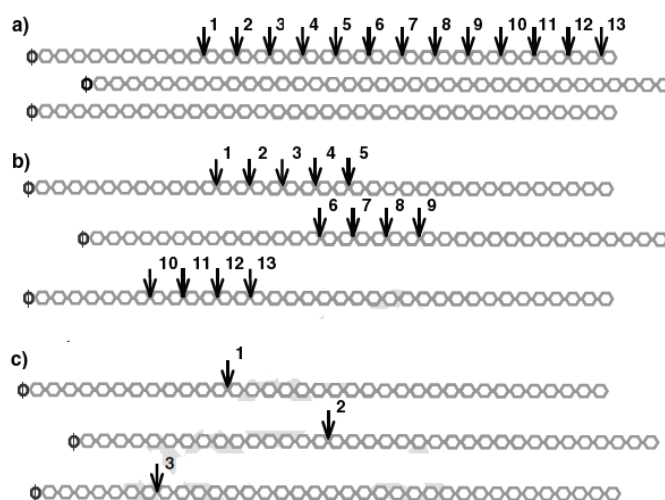
As α -amilases não são capazes de hidrolisar as ligações α -1,6. Assim, no estágio inicial de hidrólise dextrinas são produzidas apresentando uma rápida diminuição da viscosidade da solução de amido. À medida que a hidrólise prossegue, o GP médio das dextrinas diminui gradualmente, e na fase final de hidrólise, grandes quantidades de glicose, maltose, maltotriose e outros oligossacarídeos com diferentes tamanhos, bem como α -dextrinas limites constituem os produtos de hidrólise. Todos os produtos de hidrólise possuem uma configuração α (GUPTA et al., 2003).

Apesar das várias similaridades entre as enzimas α -amilases, existem diferenças em sua estrutura, principalmente relacionadas ao sítio ativo dessas enzimas, onde ocorre a ligação com o substrato. Essa estrutura varia entre as α -amilases de diferentes origens, o que provavelmente é um dos fatores que explica as diferentes especificidades (TANIGUCHI; HONNDA, 2017). A arquitetura do sítio ativo da enzima, em particular, o número de subloais e a posição dos resíduos catalíticos no local ativo, determina a ligação do substrato produtivo e a distribuição dos malto-oligossacarídeos resultante. A susceptibilidade do amido ao ataque de amilase depende das propriedades do amido específico e das características da amilase

específica. Em geral, acredita-se que as α -amilases degradam os polissacarídeos de amido de forma aleatória (GUPTA et al., 2003). No entanto sabe-se que α -amilases de diferentes fontes degradam o amido de acordo com o padrão catalítico específico (BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2008).

Existem três padrões catalíticos das α -amilases: o ataque em cadeia simples, o múltiplo ataque, e o ataque em multi-cadeias ou ataque aleatório (ROBYT; FRANCH, 1967; BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2008). A Figura 4 apresenta um esquema do padrão de ação de α -amilases.

Figura 4 - Representação esquemática dos padrões de ação de α -amilases em fragmentos de amido a) padrão de ataque em cadeia simples; b) padrão de múltiplo ataque; c) padrão de ataque em multi cadeias. Fonte: Bijttebier; Goesart; Delcour, (2008).



O ataque em cadeia simples (Fig. 4a) consiste no padrão de ação no qual a cadeia do polímero é sucessiva e completamente hidrolisada antes da dissociação do complexo enzima-substrato. No padrão de múltiplo ataque (Fig. 4b) as enzimas clivam varias ligações glicosídicas sucessivamente após o primeiro ataque antes de se dissociar do substrato, posteriormente se dissocia e se liga em uma próxima cadeia. A direção desse mecanismo é para a extremidade não redutora do substrato, já no ataque em multi cadeias ou aleatório (Fig. 4c) apenas uma ligação é hidrolisada a

cada ligação enzima-substrato (BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2008; DERDE; GOMAND; DELCOUR 2012).

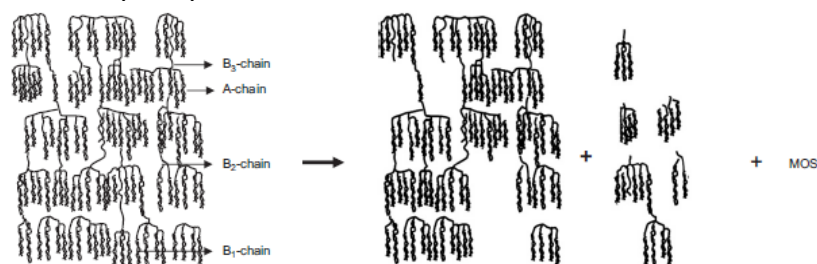
2.1.1. α -amilase fúngica

A α -amilase fúngica (glucan α -1,4- maltohidrolase EC.3.2.1.1) é uma endoenzima, que quebra as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna das cadeias de amilose e amilopectina (SAID et al., 2004). Essa enzima possui um mecanismo de ataque em multi-cadeia, ou o chamado aleatório onde todas as ligações são igualmente susceptíveis à hidrólise. Como resultado, pode-se observar uma rápida diminuição na massa molecular dos polímeros (BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2008; DERDE; GOMAND; DELCOUR, 2012). Contudo algumas ligações são menos suscetíveis à hidrólise do que outras principalmente aquelas mais próximas às extremidades e as próximas aos pontos de ramificação (BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2008). Os produtos finais da hidrólise por α -amilase fúngica são maltose, maltotriose e outros malto-oligossacarídeos de maiores GP, além de α -dextrinas limites (DERDE; GOMAND; DELCOUR, 2012). Essa enzima atua por um mecanismo de retenção, ou seja, o grupo hidroxila resultante irá manter a configuração α (MAAREL et al., 2002; TANIGUCHI; HONNDA, 2017). Robyt e French (1967) avaliaram o padrão de ação de α -amilase de diferentes fontes, incluindo a de *Apergillus oryzae* analisando o aumento da concentração de açúcares totais liberados. Esses autores observaram que essa enzima possui pouco, porém, mensurável, mecanismo de múltiplo ataque devido à baixa liberação de oligossacarídeos pequenos (BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2008). A Figura 5 mostra uma representação esquemática da ação da α -amilase fúngica.

A ação da α -amilase fúngica por endo-cisão ocorre preferencialmente entre os clusters liberando assim clusters individuais ou grupos de clusters da amilopectina, e em seguida ocorre a desagregação das cadeias mais curtas dentro desses clusters

(GOESAERT; BIJTTEBIER; DELCOUR, 2010). Essa enzima possui baixa estabilidade térmica, não possuindo atividade enzimática em temperatura acima de 70°C, sendo que em temperaturas mais altas essa amilase pode apresentar seu padrão de múltiplo ataque (LEMAN et al., 2005; GOESAERT, BIJTTEBIER, DELCOUR, 2010).

Figura 5- Representação esquemática da ação da α -amilase fúngica nas cadeias de amilopectina. MOS – malto-oligossacarídeos de GPs variados. Fonte: Leman, Goesaert e Delcour,(2009).

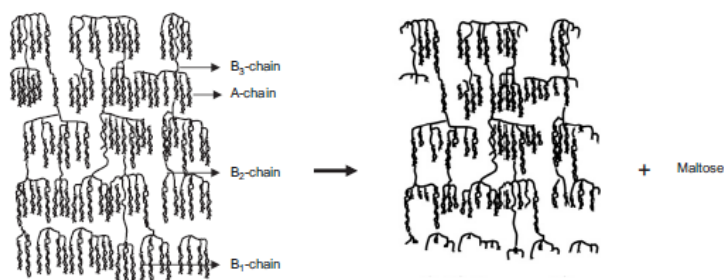


2.1.2. α -amilase maltogênica

A α -amilase maltogênica (glucan α -1,4- maltohidrolase EC.3.2.1.133) é uma enzima que catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 em polissacarídeos como o amido, liberando como seu produto principal sucessivas moléculas de maltose (LEMAN; BIJTTEBIER; DELCOUR, 2009; MIAO et al., 2014). A ação dessa enzima mantém a configuração anomérica no substrato, dessa forma ela é uma enzima de retenção, então produz α -maltose (MAAREL et al., 2002; TANIGUCHI; HONNDA, 2017). Seu modo de ação não é completamente claro, porém acredita-se que essa enzima atue como uma exo-amilase além de ser uma endo-enzima. Essa amilase não requer uma extremidade não redutora e não inverte a configuração anomérica (BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR, 2008) como ocorre com a β -amilase. De acordo com Derde, Gomand e Delcour, (2012), a α -amilase maltogênica produz especificamente malto-oligossacarídeos com um determinado GP por um mecanismo de exo-ação, enquanto Bijteteber, Goesaert e Delcour (2010) mostraram que essa enzima reduz a massa molecular da amilose por endo-ação. Também há indícios de

que as cadeias de amilopectina são afetadas pela ação desta enzima produzindo açúcares redutores. Entretanto a hidrólise da amilopectina é restrita (DERDE; GOMAND; DELCOUR, 2012), afetando principalmente as cadeias mais curtas e externas dessa fração do amido (GOESAERT, BIJTTEBIER, DELCOUR, 2010). Outra característica importante desta enzima é que ela possui um alto grau de múltiplo ataque, principalmente sobre as cadeias de amilopectina (BIJTTEBIER; GOESAERT; DELCOUR 2008). A Figura 6 mostra uma representação esquemática da ação da α -amilase maltogênica. A estabilidade térmica da α -amilase maltogênica é intermediária, pois, a mesma é inativada a 100°C após 5 min, e apresenta apenas 76% da sua atividade após ser incubada por 5 min a 80°C (LEMAN et al., 2005).

Figura 6 - Representação esquemática da ação da α -amilase maltogênica nas cadeias de amilopectina. Fonte: Leman, Goesaert e; Delcour,(2009).

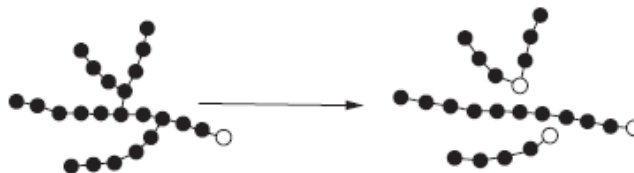


2.2. Enzimas desramificantes

A pululanase (Endo- α -1,6-glucanohidrolase E.C.3.2.1.41) e a isoamilase (Endo- α -1,6-glucanohidrolase E.C.3.2.1.66) pertencem ao grupo das enzimas desramificantes, as quais hidrolisam apenas as ligações α -1,6 em amido, dextrinas limite e, no caso da pululanase, em pululano. A isoamilase não é capaz de hidrolisar o pululano devido a sua incapacidade de hidrolisar as cadeias ramificadas de menor comprimento (MAAREL et al., 2002; SAID et al., 2004). As enzimas desramificantes

também pertencem à família GH13. A Figura 7 mostra esquematicamente a hidrólise das ligações α -1,6.

Figura 7 - Representação esquemática da ação de enzimas desramificantas sobre as cadeias de amido. Fonte: Tomasik e Horton, (2012).



Essas enzimas desempenham papéis importantes na indústria do amido porque são as únicas enzimas que hidrolisam seletivamente as ligações α -1,6. Ambas as enzimas produzem cadeias de α -1,4-glucano ou malto-oligossacarídeos (TANIGUCHI; HONNDA, 2017). Esses fragmentos são polímeros lineares que contém cerca de 10 a 65 unidades de anidro glicose (LEONG et al., 2007). A modificação do amido por meio de enzimas desramificantes, como a pululanase, resulta em notáveis novas propriedades e funcionalidades desses amidos, atendendo aos requisitos de aplicações específicas (LIU et al., 2017). A pululanase em combinação com a β -amilase é amplamente utilizada na indústria de sacarificação de amido para produzir maltose (TANIGUCHI; HONNDA, 2017). A desramificação do amido aumenta a capacidade das cadeias de formarem dupla hélice. Uma importante consequência da desramificação de amidos então está relacionada à redução de sua digestibilidade levando à formação de amido lentamente digerível (ALD) ou de AR (LIU et al., 2017).

3. ULTRASSOM

A utilização do ultrassom tem sido alvo de pesquisa e desenvolvimento na indústria de alimentos mostrando efeitos benéficos no processamento e conservação de alimentos, aumentando o rendimento de produtos, diminuindo o tempo de

processamento e custos operacionais, melhorando a qualidade dos produtos finais (PATIST; BATES, 2008; WANG et al., 2017). É uma técnica ecologicamente correta, eficiente, segura e econômica (DING et al. 2019). O ultrassom é definido como ondas mecânicas acústicas que necessitam de um meio para se propagarem e possuem frequência acima de 20 kHz, isto é, ondas com frequência acima do limiar de audição humana (de 16 kHz a 20 kHz) (ZHU et al., 2015). Essas ondas podem ser geradas com o uso de transdutores piezoelétricos ou magnetostritivos que criam vibrações de alta energia. Estas vibrações são amplificadas e transferidas para uma sonda que está em contato direto com o fluido (PINTO et al., 2015).

O ultrassom é dividido em duas faixas de frequência, incluindo o ultrassom de sinal (alta frequência) e o ultrassom de potência (baixa frequência) (PATIST; BATES, 2008). O ultrassom de sinal é o ultrassom de baixa intensidade ($<1 \text{ W/cm}^2$) e altas frequências, maiores que 100 kHz (PATIST; BATES, 2008). Esse tipo de ultrassom é usado quando não se deseja causar nenhuma alteração física ou química nos materiais sendo utilizado como uma técnica analítica que permite análises rápidas, precisas, de baixo custo, e não destrutivas (MCCLEMENTS; GUNASEKARAN, 1997). Com baixas intensidades (ou altas frequências) a transmissão acústica causa o movimento e a mistura dentro do fluido, sem formação de bolhas, portando sem causar alterações no material (AWAD et al., 2012). Por outro lado, o ultrassom de potência é o de alta intensidade ($> 1 \text{ W/cm}^2$) e baixa frequência (16-100 KHz) (PATIST; BATES, 2008; AWAD et al., 2012). É utilizado para afetar um processo específico ou um produto. Isso é possível graças aos efeitos que uma onda ultrassônica de alta intensidade e baixa frequência é capaz de produzir no meio, podendo causar alterações físicas, químicas ou mecânicas no produto. Esse tipo de ultrassom pode ser utilizado para esterilização, emulsificação de alimentos, homogeneização, secagem, filtração, inativação de enzimas (MCCLEMENTS; GUNASEKARAN, 1997; WANG et al 2017).

Entre as várias aplicações alimentares do ultrassom, o uso dessa técnica no amido é de grande importância, pois esse carboidrato é um dos principais ingredientes de diversos produtos alimentares e industriais (ZHU 2015). O tratamento do amido com ultrassom de potência é um método físico de modificação do amido que pode causar modificações químicas e físicas nesse polissacarídeo a fim de atender às necessidades das indústrias, já que o amido na sua forma nativa não possui algumas propriedades específicas (Kim et al., 2013). Inúmeros estudos têm mostrado que a sonicação pode afetar as propriedades físico-químicas do amido incluindo a solubilidade, poder de inchamento, transparência, temperatura de gelatinização e entalpia, propriedades de pasta e cristalinidade relativa (PATIST; BATES, 2008; ZUO et al., 2009; CHAN; BHAT; KARIM 2010; ZHU et al., 2012; SUJKA; JAMROZ, 2013; PINTO et al., 2015; LI et al. 2018; YANG et al. 2019). Além disso, dependendo das condições de ultrassom também pode provocar danos na superfície dos grânulos e a degradação das cadeias do amido em fragmentos de menor massa molecular (CHAN; BHAT; KARIM 2010; ZHU et al., 2012; HAAJ et al., 2013; PINTO et al., 2015; ZHENG et al., 2015; KANG et al., 2016; WANG et al. 2017; LU et al. 2018; FALSIFI et al. 2019) porém, seu mecanismo de quebra ainda não foi totalmente estabelecido.

Os efeitos do ultrassom são atribuídos ao fenômeno de cavitação um efeito causado pelas ondas ultrassônicas de alta intensidade e baixas frequências, pois a transmissão acústica, desse tipo de ultrassom causa a formação, crescimento e colapso de grandes bolhas, o que provoca a liberação de energia (AWAD et al., 2012; LU et al 2018). Devido à capacidade de um solvente em absorver e transmitir a energia, as vibrações causadas por meio do ultrassom levam à cavitação (ZHU 2015). O processo de cavitação acontece quando as ondas ultrassônicas são propagadas através de um meio aquoso. Uma série de ciclos de compressões e descompressões é induzida por meio de deslocamento das moléculas, resultando no movimento do tipo onda contínua. Quando a pressão local no meio durante o ciclo de descompressão cai

abaixo da pressão de vapor do líquido, pequenas bolhas podem ser formadas a partir do gás já existente no fluido. Durante o ciclo de compressão, as bolhas encolhem. Com vários ciclos, as bolhas continuam a crescer até o ponto em que a oscilação da parede da bolha é igual ao da frequência aplicada pelas ondas sonoras, resultando na explosão das mesmas durante um ciclo de compressão. A explosão de bolhas produz uma força de cisalhamento muito alta e turbulência com grandes ondas de energia aumentando drasticamente a temperatura e energia do local, modificando assim as condições físicas e químicas do sistema. No amido, a cavitação induz à formação de "*micro-jets*", isto é, um colapso de bolhas que resultam em um jato de disparo de água na superfície do grânulo e forças de cisalhamento que são responsáveis pelos danos aos grânulos de amido (ZHU 2015). De acordo com Patist e Bates (2008), a frequência é inversamente proporcional ao tamanho das bolhas, portanto o ultrassom de baixa frequência (10-100KHz) gera grandes bolhas de cavitação resultando em temperaturas e pressão mais altas na zona de cavitação. À medida que a frequência aumenta, a zona de cavitação torna-se menos violenta e na faixa de mega-hertz (MHz) não se observa mais cavitação e o mecanismo principal é a transmissão acústica. Radicais livres também podem ser gerados a partir da dissociação das moléculas de água devido à ação da cavitação, os quais também podem causar a cisão das cadeias de amido (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2005). Contudo os efeitos do ultrassom sobre os grânulos de amido dependem de fatores como: potência e frequência do ultrassom, tempo do tratamento, bem como a origem botânica e concentração da mistura de amido.

Ultrasonicação com frequência de 20 kHz causou a degradação de cadeias de amidos de arroz ceroso resultando em dextrinas com menor tamanho molecular e polidispersão reduzida quando determinados por técnicas cromatográficas (ISONO et al., 1994). Zeng et al. (2015) estudaram o efeito do ultrassom de baixa frequência (40 kHz) e potencia de 300 W por 55 min a 25°C em grânulos de amidos de flor de lótus

seguido de autoclavagem e resfriamento a 4°C por 24 h. Os autores observaram um aumento significativo no teor de AR3, devido à quebra das cadeias de amido causada pela sonicação. O processo de degradação tem sido atribuído à cavitação que cria alta pressão, elevação da temperatura e alta força de atrito que pode quebrar as cadeias de amido (SUJKA; JAMROZ, 2013). Yang et al (2019) estudaram o efeito do ultrassom a 100W e 400W de potência durante 40 min nos grânulos de amido de milho ceroso e observaram que sob essas condições ocorre principalmente a degradação da região amorfa, reduzindo as cadeias B1, B2 e B3 e aumentando a proporção de cadeias curtas (A), o diâmetro dos grânulos desses amidos também reduziram, os autores atribuíram a degradação à cavitação, bem como ao ataque dos radicais livres. Iida et al 2008 mostraram que a sonicação, usando 100 e 120 W, de pastas de amidos de milho, batata, batata-doce e tapioca reduziu gradualmente a massa molecular dos amidos durante os primeiros 30 min de sonicação, após esse tempo, a despolimerização prosseguiu lentamente. No entanto, dados sobre onde ocorre a cisão dessas cadeias não é relatado.

O efeito do ultrassom em amidos depende de muitos fatores, como as condições de sonicação (frequência, potência, temperatura e tempo de tratamentos), relação amido/solvente, bem como a origem botânica, estado físico do amido, uma vez que esses parâmetros irão determinar a extensão das mudanças causadas por ação desse tratamento físico (ZHU 2015; FALSAFI et al 2019). Assim, dependendo das condições, a sonicação pode também ser usada como um pré-tratamento precedendo a desramificação para potencializar a retrogradação e formação de AR.

4. REFERÊNCIAS

ALBERT EINSTEIN. **Pensador.** Disponível em: https://www.pensador.com/autor/albert_einstein/. Acesso em: 20 agos. 2019.

ALFA, M. J.; STRANG, D. TAPPIA, S. P.; GRAHAM, G. V.; FORBES, J. D.; LAMINMAN, B.; OLSON, B.; GAGNE, P.; BRAY, D.; MURRAY, B. L.; DUFAULT, B.;

LIX, L. M. A randomized trial to determine the impact of a digestion resistant starch composition on the gut microbiome in older and mid-age adults, P.1-11, 2017.

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.

AWAD, T. S., MOHARRAM, H. A.; SHALTOUT, O. E.; ASKER, D. YOUSSEF, M. M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, v.48, p. 410-427, 2012.

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

BERRY, C. S. Resistant Starch: Formation and Measurement of Starch that Survives Exhaustive Digestion with Amyolytic Enzymes during the Determination of Dietary Fibre. **Journal of Cereal Science**, v. 4, p. 301-314, 1986.

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

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

BIJTTEBIER, A.; GOESAERT, H.; DELCOUR, J. A. Amylase action pattern on starch polymers. **Section Cellular and Molecular Biology**, v. 63, p. 989-999 2008.

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.

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.

CHEN, P.; XIE, F.; ZHAO, L., QIAO, Q.; LIU, X. Effect of acid hydrolysis on the multi-scale structure change of starch with different amylose content. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 359-368, 2017.

CHRISTINE, H.; EMILIEN, W. H.; JAMES, H.H. Effect of resistant wheat starch on subjective appetite and food intake in healthy adults. **Nutrition**, DOI: 10.1016/j.nut.2017.06.020, 2017.

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

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

DERDE, L. J.; GOMAND, S. V.; COURTIN, C. M. ; DELCOUR, J. A. Characterization of three starch degrading enzymes: Thermostable β -amylase, maltotetraogenic and maltogenic α -amylases. **Food Chemistry**. V. 135, p.713-721 2012.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. R.; ROBERTS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-354, 1956.

DUPUIS, J. H.; LIU, Q.; YADA, R. Methodologies for Increasing the Resistant Starch Content of Food Starches: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p. 1219-1234.

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.

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.

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

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. S.; YOO, S.; JANE, J. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 243-248, 2002.

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

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, n. 3-4, p. 177-191, 1997.

GARCIA, V., COLONNA, P., BOUCHET, B., & GALLANT, D. J. Structural changes of cassava starch granules after heating at intermediate water contents. **Starch/Stärke**, 49, 171–179, 1997.

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.

GOESAERT, H.; SLADE, L.; LEVINE, H.; DELCOUR, J.V. Amylases and bread firming – an integrated view. **Journal Cereal Science**, v. 50, p. 345 – 352, 2009.

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.

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

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

HIZUKURI, S. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. **Carbohydrate Research**, v. 141, p.295–306, 1985.

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

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.

HUANG, T. T.; ZHOU, D. N.; JIN, Z. Y., XU, X. M.; HEN, H. Q. Effect of debranching and heat-moisture treatments on structural characteristics and digestibility of sweet potato starch. **Food Chemistry**, v. 187, p.218-224, 2015

HUNG, P. V.; VIEN, N. L.; PHI, N. T. L. Resistant starch improvement of rice under a combination of acid and heat-moisture treatments. **Food Chemistry**, v. 191, p. 67-73, 2016.

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, p. 2895-2905, 1998.

JANE, J. Current understanding on starch granule structure. **The Japanese Society of Applied Glycoscience**, v. 53, p. 205-213, 2006.

JANE, J.; CHEN, Y. Y.; LEE, L. F.; MCPHERSON, A. E.; WONG, K. S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWAM, T. Effects of amylopectin branch length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 629-637, 1999.

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

JIANG, H.; MIAO, M.; JIANG, F. Y. B.; ZHANG, T. Enzymatic modification of corn starch with 4- α -glucanotransferase results in increasing slow digestible and resistant starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 208-214, 2014.

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

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

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

LI, L.; JIANG, H.; CAMPBELL, M.; BLANCO, M.; JANE, J. Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches. Part I: Relationship between resistant starch contents and molecular structures. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 396-404, 2008.

LI, Y.; XU, J.; ZHANG, L.; DING Z.; GU, Z. Investigation of debranching pattern of a thermostable isoamylase and its application for the production of resistant starch. **Carbohydrate Research**, v. 446, p. 93-100, 2017.

LI, M.; LI, J.; ZHU, C. Effect of ultrasound pretreatment on enzymolysis and physicochemical properties of corn starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 848-856, 2018.

LIU, G.; GU, Z.; HONG, Y.; CHENG, L.; LI, C. Structure, functionality and applications of debranched starch : A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 70-79, 2017.

LIU, H.; GUI, X.; LI, W.; WANG, X.; IV, M.; PENG, Q. Changes in physicochemical properties and in vitro digestibility of common buckwheat starch by heat-moisture treatment and annealing. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 237-244, 2015.

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

LUCKETT, C.R.; WANG, Y.J. Effects of β -amylolysis on the resistant starch formation of debranched corn starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4751-4757, 2012.

MAAREL, M. J. E. C.; VEM, B. C. D.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H. L.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase Family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2002.

MARC, J.E.C.V.D.M.; BART, V.D.V.; JOOST, C.M.U.; HANS, L.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the -amylase Family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2002.

MCCLEMENTS, D. J. Ultrasonic Characterization of Foods and Drinks: Principles, Methods, and Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 1- 46, 1997.

MIAO, M.; JIANG, B.; CUI, S. W TAO ZHANG, T.; ZHENG YU JIN, Z. Slowly digestible starch – a review. **Food Science and Nutrition**, v.55, p.1642–1657, 2014

MUTLU, S.; KAHRAMAN, K.; OZTURK, S. Optimization of resistant starch formation from high amylose cornstarch by microwave irradiation treatments and characterization of starch preparations. **International Journal of Biological Macromolecules**, V. 95, P. 635-642, 2017.

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

PATEL, H.; ROYALL, P.G.; GAISFORD, S.; WILLIAMS, G.R.; EDWARDS, C. H.; WARREN, F. J.; FLANAGAN, B. M.; ELLIS, P. R.; BUTTERWORTH, P. J. Structural and enzyme kinetic studies of retrograded starch: Inhibition of α -amylase and consequences for intestinal digestion of starch. **Carbohydrate Polymers**. v. 154, p.154-161, 2017.

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 147-154, 2008.

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, p. 1-17, 2001.

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

PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; DEON, V. G.; MOOMAND, K.; HALAL, S. L. M.; ZAVAREZE, E. R.; LIM, L. T.; DIAS, A. R. G. Effects of single and dual physical modifications on pinhão starch. **Food Chemistry**, v. 187, p. 98-105, 2015.

REDDY, C. K.; SURIYA, M.; HARIPRIYA, S. Physicochemical 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.

ROBYT, J. F. Enzymes and their action on starch. In J. BeMiller, & R. Whistler(Eds.), *Starch: Chemistry and technology* (pp. 237e292). Amsterdam: Academic Press, 2009.

ROBYT J.F.; FRENCH D. Multiple attack hypothesis of α - amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae* α -amylases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.122, p. 8–16, 1967.

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.

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

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.

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

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

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Hydrolysis of native starches with amylases. **Animal Feed Science and Technology**, v. 130, p. 39-54, 2006.
Taniguchi, H.; Honnda, Y. Amylases. **Applied Microbiology**, p159-153, 2017

TOPPING, D.L.; FUKUSHIMA, M.; BIRD, A. R. Resistant starch as a prebiotic and symbiotic: state of the art. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 171-176, 2003.

VILLAS-BOAS, F.; FRANCO, C. M. L. Effect of bacterial β -amylase and fungal α -amylase on the digestibility and structural characteristic of potato and arrowroot starches. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 795-803, 2016

WANG, D.; MA, X.; YAN, L.; CHANTAPAKUL, T.; WANG, W.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of starch catalyzed by glucoamylase: Investigation on starch properties and degradation kinetics. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 47-54, 2017.

ZAVAREZE, E.R.; DIAS, A.R.G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.317-328, 2011.

ZENG, S.; WU, X.; LIN, S.; ZENG, H.; LU, X.; ZHANG, Y.; ZHENG, B. Structural characteristics and physicochemical properties of lotus seed resistant starch prepared by different methods. **Food Chemistry**, v. 186, p. 213-222, 2015.

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, L.; HU, X.; XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Slowly digestible starch from rice starches by temperature-cycled retrogradation. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 970-974, 2011.

ZHU, F. Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1-17, 2015.

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.

Capítulo II

Pré-tratamentos enzimáticos: Efeito das alfa-amilases fúngica e maltogênica precedendo a desramificação na cinética enzimática e na formação, estrutura molecular, cristalina, térmica e digestibilidade de amidos retrogradados.

Este capítulo está dividido em duas partes: A primeira contém o estudo da cinética de hidrólise dos amidos de batata-doce, mandioca e milho com alto teor de amilose submetidos à ação das α -amilases fúngica e α -maltogênica, cujos resultados foram organizados e publicados no periódico ***Carbohydrate Research***, v. 479, p. 23-30, 2019. A segunda inclui o efeito dessas enzimas precedendo a desramificação na formação e características moleculares, cristalinas, térmicas e de digestibilidade dos amidos retrogradados. Os resultados dessa etapa foram organizados na forma de um manuscrito submetido ao periódico ***Food Hydrocolloids***.

Influence of molecular structure on the susceptibility of starch to α -amylase

Flávia Villas-Boas^a, Yasmin Yamauti^a, Marcia Maria de Souza Moretti^a, Celia M. L. Franco^{a*}

UNESP — São Paulo State University, Department of Food Engineering and Technology

Abstract

The effect of the molecular structure of sweet potato (SPS), cassava (CAS) and high amylose maize (HAS) starches on the susceptibility to fungal and maltogenic α -amylases was investigated. The logarithm of the slope (LOS) and non-linear least-squares (NLLS) methods were used for fitting hydrolysis kinetics data. The maltooligosaccharides released during hydrolysis were quantified and the hydrolysis residues were analyzed. The hydrolysis kinetic curves were well fitted to the LOS and NLLS models. SPS, CAS and HAS were hydrolyzed in one single phase by fungal α -amylase while two hydrolysis phases were identified for the root starches and a single phase for HAS, when maltogenic α -amylase was used. The lowest percentage of residual starch was found for CAS, independent of enzyme source, due to the high proportion of amylopectin short chains in this starch. On the other hand, the high proportion of HAS long chains contributed to its increased starch degradation rate coefficient during fungal α -amylase hydrolysis, while the high amylose content favored the endo-action pattern of maltogenic α -amylase. Independent of starch source, maltooligosaccharides of different sizes, especially G2- G5, were released after the fungal α -amylase action which hydrolyzes mainly inner and long amylopectin chains. Mainly maltose was produced in the maltogenic α -amylase hydrolysis which breaks the outer amylopectin chains by exo-action and amylose chains by endo-action. The starch

molecular structure strongly interferes in both enzyme susceptibility and the action mechanism, as well as in the distribution and amount of products released.

Keywords: Starch; Hydrolysis kinetics; Chain length; Enzyme action mechanism

1. INTRODUCTION

Starch is a polysaccharide that has special physicochemical properties that determine its behavior and make it an important ingredient for a wide variety of food products. Structurally, starch is constituted of two polymers of glucose, (i) amylose, an essentially linear polymer formed by glucose units linked by α -1,4 linkages, and (ii) amylopectin, a highly branched polymer, consisting of numerous short chains of (1–4)- α -D-glucans that are interconnected by α -1-6 linkages, these links being responsible for ramifications [1,2] The amylose and amylopectin chains are arranged radially within the granule, with non-reducing ends pointing to the granule surface forming a semicrystalline structure where amylopectin is associated with crystalline regions (double helices) and amylose and branching points are associated with amorphous areas [3,4]. The functionality of the starch depends on the physical organization of these two macromolecules within the granular structure as well as the ratio between them and their size distribution, which vary according to the botanical origin of the starch. The hydrolysis of starch catalyzed by amylases is one of the most important enzymatic reactions applied in the food, drink and pharmaceutical industries [5]. Amylolysis produces modifications in the starch structure and changes its functional properties. The way in which these modifications occur is determined by the mechanism of action of the particular enzyme. Differences in the enzymatic susceptibility of granular starches have been attributed to interactions between many factors, such as botanical source, granule size, amylose and amylopectin ratio, polymorphic type (A, B or C) and crystallinity, type of enzyme and hydrolysis conditions (concentration, pH, temperature) [4,6–8]. However, after gelatinization, the granular

and crystalline structures are lost and thus the different enzymatic susceptibilities between starches, and the products obtained from hydrolysis are deeply affected by the starch molecular structure, as well as the characteristics and mechanism of action of the enzyme [9–11].

The effect of the amylopectin molecular structure on the pancreatic α -amylase hydrolysis of normal and waxy rice starches was investigated [12]. The authors observed that the higher proportion of intermediate and long chains (DP 25–36 and DP $\geq$ 37) and the lower proportion of DP 13–24 chains contained in waxy rice starch strongly contributed to the higher resistance of this starch to the enzyme, compared to normal rice starch. On the other hand, the oat starch was found to be less susceptible to this enzyme than rice starch due to its higher amylose content, larger amylose chain size and lower proportion of amylopectin short chains, when compared to the rice starch [11].

Fungal α -amylase (glucan α -1,4-maltohydrolase EC.3.2.1.1.3) is an endoenzyme that breaks α -1,4-glycosidic linkages present in the inner part of amylose and amylopectin chains by a random hydrolysis mechanism releasing maltose, maltotriose and other malto-oligosaccharides with higher degree of polymerization (DP), as well as α -limit dextrins [9,13], while maltogenic α -amylase (glucan α -1,4-maltohydrolase EC 3.2.1.1.33) catalyzes the hydrolysis of α -1,4-glycosidic linkages releasing maltose as the main product [14,15]. Although its mode of action is not completely understood, it is known that this enzyme has an endo/exo-mechanism, besides having a mechanism of multiple attack especially on the amylopectin chains [9].

Both of the amylases are important for the baking and starch syrup industries. They can also be used as a pretreatment preceding debranching and retrogradation of starch to potentiate resistant starch production. In baking industry, fungal α -amylase is mainly added for increasing the level of fermentation substrate and reducing sugars for

Maillard reaction during baking, while maltogenic α -amylase is used as an anti-staling agent [13,16]. In extremely high maltose syrup production, the level of glucose and malto-oligosaccharides, considered impurities, reach almost 30% [17], while in resistant starch production an ideal chain length is required for retrogradation [18]. Thus, understanding the molecular structure features of starch and its influence on the enzymatic susceptibility may contribute for a correct choice of the enzyme and botanical source of starch for a particular process.

Most of the studies on starch enzymatic hydrolysis have reported the starches from conventional botanical sources such as maize, wheat, and potato [12,19–21]. In this work, we have considered starches from cassava, sweet potato, and high amylose maize. Both the roots are two of the world's main carbohydrate sources [22,23], mainly in tropical areas. In 2017, world production of cassava was estimated to be 291.92 million tons, while production of sweet potato was estimated to be 112.83 million tons [24]. These starchy crops have cultural and economic importance in tropical countries and must be valued especially because the starch extraction process is simple and cheap. The high amylose maize starch was used for evaluating and comparing the influence of the amylose content on the susceptibility of starch to α -amylase.

The application of the logarithm of the slope (LOS) method for analyzing the starch hydrolysis curves using the first-order enzyme kinetic can identify and quantify the starch hydrolysis at different points in time. The parameters obtained from the LOS plot have been used to promote a better understanding about the effect of starch molecular structure on its enzymatic degradation [10–12,19].

Thus the present study aims to evaluate the influence of the molecular structure of the sweet potato, cassava and high amylose maize starches on the mechanism of action of fungal α -amylase and maltogenic α -amylase. The kinetics of the cooked starch hydrolysis rates were estimated using logarithm-of-slope analysis (LOS)

combined with a modified - nonlinear least-square (NLLS) method, with a method reported previously [25].

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material

The starches were isolated from fresh roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*), Canadian cultivar, kindly provided by the Tropical Root Center (CERAT/UNESP) and fresh roots of cassava (*Manihot esculenta*), Cascudinha cultivar, donated by PROMAFA-cassava products Fadel Ltda (Palmital, Brazil). Commercial high amylose maize starch (AmyloGel 03003, Cargill Agricola S/A, Sao Paulo, Brazil) was also used. Fungal α -amylase from *Aspergillus oryzae* (Sigma, USA, 53,000 U) and maltogenic α -amylase from *Bacillus sp* (Novamyl® 1.000 BG, 10,000 U) were used in the starch hydrolysis. The chemical compositions of the previously isolated sweet potato and cassava starches, along with the high amylose maize starch, were determined using the methods of the American Association of Cereal Chemists [26]. The sum of the levels of lipids, proteins and ash was very low (< 1%) indicating that the starches were pure for analysis purposes. The sweet potato, cassava, and high amylose maize starches used in this work were denominated SPS, CAS, and HAS, respectively.

2.2. Amylose content and distribution of branch-chain length of amylopectin

The starches were defatted and the amylopectin was separated from the amylose by amylose-butanol complex formation [27]. Iodine affinities of the isolated amylopectins and defatted starches were determined [28] and measured using a 716 DMS Titrimetric potentiometric autotitrator (Metrohm, Herisau, Switzerland). The apparent amylose content was calculated by dividing the iodine affinity of the defatted starch by 20% [29], and the absolute amylose content was assessed by subtracting the iodine

affinity of the isolated amylopectin from that of the defatted starch [28]. The branch-chain length distributions of the amylopectins were analyzed by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) using an ICS 3000 system (Dionex Corporation, USA) equipped with an AS40 auto sampler following the methodology described by Costa et al. [23].

2.3. Starch hydrolyses

Starch suspensions (6% w/v) in an acetate buffer 0.1 M, pH 5.0, were heated in a bath of boiling water for 30 min and autoclaved at 121 °C for 30 min to ensure complete starch gelatinization. The hydrolysis was performed in a Dubnoff type water bath (Marconi, Piracicaba, Brazil) under agitation (100 rpm). The temperature was adjusted to 55 °C and fungal α -amylase or maltogenic α -amylase (5 U/g starch) was added. Aliquots of the reaction mixture (0.1 mL) were taken after 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 540, 720 and 1440 min, added to 0.9 mL of hot water, boiled for 15 min for enzyme inactivation, and centrifuged at 10,000 *g* for 10 min. The supernatant was analyzed for total carbohydrate content [30]. The hydrolysis percentage was calculated based on the relationship between the total sugar content and the initial starch mass. The starch degradation data have been plotted using the logarithm of the slope (LOS) method and non-linear least-squares (NLLS) method [25]. The LOS plot was used to identify if more than one phase occurred during the hydrolysis period and the NLLS method was used to obtain the starch degradation rate coefficient (*k*) and residual (non-hydrolyzed) starch content (*C_{res}*). The malto-oligosaccharides (G 1–7) released after 180, 360, 540 and 720 min by the action of amylases were also determined from the supernatant. The hydrolysis residues at these times were recovered using anhydrous ethanol and centrifuged at 7000 *g* for 20 min. The precipitate was maintained at 40 °C for 40 min to evaporate any residual ethanol

and then lyophilized. All hydrolysis experiments were carried out in duplicate in different days.

2.4. Determination of malto-oligosaccharides (DP 1-7) released by action of amylases

The amounts of glucose (G1), maltose (G2), maltotriose (G3), maltotetraose (G4), maltopentaose (G5), maltohexaose (G6), and maltoheptaose (G7) were determined by HPAEC-PAD. The filtered (0.22 μ m) sample (20 μ L) was automatically injected into the HPAECPAD system. The columns, flow rate and eluents were those described by Costa et al. [23]. The eluent gradients were: 0–10 min, linear gradient of 100mM sodium hydroxide; 10–25 min, gradient from 70mM to 130mM sodium acetate and linear gradient of 100mM sodium hydroxide; 25–30 min, linear gradient of 100mM sodium hydroxide. A standard curve with a mixture of maltodextrins (DP 1–7) at concentrations of 2–70 μ g was used to quantify the malto-oligosaccharides.

2.5. Distribution of molecular components of hydrolysis residues

Starches and hydrolysis residues at 0, 180, 360, 540, and 720 min were debranched [31], with modifications. Samples were suspended in an acetate buffer (pH 5.0) with pullulanase added (40 U/g sample). The mixture was incubated for 24 h at 50 °C and then boiled for 20 min for enzyme inactivation. Debranched starch and debranched hydrolysis residues were recovered by precipitation with anhydrous ethanol and lyophilized. Molecular size distribution of these samples was performed in duplicate using a Bio-Gel P6 column (Bio-Rad, Hercules, USA). Debranched starch or debranched hydrolysis residues (100 mg) were dispersed in 90% DMSO solution (10 mL) boiled under stirring for 30 min and stirred for another 16 h at room temperature. Aliquots containing 1.5 mL were dispersed in 5 mL of deionized water and 1 mg of glucose was added. The mixture was constantly stirred in a boiling water bath for 30

min and then cooled to room temperature. A 3.6 mL aliquot of the mixture was applied to the top of a column (100 cm×1.0 cm) packed with Bio-Gel P6, and downwardly eluted at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions of 2.5 mL were collected every 5 min and analyzed for total carbohydrates using the phenol-sulfuric method [30]. The reducing value of the fractions at each peak was determined using the modified Park-Johnson method [32]. The average degree of polymerization was calculated from the ratio of total carbohydrate/reducing value at each peak fraction [31].

2.6. Statistical analysis

Starch hydrolysis was performed in duplicate. All the other analyses were done in duplicate except the amylose content that was determined in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) was applied using the Statistica software, v. 7.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, USA). Differences were evaluated using the Tukey test. The significance level was set at a p value ≤ 0.05 . The NLLS fitting was performed using Excel 2013 with the NLLS minimization tool “Solver” (Microsoft, Redmond, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Amylose content of the starches and distribution of amylopectin branch-chain length

As expected, the highest level of amylose was observed in HAS followed by CAS and SPS (Table 1). The iodine affinities of the starches and isolated amylopectin are shown in supplementary material (anexo 1, Table S1).

The levels of apparent and absolute amylose of the HAS were 62.0 and 50.2%, respectively. Similar results have been found for amylo maize VII [33] and Gelose50 [34] both of them high amylose maize starches. The high iodine affinity of amylopectin chains of this starch indicates a high proportion of long side chains, which are capable of complexing with iodine and overestimate the amylose content. The apparent

amylose content of the SPS and CAS were similar and close to 24%. However, SPS amylopectin had higher iodine affinity when compared to CAS amylopectin, indicating that their branch chains are longer than those of CAS.

Table 1 - Branch-chain length distribution of amylopectin and amylose content of CAS, SPS, and HAS

Starch	Chain length (%)				DP	Amylose content (%)	
	DP(6-12)	DP(13-24)	DP(25-36)	DP(≥ 37)		Apparent	Absolute
SPS	23.6(0.1) ^b	45.9(0.1) ^a	14.5(0.2) ^b	16.0(0.0) ^c	22.7 ^b	24.5(0.6) ^c	16.9(0.2) ^c
CAS	27.2(0.1) ^a	43.8(0.0) ^b	13.4(0.1) ^c	15.6(0.1) ^b	22.1 ^c	23.7(0.3) ^b	18.3(0.6) ^b
HAS	11.2(0.0) ^c	38.8(0.2) ^c	19.3(0.2) ^a	30.7(0.1) ^a	30.3 ^a	62.7(0.2) ^a	50.2(0.4) ^a

Average of the two replicates (chain length) and three replicates (amylose content) followed by standard deviation. DP: degree of polymerization. Values with different letters in the same column are significantly different ($p \leq 0.05$).

Standardized distributions of the amylopectin branch-chain lengths of SPS, CAS and HAS are shown in Table 1. Among the starches studied, HAS had the longest average chain length (DP 30.3) followed by SPS (DP 22.7) and then CAS (DP 22.1). These results corroborate the apparent and absolute amylose contents shown Table 1.

Starch granules have different polymorphisms exhibiting different crystalline patterns (A, B and C), which depend on the amylopectin branch-chain length. Starches with longer branch-chains have a B-type pattern, while those with shorter branch-chains display an A-type pattern [35, 36]. The C-type pattern consists of a combination of the two structures A and B [3]. CAS had the highest proportion (27.2%) of short chains (DP 6–12) and the lowest number of long chains (DP ≥ 37) when compared to the others starches, a typical characteristic of the A-type crystalline pattern, as already reported in the literature [13,23]. Starches containing high amylose content are reported to have a B-type crystalline pattern [33,37,38], HAS had the lowest proportion of chains with DP 6–12 (11.2%) and the highest of chains with DP ≥ 37 (30.7%), which favored the longest average chain length of this starch. On the other hand, SPS had

intermediate amounts of long and short branch chains, a typical behavior of C-type pattern starch as has been described in literature [39]. The crystalline patterns of the three native starches were confirmed using a benchtop X-ray diffractometer (Mini Flex 300, Rigaku, Tokyo, Japan) as shown in supplementary material (anexo 1, Figure S1).

3.2. Starch hydrolysis

The hydrolysis kinetics of the starches is shown in Figure 1 and the starch degradation rate coefficient (k) and residual (non-hydrolyzed) starch content (C^∞) are given in Table 2. The hydrolysis data was fitted into the LOS and NLLS models for both the enzymes used. The LOS plot revealed only one hydrolysis step, regardless of the starch botanical source, when fungal α -amylase was used (Figure 1, a1, b1, c1). The number of hydrolysis phases is dependent on enzyme specificity and mode of action. Studies with granular starches [12, 40–44] have extensively shown that the hydrolysis is quicker in the first phase because the readily exposed starch fractions (amorphous areas) are more easily accessed by the enzyme. In the slower phase, the hydrolysis of the fractions with more difficult access (crystalline areas) occurs. On the other hand, the hydrolysis of gelatinized starches, in general, occurs in a single phase since the gelatinization makes the starch completely accessible to the enzyme [25].

Adjusting the data by the NLLS method, the CAS had the lowest C^∞ (Table 2), indicating this starch to be the most susceptible to fungal α -amylase. This probably occurred due to the high proportion of chains with DP 6–12 in the CAS amylopectin (Table 1).

A-type starch, such as CAS, has a high proportion of short chains in the same cluster due to the greater number of branches [35], which are more widely dispersed within the cluster [1] increasing the number of access points for the reaction between amylase and the substrate [45]. On the other hand, although HAS is the most resistant

to fungal α -amylase ($> C^\infty$), when compared to the other starches, it had the highest starch degradation rate coefficient (k). Starches with higher C^∞ do not always have lower k [25]. The highest value of k can be attributed to the high proportion of long chains in HAS, mainly in the amylopectin.

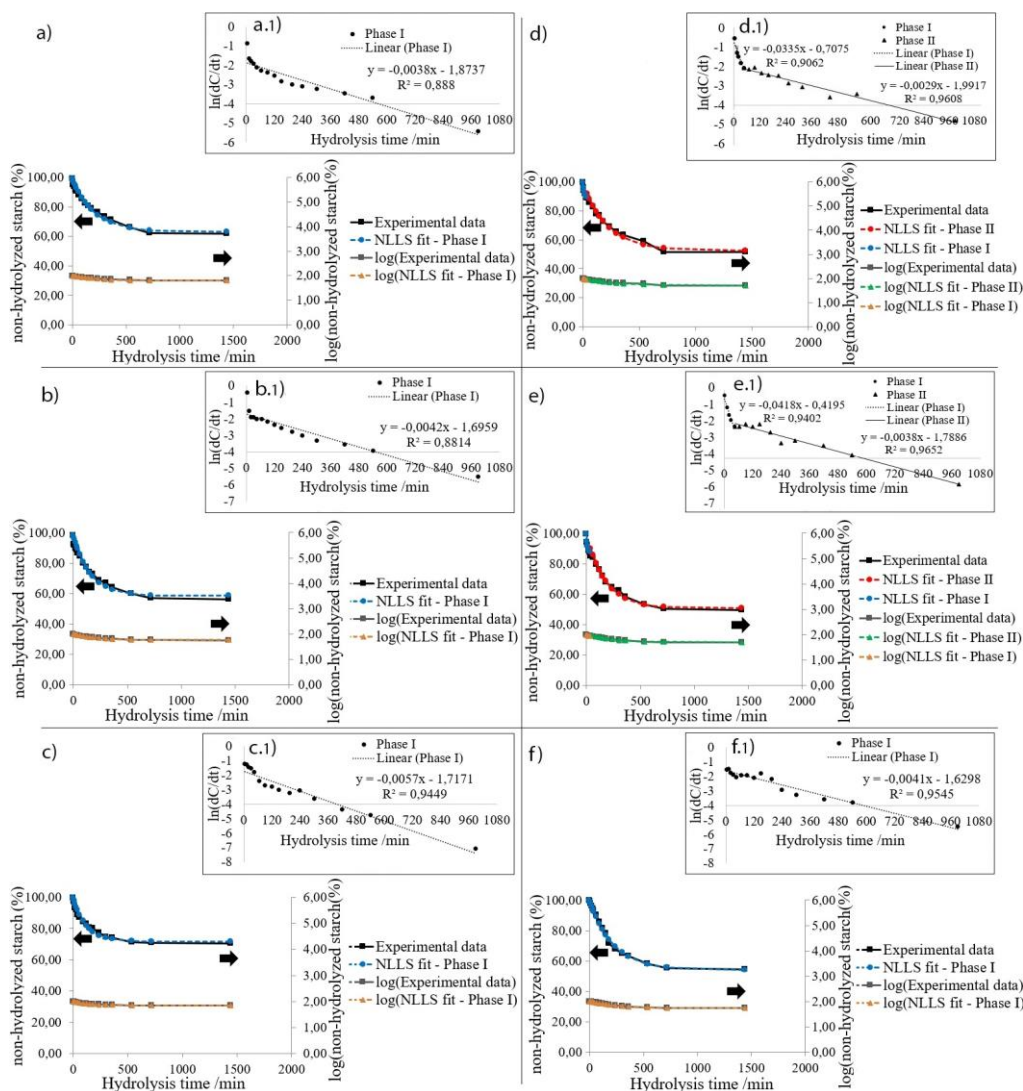


Figure 1 - Kinetics of hydrolysis of SPS, CAS and HAS by fungal α -amylase (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f) using the logarithm of slope fit (LOS) (a1 – f1) and the non-linear least-squares fit (NLLS) (a - f), with both as a linear and logarithmic representation.

Studies have shown that amylose and amylopectin long chains favor the random action pattern of fungal α -amylase and so the longer chains that connect to different clusters are hydrolyzed by the enzyme first [9,46]. However, the high amylose

content of HAS limits its degradation. Amylose has a high tendency to retrograde so, with increasing incubation time, these molecules re-associate reducing their susceptibility to the enzyme [10,47]. SPS had intermediate values of C_{∞} and the lowest k values when compared to CAS and HAS.

Table 2 - Values of starch degradation rate coefficient ($k \cdot \text{min}^{-1}$) and percentage of residual starch ($C_{\text{res}} \%$) calculated by NLLS method for SPS, CAS, and HAS

Hydrolysis		Fungal α -amylase			
Phase	Starches	$k \cdot \text{min}^{-1}$		$(C_{\text{res}} \%)$	
		Norm	Log	Norm	Log
Phase I	SPS	0.0047(0.000) ^c	0.0044(0.000) ^c	62.60(0.48) ^b	61.99(0.59) ^b
	CAS	0.0064(0.000) ^b	0.0059(0.000) ^b	58.24(0.17) ^c	57.43(0.18) ^c
	HAS	0.0080(0.000) ^a	0.0077(0.000) ^a	71.35(0.57) ^a	70.99(0.62) ^a
Maltogenic α -amylase					
		$k \cdot \text{min}^{-1}$		$(C_{\text{res}} \%)$	
		Norm	Log	Norm	Log
Phase I	SPS	0.061(0.009) ^b	0.060(0.008) ^b	88.00(0.23) ^a	87.93(0.23) ^a
	CAS	0.099(0.000) ^a	0.098(0.000) ^a	86.80(0.12) ^a	86.76(0.14) ^a
	HAS	0.0046(0.004) ^c	0.0047(0.000) ^c	54.35(0.60) ^b	54.53(0.63) ^b
Phase II	SPS	0.0045(0.000) ^b	0.0043(0.000) ^b	52.9(0.55) ^a	52.29(0.65) ^a
	CAS	0.0054(0.000) ^a	0.0052(0.000) ^a	48.4(0.91) ^b	48.36(1.40) ^b
	HAS	-	-	-	-

Average of the four replicates followed by standard deviation. Values with different letters in the same column and phase are significantly different ($p \leq 0.05$).

When maltogenic α -amylase was used, however, the LOS plot revealed a discontinuity that occurred between 30 and 40 min of hydrolysis for the root starches (SPS and CAS) (Figure 1, d1, e1). This was not observed for HAS (Figure 1, f1). These results indicate that SPS and CAS were hydrolyzed in two steps, with a faster k in phase I, especially for CAS, and a slower k in phase II, more significant for SPS (Table 2), suggesting the number of phases to the hydrolysis for gelatinized starch depends not only on the action mechanism of the enzyme but also on the molecular structure of the starch.

Maltogenic α -amylase is able to hydrolyze both internal and external chains of starch due to its endo-exo mechanism. Its exo-action preferentially occurs in the

external chains of amylopectin, while its endo-attack mainly occurs in amylose molecules [48]. Therefore, the hydrolysis of CAS and SPS by this enzyme occurring in two phases can be attributed to the high amylopectin content of these starches. In addition, as discussed previously, starches with a high proportion of short chains, like CAS (A-type starch) and SPS (CA-type starch), have a greater number of branches when compared to HAS (B-type starch) that favors the multiple attack mechanism on amylopectin chains. Therefore, in the early stages of hydrolysis of these root starches, maltogenic α -amylase preferentially acts on the external chains of amylopectin by a multiple attack mechanism. As occurred in the hydrolysis with fungal α -amylase, CAS showed the lowest C^∞ when hydrolyzed with maltogenic α -amylase due to its structural characteristics. On the other hand, for HAS, only one hydrolysis phase was seen and it had a low k (0.0046 min^{-1} , Table 2) probably due to the large amount of amylose favoring the enzyme endo-action pattern and so leading to a decrease in the speed of reaction. Although having a slower hydrolysis rate, HAS was more susceptible to maltogenic α -amylase when compared to fungal α -amylase. This can be attributed to the hydrolysis of amylose chains by the endo-mechanism seen with this enzyme. This implies that, for this starch, the maltogenic α -amylase attacks the amylose molecules from the beginning of hydrolysis.

The starches were more susceptible to maltogenic α -amylase action, when compared with fungal α -amylase. These results were confirmed by lower C^∞ values obtained after 1440 min for the maltogenic α -amylase hydrolysis (Table 2). Both amylases used in this work are endoenzymes, which hydrolyze α (1–4) bonds of amylose and amylopectin chains. Nevertheless, while fungal α -amylase hydrolyzes only one glycosidic bond by enzyme-substrate encounter (random attack), several glycosidic bonds may be broken successively by maltogenic α -amylase before the enzyme dissociates from the substrate (multiple attack) [9,14]. In addition, maltogenic α -amylase also hydrolyzes the outer chains of amylopectin by exo-action [14,48].

3.3. Identification of malto-oligosaccharides released by amylases action

The malto-oligosaccharides resulting from enzymatic action differ depending on the origin of amylase because they are determined by the architecture of the enzyme active site. The total number of subsites at each catalytic site, as well as the position of catalytic residue, determines the distribution of the products released after enzyme action [48,49].

The distribution profile of the products released by fungal α -amylase from the starches was similar, independent of the starch botanical source. There were significant amounts of G2 to G7 that slightly increased with hydrolysis time (Figure 2 a, b, c). This can be attributed to the presence of nine subsites at the active site of the enzyme, each one capable of accommodating only one glucose residue, and also the random action mechanism of the enzyme [48,49].

The main malto-oligosaccharides released by fungal α -amylase were G2 and G3, especially for CAS and SPS. Expressive amounts of maltose and maltotriose being released by fungal α -amylase action on potato starch were also found by Sahnoun et al.[50]. The structural characteristics of the starches influenced the amount of each product. Although CAS is more susceptible to fungal α -amylase (Table 2), the action of the enzyme on this starch produced lower concentrations of malto-oligosaccharides when compared to SPS, especially G2-G5. These results suggest the fungal α -amylase action on the CAS released higher amounts of malto-oligosaccharides with $G > 7$, which were not quantified in this work due to the absence of any specific pattern. Malto-oligosaccharides up to G10 were found when the hydrolysis of waxy corn starch with fungal α -amylase was studied [49].

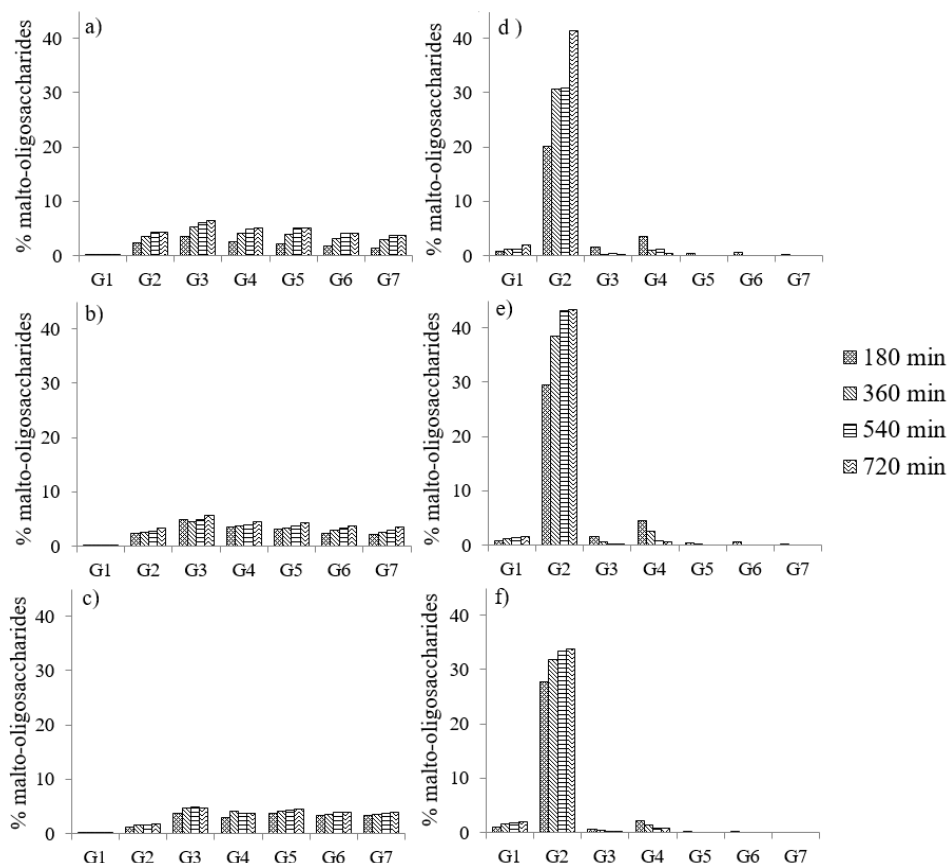


Figure 2 - Percentage of glucose (G 1), maltose (G 2), maltotriose (G 3), maltotetraose (G 4), maltopentose (G 5), maltohexaose (G 6), maltoheptose (G 7), produced by hydrolysis of SPS, CAS and HAS by fungal α -amylase (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f).

HAS had the lowest amount of G2, when compared to the other starches. This can be related to the high number of long chains in this starch (Table 1) and the high specificity of fungal α -amylase for long chains releasing α -limit dextrins.

In general, the distribution profiles of malto-oligosaccharides released by maltogenic α -amylase action on the starches were also similar, independent of the starch source. There was a great predominance of G2 (Figure 2 d, e, f). The maltogenic α -amylase is a maltose forming enzyme, since its active site has five subsites with a single starch-binding domain, which generates maltose [13,48]. The amount of maltose gradually increased with the increase in hydrolysis time, mainly for

SPS and CAS. This increase was less expressive in HAS probably due to the lower susceptibility of this starch to hydrolysis.

In the first 180 min of hydrolysis, independent of starch source, small amounts of G3 and G4 were also detected, which reduced over time while increasing the G1 and G2 contents. These results show that for longer incubation times, G3 and G4 were degraded by the enzyme. Similar results were found by Pan et al. [45] who reported that maltogenic α -amylase could also release malto-oligosaccharides like G4, G5, and G6, and then degrade them into maltose.

3.4. Molecular size distribution of the hydrolysis residue components

The distributions of molecular components of the hydrolysis residues after 0, 180, 360, 540, and 720 min of treatment were evaluated by gel permeation chromatography (Bio-Gel P6) after pullulanase debranching. To better visualize the results, the chromatograms obtained from 0, 180 and 720 min of hydrolysis are shown in Figure. 3, while the data from the intermediate times, which followed the same trend as the start and finish times, are shown in the supplementary material (anexo 1, Figure S2).

The chromatograms of the debranched hydrolysis residues (0 h -control) exhibited a profile containing four peaks, no matter the starch source. The first peak (I) corresponded to amylose molecules and very long chains of amylopectin (B4) which have large molecular mass and were eluted in the column void volume. The second peak (II) corresponded to amylopectin long chains (B2 and B3) with DP between 40 and 50, followed by a third peak (III) which corresponded to the short and intermediate chains (A and B1) with average DP of 16. The last peak corresponded to glucose (G), added to the sample to mark the end of elution. The amylopectin molecule consists of A, B (B1–B4) and C chains. The fractions with DP < 13 and DP 13–30 comprise the

short (A) and intermediate (B1) chains, respectively, and the chains with DP > 30 correspond to the long chains (B2–B4) [51].

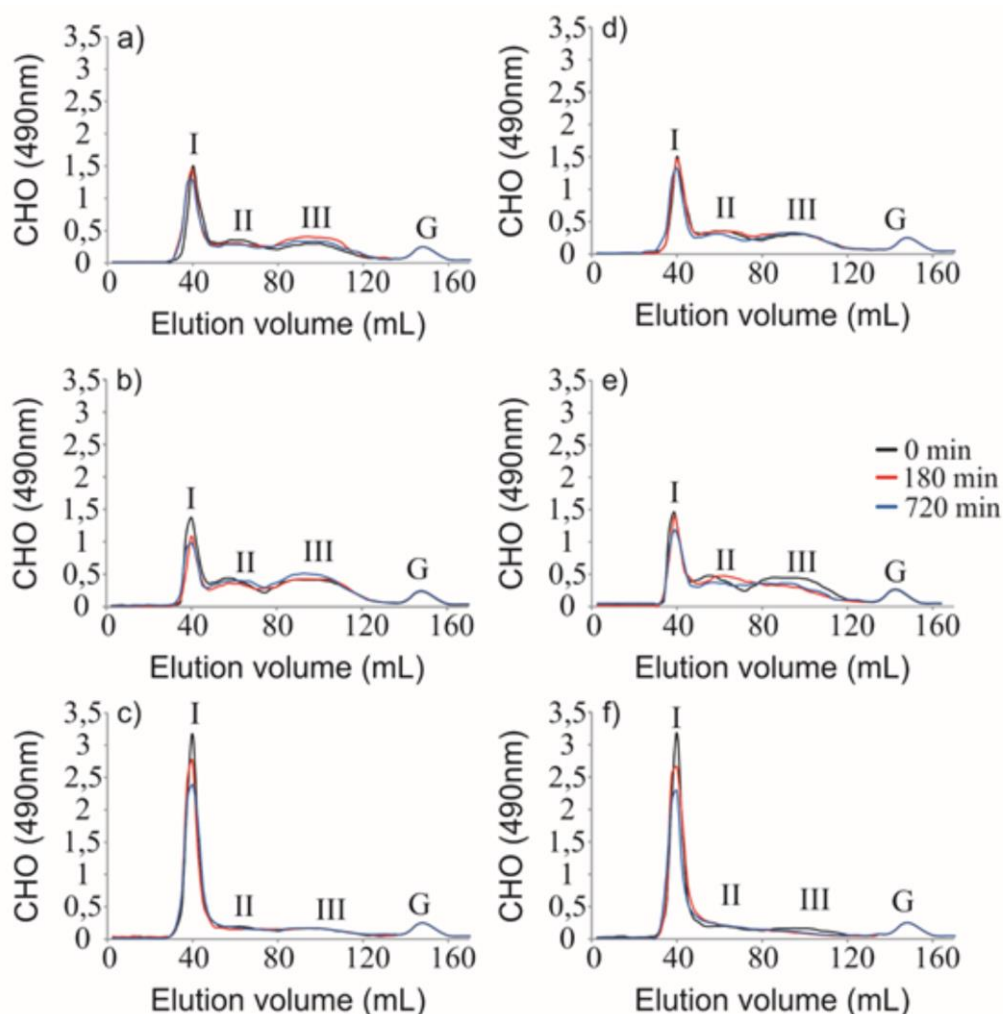


Figure 3- Elution profiles of the hydrolysis residues of SPS, CAS and HAS by fungal α -amylase (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f) after 0, 180 and 720 min obtained by Bio-Gel P6 permeation chromatography: CHO : total carbohydrate; (G) = Glucose.

CAS had the highest peak III intensity followed by SPS while the HAS peak III intensity was low, confirming the higher proportion of A and B1 chains in the root starches (Table 1). On the other hand, HAS displayed the highest intensity for peak I when compared to the other starches, corroborating its high amylose content and high proportion of long chains.

Independent of the starch, there was a decrease in peaks I and II and an increase in peak III as the fungal α -amylase hydrolysis time increased (Figure 3 a, b, c). These results indicate that amylose and very long and long chains of amylopectin were mainly hydrolyzed. Peak I reduction occurred more intensely with HAS, probably due to its highest content of very long chains (amylose and amylopectin) (Table 1). These results corroborate the high k value observed in hydrolysis kinetic of this starch (Table 2). As discussed in a previous paper [18], due to the random action of fungal α -amylase on the substrate, the number of breaks on a given chain is higher the higher its DP. In addition, fungal α -amylase hydrolyzes by endo-action, preferably, the longer internal chains of amylopectin (B2–B4), which connect to different clusters, thus releasing individual clusters and, later, the hydrolysis of chains within these clusters occurs [18,48].

The action of the maltogenic α -amylase caused a progressive reduction in peaks I and III, and a right displacement of peak II for CAS and HAS (Figure 3e and f). These results indicate that this enzyme acted by endo-action on the very long chains (Peak I) and by exo-action on the outer chains (A, B1) of amylopectin. On the other hand, there was a slight reduction in peaks I and II and an increase and enlargement in peak III for SPS (Figure 3 d). In this starch, it seems that the enzyme acted more intensely by exo-action on the amylopectin long chains (B2–B3), probably because this starch has a low amount of short chains (DP 6–12) when compared to CAS.

Studies have shown maltogenic α -amylase has not significant action on the amylopectin inner chains [16,48]. However, after long hydrolysis times, when the amylopectin outer chains have been broken, the internal part of the molecule becomes more accessible to the enzyme, whereas the endo-attack preferentially occurs on the amylose chains [48]. These results suggest that the maltogenic α -amylase mainly induced the breaking of amylose chains by endo-action on all the starches but it was more pronounced for HAS due to its high amylose content. In CAS, besides chains B2–

B3, maltogenic α -amylase acted more intensely on the short chains (A) and with increasing hydrolysis time, the most significant breakdown of amylopectin long chains occurred because they became more readily exposed to the maltogenic α -amylase.

4. CONCLUSION

The study was conducted to understand the relationship between molecular structure and enzymatic susceptibility (fungal and maltogenic α -amylases) in starches from cassava, sweet potato (important carbohydrate sources mainly in tropical countries) and high amylose maize starch, used due to its high amount of amylose (> 50%). Cassava starch was the most susceptible to the enzymes while high amylose maize starch the most resistant. All the starches were hydrolyzed with fungal α -amylase in one single phase while the root starches treated with maltogenic α -amylase had two steps of hydrolysis. The high proportion of short chains (DP 6–12) in the root starches favors the multiple attack mechanism of the enzyme that preferentially occurs on the outer chains of amylopectin. Amylose content and distribution of amylopectin branch-chain length influence the resistance of starch to enzymes and reaction velocity. The higher the amylose content and proportion of long branch-chains (DP $\geq$ 37) of amylopectin the higher the level of residual starch (C_∞). Although the high amylose amount in maize starch limits its degradation, the high proportion of long chain (DP > 50) favors the higher velocity of hydrolysis with fungal α -amylase due to random action of this enzyme. The main malto-oligosaccharides released by fungal α -amylase are maltose and maltotriose, while maltogenic α -amylase produces besides maltose, small amounts of maltotriose and maltotetraose, which are broken in glucose and maltose with increasing the reaction time. Therefore, when using these enzymes in food systems or for production of modified starch, it should be taken into account that the structural characteristics of starch affect both the enzyme action pattern, as well as the

distribution and amount of any released products. Understanding this relationship can facilitate the choice of specific starch and enzyme for a given application.

Acknowledgements

The authors thank the São Paulo State Research Foundation – FAPESP – (grants n° 2017/19521-1), National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (grant n° 307942/2015-5) in Brazil for financial support, and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES for their scholarship awarded to the first author.

5. REFERENCES

- [1] J. Jane, Current understanding on starch granule structures, *J. Appl. Glycosci.* 53 (2006) 205–213 <https://doi:10.5458/jag.53.205>.
- [2] J.N. BeMiller, R.L. Whistler, *Starch: Chemistry and Technology*, Academic Press, 2009.
- [3] A. Buléon, P. Colonna, V. Planchot, S. Ball, Starch granules: structure and biosynthesis 23 (1998) 85–112 [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00040-3).
- [4] E.R. Zavareze, A.R.G. Dias, Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: a review, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 317–328 <https://doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.064>.
- [5] A. Sharma, T. Satyanarayana, Microbial acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications, *Process Biochem.* 48 (2013) 201–211 <https://doi:10.1016/j.procbio.2012.12.018>.
- [6] R.F. Tester, X. Qi, J. Karkalas, Hydrolysis of native starches with amylases, *Anim. Feed Sci. Technol.* 130 (2006) 39–54 <https://doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.01.016>.

- [7] T.S. Rocha, A.P.A. Carneiro, C.M.L. Franco, Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of root and tuber granular starches, *Food Sci. Technol.* 30 (2010) 544–551 <https://doi:10.1590/S0101-20612010000200039>.
- [8] H. Liu, X. Guo, W. Li, X. Wang, M. Lv, Q. Peng, M. Wang, Changes in physicochemical properties and in vitro digestibility of common buckwheat starch by heat moisture treatment and annealing, *Carbohydr. Polym.* 132 (2015) 237–244 <https://doi:10.1016/j.carbpol.2015.06.071>.
- [9] A. Bijttebier, H. Goesaert, J.A. Delcour, Amylase action pattern on starch polymers, *Biologia (Bratisl)* 63 (2008) 989–999 <https://doi:10.2478/s11756-008-0169-x>.
- [10] Z.A. Syahariza, S. Sar, J. Hasjim, M.J. Tizzotti, R.G. Gilbert, The importance of amylose and amylopectin fine structures for starch digestibility in cooked rice grains, *Food Chem.* 136 (2013) 742–749 <https://doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.053>.
- [11] J. Xu, Q. Kuang, K. Wang, S. Zhou, S. Wang, X. Liu, S. Wang, Insights into molecular structure and digestion rate of oat starch, *Food Chem.* 220 (2017) 25–30 <https://doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.191>.
- [12] L. Guo, Y. Xiao, C. Zhu, S. Wang, X. Du, B. Cui, In vitro enzymatic hydrolysis of amylopectins from rice starches, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1001–1009 <https://doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.138>.
- [13] L.J. Derde, S.V. Gomand, C.M. Courtin, J.A. Delcour, Characterisation of three starch degrading enzymes: thermostable β -amylase, maltotetraogenic and maltogenic α -amylases, *Food Chem.* 135 (2012) 713–721 <https://doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.031>.
- [14] P. Leman, H. Goesaert, J.A. Delcour, Residual amylopectin structures of amylase treated wheat starch slurries reflect amylase mode of action, *Food Hydrocolloids* 23 (2009) 153–164 <https://doi:10.1016/j.foodhyd.2007.12.007>.

- [15] M. Miao, S. Xiong, B. Jiang, H. Jiang, S.W. Cui, T. Zhang, Dual-enzymatic modification of maize starch for increasing slow digestion property, *Food Hydrocolloids* 38 (2014) 180–185 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.006>.
- [16] H. Goesaert, L. Slade, H. Levine, J.A. Delcour, Amylases and bread firming – an integrated view, *J. Cereal Sci.* 50 (2009) 345–352 <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2009.04.010>.
- [17] Y. Sun, X. Duan, L. Wang, J. Wu, Enhanced maltose production through mutagenesis of acceptor binding subsite +2 in *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase, *J. Biotechnol.* 217 (2016) 53–61 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.11.007>.
- [18] F. Villas-Boas, C.M.L. Franco, Effect of bacterial β -amylase and fungal α -amylase on the digestibility and structural characteristics of potato and arrowroot starches, *Food Hydrocolloids* 52 (2016) 795–803 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.024>.
- [19] W. Zou, M. Sissons, M.J. Gidley, R.G. Gilbert, F.J. Warren, Combined techniques for characterizing pasta structure reveals how the gluten network slows enzymic digestion rate, *Food Chem.* 188 (2015) 559–568 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.032>.
- [20] H. Patel, P.G. Royall, S. Gaisford, G.R. Williams, C.H. Edwards, F.J. Warren, B.M. Flanagan, P.R. Ellis, P.J. Butterworth, Structural and enzyme kinetic studies of retrograded starch: Inhibition of α -amylase and consequences for intestinal digestion of starch, *Carbohydr. Polym.* 164 (2017) 154–161 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.040>.
- [21] L. Guo, In vitro amylase hydrolysis of amylopectins from cereal starches based on molecular structure of amylopectins, *Food Hydrocolloids* 77 (2018) 238–247 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.039>.
- [22] T.-T. Huang, D.-N. Zhou, Z.-Y. Jin, X.-M. Xu, H.-Q. Chen, Effect of debranching and heat-moisture treatments on structural characteristics and digestibility of sweet

potato starch, Food Chem. 187 (2015) 218–224

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.050>.

[23] M.S. Costa, D.P. Volanti, M.V.E. Grossmann, C.M.L. Franco, Structural, thermal, and morphological characteristics of cassava amyloextrins, J. Sci. Food Agric. 98 (2018) 2751–2760 <https://doi:10.1002/jsfa.8771>.

[24] Food and agricultural organization of the united nations (FAO), <http://www.fao.org/faostat/en/#data/>, (2017), Accessed date: 22 April 2019.

[25] W. Yu, K. Tao, R.G. Gilbert, Improved methodology for analyzing relations between starch digestion kinetics and molecular structure, Food Chem. 264 (2018) 284–292 <https://doi:10.1016/J.foodchem.2018.05.049>.

[26] Approved Methods of the AACC, American Association of Cereal Chemists, Sant Paul, 2000.

[27] J. Jane, J. Chen, Effect of amylose molecular size and amylopectin branch chain length on paste properties of starch, Cereal Chem. 69 (1992) 60–65.

[28] T. Kasemsuwan, J. Jane, P. Schnable, P. Stinard, D. Robertson, Characterization of the dominant mutant amylose extender (Ae1-5180) Maize Starch1, Cereal Chem. 5 (1992) 457–464.

[29] Y. Takeda, S. Hizukuri, B.O. Juliano, Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine, Carbohydr. Res. 168 (1987) 79–88 [https://doi:10.1016/0008215\(87\)80008-3](https://doi:10.1016/0008215(87)80008-3).

[30] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem. 79 (1956) 350–354 <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

[31] J. Jane, L. Shen, J. Chen, S. Lim, T. Kasemsuwan, W.K. Nip, Physical and chemical studies of taro starches and Flours1 2, Cereal Chem. 69 (1992) 528–535.

- [32] S. Hizukuri, Y. Takeda, M. Yasuda, A. Suzuki, Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes, *Carbohydr. Res.* 94 (1981) 205-213 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80718-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80718-1).
- [33] J. Jane, Y.Y. Chen, L.F. Lee, A.E. McPherson, K.S. Wong, M. Radosavljevic, T. Kasemsuwan, Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch, *Cereal Chem.* 76 (1999) 629-637 <https://dx.doi.org/10.1094/cchem.1999.76.5.629>.
- [34] Z. Yang, P. Swedlund, Y. Hemar, G. Mo, Y. Wei, Z. Li, Z. Wu, Effect of high hydrostatic pressure on the supramolecular structure of corn starch with different amylose contents, *Int. J. Biol. Macromol.* 85 (2016) 604-614 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.018>.
- [35] S. Hizukuri, Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules, *Carbohydr. Res.* 141 (1985) 295-306 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90461-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90461-0).
- [36] J. Jane, K. Wong, A.E. McPherson, Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrans, *Carbohydr. Res.* 300 (1997) 219-227 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00056-6).
- [37] C.R. Luckett, Y.-J. Wang, Effects of β -amylolysis on the resistant starch formation of debranched corn starches, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 4751-4757 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf300854e>.
- [38] B. Zhang, L. Chen, Y. Zhao, X. Li, Structure and enzymatic resistivity of debranched high temperature-pressure treated high-amylose corn starch, *J. Cereal Sci.* 57 (2013) 348-355 <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2012.12.006>.
- [39] T.-T. Huang, D.-N. Zhou, Z.-Y. Jin, X.-M. Xu, H.-Q. Chen, Effect of debranching and heat-moisture treatments on structural characteristics and digestibility of sweet

potato starch, Food Chem. 187 (2015) 218-224

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.050>.

[40] A.C. Dona, G. Pages, R.G. Gilbert, M. Gaborieau, P.W. Kuchel, Kinetics of in vitro digestion of starches monitored by time-resolved ^1H nuclear magnetic resonance, *Bio macromolecules* 10 (2009) 638-644 <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm8014413>.

[41] S. Dhital, A.K. Shrestha, M.J. Gidley, Relationship between granule size and in vitro digestibility of maize and potato starches, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 480-488 <https://doi.org/10.1016/J.carbpol.2010.05.018>.

[42] P.J. Butterworth, F.J. Warren, T. Grassby, H. Patel, P.R. Ellis, Analysis of starch amylolysis using plots for first-order kinetics, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 2189-2197 <https://doi.org/10.1016/J.carbpol.2011.10.048>.

[43] H. Patel, R. Day, P.J. Butterworth, P.R. Ellis, A mechanistic approach to studies of the possible digestion of retrograded starch by α -amylase revealed using a log of slope (LOS) plot, *Carbohydr. Polym.* 113 (2014) 182-188 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.089>.

[44] L. Guo, In vitro amylase hydrolysis of amylopectins from cereal starches based on molecular structure of amylopectins, *Food Hydrocolloids* 77 (2018) 238-247 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.039>.

[45] S. Pan, N. Ding, J. Ren, Z. Gu, C. Li, Y. Hong, L. Cheng, T.P. Holler, Z. Li, Maltooligosaccharide-forming amylase: characteristics, preparation, and application, *Biotechnol. Adv.* 35 (2017) 619-632 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.04.004>.

[46] S.V. Gomand, L. Lamberts, L.J. Derde, H. Goesaert, G.E. Vandeputte, B. Goderis, R.G.F. Visser, J.A. Delcour, Structural properties and gelatinization characteristics of potato and cassava starches and mutants thereof, *Food Hydrocolloids* 24 (2010) 307-317 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.008>.

- [47] Z. Ao, S. Simsek, G. Zhang, M. Venkatachalam, B.L. Reuhs, B.R. Hamaker, Starch with a slow digestion property produced by altering its chain length, branch, density, and crystalline structure, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 4540-4547 <https://doi.org/10.1021/Jbiotechadv.2017.04.004>.
- [48] A. Bijttebier, H. Goesaert, J.A. Delcour, Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: structural analysis of the residual amylopectin population, *Carbohydr. Res.* 345 (2010) 235-242 <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.11.010>.
- [49] N. Mohanan, T. Satyanarayana, Amylases, Ref. Module in Life Sciences vols. 1-20, *Encyclopedia of Microbiology*, 2018, pp. 163-180 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.13003-1>.
- [50] M. Sahnoun, S. Bejar, A. Sayari, M.A. Triki, M. Kriaa, R. Kammoun, Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2, *Process Biochem.* 47 (2012) 18-25 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.016>.
- [51] S. Hizukuri, Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance, *Carbohydr. Res.* 147 (1986) 342-347 [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90643-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90643-8).

Anexo 1

Table S1 – Iodine affinity

Amido	Iodine Affinity	
	Starch	Amylopectin
SPS	$4,81 \pm 0,25^b$	$1,6 \pm 0,13^b$
CAS	$4,76 \pm 0,15^b$	$1,26 \pm 0,05^c$
HAS	$12,40 \pm 0,10^a$	$4,72 \pm 0,03^a$

Average of the four replicates followed by standard deviation. Values with different letters in the same column and phase are significantly different ($p \leq 0.05$).

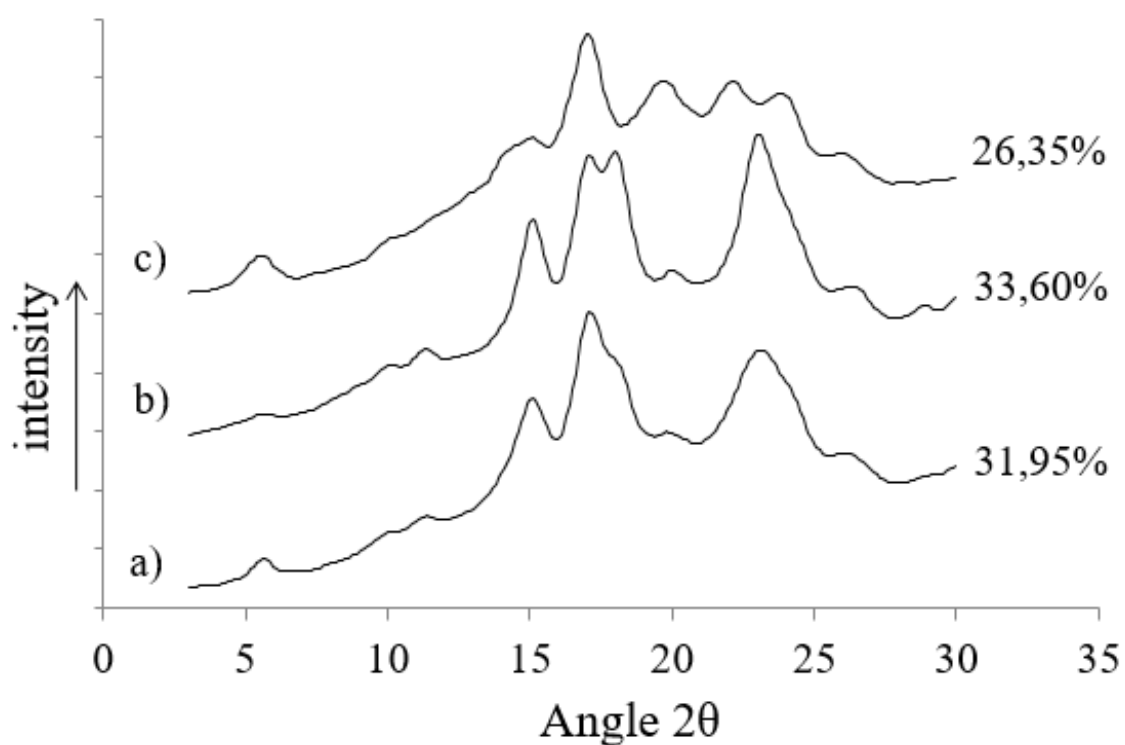


Figure S1 - X-ray diffraction pattern and relative crystallinity of native starches: a) SPS; b) CAS; c) HAS.

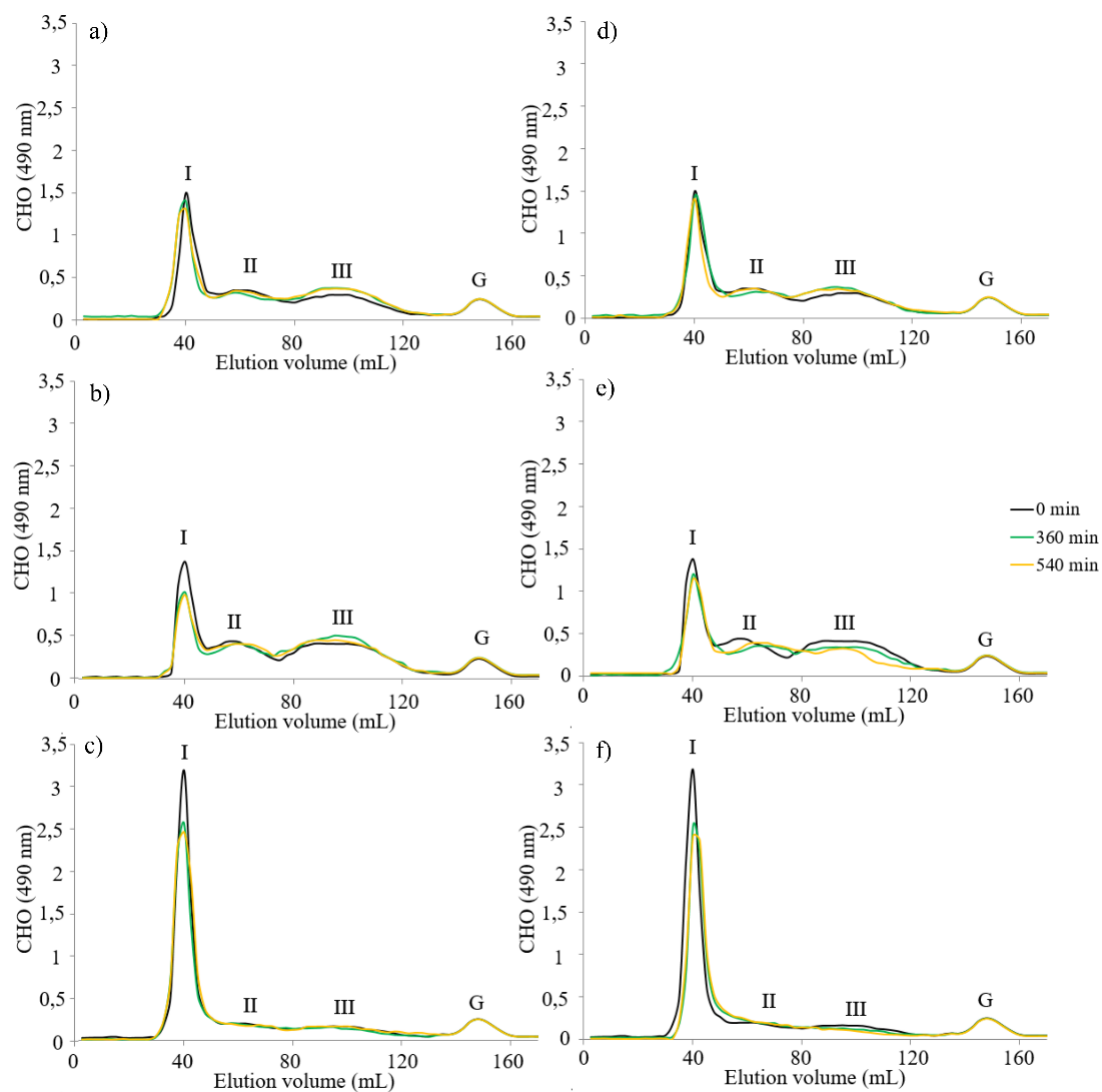


Figure S2 - Elution profiles of the hydrolysis residues of SPS, CAS and HAS by fungal α -amylase (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f) after 0, 360 and 540 min obtained by Bio-Gel P6 permeation chromatography: CHO : total carbohydrate; (G) = Glucose

Effect of amylolysis on the formation, the molecular, crystalline and thermal characteristics and the digestibility of retrograded starches

Flávia Villas-Boas^a, William Marcondes Facchinatto^b, Luiz Alberto Colnago^c, Diogo Paschoalini Volant^d, Celia Maria Landi Franco^{a*}

^a UNESP — São Paulo State University, Department of Food Engineering and Technology.

^b USP — University of Sao Paulo, Sao Carlos Institute of Chemistry..

^c Embrapa Instrumentation — Brazilian Agricultural Research Corporation.

^d UNESP — São Paulo State University, Department of Chemistry and Environment Science.

Abstract

This study evaluated the effect of amylases on the formation, the molecular, crystalline and thermal characteristics and the digestibility of retrograded starches using sweet potato (SPS), cassava (CAS) and high amylose maize (HAS) starches. The starches were gelatinized, hydrolyzed with fungal or maltogenic α -amylase, de-branched and retrograded. The modified starches were then analyzed for digestibility, chain size distribution using high-performance size exclusion chromatography, relative crystallinity and crystallite size by X-ray diffractometry, thermal properties using differential scanning calorimetry and the proportion of double helices using nuclear magnetic resonance spectroscopy. CAS was the most susceptible and HAS the most resistant to the action of both enzymes which reached 43.4% and 29.6% of hydrolysis respectively after incubation with fungal α -amylase and 50.7% and 44.4% with maltogenic α -amylase. Amylolysis was efficient in forming resistant starch type 3 (RS3) and high levels (> 60%) were found for all starches. RS3 content was highly correlated with the proportion of intermediate-size chains with degrees of polymerization between 13 and 30 for all starches, especially for the root starches, while for HAS, the high amylose content and reduction in the size of amylose chains and very long amylopectin chains also deeply contributed for the RS3 formation. These sizes (DP 13-30) are best suited

for the formation of a more crystalline, more perfect, and more strongly bonded structure, composed of larger crystallites, and with a higher concentration of double helices. High correlation coefficients were found between RS3, relative crystallinity, crystallites size, and enthalpy change.

Keywords: Resistant starch; slowly digestible starch; chain size; starch crystal

1. INTRODUCTION

The concern of consumers with the nutritional and functional quality of food has driven the research and development of products that help keep individuals healthy. According to its *in vitro* digestibility, starch is classified into: rapidly digestible starch (RDS), which is converted to glucose within 20 min when incubated with pancreatic α -amylase and amyloglucosidase at 37 °C; slowly digestible starch (SDS), that is converted to glucose within 120 min when incubated under the same conditions; and resistant starch (RS), which is not digested by amylolytic enzymes in the digestive tract (Englyst, Kingman & Cummings, 1992).

The use of RS or SDS in foods has increased due to their health benefits. SDS releases glucose into the bloodstream in a slow and continuous manner with low glycemic response (Jiang, Miao, Ye, Jiang, & Zhang, 2014) prolonging the feeling of satiety. This helps in the control and prevention of cardiovascular disease, type II diabetes and obesity (Han & BeMiller, 2007; Jiang et al., 2014; Zhang & Hamaker, 2009). RS has physiological behavior similar to that of dietary fiber. Its most common action is to increase the fecal bolus and reduce the pH of the colon (Pereira, 2007). It has also been reported to influence the reduction of serum cholesterol and triglycerides levels (Fuentes-Zaragoza et al., 2011) showing positive effects in cases of diabetes, obesity and cardio-vascular disease (Emilien, Hsu, & Hollis, 2017; Fuentes-Zaragoza et al., 2011), in addition this starch fraction presents a prebiotic effect through

stimulation the growth of bifidobacterias in the colon (Rodríguez-Cabezas et al., 2010; Zeng et al., 2015) Thus, improving food quality by using higher levels of SDS and RS is of growing interest to researchers and the food industry as well as health professionals. Among the different types of RS, retrograded starch, which is called RS3, stands out because it is formed by natural processes that involve heat and humidity. In addition to being thermally stable at different stages of processing, allowing it to maintain its resistance when used in a wide variety of food (Fuentes-Zaragoza et al., 2011; Pongjanta, Utaipattanaceep, Naivikul, & Piyachomkwan, 2009), retrograded starch is a physically modified starch and for that it is not restricted in its use as an ingredient. Also, when compared to dietary fibers, it causes less interference in the sensory characteristics of food because it is white in color, has neutral flavor and a smaller sized particles (Ding, Luo, & Lin, 2019; Fuentes-Zaragoza et al., 2011)

The most common raw material for obtaining RS3 is amylose, due to its tendency to re-associate. However, de-branched starches have also been shown to be efficient in forming RS3 since the linear fragments released through debranching have greater mobility and a tendency to recrystallize (Berry, 1986). Zeng et al. (2014) reported that the RS3 content more than doubled when debranching preceded the retrogradation of waxy maize starch. A suitable linear chain length is needed for double helix formation and a consequent reduction in starch digestibility. The use of enzymes prior to debranching, combined with a method that enhances retrogradation, is an efficient way of forming RS3 (Hung, Vien, & Lan Phi, 2016; Luckett & Wang, 2012; Villas-Boas & Franco, 2016; Wu et al., 2017; Zeng et al., 2015; B. Zhang, Chen, Zhao, & Li, 2013; Zhou, Meng, Chen, Zhu, & Yuan, 2014). Amylolysis mainly involves breaking the molecules into low molecular weight fragments which raises the number of smaller linear molecules than those of the original starch resulting in increased retrogradation. The data on the optimal chain length to enhance retrogradation are still contradictory and, therefore, this is the most important factor to be studied. Luckett and

Wang (2012) reported that amylose (degree of polymerization (DP) > 100) and amylopectin chains (DP 21-26) contributed to the formation of RS3 in corn starches with different amylose contents, while Villas-Boas and Franco (2016) reported that fungal α -amylase was efficient in the formation of RS3 and SDS in potato and arrowroot starches and that the reduction in digestibility was enhanced by the reduction in the proportion and DP of amylopectin very long chains and the increase in the proportion of short chains, especially with DP ~ 15.

The characteristics of the crystalline structure formed during the retrogradation are determinant in the resistance of the starch to the enzymes, so the study of the characteristics of the crystals formed, as well as their relation to the thermostability is important for a better understanding of how the length of the chains and their interactions influence the formation of more stable and resistant double helices. Zhang and Hamaker (2009) reported that imperfect crystals formed from starch retrogradation are associated with slower digestion, i.e. higher SDS formation. Thus, in RS3 production, larger or smaller amounts of SDS may be formed depending on the perfection of the crystals formed in retrogradation.

The use of different enzymes that enhance retrograded starch formation leads to different structural and physicochemical characteristics, as well as different starch digestibility. Both enzyme source and substrate determine the mechanism of action of α -amylase and the products released after its action (Goesaert, Slade, Levine, & Delcour, 2009; Villas-Boas, Yamauti, Moretti, & Franco, 2019). *Aspergillus oryzae* α -amylase breaks α -1,4 bonds present in the starch chains by a random hydrolysis mechanism (Bijttebier, Goesaert, & Delcour, 2010; Villas-Boas et al., 2019), while maltogenic α -amylase breaks α -1,4 bonds of starch chains by an exo-action mechanism releasing successive units of maltose, as well as hydrolyzing the inner part of starch chains by an endo-action mechanism (Goesaert et al., 2009; Miao et al., 2014; Villas-Boas et al., 2019).

The objective of this work was to evaluate the effects of fungal α -amylase and maltogenic α -amylase on the formation of SDS and RS3 and their molecular, crystalline and thermal characteristics using root starches (cassava and sweet potato) and high-amylose maize starch. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) and cassava (*Manihot esculenta*) are starchy crops of great cultural and economic importance in tropical countries such as Brazil. There is good potential for their industrial use, especially their starch, because the extraction process is simple and inexpensive. High amylose maize starch was used for comparison because amylose is the main raw material for RS3 formation. To the best of the authors' knowledge, this is the first report describing the use of maltogenic α -amylase with cassava and sweet potato starches to produce resistant starch and characterizing their molecular, crystalline, and thermal properties.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material

Starches from fresh roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*), Canadian variety, and cassava (*Manihot esculenta*), *Cascudinha* variety, were isolated as described in a previous paper (Villas-Boas et al., 2019) and used in this study. Commercial high amylose maize starch (AmyloGel 03003, Cargill Agrícola S/A, São Paulo, Brazil) was also used. Fungal α -amylase from *Aspergillus oryzae*, maltogenic α -amylase from *Bacillus* sp (Novamyl® 1.000 BG), pullulanase from *Bacillus subtilis*, pancreatin α -amylase, amyloglucosidase from *A. niger*, and invertase from bread yeast, all of them from Sigma Aldrich, St Louis, USA, were used in this study. The starches were named SPS (sweet potato starch), CAS (cassava starch), and HAS (high amylose maize starch). The amylose content, determined by potentiometric titration, and the amylopectin branch-chain length distribution, determined by high performance anionic exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), of these starches are shown in a previous work (Villas-Boas et al., 2019).

2.2. Obtaining retrograded starches

Retrograded starches were obtained, in duplicate, as described by Villas-Boas and Franco (2016), with modifications. The starches (SPS, CAS, HAS) were suspended (6.5%, w/v) in acetate buffer 0.1 M, pH 5.0, heated in a boiling water bath and subjected to autoclaving (121 °C for 30 min) to ensure complete gelatinization. The temperature of the suspension was adjusted to 55 °C and fungal or maltogenic α -amylase (5 U/g of starch) was added. The mixtures were incubated for 3, 6, 9, and 12 h and then boiled for 30 min to inactivate the enzymes. The starches were precipitated using anhydrous ethanol and centrifuged at 7,000 *g* for 20 min. The supernatant was recovered and the percentage of hydrolysis was determined by the amount of total carbohydrates using the phenol-sulfuric method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). The precipitate was kept at 40 °C for 40 min to evaporate any residual ethanol and then lyophilized for posterior debranching.

The gelatinized starches and those hydrolyzed by amylases were suspended (5% w/v) in acetate buffer 0.1M pH 5.0 and heated in a boiling water bath for 60 min. The temperature of the solution was equilibrated to 50 °C and 40 U/g of starch of pullulanase was added. The solution was incubated for 24 h and then boiled for 30 min to inactivate the enzyme. The process of retrogradation of de-branched starches was enhanced by a heating cycle (121 °C for 30 min) followed by cooling to 4 °C for 24h. The retrograded starches were recovered by precipitation with anhydrous ethanol and lyophilized.

2.3. Digestibility of starches

Starch digestibility was determined according to the method described by Englyst et al. (1992), with modifications. Starch samples (0.5 g) were added to 20 mL of acetate buffer (0.1 M, pH 5.2) containing 4 mM CaCl₂ and kept in a water bath at 37 °C. Enzyme solution (5 mL) containing invertase, pancreatin α -amylase and

amylglucosidase was added. Aliquots of 0.5 mL were taken after 0, 20, and 120 min. Glucose was measured using a Glucose Liquiform glucose determination kit (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). The values of the different carbohydrate nutritional fractions (rapidly digestible starch, slowly digestible starch and resistant starch) were obtained by combining the values of G20 (glucose released after 20 min), G120 (glucose released after 120 min), G0 (free glucose) and TG (total glucose), according to the equations:

$$\text{RDS} = (\text{G20} - \text{G0}) \times 0.9; \quad (1)$$

$$\text{SDS} = (\text{G120} - \text{G20}) \times 0.9 \quad (2)$$

$$\text{RS} = (\text{TG} - \text{G120}) \times 0.9 \quad (3)$$

2.4. Molecular weight distribution by high-performance size exclusion chromatography coupled with refractive index (HPSEC-RI)

The molecular weight distributions of retrograded starches were determined by size exclusion chromatography. Starch samples (50 mg) were dispersed in 90% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution (5 mL) as described by Song and Jane (2000). These previously dispersed starches (1 mL) were precipitated with 3 volumes of anhydrous ethanol and centrifuged. The precipitates were suspended in 2 mL of deionized water and filtered (22 µm). The filtered samples were injected into an LC-20A high performance liquid chromatograph (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a 10 µL loop quaternary pump (LC-20AT), on-line degasser, auto sampler (SIL-20A), and a refractive index detector (RID 10A). One column guard (Shodex OHpak SB-G 6B) and three size exclusion columns (SB-806, SB-804 and SB-802), (Showa Denko K.K., Tokyo, Japan) were used for sample separation. Deionized water at a flow rate of 0.6 mL / min was used as eluent. The temperature of the detector and columns was kept at 60 °C. Dextran standards (Sigma Aldrich, St Louis, USA) of 667,800, 409,800, 273,000, 147,600, 80,900, 48,600, 23,800, 11,600, 5,220, and 1,270 Da, as

well as glucose, were used to establish the calibration curve. The degree of polymerization (DP) at the beginning, top and end points of the peaks was calculated using $DP = (M_w - 18) / 162$ based on that described Avaltroni, Bouquerand, and Normand (2004).

2.5. X-ray diffraction, relative crystallinity, and crystallite size

Native and retrograded starches were stored for 10 days at 25 °C and 90% relative humidity in a desiccator containing a saturated solution of BaCl₂ and 1% of sodium azide. The X-ray diffraction pattern of the samples was determined using a MiniFlex 300 benchtop X-ray diffractometer (Rigaku, Tokyo, Japan) equipped with Cu–K α monochromatic radiation ($\lambda = 0.1542$ nm). The scan was performed at 30 kV and 10mA for a 2θ range of 3-40° with a step size of 0.01. Relative crystallinity was quantitatively estimated based on the relationship between the peak and total areas following the method described by Nara and Komiya (1983). The crystallites size was calculated using the Scherrer Equation (4) as described by Krauser, Oliveira, Cebim, and Davolos (2018).

$$Cs = (0,94 \times \lambda) / (\beta \times \cos \theta) \quad (4)$$

Where: Cs = average crystallite size, β = line broadening in radians, θ = Bragg angle, λ = X-ray wavelength.

2.6. Thermal properties

The thermal properties of the native and retrograded starches were determined using a Pyris1 differential scanning calorimeter (Perkin Elmer, Waltham, USA). The starch samples (4 mg, dry basis) were weighed in stainless steel pans, mixed with deionized water (12 μ L) and sealed. The sealed pans were kept at room temperature for 12 h to equilibrate and scanned at a rate of 10 °C/min over a temperature ranging from 25 °C to 180 °C. An empty pan was used as a reference.

2.7. Solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance

High-resolution cross-polarized magic angle spinning technique, ^{13}C CPMAS, was carried out on an Avance 400 solid state nuclear magnetic resonance (SSNMR) spectrometer (Bruker, Billerica, USA) coupled with a magic angle spinning (MAS) double-resonance probe-head of 4-mm, operating at $\nu = 100.5$ MHz (^{13}C) and 400.0 MHz (^1H) for pulse sequence and 5.0 μs (^{13}C) and 2.5 μs (^1H) for 90° pulse length, applied for spin-lock cross-polarization transfer. Each spectrum was acquired at 10 kHz (± 2 Hz) of spinning frequency at 54.7° magic angle after submitting 70 kHz of decoupling field (high power proton decoupling - HPPD) for spinal ^1H -decoupling, contact time of 2000 μs for cross-polarization (CP) blocks, pre-scan of 15 μs , recycle delay (d1) of 5.0 s and acquisition ~ 25 μs with at least 1024 accumulated scans. The chemical shift of ^{13}C was indirectly calibrated with the external standard hexamethylbenzene (HMB) referred at 17.3 ppm for the resonance signal of maximum intensity (Silva et al., 2017). The quantitative evaluation of ordered-phase signature on starch samples with respect to double helix content (%) was calculated according to the integral ratio of C4 and C1-C6 carbon signals ($I_{\text{C4}}/I_{\text{C1-C6}}$) from the retrograded to gelatinized (amorphous) starch signature, as described by Borgracheva, Wang and Hedley (2001).

$$\text{Double helix (\%)} = 100 - \left[\frac{(I_{\text{C4}}/I_{\text{C1-C6}})_{\text{retrograded starch}}}{(I_{\text{C4}}/I_{\text{C1-C6}})_{\text{gelatinized starch}}} \right] \times 100 \quad (5)$$

The short-range phase arrangement was estimated through the conformational changes assigned to the broad C1 signal profile (107-90 ppm). The crystalline fraction contribution was set around 101, 100 and 99 ppm although the interfacial contribution between ordered-phases at 103, 97 and 94 ppm was considered as the amorphous phase. This average crystalline-phase content was compared to the relative crystallinity calculated by X-ray diffraction. The double helix percentage and C1 spectral decomposition integrals were provided by fitting Voigt functions, an arithmetic

combination of Gaussian and Lorentzian profiles (Mutungi, Passauer, Onyango, Jaros, & Rohm, 2012) using PeakFit™ (v4.12) software for spectra processing.

2.8. Statistical analysis

Starch hydrolysis was performed in duplicate. All the other experiments were performed at least in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) and Pearson correlation tests were applied using the Statistica software, v. 7.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, USA). Differences were evaluated using the Tukey test. The significance level was set at a p value ≤ 0.05 . The Pearson correlation coefficient determined the following: Strong correlation: ($r \geq 0.9$, $p > 0.05$) medium correlation ($0.6 \leq r < 0.9$, $p > 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Hydrolysis of starches with α -amylases

The hydrolysis percentages of SPS, CAS and HAS submitted to the action of fungal α -amylase and maltogenic α -amylase as a function of time are shown in Figure 1. Although the hydrolysis profile for the different starches was similar regardless of the enzyme used, the extent of hydrolysis was different between the starches, times and enzymes used. There was a rapid increase in hydrolysis percentages during the first 3 h of treatment reaching 21.1%, 27.6% and 19.9% with fungal α -amylase, and 27.9%, 31.9% and 28.5% with maltogenic α -amylase for SPS, CAS and HAS, respectively. After this time there was a drop in the speed of hydrolysis and, after 12 h of treatment, the hydrolysis percentages reached 37.8%, 43.4% and 29.6% with fungal α -amylase and 47.7%, 50.7% and 44.4% with maltogenic α -amylase, for SPS, CAS and HAS, respectively.

The enzymatic susceptibility of starch is influenced by its structural characteristics (Villas-Boas et al., 2019; Yu, Tao, & Gilbert, 2018) and the mechanism of action of the enzyme used (Bijttebier et al., 2010; Villas-Boas et al., 2019). CAS was

the starch most susceptible to hydrolysis, regardless of the enzyme, due to the high percentage of chains with DP 6-12 (27.2%) present in this starch, which favors enzymatic hydrolysis. On the other hand, HAS was the most resistant to the enzymes, due to its high amylose content (50.2%) and high proportion of long chains (DP $\geq$ 37, 30.7%) (Villas-Boas et al., 2019).

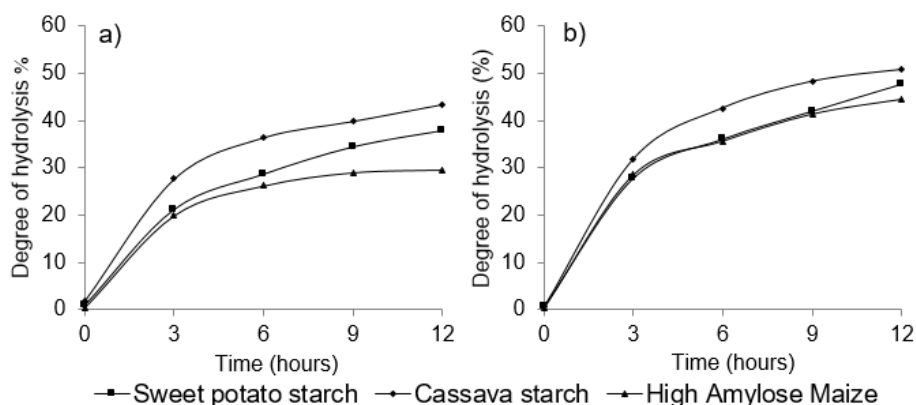


Figure 1 - Hydrolysis percentage of starches subjected to (a) fungal α -amylase and (b) maltogenic α -amylase as a function of time.

The highest percentages of hydrolysis were obtained when starches were incubated with maltogenic α -amylase, regardless of the botanical source of the starch. This is because, although both enzymes hydrolyze the α (1,4) bonds of amylose and amylopectin chains, they have different mechanisms of action and so release products with different populations of oligosaccharides. Further details on the mechanism of action and susceptibility of these starches to amylases have been discussed in a previous article (Villas-Boas et al., 2019).

3.2. Digestibility of starches

Gelatinized starches (autoclaved at 121 °C for 30 min) exhibited high RDS contents and very low RS3 values (Table1). This happens because gelatinization causes granular disorganization (Perera, Meda, & Tyler, 2010). However, the HAS had a significant amount of SDS (23.3%) confirming that this is a naturally resistant starch

(RS2) due to its high amylose content (50.24%). Starches with high amounts of amylose are digested more slowly (Han & BeMiller, 2007) because amylopectin molecules have a larger surface area than amylose making amylopectin the main substrate for attack by digestive enzymes (Singh, Dartois, & Kaur, 2010).

Retrogradation reduced the RDS and SDS contents by increasing the RS3 content. This effect was more pronounced for HAS, which also had the highest amylose content, followed by CAS (18.3% amylose), and SPS (16.9% amylose). During low temperature retrogradation, amylose chains can interact rapidly forming stable double helices (Bulpin & Gidley, 1987; Liu, Gu, Hong, Cheng, & Li, 2017), favoring the formation of RS3.

The release of amylopectin side chains before retrogradation favored re-association leading to reduced starch digestibility. The RS3 content increased substantially when the starches were de-branched with pullulanase and retrograded. In root starches, the RS3 content practically doubled after debranching which also favored the increase in SDS content, while, for HAS, a 40% increase in RS3 content and 39% reduction in SDS level were seen. This is related to the structural characteristics of these starches, such as the amylose content and chain length distribution, and also how these chains interact to form more or less perfect crystals during retrogradation.

Pretreatment of starches with both amylases caused a considerable (> 30%) increase in RS3 content and considerably higher values were found (Table 1). Reducing the length of starch chains in smaller molecular weight fragments tends to enhance the formation of RS3, as smaller chains have greater mobility and higher tendency to retrograde (Li et al., 2017; Luckett & Wang, 2012; Villas-Boas & Franco, 2016; Wu et al., 2017; H. Zhang & Jin, 2011; Zhou et al., 2014).

Table 1 - Rapidly digestible starch (RDS), slowly digestible starch (SDS) and resistant starch (RS) contents in SPS, CAS and HAS submitted to amylolysis for different times.

Starch	FDS	SDS	RS
SPS G	86,8±0,2	11,0±0,1	2,2±0,1
SPS R	83,7±0,8	5,4±0,8	10,9±0,1
SPS P	59,8±0,2 ^a	16,8±0,4 ^c	23,4±0,3 ^f
SPS 3FP	20,1±0,9 ^f	14,9±0,1 ^d	65,0±0,4 ^a
SPS 6FP	26,7±0,5 ^{cd}	20,5±0,8 ^b	52,8±0,5 ^d
SPS 9FP	23,2±0,4 ^e	18,1±0,2 ^{bc}	58,7±0,1 ^{bc}
SPS 12FP	34,2±0,2 ^b	23,2±0,5 ^a	42,6±0,7 ^e
SPS 3MP	24,8±0,2 ^{de}	18,6±0,1 ^{bc}	56,6±0,2 ^c
SPS 6MP	30,0±0,7 ^c	11,0±0,9 ^e	59,0±0,3 ^b
SPS 9MP	34,2±0,7 ^b	14,5±0,2 ^d	51,3±0,7 ^d
SPS 12MP	34,0±0,6 ^b	13,6±0,7 ^d	52,4±0,4 ^d
CAS G	91,6±0,1	6,7±0,1	1,7±0,1
CAS R	78,2±0,3	6,18±0,2	15,2±0,7
CAS P	53,3±0,2 ^a	14,8±0,9 ^{cd}	31,9±0,1 ^g
CAS 3FP	36,1±0,3 ^{bc}	19,2±0,1 ^b	45,5±0,7 ^f
CAS 6FP	32,2±0,4 ^e	19,0±0,5 ^b	49,5 ±0,6 ^{cd}
CAS 9FP	37,8±0,9 ^b	16,8±0,8 ^c	45,6±0,2 ^{ef}
CAS 12FP	33,2±0,5 ^e	15,6±0,1 ^c	51,6±0,9 ^{bc}
CAS 3MP	35,0±0,8 ^{cd}	11,5±0,1 ^e	53,5±0,2 ^b
CAS 6MP	26,4±0,1 ^g	13,2±0,4 ^{de}	60,4±0,2 ^a
CAS 9MP	29,2±0,6 ^f	22,5±0,5 ^a	48,3±0,1 ^{de}
CAS 12MP	32,7±0,7 ^{de}	11,5±0,1 ^e	55,8±0,4 ^b
HAS G	74,1± 1,1	23,3±0,6	2,6±0,5
HAS R	57,4±0,5	12,7±0,4	29,8±0,2
HAS P	50,7±0,4 ^a	7,80±0,1 ^d	41,5±0,2 ^h
HAS 3FP	28,7±0,1 ^{cd}	17,2±0,1 ^a	54,1±0,3 ^f
HAS 6FP	30,0±0,5 ^c	17,4±0,4 ^a	52,6±0,1 ^g
HAS 9FP	28,1±0,1 ^d	10,3±0,2 ^{bc}	61,6±0,3 ^{cd}
HAS 12FP	33,3±0,4 ^b	8,3±0,6 ^d	58,4±0,1 ^e
HAS 3MP	15,8±0,1 ^g	16,2±0,1 ^a	68,0±0,1 ^a
HAS 6MP	28,8±0,2 ^{cd}	8,8±0,8 ^{cd}	62,4±0,1 ^c
HAS 9MP	25,2±0,4 ^f	10,6±0,4 ^{bc}	64,2±0,2 ^b
HAS 12MP	27,7±0,3 ^e	11,7±0,5 ^b	60,6±0,3 ^d

*Mean of three repetitions followed by the standard deviation. Values followed by different letters in the same column for each starch differ significantly by the Tukey test ($p \leq 0.05$). G = gelatinized; R = retrograded; P = de-branched; SPS = sweet potato starch: CAS = cassava starch: HAS = high amylose maize starch: FP = hydrolyzed with fungal α -amylase prior to debranching and retrogradation; MP = hydrolysed with maltogenic α -amylase prior to debranching and retrogradation. 3, 6, 9, and 12 h: treatment time with the amylases.

The levels of RS3 and SDS varied with hydrolysis time for all starches when both enzymes were used. As enzymes with different mechanisms of action were acting on starches with different structural characteristics, chains with different lengths and tendencies to re-associate were released. Luckett and Wang (2012), Villas-Boas and

Franco (2016) and Wu et al. (2017) also showed the need for an adequate chain length to enhance retrogradation.

There was a 180% increase in RS3 content when SPS was treated first with fungal α -amylase, reaching 65% after 3 h of hydrolysis. Considerably high levels of RS3 were also found for CAS (51.6%) after 12 h and for HAS (61.6%) after 9 h of incubation with this enzyme. The maltogenic α -amylase also caused a remarkable increase (150%) in the SPS RS3 content which showed 59% of this fraction after 6 h of incubation, while the CAS RS3 content reached 60.4% after 6 h of treatment. The highest RS3 content (68%) was seen when HAS was pre-hydrolyzed with maltogenic α -amylase for 3 h. Significant amounts of SDS were also found after the action of both enzymes, especially in SPS with fungal α -amylase after 12 h (23.2%) and in CAS with maltogenic α -amylase after 9 h (22.5%) (Table1).

3.3. Molecular weight distribution by HPSEC-RI

The normalized molecular size distributions of SPS, CAS and HAS after fungal α -amylase or maltogenic α -amylase treatment and debranching, determined by HPSEC, are shown in Figure 2, and the proportions of each of the fractions and their respective Peak Degrees of Polymerization (DP_{peak}) are listed in Table 2.

The root starches that were only de-branched (0h) showed five fractions of chains. Fraction I corresponds to high molecular weight amylose chains ($> 667,800$ Da) eluted at 26.3 min for SPS (Figures. 2a and 2d) and 26.1min for CAS (Figures. 2b and 2e). Fraction II corresponds to chains with DPs between 4,100 and 120 suggesting that they are amylose chains and some very long amylopectin chains (B_4). The DP_{peak} of these chains was ~ 662 for SPS and ~ 720 for CAS (Table 2). According to Gilbert, Witt, and Hasjim (2013); Vilaplana, Hasjim, and Gilbert (2012) the number of glucose units in the very long chains of amylopectin ranges from 100 to 125. Fraction III refers to amylopectin long chains (B_2 and B_3), with DP between 30 and 120, while in fraction

IV the intermediate chains (B_1) with DP between 29 and 13 were eluted. Short chains (A) with DP <13 were eluted in fraction V. On the other hand, due to the broad molecular mass distribution of HAS (Lin et al., 2016), chains with molecular mass >667,800 Da were separated into two fractions (I' and I), eluted respectively at 24.1 and 25.5 min (Figures. 2c and 2f). The fraction II displayed a very large area compared with that of the root starches due the very high amylose content (50.2%) and high proportion (30.7%) of long chains of amylopectin of this starch. Fractions III, IV and V correspond to fractions of amylopectin chains, with DP_{peak} comparable to those found in the same fractions of root starches and presented in Table 2. According to the classification by (Hizukuri, 1986), amylopectin consists of chains A, B ($B_1 - B_4$) and C. Fractions with DP <13 and DP 13 - 30 make up the short (A) and intermediate (B_1) chains, respectively, while the chains with DP > 30 correspond to the long chains ($B_2 - B_4$). The C chain carries the reducing end of the molecule.

The proportion of amylose and amylopectin chains eluted in the different fractions (Table 2) for SPS, CAS and HAS corroborates the results for amylose content and length distribution of branched amylopectin chains obtained by potentiometric titration and HPAEC-PAD respectively and presented in previous work (Villas-Boas et al., 2019)

The action of both enzymes reduced the proportion of amylose chains with molecular weight >667,800 Da (fraction I in SPS and CAS and fractions I' and I in HAS) during 12 h of treatment. A slight delay in the elution time of this fraction was also noted, indicating a reduction in DP_{peak} of these chains. As expected, this effect was more intense when maltogenic α -amylase was used. This enzyme preferentially hydrolyzes the endo-action amylose chains, while the amylopectin chains are hydrolyzed by exo-action (Villas-Boas et al., 2019).

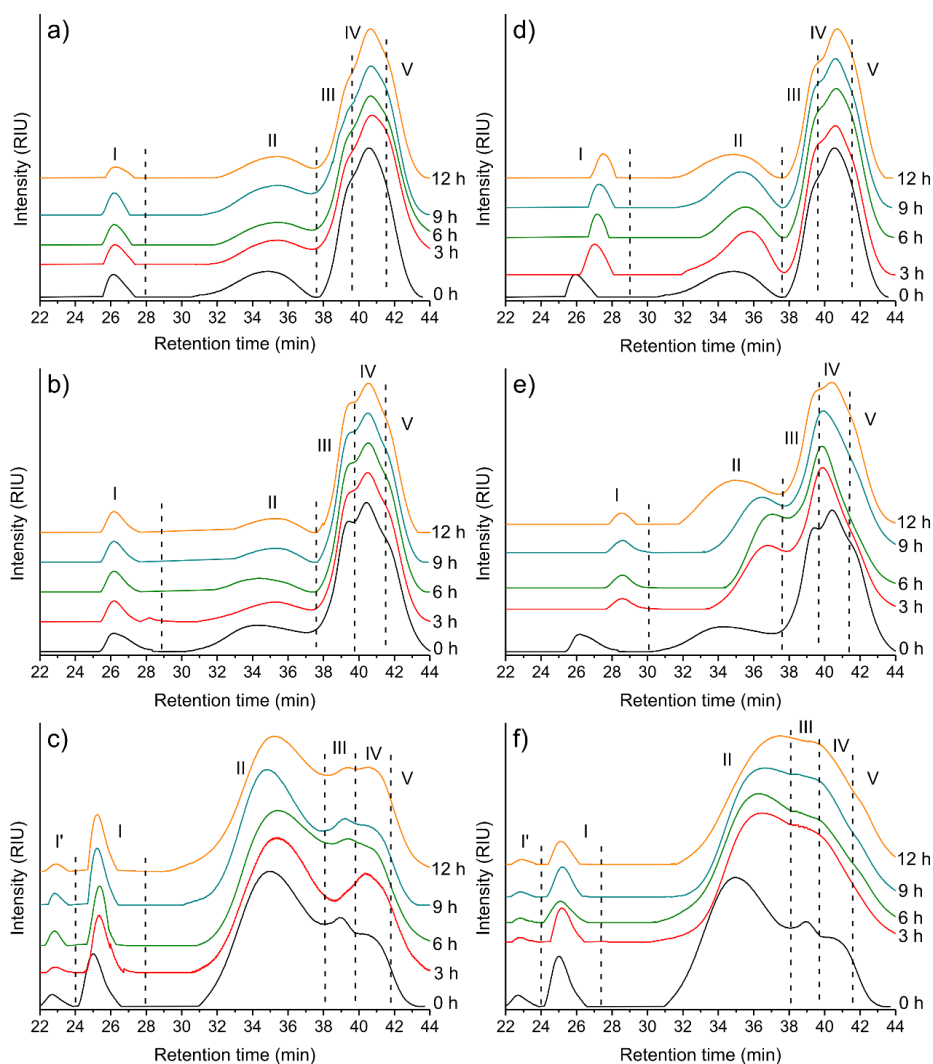


Figure 2 - Molecular size distribution, obtained by HPSEC-RI, of SPS (a, d), CAS (b, e) and HAS (c, f) after fungal α -amylase hydrolysis (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f) at different times and debranching.

In general, fungal α -amylase acted on amylose and especially on both long and very long chains of amylopectin ($B_2 - B_4$) causing, in root starches, a significant reduction in the size and proportion of chains of fraction II with treatment time. The proportion of fraction III chains in SPS was slightly reduced, while in CAS the proportion of these chains increased (Table 2). A significant increase in the proportion of fraction IV (DP 13 - 30) was observed in both starches, reaching 44.6% in SPS with 3 h of hydrolysis and 40.7% in CAS with 12 h of treatment. Fraction V (DP <13) hardly changed during treatment. On the other hand, for HAS, there was a slight increase in

the proportion of chains present in fraction II but its DP_{peak} decreased from 760 to ~ 550 over time indicating the action of the enzyme on fraction II. Fraction III was reduced, and as with root starches, there was a significant increase in fraction IV, which reached 15.6% with 9 h of treatment. The proportion of short chains ($DP < 13$) did not change over the incubation time. These results show that fungal α -amylase acted mainly on long and very long amylopectin chains (B2 - B4) that connect to different clusters and subsequently hydrolyzed the intermediate chains (B1) within these clusters.

The maltogenic α -amylase caused a reduction in the proportion and DP_{peak} of SPS fraction II and a significant increase in the proportion of intermediate chains (fraction IV) that reached 41.9% after 6 h of treatment. On the other hand, for CAS, there was a reduction in the proportion of fraction I and an increase in the proportion of chains present in fraction II with substantial delay in the elution time of the peak reducing DP_{peak} from 720 to ~ 250 , indicating the enzyme action on fractions I and II. The peak in fraction III virtually disappeared and there was a significant increase in the proportion of intermediate chains (fraction IV) which had its DP_{peak} increased from 20.4 to ~ 29 .

To better understand how the length of starch chains affects recrystallization and, consequently, the digestibility of retrograded starch, correlation between the content of RS3, SDS and the fractions formed after amylase action and starch debranching was analyzed. The RS3 content had a strong positive correlation with fraction IV (intermediate chains) for SPS and CAS ($r = 0.97$, $r = 0.90$ and $r = 0.84$) and mean correlation for HAS ($r = 0.84$) and was negatively correlated with fraction I in CAS ($r = -0.76$) and SPS ($r = -0.91$) and with fractions I and II in HAS ($r = -0.79$ and $r = -0.68$ respectively).

Table 2 - Relative area (%) and DP_{peak} of the different fractions of starches obtained from chromatograms HPSEC-RI of the enzyme-treated starches

Starches	Property	F I'	F I	F II	F III	F IV	F V
SPS P	Area (%)	nd	5.8±0.1	19.1±0.9	22.6±0.5	32.2±0.6	20.2±0.4
	DP _{peak}		>4100	662.0±0.8	30.25±0.0	19.7±0.2	12.7±0.2
SPS 3FP	Area (%)	nd	4.0±0.7	12.8±0.3	19.0±0.6	44.6±0.9	19.6±0.7
	DP _{peak}		>4100	452.1±0.9	32.2±0.7	19.8±0.4	11.1±0.2
SPS 6FP	Area (%)	nd	3.4±0.3	12.1±0.9	21.8±0.9	40.4±0.7	22.9±0.2
	DP _{peak}		>4100	449.3±0.8	34.0±0.0	19.4±0.3	11.5±0.3
SPS 9FP	Area (%)	nd	3.3±0.5	16.6±0.9	20.5±1.0	41.0±0.2	18.5±0.4
	DP _{peak}		>4100	419.9±0.0	35.9±0.1	20.1±0.1	12.3±0.3
SPS 12FP	Area (%)	nd	3.0±0.1	13.3±0.1	24.6±0.1	37.9±0.3	21.9±0.5
	DP _{peak}		>4100	404.6±0.4	31.6±0.1	19.6±0.3	13.0±0.3
SPS 3MP	Area (%)	nd	5.0±0.6	18.2±0.1	22.0±0.3	39.8±0.7	14.9±0.9
	DP _{peak}		>4100	414.1±0.1	31.6±0.1	20.1±0.8	11.7±0.4
SPS 6MP	Area (%)	nd	3.7±0.8	13.3±0.4	21.3±0.9	41.9±0.6	19.7±0.6
	DP _{peak}		>4100	403.4±0.9	32.4±0.5	19.4±0.6	13.0±0.6
SPS 9MP	Area (%)	nd	3.5±0.2	15.2±1.1	22.0±1.0	39.2±0.4	19.2±0.6
	DP _{peak}		>4100	412.6±0.8	33.61±0.2	20.2±0.7	13.7±0.2
SPS12MP	Area (%)	nd	3.4±0.0	13.8±0.7	22.6±0.7	40.1±0.1	20.3±0.9
	DP _{peak}		>4100	440.3±0.1	30.82±0.0	19.0±0.3	13.1±0.0
CAS P	Area (%)	nd	6.3±0.1	18.1±0.2	20.2±0.9	31.1±0.1	24.4±0.2
	DP _{peak}		>4100	720.4±0.3	35.6±0.8	20.4±0.1	12.6±0.5
CAS 3FP	Area (%)	nd	4.5±0.1	12.6±0.3	23.0±0.5	34.7±0.1	25.5±0.4
	DP _{peak}		>4100	610.9±0.0	34.0±0.2	21.4±0.2	13.3±0.4
CAS 6FP	Area (%)	nd	3.8±0.9	10.8±0.1	22.0±0.8	39.6±0.9	24.5±0.2
	DP _{peak}		>4100	696.0±0.2	36.2±0.6	21.3±0.2	14.8±0.0
CAS 9FP	Area (%)	nd	3.3±0.8	10.3±0.7	25.4±0.8	35.9±0.0	26.0±1.0
	DP _{peak}		>4100	524.0±0.1	36.0±0.2	21.6±0.3	14.3±0.0
CAS 12FP	Area (%)	nd	2.9±0.2	10.1±0.1	21.0±0.1	40.7±0.2	26.1±0.3
	DP _{peak}		>4100	509.0±0.6	35.8±0.0	21.4±0.0	12.5±0.1
CAS 3MP	Area (%)	nd	4.7±0.1	20.7±0.5	19.3±1.0	39.0±0.5	15.7±0.6
	DP _{peak}		>4100	260.3±0.9	43.0±0.1	29.2±0.0	14.6±0.3
CAS 6MP	Area (%)	nd	2.2±0.2	21.6±1.0	19.6±0.7	41.6±0.1	14.9±0.9
	DP _{peak}		>4100	188.2±0.8	44.4±0.9	29.3±0.1	13.7±0.7
CAS 9MP	Area (%)	nd	2.2±0.6	23.9±0.8	21.3±0.5	37.0±0.1	15.4±0.1
	DP _{peak}		>4100	248.4±0.2	41.2±0.3	29.1±0.2	14.6±0.3
CAS12MP	Area (%)	nd	1.4±0.1	24.0±0.4	22.0±0.7	37.8±0.7	15.5±0.3
	DP _{peak}		>4100	477.5±0.3	40.7±0.1	22.5±0.4	13.3±0.1
HAS P	Area (%)	1.33±0.3	6.6±0.6	56.1±0.6	20.9±0.7	10.0±0.2	5.2±0.7
	DP _{peak}	>4100	>4100	760.6±0.9	44.0±0.2	23.4±0.9	12.9±0.4
HAS 3FP	Area (%)	0.87±0.1	5.3±0.3	58.6±0.1	14.1±0.7	15.2±0.7	6.1±0.7
	DP _{peak}	>4100	>4100	552.2±0.6	38.0±0.0	23.4±0.0	11.9±0.5
HAS 6FP	Area (%)	0.86±0.1	5.2±0.4	55.0±0.9	21.3±0.5	12.9±0.7	4.3±0.7
	DP _{peak}	>4100	>4100	528.3±0.1	39.1±0.2	25.3±0.1	11.5±0.0
HAS 9FP	Area (%)	0.80±0.2	5.2±0.7	56.7±0.1	17.9±0.1	15.6±0.5	3.8±0.7
	DP _{peak}	>4100	>4100	594.0±0.9	43.6±0.3	25.8±0.7	13.7±0.1
HAS 12FP	Area (%)	0.63±0.1	4.7±0.5	56.5±0.6	19.4±0.3	13.8±0.1	5.0±0.1
	DP _{peak}	>4100	>4100	5187±0.1	40.2±0.1	25.3±0.2	12.1±0.6
HAS 3MP	Area (%)	0.47±0.1	4.2±0.4	39.9±0.3	19.5±0.6	31.0±0.7	4.9±0.7
	DP _{peak}	>4100	>4100	258.0±0.9	41.4±0.2	29.7±0.3	11.9±0.1
HAS 6MP	Area (%)	0.46±0.1	3.9±0.6	48.5±0.0	19.4±0.2	22.8±0.8	5.0±0.1
	DP _{peak}	>4100	>4100	288.9±0.0	40.6±0.4	29.2±0.5	12.5±0.0
HAS 9MP	Area (%)	0.44±0.1	3.8±0.6	46.6±0.2	18.5±0.1	25.6±0.8	4.6±0.5
	DP _{peak}	>4100	>4100	241.0±0.7	40.7±0.1	29.5±0.1	12.8±0.2
HAS12MP	Area (%)	0.42±0.2	3.2±0.4	46.1±0.3	19.5±0.3	24.9±0.6	4.9±0.1
	DP _{peak}	>4100	>4100	153.1±0.7	39.5±0.0	29.9±0.4	11.7±0.0

* Mean of three repetitions followed by the standard deviation. SPS = sweet potato starch, CAS = cassava starch, HAS = high amylose maize starch, P = de-branched, FP = hydrolyzed with fungal α -amylase prior to debranching, MP = hydrolyzed with fungal α -amylase prior to debranching, nd = not detected. 3, 6, and 12 h: treatment time with the amylases.

The SDS content showed no correlation with any of the fractions. These results indicate that, although amylose content favors the formation of RS3, the reduction in the size of these chains, coupled mainly with the increase in the proportion of chains with DP 13-30, also enhances the formation of RS3. These results are consistent with those reported by Eerlingen, Deceuninck and Delcour (1993) who showed that RS3 is formed by double helix aggregation along a chain region around 24 glucose units and by Shi and Seib (1992); Yang et al. (2016) who observed that higher proportions of chains with DP 16-30 have a positive effect on retrogradation. Allied to this, Gidley and Bulpin (1988) reported that amylose chains with $DP < 2000$ have their tendency to retrograde increased. During retrogradation, a tightly packed double helix structure is formed, which makes glycosidic (α -1,4) bonds inaccessible to amylases. Gidley and Bulpin (1988) showed that the retrogradation of chains with $DP < 90$ glucose units, and those with $250 < DP < 660$ occurs by alignment, where hydrogen bonds between the double helices occur along the entire length of the chains, forming a more orderly structure and more perfect crystals, which is probably a determining factor in increasing the resistance of retrograded starch. This alignment may also be favored by increasing the proportion of chains with the same DP. Chains with more varying sizes have the possibility of forming weaker packaged double helices and, consequently, more imperfect crystals, increasing the SDS content. Xie, Hu, Jin, Xu, and Chen (2014) reported that SDS may be a result of the formation of imperfect crystals, which are more easily digested than crystals found in RS3.

3.4. X-ray diffraction, relative crystallinity, and crystallite size

The X-ray diffraction patterns and their relative crystallinity (RC) of native and retrograded SPS, CAS and HAS are shown in Figure 3. As described in the literature, SPS has a type C pattern, which consists of a combination of polymorphisms A and B, while CAS and HAS have type A and B patterns, respectively. Starch polymorphism is

dependent on the length of the branched chains of its amylopectin (Hizukuri, 1985).

Type A pattern starches generally have higher proportions of short branched chains, while type B starches have higher proportions of long branched chains, as evidenced by the amylopectin branched chain length distribution data of these starches (Villas-Boas et al., 2019).

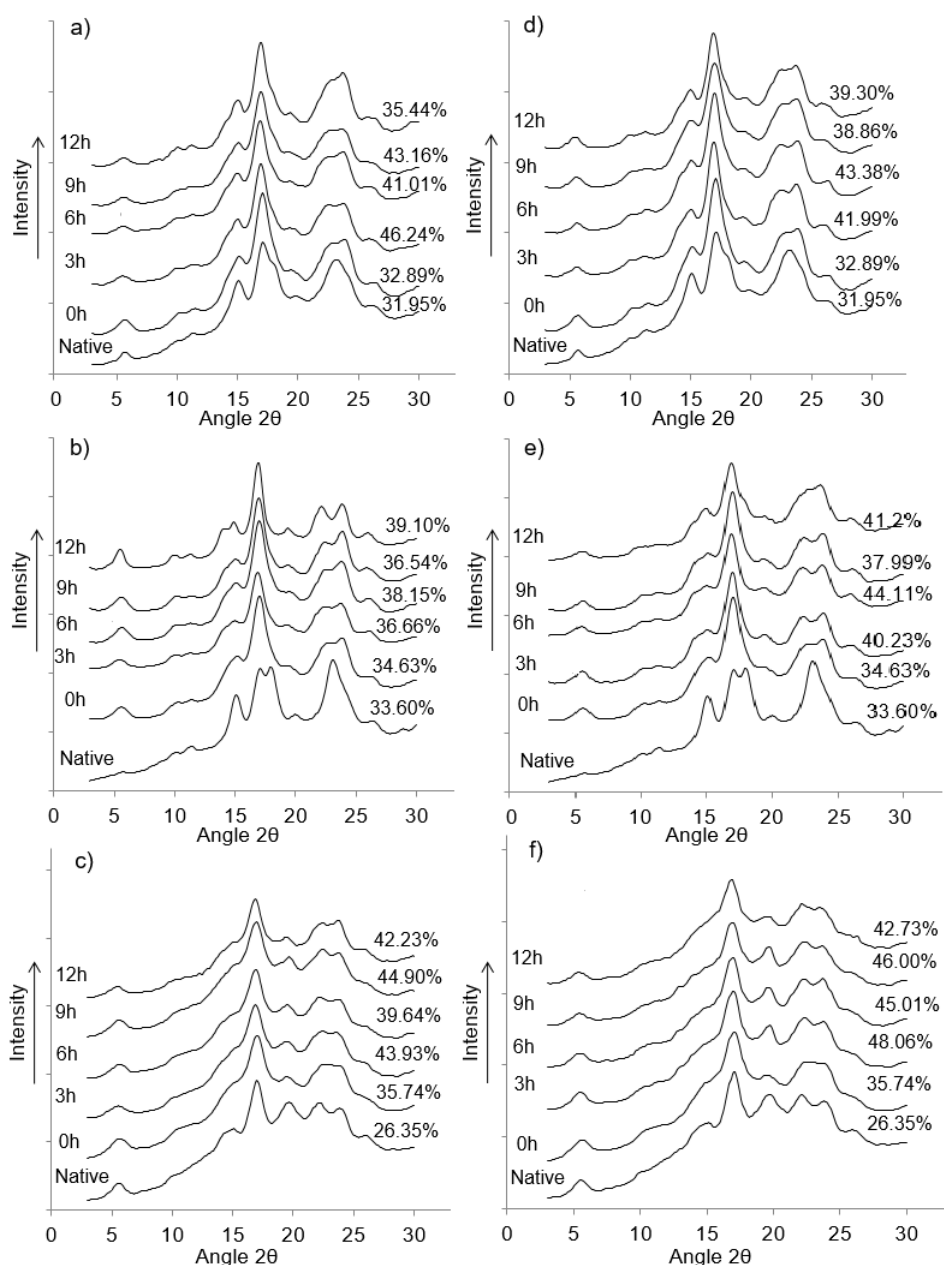


Figure 3 - X-ray diffractograms of native SPS, CAS and HAS, and treated with fungal α -amylase (a, b, c) and maltogenic α -amylase (d, e, f) for 0 h, 3 h, 6 h, 9 h and 12 h, de-branched and retrograded.

Re-association of starch chains during retrogradation leads to the formation of a new crystalline structure, different from that of the native starch. Retrograded starches exhibit a type B crystallinity pattern with peaks at 5.6° , 17° , 22° and 24° for 2θ , as extensively reported (Cai & Shi, 2013; Luckett & Wang, 2012; Ma, Ma, Zhou, Li, & Hu, 2019; Villas-Boas & Franco, 2016; Wu et al., 2017)

The RC of the de-branched and retrograded starches ranged from 32.89 to 35.74%. However, in all three starches, there was better re-association of the linear amylopectin chains released after hydrolysis of α -1,6 bonds by pullulanase action, thus forming a more ordered structure. When amylolysis preceded debranching and retrogradation, there was a significant increase in RC, regardless of treatment time. As with digestibility, RC varied with hydrolysis time due to the release of chains with different sizes. Increases of up to 40%, 27% and 34% in RC were observed for SPS, CAS and HAS, respectively, when compared to their respective de-branched starches. Other authors have also found an increase in RC when using different enzymes preceding the debranching of starches from different botanical sources (Villas-Boas & Franco, 2016; Wu et al., 2017; Zeng et al., 2015)

RC was strongly correlated with fraction IV for SPS ($r = 0.94$) and showed a mean correlation for CAS and HAS of $r = 0.84$ and $r = 0.81$, respectively. RC was also strongly correlated with the RS3 content for all starches ($r = 0.95$ for SPS and HAS and $r = 0.94$ for CAS). These results indicate that a higher proportion of DP 13-30 chains is an important factor in increasing the molecular order of starches. On the other hand, there was a negative mean correlation between RC and fraction V (-0.73) for CAS, since this starch is characterized by having high proportions of A chains, showing that these chains in high proportions negatively influence the formation of a more organized structure. Chains with $DP < 10$ are unable to form double helices (Bulpin & Gidley, 1987; Jane, Wong, & McPherson, 1997). There was also a negative mean correlation between RC and fraction I' ($r = -0.80$) for HAS, indicating that the reduction of very long

amylose chains enhances the formation of a highly organized structure during recrystallization (Gidley et al., 1995). Along with the increase in starch RC, there was increase in the size of the formed crystallites (Table 3).

Table 3 - Crystallite size of retrograded SPS, CAS and HAS

Starch	Crystallite size (nm)
SPS P	6,61 ^f
SPS 3h F P	7,85 ^a
SPS 6h F P	7,46 ^d
SPS 9h F P	7,55 ^b
SPS 12h F P	7,18 ^e
SPS 3h M P	7,53 ^{bc}
SPS 6h M P	7,58 ^b
SPS 9h M P	7,44 ^d
SPS 12h M P	7,48 ^{cd}
CAS P	6,89 ^e
CAS 3h F P	7,08 ^d
CAS 6h F P	7,46 ^{bc}
CAS 9h F P	7,10 ^d
CAS 12h F P	7,48 ^{bc}
CAS 3h M P	7,50 ^{bc}
CAS 6h M P	7,68 ^a
CAS 9h M P	7,38 ^c
CAS 12h M P	7,60 ^{ab}
HAS P	6,93 ^f
HAS 3h F P	7,57 ^{de}
HAS 6h F P	7,46 ^e
HAS 9h F P	7,72 ^{bc}
HAS 12h F P	7,62 ^{cd}
HAS 3h M P	8,05 ^a
HAS 6h M P	7,73 ^{bc}
HAS 9h M P	7,81 ^b
HAS 12h M P	7,66 ^{cd}

P = de-branched with pullulanase; FP = hydrolyzed with fungal α -amylase prior to debranching; MP = hydrolyzed with fungal α -amylase prior to debranching. SPS = sweet potato starch: CAS = cassava starch: HAS = high amylose maize starch: 3.6.9, and 12 h: treatment time with the amylases.

Crystallites size is related to its perfection, in a way that an increase of crystallites size indicates the formation of more perfect crystalline structure (Gidley et al., 1995; Kiatponglarp, Tongta, Rolland-Sabaté, & Buléon, 2015), and consequently decreases the digestive enzyme accessibility. There was strong correlation between crystallites size and RS3 level for SPS ($r = 0.99$), and for CAS and HAS ($r = 0.96$). This probably occurred because the increase in the proportion of fraction IV (DP 13-30) and

the reduction in the length of the chains of fraction II may have caused an increase in mobility and interaction between the chains. That would allow a larger number of encounters between these chains, favoring nucleation and a propagation and so leading to the formation of larger, more perfect and more strongly bound crystallites. An increase in the chain mobility increases the size and perfection of the crystallites (Kiatpongarp et al., 2015).

3.5. Thermal properties

The gelatinization temperatures of native root starches were all very close and were also lower than those found for HAS (Table 4) due to the dense packing of the long amylose and amylopectin chains present in the latter.

The three retrograded starches had a wide endothermic transition range (ΔT). Starch transition temperatures ranged from 51 to 105 °C for the root starches and from 115 to 161 °C for HAS. This amplitude, more expressive in starches submitted to enzymatic pretreatment, indicates greater heterogeneity of the crystals formed after retrogradation, which have different melting temperatures and thermal stability, due to their being formed by chains of different lengths, as reported by Luckett and Wang (2012) Villas-Boas and Franco (2016); Wu et al. (2017). The higher transition temperatures found in HAS indicate that structures formed after recrystallization have higher thermal stability when compared to those of the root starches. Retrogradation of amylose requires high melting temperatures (~ 140 °C) (Gidley & Bulpin, 1988). The peak and final temperatures of the pretreated starches increased when compared to their respective de-branched-only starches (especially for the root starches) which showed an increase in the thermal stability of the crystals formed in retrogradation. These results agree with those of crystallites size since larger crystallites have higher thermal stability (Kiatpongarp et al., 2015). This characteristic would allow these

starches to undergo different kinds of food processing while maintaining their resistance.

Table 4 - Thermal properties of native and retrograded SPS, CAS and HAS

Starch	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	ΔT(°C)	ΔH(J/g)
SPS N	63.4±0.1	69.7±0.1	74.8±0.0	11.4	12.3±0.0
SPS PR	59.8±0.2 ^b	78.7±0.3 ^c	96.7±0.3 ^h	36.9	9.6±0.3 ^e
SPS 3FPR	50.9±0.5 ^d	73.5±0.6 ^d	104.0±0.2 ^b	53.1	19.6±0.4 ^a
SPS 6FPR	50.2±0.9 ^d	73.4±0.5 ^d	100.1±0.0 ^{de}	49.9	13.2±0.4 ^c
SPS 9FPR	51.0±0.9 ^d	77.0±0.5 ^d	98.9±0.4 ^g	47.9	15.5±0.4 ^b
SPS 12FPR	50.5±0.8 ^d	73.2±0.1 ^d	99.0±0.4 ^{fg}	48.5	11.4±0.3 ^d
SPS 3MPR	55.9±0.3 ^c	91.1±0.7 ^a	106.7±0.6 ^a	50.8	15.2±0.2 ^b
SPS 6MPR	61.9±0.3 ^a	79.7±0.1 ^c	100.5±0.6 ^{cd}	38.6	15.9±0.3 ^b
SPS 9MPR	56.4±0.1 ^c	83.2±0.7 ^b	99.5±0.8 ^{ef}	43.1	13.0±0.1 ^c
SPS 12MPR	59.1±0.3 ^b	74.1±0.5 ^d	99.3±0.4 ^{fg}	40.2	13.7±0.1 ^c
CAS N	64.3±0.1	68.7±0.4	73.2±0.0	8.9	12.9±0.1
CAS PR	62.0±0.1 ^{de}	81.4±0.5 ^f	101.7±0.1 ^d	39.7	11.1±0.7 ^f
CAS 3FPR	65.9±0.1 ^a	84.2±0.6 ^{cd}	102.0±0.2 ^d	36.1	12.0±0.5 ^e
CAS 6FPR	55.2±0.6 ^g	81.9±0.8 ^{ef}	102.4±0.1 ^d	47.2	13.1±0.2 ^{cd}
CAS 9FPR	65.6±0.4 ^a	90.1±0.8 ^b	104.2±0.1 ^c	38.6	12.2±0.5 ^e
CAS 12FPR	62.9±0.4 ^{cd}	82.2±0.3 ^{ef}	100.1±0.7 ^e	37.2	13.4±0.1 ^c
CAS 3MPR	64.3±0.2 ^b	90.6±0.0 ^{ab}	107.3±0.0 ^b	43.0	14.2±0.1 ^b
CAS 6MPR	61.9±0.7 ^{ef}	91.8±0.6 ^a	110.2±0.3 ^a	48.3	16.2±0.2 ^a
CAS 9MPR	63.2±0.0 ^c	82.3±0.1 ^{ef}	107.7±0.9 ^b	44.5	12.3±0.2 ^{de}
CAS 12MPR	61.5±0.5 ^f	83.2±0.1 ^{de}	101.9±0.2 ^d	40.4	14.5±0.1 ^b
HAS N	70.7±0.2	79.6±0.3	101.8±0.3	31.1	14.9±0.1
HAS PR	118.1±0.6 ^{ef}	141.0±0.7 ^b	153.7±0.7 ^c	35.6	10.3±0.8 ^h
HAS 3FPR	122.7±0.8 ^b	140.6±0.7 ^b	152.2±0.6 ^{de}	29.5	14.5±0.6 ^f
HAS 6FPR	120.4±0.2 ^c	140.9±0.7 ^b	154.7±0.1 ^c	34.3	13.3±0.5 ^g
HAS 9FPR	119.4±0.4 ^{de}	137.2±0.1 ^d	146.9±0.6 ^g	27.5	17.0±0.5 ^{cd}
HAS 12FPR	121.4±0.6 ^{bc}	139.1±0.1 ^c	151.7±0.6 ^{ef}	30.3	15.7±0.2 ^{ef}
HAS 3MPR	118.0±0.6 ^f	142.2±0.2 ^a	150.4±0.7 ^f	32.4	24.1±0.7 ^a
HAS 6MPR	121.4±0.3 ^{bc}	138.8±0.2 ^c	159.2±0.6 ^b	37.8	17.6±0.4 ^c
HAS 9MPR	116.3±0.2 ^g	141.6±0.3 ^{ab}	161.3±0.4 ^a	45.0	18.6±0.3 ^b
HAS 12MPR	124.7±0.5 ^a	140.7±0.2 ^b	151.6±0.7 ^{ef}	26.9	16.2±0.2 ^{de}

* Mean of three repetitions followed by the standard deviation. Values followed by different letters in the same column and starch source differ significantly by the Tukey test ($p \leq 0.05$). N = native starch; P = de-branched; FP = hydrolyzed with fungal α -amylase prior to debranching and retrogradation; MP = hydrolyzed with maltogenic α -amylase prior to debranching and retrogradation. SPS = sweet potato starch; CAS = cassava starch; HAS = high amylose maize starch: 3.6.9, and 12 h: treatment time with the amylases. To, Tp, Tc = onset, peak and conclusion temperatures, ΔT: T_c – T_o. ΔH= enthalpy change.

Enthalpy change (ΔH) is related to the content, ordering and stability of the double helix structure (Kiatpongarp et al., 2015; Xu, Chen, Luo, & Lu, 2019). Debranched and retrograded starches showed high ΔH (Table 4). These values increased substantially when amylolysis preceded debranching and varied with

incubation time for both enzymes due to the different chain sizes formed, which, in turn, formed double helices with different degrees of packaging. Increases of 104%, 45% and 130% were seen in ΔH for SPS, CAS and HAS respectively. The ΔH reached 19.6 J / g for SPS with 3 h of fungal α -amylase hydrolysis, 16.2 J / g for CAS with 6 h of hydrolysis with maltogenic α -amylase and 24.1 J / g for HAS hydrolyzed for 3 h with maltogenic α -amylase. These results show that, although amylose retrogradation has high thermal stability, the interaction force between the chains can be increased by the action of amylolysis.

There was a positive correlation between ΔH and fraction IV ($r = 0.93, 0.83$ and 0.9 for SPS, CAS and HAS, respectively), between ΔH and RS3 content ($r = 0.91, 0.92$ and 0.87 for SPS, CAS and HAS, respectively), between ΔH and RC ($r = 0.97, 0.99$ and 0.87 for SPS, CAS and HAS, respectively), and between ΔH and crystallites size ($r = 0.89$ for SPS and 0.90 for CAS and HAS). Additionally, for HAS, ΔH also had a negative mean correlation with fraction II ($r = -0.80$). These results also show that even though amylose has a strong tendency to re-associate, the reduction in DP and the proportion of these longer chains further enhances their reorganization. Allied to this, the increase in the proportion of intermediate chains in fraction IV is very important to the increase in enthalpy. As already discussed, these chains realign themselves into more tightly packed crystallites and in larger size, meaning that this crystalline structure needs more energy to break it down.

3.6. Solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance

The starches from each of the botanical sources with the highest RS3 contents had their molecular structures analyzed by nuclear magnetic resonance. The CPMAS spectra of gelatinized (amorphous) SPS, CAS and HAS, de-branched by pullulanase and their respective starches subjected to the action of fungal α -amylase and

maltogenic α -amylase prior to debranching are shown in Figure 4 and the results for relative crystallinity and double helix concentration are given in Table 5.

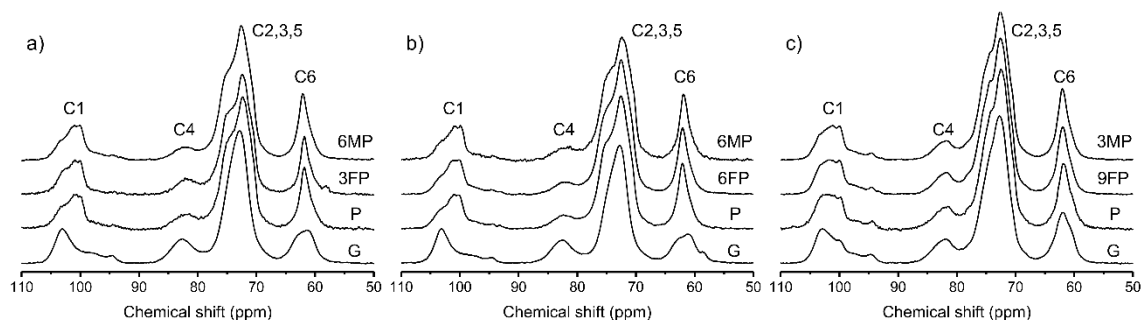


Figure 4 - ^{13}C CPMAS spectra obtained at 10 kHz from SPS (A), CAS (B) e HAS (C) treated with fungal α -amylase (FP) and maltogenic α -amylase (MP). Amorphous (G), de-branched and retrograded (P)

The most obvious change resides in the profile of the C1 carbon resonance signal in the range from 107 to 90 ppm. This change illustrates the dependence of conformational effects of different torsion angles of α - (1-4) glycosidic bonds, which can be translated to the greater spatial regularity of chemical groups in the order of bonding lengths, as the C1 signal enhances its symmetry profile (Paris, Bizot, Emery, Buzaré, & Buléon, 1999). In contrast, the deconvolution of broad signals, especially those observed at 103 ppm and 82 ppm, for carbons C1 and C4, respectively, characterize amorphous domains. The higher the relative contribution of these signals, the lower the concentration of crystalline domains for the B-type polymorph (Michael J. Gidley & Bociek, 1985).

The increased contribution of the ordered phases at 101, 100 and 99 ppm shown in the CPMAS spectra (Figure 4) indicates an increase in relative crystallinity. These data corroborate those obtained by X-ray diffraction (Table 5) and the RS3 content (Table 1). Zeng et al. (2015) also found a similar trend in RS3 formation, achieving a proportional increase in crystalline content over short and long chemical bonding distances by means of these methods. Strong positive correlation ($r = 0.98$) was found between the RC, obtained by CPMAS, and the RS3 content. In addition, the

double helix concentration and the crystalline phases of the samples with amylolysis increased substantially when compared to the respective de-branched starches, regardless of the botanical source, and the HAS hydrolyzed for 3h by the maltogenic α -amylase obtained the highest values for double helix and crystalline phase for both cases (Table 5). The increase in double-helix concentration is consistent with the increase in the relative crystallinity of these starches, as also reported by Zeng et al. (2015).

Table 5 - Relative crystallinity (RC) calculated from X-ray standards (XRD) and CPMAS spectra; and relative double helix content calculated using the CPMAS spectra

Samples	RC (%)		Double helix (%)
	XRD	CPMAS	
SPS P	32.9	38.5	36.3
SPS3FP	46.2	58.3	56.5
SPS6MP	43.4	52.0	45.4
CAS P	34.6	43.1	39.6
CAS6FP	38.2	50.8	48.1
CAS6MP	44.1	54.5	52.7
HAS P	35.7	43.8	36.6
HAS9FP	44.9	55.6	52.3
HAS3MP	48.1	58.8	57.0

SPS = sweet potato starch; CAS = cassava starch; HAS = high amylose maize starch; P = de-branched; FP = hydrolyzed with fungal α -amylase prior to debranching and retrogradation; MP = hydrolyzed with maltogenic α -amylase prior to debranching and retrogradation; .3.6.9, and 12 h: treatment time with the amylases

The higher double-helix concentration, representing structures ordered at short chemical bonding distances, directly contributed to the increased regular packing of long-distance chains to the formation of a more orderly crystal structure (Atichokudomchai, Varavinit, & Chinachoti, 2004). These results also corroborate the data of ΔH (Table 4), indicating the increase in double helix concentration and higher energy is required for gelatinization of these starches. A strong positive correlation ($r = 0.91$) was also found between double helix concentration and the RS3 content of these

starches, which confirms that α -amylases action enhances starch recrystallization. The strong correlation between crystal structure and resistance to digestive enzymes shows that the increase in double helix concentration is an important factor in the increase of RS3 content.

4. CONCLUSION

Enzymatic pretreatment is effective in reducing starch digestibility. Content of RS3 greater than 60% and SDS around 20% were obtained. In general, the increase in RS3 content is mainly due to the increase in the proportion of chains with DP between 13-30 and the reduction of long amylose chains from ~ 720 to a DP of 200 - 450 due to the formation of larger proportion of more tightly packed double helices favoring greater nucleation and propagation of larger crystallites. Although amylose content is the main raw material for obtaining RS3, the reduction of DP of these chains is an important factor in enhancing the formation of this starch fraction. A strong positive correlation between relative crystallinity, crystallites size, ΔH and RS3 content is shown and resistant starches with higher thermal stability are formed. The high levels of RS3 found in root starches show that amylolysis is a good alternative for obtaining starches more resistant from conventional botanical sources such as sweet potato and cassava, which are widely produced in tropical countries, with lower cost and easy isolation of the starch. Thus, the mechanism of action of enzymes, the hydrolysis time and the structural characteristics of native starch, especially the distribution of the length of its chains, are important factors in obtaining RS3 when amylolysis precedes the debranching.

Acknowledgements

The authors would like to thank the São Paulo State Research Foundation – FAPESP – (grants n° 2017/19521-1; 2016/20970-2) and the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (grant n° 307942/2015-5) in Brazil for their financial support and, also, the National Council for the Improvement of Higher Education - CAPES for their scholarship awarded to the first author.

5. REFERENCES

- Atichokudomchai, N., Varavinit, S., & Chinachoti, P. (2004). A study of ordered structure in acid-modified tapioca starch by ^{13}C CP/MAS solid-state NMR. *Carbohydrate Polymers*, 58, 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.07.017>.
- Avaltroni, F., Bouquerand, P. E., & Normand, V. (2004). Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 58, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.08.001>.
- Berry, C. S. (1986). Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*, 4, 301–314. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(86\)80034-0](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(86)80034-0).
- Bijttebier, A., Goesaert, H., & Delcour, J. A. (2010). Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: structural analysis of the residual amylopectin population. *Carbohydrate Research*, 345, 235–242; <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.11.01>.
- Bulpin, P. V., & Gidley, M. J. (1987). Crystallisation of Malto-oligosaccharides as models of the crystalline forms of starch: minimum chain-length requirement for the formation of double helices. *Carbohydrate Research*, 161, 291–300. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90086-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90086-7).
- Cai, L., & Shi, Y. C. (2013). Self-assembly of short linear chains to A- and B-type starch spherulites and their enzymatic digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10787–10797. <https://doi.org/10.1021/jf402570e>.
- Ding, Y., Luo, F., & Lin, Q. (2019). Insights into the relations between the molecular structures and digestion properties of retrograded starch after ultrasonic treatment. *Food Chemistry*, 294, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.050>.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 79, 350–354. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., & Cummings, J. H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, 33–50.
- Eerlingen, R. C., Deceuninck, M., & Delcour, J. A. (1993). Enzyme-resistant starch. II. influence of amylose chain length on resistant starch formation. *Cereal Chemistry*, 70, 345–350.
- Emilien, C. H., Hsu, W. H., & Hollis, J. H. (2017). Effect of resistant wheat starch on subjective appetite and food intake in healthy adults. *Nutrition*, 43–44, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.06.020>.

- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch/Staerke*, 63, 406–415. <https://doi.org/10.1002/star.201000099>.
- Gidley, M. J., & Bociek, S. M. (1985). Molecular organization in starches: a ^{13}C CP/MAS NMR study. *Journal of the American Chemical Society*, 107, 7040–7044. <https://doi.org/10.1021/ja00310a047>.
- Gidley, M. J., & Bulpin, P. V. (1988). Aggregation of amylose in aqueous systems: the effect chain length on phase behavior and aggregation kinetics. *American Chemical Society*, 22, 341–346. <https://doi.org/10.1021/ma00191a062>.
- Gidley, M. J., Cooke, D., Darke, A. H., Hoffmann, R. A., Russell, A. L., & Greenwell, P. (1995). Molecular order and structure in enzyme-resistant retrograded starch. *Carbohydrate Polymers*, 28, 23–31. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(96\)813877](https://doi.org/10.1016/0144-8617(96)813877).
- Gilbert, R. G., Witt, T., & Hasjim, J. (2013). What is being learned about starch properties from multiple-level characterization. *Cereal Chemistry*, 90, 312–325. <https://doi.org/10.1094/cchem-11-12-0141-fi>
- Goesaert, H., Slade, L., Levine, H., & Delcour, J. A. (2009). Amylases and bread firming—an integrated view. *Journal of Cereal Science*, 50, 345–352. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2009.04.010>.
- Han, J. A., & BeMiller, J. N. (2007). Preparation and physical characteristics of slowly digesting modified food starches. *Carbohydrate Polymers*, 67, 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.011>.
- Hizukuri, S. (1985). Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, 141, 295–306. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90461-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90461-0).
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research*, 147, 342–347. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90643-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90643-8).
- Hung, P. Van, Vien, N. L., & Lan Phi, N. T. (2016). Resistant starch improvement of rice starches under a combination of acid and heat-moisture treatments. *Food Chemistry*, 191, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.002>.
- Jane, J., Wong, K., & McPherson, A. E. (1997). Branch-structure difference in starches of A- and B-type x-ray patterns revealed by their Naegeli dextrans. *Carbohydrate Research*, 300, 219–227. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00056-6).
- Jiang, H., Miao, M., Ye, F., Jiang, B., & Zhang, T. (2014). Enzymatic modification of corn starch with 4- α -glucanotransferase results in increasing slow digestible and resistant starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.044>
- Kiatpongarp, W., Tongta, S., Rolland-Sabaté, A., & Buléon, A. (2015). Crystallization and chain reorganization of debranched rice starches in relation to resistant starch formation. *Carbohydrate Polymers*, 122, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.070>
- Krauser, M. de O., Oliveira, H. H. de S., Cebim, M. A., & Davolos, M. R. (2018). Relationship between scintillation properties and crystallite sizes in $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$. *Journal of Luminescence*, 203, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.06.038>.
- Li, Y., Xu, J., Zhang, L., Ding, Z., Gu, Z., & Shi, G. (2017). Investigation of debranching pattern of a thermostable isoamylase and its application for the production of resistant starch. *Carbohydrate Research*, 446, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.05.016>.
- Lin, L., Guo, D., Huang, J., Zhang, X., Zhang, L., & Wei, C. (2016). Molecular structure and enzymatic hydrolysis properties of starches from high-amylose maize inbred lines and their hybrids. *Food Hydrocolloids*, 58, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.001>.

- Liu, G., Gu, Z., Hong, Y., Cheng, L., & Li, C. (2017). Structure, functionality and applications of debranched starch: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.004>.
- Luckett, C. R., & Wang, Y. J. (2012). Effects of β -amylolysis on the resistant starch formation of debranched corn starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4751–4757. <https://doi.org/10.1021/jf300854e>.
- Ma, Z., Ma, M., Zhou, D., Li, X., & Hu, X. (2019). The retrogradation characteristics of pullulanase debranched field pea starch: Effects of storage time and temperature. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 984–992. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.064>.
- Miao, M., Xiong, S., Jiang, B., Jiang, H., Cui, S. W., & Zhang, T. (2014). Dual-enzymatic modification of maize starch for increasing slow digestion property. *Food Hydrocolloids*, 38, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.006>.
- Mutungi, C., Passauer, L., Onyango, C., Jaros, D., & Rohm, H. (2012). Debranched cassava starch crystallinity determination by Raman spectroscopy: Correlation of features in Raman spectra with X-ray diffraction and ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 87, 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.032>.
- Nara, S., Komiya, T. (1983). Studies on the relationship between water-saturation state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. *Starch/Stärke*, 35, 407–410. <https://doi.org/10.1002/star.19830351202>.
- Paris, M., Bizot, H., Emery, J., Buzaré, J. Y., & Buléon, A. (1999). Crystallinity and structuring role of water in native and recrystallized starches by ^{13}C CP-MAS NMR spectroscopy. 1: Spectral decomposition. *Carbohydrate Polymers*, 39, 327–339. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00022-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00022-3).
- Pereira, K. D. (2007). Resistant starch, the latest generation of energy control and healthy digestion. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 27, 88–92. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000500016>.
- Perera, A., Meda, V., & Tyler, R. T. (2010). Resistant starch: a review of analytical protocols for determining resistant starch and of factors affecting the resistant starch content of foods. *Food Research International*, 43, 1959–1974. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.003>.
- Pongjanta, J., Utaipattanaceep, A., Naivikul, O., & Piyachomkwan, K. (2009). Debranching enzyme concentration effected on physicochemical properties and α -amylase hydrolysis rate of resistant starch type III from amylose rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 78, 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.037>.
- Rodríguez-Cabezas, M. E., Camuesco, D., Arribas, B., Garrido-Mesa, N., Comalada, M., Bailón, E., Cueto-Sola, M., Utrilla, P., Guerra-Hernández, E., Pérez-Roca, C., Gálvez, J., Zarzuelo, A. (2010). The combination of fructooligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats. *Clinical Nutrition*, 29, 832–839. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.05.005>.
- Shi, Y. C., & Seib, P. A. (1992). The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. *Carbohydrate Research*, 227, 131–145. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(92\)85066-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(92)85066-9).
- Silva, D. S., Almeida, A., Prezotti, F. G., Facchinatto, W. M., Colnago, L. A., Campana-Filho, S. P., & Sarmiento, B. (2017). Self-aggregates of 3,6-O,O'-dimyristoylchitosan derivative are effective in enhancing the solubility and intestinal permeability of camptothecin. *Carbohydrate Polymers*, 177, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.114>.
- Singh, J., Dartois, A., & Kaur, L. (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.12.001>.
- Song, Y., & Jane, J. L. (2000). Characterization of barley starches of waxy, normal and

- high amylose varieties. *Carbohydrate Research*, 41, 365–377. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00098-3).
- Vilaplana, F., Hasjim, J., & Gilbert, R. G. (2012). Amylose content in starches: toward optimal definition and validating experimental methods. *Carbohydrate Polymers*, 88, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.072>.
- Villas-Boas, F., & Franco, C. M. L. (2016). Effect of bacterial β -amylase and fungal α -amylase on the digestibility and structural characteristics of potato and arrowroot starches. *Food Hydrocolloids*, 52, 795–803. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.024>.
- Villas-Boas, F., Yamauti, Y., Moretti, M. M. S., & Franco, C. M. L. (2019). Influence of molecular structure on the susceptibility of starch to α -amylase. *Carbohydrate Research*, 479, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.05.001>.
- Wu, C., Zhou, X., Wei, B., Tian, Y., Xu, X., & Jin, Z. (2017). Effects of α -maltotriohydrolase hydrolysis prior to debranching on the structure and digestibility of normal maize starch. *Starch/Staerke*, 69, 1–8. <https://doi.org/10.1002/star.201600078>.
- Xie, Y. Y., Hu, X. P., Jin, Z. Y., Xu, X. M., & Chen, H. Q. (2014). Effect of temperature-cycled retrogradation on in vitro digestibility and structural characteristics of waxy potato starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.007>.
- Xu, X., Chen, Y., Luo, Z., & Lu, X. (2019). Different variations in structures of A- and B-type starches subjected to microwave treatment and their relationships with digestibility. *LWT - Food Science and Technology*, 99, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.072>.
- Yang, Z., Swedlund, P., Hemar, Y., Mo, G., Wei, Y., Li, Z., & Wu, Z. (2016). Effect of high hydrostatic pressure on the supramolecular structure of corn starch with different amylose contents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 604–614. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.018>.
- Yu, W., Tao, K., & Gilbert, R. G. (2018). Improved methodology for analyzing relations between starch digestion kinetics and molecular structure. *Food Chemistry*, 264, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.049>.
- Zeng, F., Chen, F., Kong, F., Gao, Q., Aadil, R. M., & Yu, S. (2015). Structure and digestibility of debranched and repeatedly crystallized waxy rice starch. *Food Chemistry*, 187, 348–353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.033>.
- Zeng, F., Ma, F., Gao, Q., Yu, S., Kong, F., & Zhu, S. (2014). Debranching and temperature-cycled crystallization of waxy rice starch and their digestibility. *Carbohydrate Polymers*, 113, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.057>.
- Zhang, B., Chen, L., Zhao, Y., & Li, X. (2013). Structure and enzymatic resistivity of debranched high temperature–pressure treated high-amylose corn starch. *Journal of Cereal Science*, 57, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.12.006>.
- Zhang, G., & Hamaker, B. R. (2009). Slowly digestible starch: Concept, mechanism, and proposed extended glycemic index. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 852–867. <https://doi.org/10.1080/10408390903372466>.
- Zhang, H., & Jin, Z. (2011). Preparation of products rich in resistant starch from maize starch by an enzymatic method. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1610–1614. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.070>.
- Zhou, Y., Meng, S., Chen, D., Zhu, X., & Yuan, H. (2014). Structure characterization and hypoglycemic effects of dual modified resistant starch from indica rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 103, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.020>.

Capítulo III

Pré-tratamento com ultrassom: Efeito do ultrassom sobre a formação de amido resistente e suas características estruturais.

Efeito do ultrassom sobre a formação de amido resistente e suas características estruturais

Flávia Villas Boas^a, William Marcondes Facchinatto^b, Luiz Alberto Colnago^c, Diogo Paschoalini Volant^d, Celia Maria Landi Franco^{a*}

^a UNESP — São Paulo State University, Department of Food Engineering and Technology.

^b USP — University of São Paulo, São Carlos Institute of Chemistry..

^c Embrapa Instrumentation — Brazilian Agricultural Research Corporation..

^d UNESP - São Paulo State University, Department of Chemistry and Environment Science.

Resumo

O efeito do ultrassom sobre a formação e características estruturais do amido resistente tipo 3 (AR3) foram avaliadas. Amidos de batata-doce (SPS), mandioca (CAS) e milho com alto teor de amilose (HAS) foram autoclavados (121°C/30 min), sonificados em diferentes tempos e potências, desramificados e retrogradados. Os amidos modificados foram analisados quanto à distribuição de peso molecular (HPSEC), cristalinidade relativa e tamanho dos cristalitos (difratometria de raios-X), propriedades térmicas (DSC) e digestibilidade *in vitro*. A proporção de duplas hélices nos amidos com mais alto nível de resistência também foi determinada (RMN¹³C). O ultrassom, devido à cavitação, rompeu preferencialmente as cadeias muito longas (> 667.800 Da) e longas (GP ~ 700) amilose causando aumento na proporção de cadeias menores com GP ~500-600, GP 30-120 e principalmente GP 13-30. Essas cadeias, por apresentarem tamanhos mais adequados à reassociação, potencializaram a retrogradação resultando no aumento da cristalinidade, entalpia (ΔH) e teor de AR3. No entanto, as condições de sonicação e a estrutura molecular influenciaram os efeitos do ultrassom sobre o amido. Nos amidos de raízes as maiores CR, ΔH e AR3 foram obtidos no tratamento a 40 W, enquanto para o HAS a potência de 20 W foi mais efetiva. O teor de amilose, a redução no GP das cadeias longas e muito longas

deste polímero e o aumento na proporção de cadeias com GP 13-30, especialmente GP 20-23, foram determinantes para o aumento nos níveis de AR3. O ultrassom é uma tecnologia ambientalmente amigável e economicamente correta que se mostra eficiente na formação de AR3.

Palavras chave: Ultrassom, cavitação, amido resistente, estrutura molecular

Abstract

The effect of ultrasound on the formation and structural characteristics of resistant starch type 3 (RS3) were evaluated. Sweet potato (SPS), cassava (CAS) and high amylose maize (HAS) starches were autoclaved (121°C/30 min), sonicated, debranched and retrograded. The modified starches were analyzed for molecular weight distribution (HPSEC), relative crystallinity and crystallite size (X-ray diffractometry), thermal properties (DSC) and in vitro digestibility. The proportion of double helices in the highest resistant starches was also determined (¹³C NMR). Ultrasound due to cavitation preferentially disrupted very long (> 667,800 Da) and long (DP ~ 700) amylose chains causing increased proportion of smaller chains with DP ~ 500-600, DP 30-120 and mainly DP 13-30. These chains, because they are more suitable for reassociation, potentiated retrogradation resulting in increased crystallinity, enthalpy (ΔH) and RS3 content. However, sonication conditions and molecular structure influenced the effects of ultrasound on starch. In the root starches the highest CR, ΔH and RS3 were obtained in the 40 W treatment, while for the HAS the 20 W power was more effective. The amylose content, the reduction in DP of long and very long chains of this polymer and the increase in the proportion of chains with DP 13-30, especially DP 20-23, were determinant for the increase in RS3 levels. Ultrasound is an environmentally friendly and economically correct technology and effective in forming RS3.

Key words: Ultrasound, cavitation, resistant starch, molecular structure

1. INTRODUÇÃO

O ultrassom, usado como método físico de modificação de alimentos, tem sido associado ao conceito emergente de “química e tecnologia verde”. É ecologicamente correto, eficiente, seguro e economicamente viável. Sua utilização na modificação de amidos tem imenso potencial, visto que esse polissacarídeo é um importante ingrediente e na sua forma nativa nem sempre atende algumas necessidades específicas da indústria (KIM et al., 2013). Ondas de ultrassom são ondas acústicas que necessitam de um meio para se propagar a uma frequência acima do limite da audição humana (> 16 kHz). As ondas ultrassônicas de alta intensidade (> 1 W/cm²) e baixa frequência (16-100 kHz) podem gerar o fenômeno de cavitação e causar alterações físicas, químicas ou mecânicas no meio em que se propagam (ZHU et al., 2015; LU et al., 2018).

Inúmeros estudos têm mostrado que o ultrassom pode afetar as propriedades físico-químicas do amido incluindo solubilidade, poder de inchamento, temperatura de gelatinização e entalpia, propriedades de pasta e cristalinidade relativa (SUJKA; JAMROZ, 2013; PINTO et al., 2015; LI et al., 2018; YANG et al., 2019). Também tem sido reportado que o ultrassom de alta potência provoca danos na superfície granular e rompimento das cadeias do amido em fragmentos de menor massa molecular (PINTO et al., 2015; ZHENG et al., 2015; KANG et al., 2016; WANG et al., 2017; FALSIFI et al., 2019). Yang et al. (2019) usaram ultrassom a potências de 100 e 400 W e frequência de 15 kHz em dispersões de amido granular de milho ceroso e observaram que as cadeias mais longas do amido foram quebradas. Esse efeito é atribuído principalmente à cavitação que acontece quando as ondas são propagadas através do meio induzindo a uma série de ciclos de compressão e decompressão formando pequenas bolhas. Com vários ciclos seguidos, as bolhas aumentam de tamanho até o ponto em que a oscilação da parede da bolha é igual ao da frequência aplicada pelas ondas sonoras resultando na explosão das mesmas durante um ciclo

de compressão. Essa explosão produz uma força de cisalhamento e turbulência muito altas (ZHU, 2015; LU et al., 2018).

A retrogradação do amido gelatinizado conduz à formação de uma estrutura com duplas hélices fortemente ligadas e altamente organizadas que torna as ligações glicosídicas inacessíveis às enzimas digestivas. O amido retrogradado é então denominado amido resistente tipo 3 (AR3) (ZHANG et al., 2013). O amido resistente é um carboidrato não glicêmico que possui comportamento fisiológico semelhante ao das fibras alimentares mostrando efeitos positivos em caso de diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010). Por não ser hidrolisado no sistema digestivo, ele chega até o cólon onde é usado como substrato para fermentação pelas bactérias presentes na microflora intestinal (ENGLYST et al., 1992; DUPUIS et al., 2014). Já os cristais imperfeitos formados durante a retrogradação são hidrolisados pelas enzimas digestivas, porém, lentamente, formando assim a fração de amido lentamente digerível (ALD). Esta fração de amido provoca uma liberação lenta e prolongada de glicose na corrente sanguínea prolongando a sensação de saciedade, o que auxilia no controle e prevenção de diabetes tipo II e obesidade (JIANG et al., 2014). O consumo de produtos ricos nessas frações de amido (AR e ALD) é uma das tendências alimentares atuais, visto que as mesmas são consideradas ingredientes de alta qualidade funcional (DING et al., 2019).

Amidos com alto teor de amilose são geralmente preferidos para a formação de AR3 devido à forte tendência dessa molécula a se retrogradar e formar cristais resistentes (LU et al., 2018). No entanto, vários métodos têm sido investigados a fim de potencializar a retrogradação e consequente redução na digestibilidade de amidos de diferentes fontes botânicas, incluindo ciclos de autoclavagem e resfriamento (SIMSEK; EL, 2012), extrusão termoplástica (GONZÁLEZ-SOTO et al., 2006), hidrólise ácida (CHEN et al., 2017), desramificação enzimática (REDDY et al., 2017; DING et

al., 2019) e amilólise precedendo a desramificação (LUCKET; WANG, 2012; VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016; WU et al., 2017). Esses tratamentos têm sido realizados para promover uma melhor recristalização das cadeias de amido durante a retrogradação.

A redução da massa molecular do amido por meio do ultrassom pode promover a liberação de fragmentos com maior tendência a se reassociar, e assim aumentar o nível de AR3. Contudo, um comprimento de cadeia adequado é requerido para a melhor reassociação, sendo essa a principal resposta a ser alcançada. No capítulo anterior mostramos que a amilólise precedendo a desramificação do amido levou à redução de cadeias longas da amilose com ~ 720 unidades de glicose para cadeias com GP entre 200 e 450, aliado ao aumento na proporção de cadeias intermediárias com GP entre 13 – 30 e potencializou o aumento no teor de AR3. Os dados desse trabalho concordaram com aqueles de Luckett e Wang (2012) que relataram que moléculas de amilose com GP > 100 e cadeias da amilopectina (GP 21-26) contribuíram para a formação de AR3 em amidos de milho com diferentes teores de amilose.

A utilização do ultrassom como tratamento do amido precedendo a desramificação apresenta vantagens em relação à hidrólise enzimática ou mesmo ácida devido ao conceito de química e tecnologia verde para aplicações ambientalmente amigáveis, além de minimizar o custo e tempo de tratamento. Alguns poucos trabalhos têm mostrado que a sonicação pode promover a redução da digestibilidade de amidos de diferentes fontes botânicas. Zeng et al. (2015) observaram que AR3 foi formado quando amido granular de flor de lótus foi sonicado a baixa frequência (40 kHz) e potência de 300 W por 55 min a 25°C seguido de autoclavagem e resfriamento a 4°C por 24 h. Lu et al. (2018) usaram ultrassom a 20 kHz e 600 W em sinergismo com a pululanase para estimular a desramificação em amido granular de ervilha seguido de autoclavagem e resfriamento e observaram aumento nos teores de ALD e AR3. Li et al. (2018) ao estudarem o efeito do ultrassom

a 40kHz e 420W por 40 min e 480W por 30 min no amido granular de milho observaram que sua ação ocorre primeiramente enfraquecendo as ligações intra e inter-moleculares e posteriormente rompem as ligações glicosídicas. Como a gelatinização torna o amido mais susceptível à desintegração por forças mecânicas (AZHAR; HAMDY, 1979), este trabalho propõe a utilização de potências (20-40 W) e tempos (5-25 min) mais baixos para promover a quebra das cadeias de amido. A utilização de condições mais brandas resulta em menores custos e consumo de energia. A maioria dos estudos sobre o efeito do ultrassom nas propriedades do amido tem focado principalmente na investigação das características físico-químicas dos amidos como poder de inchamento, solubilidade, propriedades térmicas e de pasta (SUJKA; JAMROZ, 2013; PINTO et al., 2015; YANG et al., 2019; FALSAFI et al., 2019). Poucos trabalhos têm usado o ultrassom para investigar a formação de amidos retrogradados e sua digestibilidade (ZENG et al., 2015; LU et al., 2018; BABU et al., 2019). No entanto, nenhum deles traz uma discussão detalhada sobre a estrutura molecular do amido resistente formado ou de suas características cristalinas como tamanho do cristalito e proporção de duplas hélices formadas durante a retrogradação. Adicionalmente, a maioria dos amidos estudados tem sido amidos de milho com diferentes teores de amilose ou amidos de fontes não convencionais como flor de lótus ou ervilha que também apresentam elevados teores de amilose. Nesse trabalho propomos o estudo de amidos de raízes como mandioca e batata-doce que são de fácil extração e muito comuns em países tropicais como o Brasil. Também usamos o amido de milho com alto teor de amilose para comparação. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo investigar como o ultrassom de alta intensidade influencia na formação, estrutura molecular, estrutura cristalina, termoestabilidade e digestibilidade do amido retrogradado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Amidos de batata-doce (*Ipomoea batatas*) da variedade Canadense e de mandioca (*Manihot esculenta*) da variedade Cascudinha isolados em laboratório e o amido de milho com alto teor de amilose comercial (AmyloGel 03003) gentilmente cedido pela Cargill Agrícola S/A, São Paulo, Brasil, foram utilizados nesse trabalho. Pululanase de *Bacillus subtilis*, α -amilase pancreática, amiloglucosidade de *A. niger* e invertase de fermento de pão, todas da Sigma, EUA, foram utilizadas. Os amidos de batata-doce, mandioca e milho com alto teor de amilose foram denominados como SPS, CAS e HAS, respectivamente. Os teores de amilose desses amidos, determinados por titulação potenciométrica, foram 16,9, 18,3 e 50,2% para SPS, CAS e HAS, respectivamente. As distribuições de comprimento de cadeias ramificadas da amilopectina desses amidos, determinadas por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) mostraram 23,6% de cadeias curtas (GP 6-12) e 16% de cadeias longas (GP $\geq$ 37) para SPS, 27,2 % de cadeias curtas e 15,6% de cadeias longas para CAS e 11,2% de cadeias curtas e 30,7% de cadeias longas para HAS. Esses dados estão mostrados em um trabalho anterior (VILLAS-BOAS et al., 2019).

2.2. Modificação do amido por ultrassom

Suspensões de amido (6,5% m/v) foram aquecidas em banho de água fervente por 30 min e submetidas à autoclavagem a 121 °C por 30 min para assegurar completa gelatinização. Para conduzir a modificação do amido mediante a aplicação de ultrassom, a pasta de amido foi colocada em um béquer com 8 cm de diâmetro e 12 cm altura. O recipiente contendo a pasta de amido foi imerso em um banho-maria mantendo-se a temperatura externa a 25 °C durante todo o experimento. Uma sonda de titânio (ϕ 10 mm, modelo MS10, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemanha) foi

acoplada a um processador ultrassônico (modelo UP100H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemanha) e imersa na suspensão de amido a uma profundidade de 1 cm. O sistema operou a uma frequência fixa de 30 kHz em sistema de pulso contínuo. De acordo com o planejamento experimental, diferentes tempos (5-25 min) e potências nominais (20-40 W) foram avaliados como variáveis independentes, utilizando o planejamento fatorial 2^2 com 3 repetições no ponto central (Tabela 1). Após cada tratamento, os amidos foram precipitados usando etanol anidro e centrifugados a 7000 g por 20 min. O precipitado foi mantido a 40 °C por 40 min para evaporar qualquer etanol residual e liofilizado.

Tabela 1 - Delineamento experimental utilizado na modificação dos amidos por ultrassom.

Ensaio	X ₁	X ₂
1	20	5
2	20	25
3	40	5
4	40	25
5 (C)	30	15
6 (C)	30	15
7 (C)	30	15

X₁: Potência nominal (W); X₂: tempo (min); (C): ponto central

Para a obtenção dos amidos resistentes, os amidos gelatinizados e sonificados foram suspensos (5% m/v) em tampão acetato 0,1M pH 5,0, desramificados com pululanase e retrogradados conforme descrito no item 2.2 do segundo artigo do capítulo anterior.

2.3. Distribuição do peso molecular por cromatografia de exclusão por tamanho com detector de índice de refração (HPSEC-RI)

As distribuições do peso molecular dos amidos desramificados e daqueles sonificados e desramificados foram determinadas por cromatografia de exclusão por tamanho. Amostras de amidos (50mg) foram dispersas em solução de DMSO 90% (5 mL), conforme procedimento descrito por Song e Jane (2000). Os amidos previamente dispersos em DMSO (1 mL) foram precipitados com 3 volumes de etanol anidro e

centrifugados. Os precipitados foram suspensos em 2 mL de água deionizada e filtrados (22 µm). As amostras filtradas foram injetadas em um HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba quaternária (LC-20AT) com loop de 10 µL, degaseificador on-line, amostrador automático (SIL-20A) e um detector de índice de refração (RID 10A). Um guarda coluna (SB – G 6B) e três colunas de exclusão por tamanho (SB-806, SB-804 e SB-802, Shodex OHpak, Showa Denko K.K., Japão) conectadas em série foram usados para a separação das amostras. Água deionizada em um fluxo de 0,6 mL/min foi usada como eluente. A temperatura do detector e das colunas foi mantida a 60°C. Padrões de dextranas (Sigma, USA) de 667.800, 409.800, 273.000, 147.600, 80.900, 48.600, 23.800, 11.600, 5.220, e 1.270 Da, além de glicose foram usados para estabelecer a curva de calibração. O grau de polimerização (GP) nos pontos iniciais, topo e final dos picos foi calculado usando $GP = (M_w - 18)/162$ baseado no método descrito por Alvatroni et al (2004).

2.4. Difração de raios-X, cristalinidade relativa e tamanho do cristalito

Os amidos sonicados, desramificados e retrogradados foram mantidos em dessecador contendo solução de BaCl₂ saturada (25 °C, aw = 0,9) por 10 dias para equilíbrio da umidade. Os padrões de difração de raios-X desses amidos foram determinados, utilizando um difractograma de bancada (MiniFlex 300, Rigaku, Japão) equipado com radiação monocromática de Cu, linha K, L= 1,542 Å utilizando porta amostra de vidro. As amostras foram analisadas de 3 a 40 ° em 2 θ com velocidade de varredura de 1°/min, e as condições de uso foram 30 kV e 10 mA. A cristalinidade relativa (CR) foi quantitativamente estimada baseada na relação entre a área dos picos e área total dos difractogramas seguindo o método de Nara e Komiya (1983). O tamanho do cristalito foi calculado usando a equação de Scherrer (1), conforme descrito por Krauser et al. 2018.

$$Cs = (0,94 \times \lambda) / (\beta \times \cos\theta) \quad (1)$$

Onde: C_s = tamanho médio do cristalito, β = largura a meia altura do pico, θ = ângulo de Bragg, λ = comprimento da onda do Raio-X.

2.5. Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos amidos foram determinadas utilizando um calorímetro diferencial de varredura (DSC, Pyris 1, Perkin Elmer, EUA). As amostras de amido (4 mg, bs) foram pesadas em porta amostra de aço inoxidável, misturadas com água deionizada (12 μ L) e seladas. Os porta amostras selados foram mantidos a temperatura ambiente por 12 h para equilíbrio e aquecidos a uma razão de 10 °C/min a uma temperatura variando de 25 a 180 °C. Um porta amostra vazio foi usado como referência. Um porta amostra contendo índio foi utilizado para calibrar o equipamento.

2.6. Digestibilidade dos amidos

Os teores de amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR3) foram determinados de acordo com a metodologia de Englyst et al. (1992), com modificações. Amostras de amido (0,5g) foram adicionadas de 20 mL de tampão acetato (0,1 M, pH 5,2) contendo 4 mM de CaCl_2 e mantidas em banho-maria a 37°C. Em seguida, a solução enzimática (5 mL) contendo invertase, α -amilase pancreática e amiloglucosidase foi adicionada. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas após 0, 20 e 120 min. A quantidade de glicose foi medida usando um kit de determinação de glicose (glicose Liquiform, Labtest, Brasil). Os valores das diferentes frações foram obtidos pela combinação dos valores de G20 (glicose liberada após 20 min), G120 (glicose liberada após 120 min) G0 (glicose livre) e TG (glicose total) de acordo com as equações 2-4:

$$\text{ARD} = (\text{G20} - \text{G0}) \times 0,9; \quad (2)$$

$$\text{ALD} = (\text{G120} - \text{G20}) \times 0,9 \quad (3)$$

$$\text{AL} = (\text{TG} - \text{G120}) \times 0,9 \quad (4)$$

2.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do ^{13}C em estado sólido

Os experimentos de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico (CPMAS) para o núcleo de carbono 13 (^{13}C) foram efetuados no equipamento Bruker® Avance 400 (9,4 T) acoplado à sonda de 4 mm (MAS) de dupla ressonância (Bruker, Billerica, USA). As análises foram conduzidas com tempos dos pulsos $\pi/2$ de 2,5 μs e 5,0 μs para os núcleos de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100,5 MHz), respectivamente, sob frequência de rotação controlada por sistema pneumático de 10 kHz (± 2 Hz). Os seguintes parâmetros foram calibrados para aquisição dos espectros CPMAS: 15 μs de pre-scan, tempo de contato (T_c) de 2.0 ms, tempo de espera (d_1) de 5.0 s, aquisição ~ 25 μs , número de aquisições (scans) ~ 1024 e frequência de desacoplamento (*High-Power Proton Decoupling*, HPPD) de 70 kHz. O padrão externo de hexametilbenzeno (HMB) foi usado para calibração do deslocamento químico (ppm) a partir do pico de maior intensidade em 17,3 ppm. A quantidade relativa de duplas hélices (%) dos amidos modificados foi calculada considerando o perfil do espectro do respectivo amido gelatinizado (amorfo) como isento de qualquer sinal de estrutura helicoidal, enquanto que a cristalinidade relativa (%) foi estimada de acordo com a contribuição da fração cristalina do sinal de ressonância do carbono C1, como descrito previamente (capítulo anterior). O processamento por deconvolução dos espectros para ambas as quantificações foi efetuado a partir de funções Voigt, utilizando o *software PeakFit*® versão 4.12.

2.8. Análise estatística

Um planejamento fatorial 2^2 com 3 repetições no ponto central variando a potência e o tempo foi utilizado para o experimento de sonicação. Um total de sete experimentos foi definido, incluindo três pontos centrais de acordo com a Tabela 1. Todas as análises foram realizadas no mínimo em triplicata, com exceção da

espectroscopia de ressonância magnética nuclear do ^{13}C em estado sólido em que os espectros foram adquiridos em uma análise por amostra. Os dados das áreas das frações (I', I, II, III, IV e V) de cadeias obtidas do HPESEC-RI e os de digestibilidade foram submetidos à análise de regressão linear, conforme modelo mostrado (equação 5) para investigar os efeitos do tempo e da potência de sonicação nessas variáveis respostas.

$$Y = b_0 + b_1.X_1 + b_2.X_2 + b_3X_1.X_2 \quad (5)$$

Onde, y é a variável de resposta; b_0 é o coeficiente de regressão para o termo constante; b_1 e b_2 são os coeficientes de regressão linear das variáveis independentes; b_3 é o coeficiente de regressão da interação entre as variáveis independentes; X_1 e X_2 são os valores codificados das variáveis independentes. Os resultados do delineamento foram avaliados usando o programa Statistica 7.0. O nível de significância estabelecido foi $p \leq 0,05$ para os coeficientes de regressão, sendo considerado sem falta de ajuste quando $p > 0,05$. Os dados obtidos por difração de raios-X e as propriedades térmicas dos amidos retrogradados foram avaliados por comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Uma análise de coeficiente de correlação de Pearson também foi realizada entre os diferentes resultados, onde se determinou: correlação forte: ($r \geq 0,9$, $p > 0,05$) e correlação média ($0,6 \leq r < 0,9$, $p > 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1. Distribuição de peso molecular dos amidos por HPSEC-RI

As distribuições normalizadas do tamanho molecular dos amidos desramificados (controle) e daqueles sonicados e desramificados estão mostradas na Figura 1, e as proporções de cada fração obtida com seu respectivo grau de polimerização no pico (GP_{pico}) estão listadas na Tabela 2. Os resultados da análise de regressão linear estão apresentados na Tabela 3.

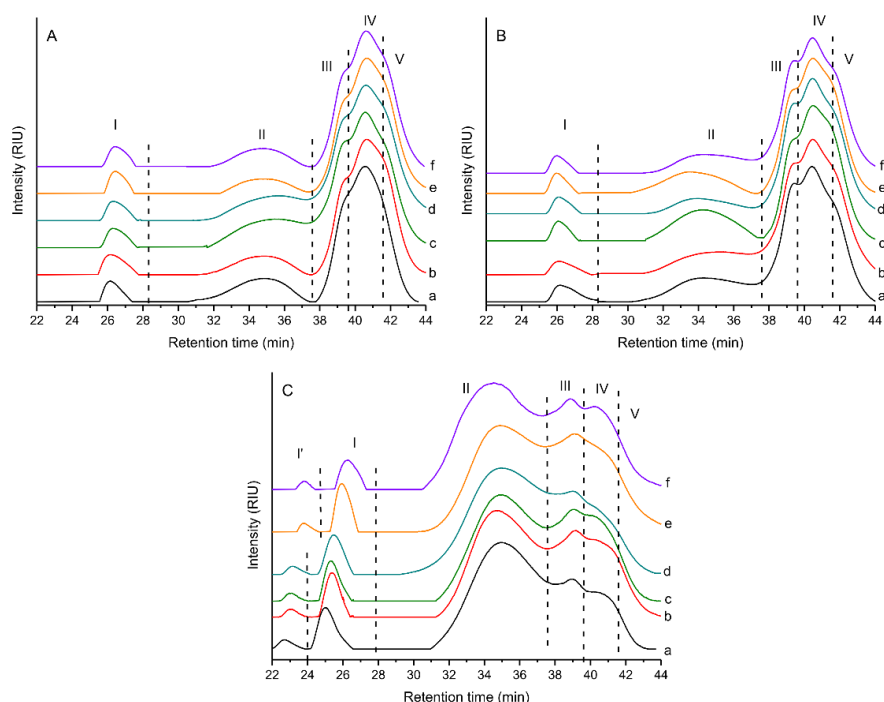


Figura 1 - Distribuição do tamanho molecular, obtidos por HPSEC-RI, dos SPS (A), CAS (B) e HAS (C) desramificados (a), sonicados a 20W/5min e desramificados (b), sonicados a 20W/25min e desramificados (c), sonicados a 30W/15min e desramificados (d), sonicados a 40W/5min e desramificados (e), sonicados a 40W/25min e desramificados (f).

Os amidos de raízes controle foram separados em cinco frações distintas de cadeias. A fração I correspondeu às cadeias com massa molecular > 667.800 Da, indicando serem cadeias muito longas de amilose, eluídas a 26,3 e 26,1 min para SPS e CAS, respectivamente (Figura 1 A e B). Esses dados mostram que as cadeias da fração I no CAS possuem massa molecular levemente superior àquelas no SPS. A fração II (GP 4.100 -120) correspondeu às cadeias de amilose e algumas cadeias muito longas de amilopectina (B_4), cujo GP_{pico} foi de ~ 662 para SPS e ~ 720 para CAS. A fração III referiu-se às cadeias longas da amilopectina ($B_2 - B_3$), com GP entre 30-120, enquanto nas frações IV e V foram eluídas as cadeias intermediárias (B_1) com GP entre 13 e 30 e as curtas (A) com $GP < 13$, respectivamente. No HAS, as cadeias com massa molecular > 667.800 Da foram separadas em duas frações (I' e I) (Figura 1 C) eluídas a 22,8 e 24,7 min, respectivamente. A fração II, com área significativamente maior que as frações II nos amidos de raízes, correspondeu às cadeias de amilose e

às cadeias muito longas de amilopectina (B_4), com $GP_{pico} \sim 760$. Esses dados corroboram com o alto teor de amilose de maior massa molecular neste amido. Amido de milho com alto teor de amilose apresenta altas proporções de cadeias muito longas da amilopectina (HUANG et al., 2015; LIN et al., 2016). As frações III, IV e V corresponderam, respectivamente, às frações de cadeias longas, intermediárias e curtas da amilopectina, com GP_{pico} próximos àqueles encontrados para os amidos de raízes.

O tratamento com ultrassom causou, em todos os amidos, redução da proporção das cadeias de amilose e das cadeias muito longas de amilopectina (frações I e II nos SPS e CAS e I', I e II no HAS) aumentando a proporção de cadeias menores (frações III e IV) (Figura 1), indicando que houve rompimento das ligações glicosídicas dos três amidos estudados. Isso ocorreu devido à alta força de cisalhamento e alta turbulência causadas pelo colapso das bolhas de cavitação durante o tratamento. Outros autores também observaram esse efeito em amidos de diferentes fontes botânicas (LUO et al., 2008; LU et al., 2018; YANG et al., 2019). Esses resultados indicam que o ultrassom atua preferencialmente sobre as cadeias mais longas do amido. Resultados semelhantes foram encontrados por Li et al. (2018), Nie et al. (2019), e Yang et al. (2019). As cadeias com maior comprimento são mais propensas a serem quebradas pelos efeitos da cavitação, já que a formação e a colisão das bolhas no meio acontecem aleatoriamente. Segundo Monroy et al. (2018), as cadeias próximas a essas bolhas colapsantes sofrem o alto cisalhamento e são rompidas. As forças mecânicas causadas pela cavitação também podem causar a dissociação das moléculas de água gerando radicais OH e átomos de hidrogênio livres, os quais podem reagir com as ligações glicosídicas causando também a cisão das mesmas. Czekowska-Biskup et al. (2005) relataram que esses dois mecanismos estão envolvidos na degradação das cadeias de amido.

Tabela 2 - Área e GP_{pico} das frações de amidos desramificados e daqueles sonicados e desramificados obtidos por HPSEC-RI

Amidos	Parâmetro	F I'	F I	F II	F III	F IV	F V
SPS P	Area(%)	nd	5,8±0,1	19,1±0,9	22,6±0,5	32,2±0,6	20,2±0,4
	GP _{pico}		>4100	662±0,8	30,25±0,0	19,7±0,2	12,7±0,2
SPS20/5	Area(%)	nd	4,7±0,1	14,4±0,1	23,11±0,8	36,5±0,6	21,7±0,0
	GP _{pico}		>4100	594±0,9	32,8±0,5	19,8±0,2	12,5±0,0
SPS20/25	Area(%)	nd	3,6±0,3	18,4±0,4	23,2±0,7	39,2±0,3	15,5±0,1
	GP _{pico}		>4100	587,4±0,8	32,5±0,1	20,3±0,0	10,7±0,3
SPS30/15	Area(%)	nd	4,5±0,1	16,8±0,6	23,0±0,8	40,3±0,4	15,4±0,7
	GP _{pico}		>4100	586,9±0,8	31,4±0,0	19,7±0,1	10,7±0,5
SPS40/5	Area(%)	nd	4,0±0,1	11,5±0,6	22,3±0,1	43,4±0,6	19,1±0,7
	GP _{pico}		>4100	578,9±0,6	32,4±0,0	19,4±0,1	10,7±0,4
SPS40/25	Area(%)	nd	3,2±0,3	14,3±0,9	23,6±0,9	41,00±0,5	17,9±0,0
	GP _{pico}		>4100	564,2±0,7	31,9±0,7	20,3±0,3	10,9±0,0
CAS P	Area(%)	nd	6,3±0,1	18,1±0,2	20,2±0,9	31,1±0,1	24,4±0,2
	GP _{pico}		>4100	720,4±0,3	35,66±0,8	20,43±0,1	12,6±0,5
CAS20/5	Area(%)	nd	4,5±0,2	15,5±0,3	22,7±0,5	35,12±0,7	22,5±0,1
	GP _{pico}		>4100	671,5±0,5	36,33±0,9	21,5±0,2	11,4±0,4
CAS20/25	Area(%)	nd	3,5±0,4	17,9±0,8	24,2±0,9	36,4±0,0	17,6±0,6
	GP _{pico}		>4100	669,7±0,9	35,6±0,0	21,8±0,2	12,0±0,5
CAS30/5	Area(%)	nd	4,1±0,0	12,4±0,5	25,2±0,9	38,1±0,6	20,2±0,3
	GP _{pico}		>4100	695,5±0,5	38,0±0,6	21,7±0,1	12,1±0,0
CAS40/5	Area(%)	nd	4,0±0,2	15,5±0,2	21,0±0,8	39,0±0,8	20,9±0,9
	GP _{pico}		>4100	640,9±0,8	37,3±0,9	21,6±0,3	11,3±0,3
CAS40/25	Area(%)	nd	3,3±0,2	14,5±0,4	22,7±0,7	42,7±0,2	17,0±0,7
	GP _{pico}		>4100	633,48±0,3	38,2±0,3	21,8±0,0	10,2±0,3
HAS P	Area(%)	1,3±0,3	6,6±0,6	56,1±0,6	20,9±0,7	9,99±0,2	5,20±0,7
	GP _{pico}	>4100	>4100	760,6±0,9	44,0±0,2	23,42±0,9	12,9±0,4
HAS20/5	Area(%)	0,7±0,0	5,2±0,2	49,8±0,0	22,6±0,2	16,6±0,4	4,9±0,0
	GP _{pico}	>4100	>4100	673,52±0,7	44,4±0,7	22,8±0,5	12,2±0,8
HAS20/25	Area(%)	0,4±0,1	3,8±0,6	43,3±0,9	27,2±0,2	20,5±0,2	5,0±0,5
	GP _{pico}	>4100	>4100	611,75±0,1	45,6±0,2	23,0±0,0	11,7±0,3
HAS30/15	Area(%)	0,5±0,2	4,4±0,5	52,9±0,1	22,1±0,4	14,5±0,1	5,8±0,9
	GP _{pico}	>4100	>4100	626,33±0,0	44,5±0,0	24,3±0,3	10,7±0,3
HAS40/5	Area(%)	0,6±0,0	4,9±0,0	48,6±0,3	26,8±0,4	13,4±0,5	5,6±0,9
	GP _{pico}	>4100	>4100	610,9±0,2	43,9±0,7	22,9±0,0	10,9±0,6
HAS40/25	Area(%)	0,4±0,1	3,3±0,1	47,7±0,7	27,7±0,7	15,6±0,3	5,0±0,1
	GP _{pico}	>4100	>4100	644,6±0,0	46,2±0,0	23,8±0,0	11,9±0,0

Média de três repetições mais desvio padrão. nd = não detectado. P = desramificado e retrogradado; 20/5 = sonificado a 20W/5min, desramificado e retrogradado; 20/25 = sonificado a 20W/25min desramificado e retrogradado; 30/15 = sonificado a 30W/5min, desramificado e retrogradado; 40/5 = sonificado a 40W/5min desramificado e retrogradado; 40/25 = sonificado a 40W/25, desramificado e retrogradado.

Nos amidos de raízes, embora sem mostrar efeito linear significativo, houve redução das frações I e II com o aumento do tempo e potência de tratamento. Segundo Yang et al. (2019), o aumento da potência de ultrassom aumenta também as forças de cisalhamento, a formação e colisão entre as bolhas de cavitação aumentando assim os efeitos desse fenômeno, além também de aumentar o teor de radicais livres, o que também contribui para o aumento da cisão das cadeias. A

proporção das frações I nos SPS e CAS reduziu em até 44,8% e 47,6%, respectivamente, enquanto na fração II, reduções de até 40% no SPS e 22,8% no CAS foram observadas. Esses efeitos causaram também redução no GP_{pico} das cadeias da fração II de 660 para ~ 560 no SPS e de 720 para ~ 630 no CAS, aumento na proporção das cadeias com GP 30-120 (fração III) e, principalmente, aumento das cadeias com GP 13-30 (fração IV) que tiveram GP_{pico} de 20 no SPS e 22 no CAS. O conteúdo de amilose, bem como o comprimento das cadeias dessa molécula são maiores no CAS quando comparado ao SPS, assim os efeitos do ultrassom nesse amido são mais pronunciados sobre as cadeias de amilose. Em contrapartida, a amilopectina do SPS possui maior proporção de cadeias longas e intermediárias quando comparada àquela do CAS, intensificando a cisão dessas cadeias pelo ultrassom nesse amido. O tempo e a potência de tratamento interferiram nos efeitos do ultrassom sobre esses amidos. Para SPS, o tempo e a interação tempo x potência mostraram efeito linear positivo sobre a fração III. As cadeias da fração IV foram significativamente afetadas pela potência, mostrando que o aumento dessa variável aumenta significativamente a formação de cadeias com GP 13-30, enquanto a interação tempo x potência apresentou efeito antagônico sobre essa fração de cadeias. A proporção de cadeias da fração V ($GP < 13$) reduziu, no entanto não mostrou efeito linear com qualquer das variáveis. Para o CAS, o aumento da fração IV foi significativamente afetado pelo tempo, potência e pela interação tempo x potência. O CAS que possui altas quantidades de cadeias curtas (GP 6-12) (VILLAS-BOAS et al., 2019), mostrou significativa redução nas cadeias com $GP < 13$ e um efeito linear negativo com o tempo foi encontrado para a fração V. Esses resultados indicam que o efeito da sonicação sobre o amido é dependente tanto do tamanho quanto da quantidade de cadeias presentes no meio. De acordo com Czechowska-Biskup et al. (2005) e Kang et al. (2016), um comprimento mínimo de cadeia é necessário para que a clivagem pelas forças mecânicas da cavitação ocorra. No entanto, esses autores

mostraram que esse comprimento mínimo varia com a potência de tratamento bem como com a concentração da amostra. Assim é possível sugerir que sob as condições usadas nesse trabalho, a quebra das cadeias maiores pode ser atribuída às forças mecânicas da cavitação, enquanto nas cadeias mais curtas, provavelmente, tenha se dado pela ação dos radicais livres formados.

Tabela 3 - Coeficientes de regressão linear estimados para as variáveis de HPSEC e teor de AR3

Fator	F I'	F I	F II	F III	F IV	F V	AR3
SPS							
Constante	Nd	4,15	15,22	23,07	40,11	17,35	59,37
Potência (X ₁)	Nd	-0,27	-2,25	-0,05	2,17*	0,35	3,16*
Tempo (X ₂)	Nd	-0,47	2,20	0,297*	0,075	-2,25	0,04
Potencia xTempo (X ₁ .X ₂)	nd	0,075	0,20	0,252*	-1,27*	0,85	-1,36*
R ² (%)	nd	62,36	78,48	94,56	99,59	49,69	96,73
P – valor	nd	0,344	0,158	0,021	0,000	0,504	0,010
Falta de ajuste	nd	0,009	0,002	0,52	0,165	0,005	0,301
CAS							
Constante	Nd	3,93	14,46	23,59	38,25	19,84	56,06
Potência (X ₁)	Nd	-0,175	-0,85	-0,8	2,54*	-0,55	4,87*
Tempo (X ₂)	Nd	0,42	-0,35	0,8	1,24*	-2,2*	1,72
Potencia xTempo (X ₁ .X ₂)	Nd	0,07	-0,85	0,05	0,605*	**	0,12
R ² (%)	Nd	83,24	25,90	36,86	98,70	93,51	94,08
P – valor	Nd	0,125	0,794	0,665	0,002	0,004	0,024
Falta de ajuste	Nd	0,013	0,001	0,028	0,763	0,056	0,074
HAS							
Constante	0,547	4,4	49,72	24,28	15,79	5,41	63,17
Potência (X ₁)	-0,007	- 0,2	0,87	1,17	-2,02*	0,175	-3,27*
Tempo (X ₂)	-0,13*	-0,75*	-1,77	1,37	1,525	-0,125	1,87
Potencia xTempo (X ₁ .X ₂)	0,037	-0,05	1,47	-0,92	**	-0,175	**
R ² (%)	97,43	94,53	33,05	35,48	80,14	28,24	80,47
P – valor	0,007	0,021	0,722	0,682	0,039	0,768	0,036
Falta de ajuste	0,268	0,184	0,000	0,004	0,107	0,00	0,052

*Estatisticamente significativo em $p \leq 0,05$ e sem falta de ajuste em $p > 0,05$; ** interação não determinada.

Para o HAS, devido ao alto teor e massa molecular da amilose, a sonicação provocou redução de até 53,2% na proporção das cadeias presentes nas frações I' e I. A proporção da fração II também reduziu em até 22,8%, diminuindo o GP_{pico} de 760 para ~ 610. Esses efeitos levaram ao aumento na proporção da fração III (GP 30-120) e das cadeias intermediarias (fração IV) cujo GP_{pico} foi de 23. Luo et al. (2008) observaram que as cadeias de amilose são mais facilmente rompidas pela ação do

ultrassom quando comparadas às cadeias de amilopectina, pois moléculas com conformação linear são mais fáceis de serem clivadas por forças mecânicas (CZEKOWSKA-BISKUP et al., 2005). O tempo teve efeito linear negativo sobre as frações I' e I, indicando que o aumento dessa variável aumenta de maneira significativa a quebra dessas cadeias. Lida et al. (2008) mostraram que os pesos moleculares dos amidos de milho, batata, tapioca e batata-doce reduziram gradualmente com o tempo de sonicação (100 e 120 W) até 30 min de tratamento e que depois disso a despolimerização prosseguiu lentamente. Embora seja notável a redução da fração II e o aumento na fração III, essas variáveis respostas não mostraram relação linear com nenhuma das variáveis independentes (tempo e potência de sonicação). Ao contrário do apresentado para os amidos de raízes, a fração IV foi negativamente afetada pela potência do ultrassom. As cadeias de amilose desse amido são muito longas, portanto o aumento na potência sobre esse amido favoreceu a formação de cadeias com GP 30-120 (fração III). A proporção das cadeias com GP < 13 praticamente não se alteraram. Esses resultados indicam que a estrutura molecular, principalmente o comprimento das cadeias de amido, influencia a ação das ondas ultrassônicas.

3.2. Difração de raios-X, cristalinidade relativa e tamanho do cristalito

Os padrões de difração de raios-X com as respectivas cristalinidades relativas (CR) dos amidos retrogradados estão apresentados na Figura 2, e os tamanhos dos cristalitos formados após retrogradação dos amidos estão apresentados na tabela 4.

Todos os amidos mostraram um padrão de difração tipo B, como é comum em amidos retrogradados (SIMSEK; EI, 2012; VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016; REDDY et al., 2017). A CR dos amidos controle foi de 32,9%, 34,6% e 35,7% para SPS, CAS e HAS, respectivamente.

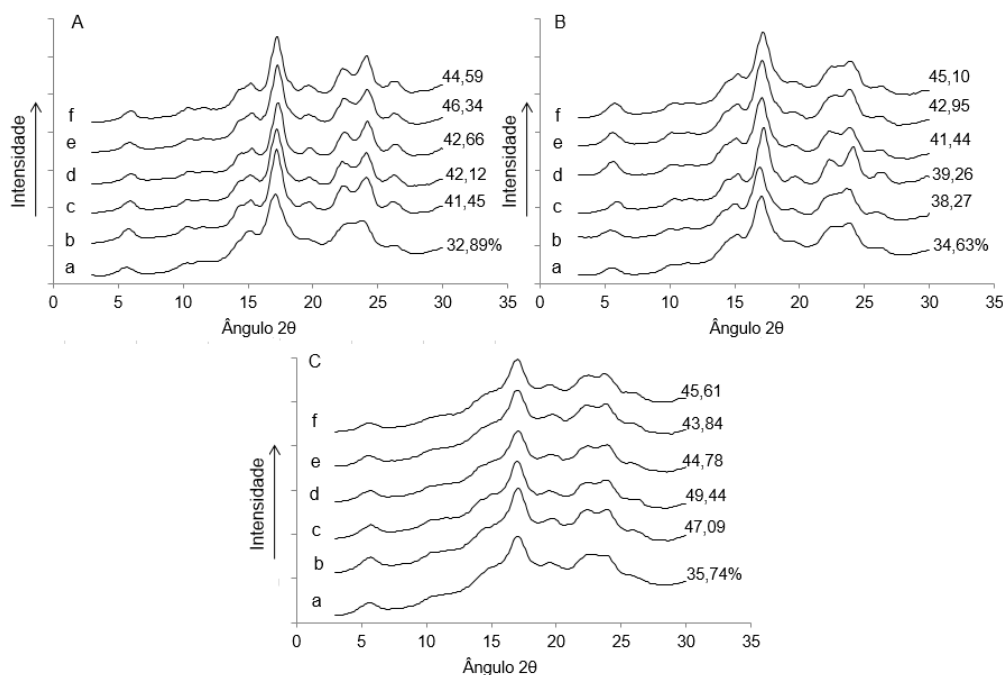


Figura 2 - Difractogramas de raios-X e cristalinidade relativa (%) dos SPS (A), CAS (B) e HAS (C) desramificados e retrogradados (a), e sonicados a 20 W/5 min (b), 20 W/25 min (c), 30 W/15 min (d), 40 W/5 min (e) e 40 W/25 min (f) precedendo a desramificação e retrogradação.

O pré-tratamento dos amidos com ultrassom aumentou a CR de todos os amidos estudados, no entanto os valores variaram com a fonte botânica do amido, bem como com o tempo e potência de sonicação, pois a variação desses parâmetros em amidos com diferentes características estruturais (quantidade e tamanhos das cadeias), leva à formação de cadeias com diferentes tamanhos e tendências à retrogradação. Aumentos na CR de amidos também foram observados quando diferentes pré-tratamentos foram usados precedendo a desramificação, como por exemplo, as hidrólises ácida e enzimática e o tratamento com micro-ondas usados para potencializar a retrogradação do amido (POLESI; SARMENTO, 2011; LUCKETT; WANG 2012; ZENG et al., 2015; VILLAS-BOAS et al., 2016). A CR aumentou até 41%, 30% e 38% para SPS, CAS e HAS, respectivamente, atingindo 46,3% para SPS sonicado a 40W/5min, 45,1% para CAS sonicado a 40/25 min, e 49,4% para HAS sonicado a 20W/25min.

A CR dos SPS e CAS sonicados tiveram uma correlação positiva forte com a fração IV obtida do HPSEC-RI ($r = 0,94$ e $r = 0,99$ respectivamente) e uma correlação negativa média com a fração I ($r = - 0,84$ para ambos os amidos). A CR do HAS, por outro lado, além da correlação positiva forte com a fração IV ($r = 0,94$) e da correlação negativa média com a fração I ($r = - 0,79$), também teve correlação negativa forte com a fração I' ($r = - 0,91$) e correlação negativa média com a fração II ($r = - 0,85$). Esses resultados mostram que a redução da proporção das cadeias muito longas da amilose juntamente com a redução do GP_{pico} das cadeias da fração II de ~ 720 para um GP_{pico} entre ~ 580 e ~ 630 contribuiu para o aumento da ordem molecular dos amidos, principalmente no HAS. As cadeias de amilose possuem alta tendência a se retrogradarem e a estrutura formada é altamente organizada (GIGLEY et al., 1995), no entanto a redução do GP dessas cadeias, potencializou essa reassociação. Além disso o aumento da proporção de cadeias com GP 13-30 (Fração IV), também é fator de grande importância para o aumento da ordem molecular dos amidos, especialmente nos amidos de raízes com teores baixos de amilose. Como as cadeias da fração IV mostram GP_{pico} entre 20 e 23 para todos os amidos, é possível sugerir que esse comprimento de cadeia seja adequado para a sua reassociação. A somatória desses fatores conduziu a formação de uma estrutura cristalina mais organizada e provavelmente mais resistente

No SPS a maior CR foi obtida quando esse amido foi sonicado a 40 W/ 5 min, enquanto para o CAS foi necessário maior tempo de tratamento sob a mesma potência. Como já mencionado, o CAS possui maior conteúdo e comprimento das cadeias de amilose, desse modo é necessário maior tempo de sonicação para promover a quebra das cadeias maiores com formação de cadeias com GP 13-30. A CR mais alta foi obtida para o HAS sonicado a 20 W/ 25 min. Isso ocorre devido às cadeias de amilose desse amido serem muito longas, assim o aumento da potência

provavelmente estimulou a cisão dessas cadeias maiores, favorecendo a formação de cadeias com GP 30-120.

Tabela 4 - Tamanho dos cristalitos dos SPS, CAS e HAS retrogradados

Amido	Tamanho do cristalito (nm)	Cristalinidade relativa (%)
SPS P	6,61±0,02 ^f	32,89 ^d
SPS 20/5	7,46±0,01 ^e	41,45 ^c
SPS 20/25	7,62±0,03 ^d	42,12 ^c
SPS 30/15	7,65±0,00 ^{cd}	42,66 ^c
SPS 40/5	7,91±0,05 ^a	46,34 ^a
SPS 40/25	7,74±0,00 ^{bc}	44,59 ^b
CAS P	6,89±0,01 ^c	34,63 ^d
CAS 20/5	7,08±0,12 ^c	38,27 ^c
CAS 20/25	7,45±0,00 ^b	39,26 ^c
CAS 30/15	7,69±0,03 ^a	41,44 ^b
CAS 40/5	7,71±0,00 ^a	42,95 ^b
CAS 40/25	7,85±0,00 ^a	45,10 ^a
HAS P	6,93±0,02 ^c	35,74 ^e
HAS 20/5	7,99±0,01 ^{ab}	47,09 ^{bc}
HAS 20/25	8,30±0,30 ^a	49,44 ^a
HAS 30/15	7,79±0,04 ^b	44,78 ^d
HAS 40/5	7,65±0,03 ^b	43,84 ^d
HAS 40/25	7,83±0,01 ^b	45,61 ^{cd}

Média de três repetições mais desvio padrão. P = desramificado e retrogradado; 20/5 = sonificado a 20W/5 min, desramificado e retrogradado; 20/25 = sonificado a 20W/25 min, desramificado e retrogradado; 30/15 = sonificado a 30W/15 min, desramificado e retrogradado; 40/5 = sonificado a 40W/5 min, desramificado e retrogradado; 40/25 = sonificado a 40W/25 min, desramificado e retrogradado.

O tamanho dos cristalitos formados na retrogradação também aumentou nos amidos sonificados quando comparado aos seus respectivos amidos desramificados, atingindo 7,91 nm no SPS 40/5, 7,85 nm no CAS 40/25 e 8,28 nm no HAS 20/25. Esses tamanhos foram fortemente correlacionados com a CR mostrando $r = 0,99$ para SPS e HAS, e 0,96 para CAS.

Aumento no tamanho dos cristalitos indica maior perfeição da estrutura cristalina (KIATPONGLART et al., 2015). A redução do tamanho das cadeias de amilose e cadeias muito longas da amilopectina pela ação do ultrassom juntamente com o aumento na proporção das cadeias com GP 13-30, especialmente das cadeias com GP entre 20 e 23 favoreceu o aumento da mobilidade e interação entre as cadeias, estimulando assim a nucleação e a propagação dos cristais levando a uma

estrutura altamente organizada. O aumento da mobilidade das cadeias estimula a propagação bem como o aumento do tamanho do cristalito (KIATPONGLART et al., 2015).

3.3. Propriedades térmicas

Os amidos pré-tratados com ultrassom tiveram uma ampla faixa de transição endotérmica (ΔT) (Tabela 5), com temperaturas que variaram de 62,34 °C a 107,33 °C para os amidos de raízes e de 112, 34 °C a 158,59 °C para o HAS. O alto ΔT encontrado indica que os cristais formados durante a retrogradação são heterogêneos possuindo diferentes temperaturas de fusão. As temperaturas de transição dos amidos aumentaram após o tratamento com ultrassom, independentemente da fonte botânica e condições de tratamento, mostrando um aumento na estabilidade térmica dos cristais formados na retrogradação. Esses resultados corroboram com os dados de tamanho do cristalito, pois cristalitos maiores possuem maior estabilidade térmica como também relatado por Kiatpongarp et al. (2015).

As temperaturas de transição do SPS e CAS foram similares e inferiores àquelas encontradas para o HAS, mostrando que as estruturas formadas após recristalização desse último amido possuem maior estabilidade térmica quando comparadas àquelas dos amidos de raízes. Isso é atribuído ao alto teor de amilose deste amido, já que a amilose retrogradada necessita de altas temperaturas para sua fusão (~140°C) (GIDLEY; BULPIN, 1988).

As mudanças de entalpia (ΔH) dos amidos controle (desramificados e retrogradados) foram 9,6, 11,1 e 10,3 J/g para SPS, CAS e HAS, respectivamente. A quebra das cadeias de amido pelo ultrassom promoveu aumentos significativos nos valores de ΔH para os amidos das três fontes botânicas. No entanto, os valores variaram com o tempo e a potência de sonicação devido aos diferentes tamanhos de cadeias formados, as quais formaram duplas hélices com diferentes graus de

empacotamento. O ΔH está relacionado ao conteúdo, ordenação e estabilidade da estrutura das duplas hélices (KIATPONGLARP et al., 2015; XU et al., 2019).

Tabela 5 - Propriedades térmicas dos SPS, CAS e HAS retrogradados

Amido	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J/g)
SPS P	59,82±0,2 ^d	78,73±0,3 ^c	96,72±0,3 ^c	36,9	9,57±0,3 ^d
SPS20/5	66,30±0,1 ^b	93,17±0,7 ^a	100,46±0,9 ^b	34,1	14,57±0,5 ^c
SPS20/25	66,59±0,2 ^b	90,58±0,3 ^b	107,22±0,1 ^a	40,6	15,43±0,1 ^c
SPS30/15	68,84±0,0 ^a	91,07±0,3 ^b	107,33±0,5 ^a	38,5	15,70±0,3 ^c
SPS40/5	66,16±0,5 ^b	92,22±0,3 ^{ab}	105,82±0,5 ^a	39,6	18,62±0,3 ^a
SPS40/25	62,37±0,2 ^c	91,10±0,0 ^b	101,00±0,5 ^b	38,2	17,14±0,3 ^b
CAS P	62,05±0,1 ^e	81,42±0,5 ^b	101,68±0,1 ^b	39,7	11,13±0,7 ^c
CAS20/5	70,48±0,3 ^a	91,00±0,8 ^a	104,06±0,5 ^b	33,5	12,71±0,4 ^c
CAS20/25	67,27±0,0 ^b	91,70±0,1 ^a	102,31±0,7 ^b	35,0	13,26±0,0 ^{bc}
CAS30/15	65,96±0,4 ^c	91,26±0,7 ^a	106,91±0,2 ^a	40,9	15,26±0,3 ^b
CAS40/5	71,80±0,5 ^a	92,74±0,2 ^a	106,91±0,7 ^a	35,1	15,70±0,7 ^b
CAS40/25	64,67±0,4 ^d	91,40±0,7 ^a	102,56±0,2 ^b	37,9	17,76±0,0 ^a
HAS P	118,14±0,6 ^a	140,89±0,7 ^c	153,73±0,7 ^c	35,6	10,35±0,8 ^e
HAS20/5	116,49±0,8 ^{ab}	140,77±0,2 ^c	155,55±0,5 ^b	39,0	19,45±0,2 ^b
HAS20/25	114,3±0,9 ^{bc}	145,58±0,6 ^a	158,69±0,6 ^a	44,3	25,18±0,4 ^a
HAS30/15	112,34±0,5 ^c	146,63±0,5 ^a	155,80±0,1 ^b	43,4	17,95±0,2 ^c
HAS40/5	116,14±0,6 ^{ab}	143,55±0,5 ^b	153,57±0,4 ^c	37,4	16,31±0,4 ^d
HAS40/25	118,53±0,7 ^a	142,53±0,4 ^b	155,80±0,5 ^b	37,3	18,35±0,2 ^c

Média de três repetições seguido de desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna, para cada amido, diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). P = desramificado e retrogradado; 20/5 = sonificado a 20W/5 min, desramificado e retrogradado; 20/25 = sonificado a 20W/25 min, desramificado e retrogradado; 30/15 = sonificado a 30W/15 min, desramificado e retrogradado; 40/5 = sonificado a 40W/5 min, desramificado e retrogradado; 40/25 = sonificado a 40W/25 min, desramificado e retrogradado. T_o, T_p, T_c: temperaturas inicial, de pico e de conclusão, respectivamente. ΔT : T_c – T_o. ΔH : mudança de entalpia.

Aumentos de até 93%, 60% e 170% foram encontrados para o ΔH no SPS, CAS e HAS, respectivamente que atingiram 18,6 J/g no SPS, 17,8 J/g no CAS, ambos sonificados a 40 W/5min e 40 W/25min, respectivamente, e 25,18 J/g para o HAS sonificado a 20 W/25 min. As cadeias de amilose tem alta tendência a retrogradação e formação de uma estrutura altamente organizada e altamente estável (GIDLEY et al., 1995; SONG et al., 2010). Os efeitos do ultrassom potencializam a retrogradação e aumentam a força de interação entre as cadeias levando a formação de uma estrutura ainda mais estável. Isso pode ser atribuído à redução do comprimento das cadeias muito longas da amilose, fator esse determinante para amidos com alto teor de amilose, aliado ao aumento na proporção de cadeias com GP entre 13-30.

Os resultados de ΔH são consistentes com aqueles encontrados para a CR (Figura 2) que mostraram uma correlação positiva forte ($r = 0,99$ para SPS e CAS, e $r = 0,97$ para HAS). Os aumentos no ΔH e CR dos amidos pré-tratados com ultrassom indicam o fortalecimento das duplas hélices e a formação de uma estrutura cristalina mais organizada após desramificação e retrogradação. O ΔH também foi fortemente correlacionado com a fração IV ($r = 0,98$ para SPS e CAS e $r = 0,99$ para HAS). Os amidos de raízes mostraram correlação negativa média com a fração I ($r = -0,84$, $r = -0,77$, respectivamente, para SPS e CAS), enquanto o HAS mostrou correlação negativa média com as frações I' ($r = -0,87$) e II ($-0,89$). Esses resultados corroboram com o fato de que a redução na proporção das cadeias longas da amilose, aliado a redução do GP_{pico} daquelas cadeias presentes na fração II (~720 para entre ~ 580 e 630) potencializa à retrogradação das amilose. Adicionalmente, o aumento na proporção das cadeias intermediarias com GP 13-30 (fração IV), principalmente as cadeias com GP 20-23 tende a potencializar a formação de duplas hélices mais fortemente empacotadas tanto no amido com alta amilose, mas principalmente nos amidos regulares. Cadeias muito longas podem dificultar a cristalização e reduzir a densidade e estabilidade dos cristais retrogradados (GENKINA et al., 2007).

3.4. Digestibilidade dos amidos

A digestibilidade dos amidos está apresentada na Tabela 6. Como mostrado no capítulo anterior, altos teores de ARD (86,8%, 91,6% e 74,1% para o SPS, CAS e HAS respectivamente) e baixos teores de AR foram encontrados nos amidos gelatinizados que é atribuído a desorganização granular provocada pela gelatinização. No entanto, a hidrólise das ligações α -1,6 pela ação da pululanase favoreceu a reassociação das cadeias durante retrogradação provocando o aumento do teor de AR3 desses amidos. O teor de ALD do SPS e CAS também aumentou. Esta fração é importante, pois apresenta baixo índice glicêmico (LEHMANN; ROBIM, 2007).

Tabela 6 - Digestibilidade dos SPS, CAS e HAS submetidos à sonicação

Amidos	ARD	ALD	AR
SPS G	86,8 ± 0,2	11,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1
SPS P	59,8 ± 0,2	16,8 ± 0,4	23,4 ± 0,3
SPS 20/5	26,9±0,7	18,0±0,8	55,1±0,3
SPS 20/25	22,5±0,5	19,6±0,5	57,9±0,2
SPS 30/15	20,5±0,6	21,3±0,4	58,2±0,3
SPS 40/5	29,1±0,4	6,8±0,6	64,1±0,1
SPS 40/25	19,9±0,9	18,6±0,4	61,5±0,5
CAS G	91,6 ± 0,1	6,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1
CAS P	53,3 ± 0,2	14,8 ± 0,9	31,9 ± 0,1
CAS 20/5	34,5±0,7	16,7±0,7	48,8±0,2
CAS 20/25	31,5±0,3	16,5±0,8	52,0±0,3
CAS 30/15	29,3±0,8	13,7±0,6b	57,0±0,1
CAS 40/5	28,4±0,3	13,3±0,2b	58,3±0,6
CAS 40/25	25,4±0,2	12,6±0,3	62,0±0,3
HAS G	74,1 ± 1,1	23,3 ± 0,6	2,6 ± 0,5
HAS P	50,7 ± 0,4	7,80 ± 0,1	41,5 ± 0,2
HAS 20/5	23,1±0,6	11,1±0,3	65,8±0,4
HAS 20/25	20,8±0,7	9,7±0,5	69,5±0,4
HAS 30/15	26,0±0,2	12,4±0,7	61,6±0,9
HAS 40/5	27,8±0,8	13,0±0,7	59,2±0,6
HAS 40/25	23,6±0,4	13,4±0,3	63,0±0,9

G = Gelatinizado; P = desramificado com pululanase e retrogradado; 20/5 = sonicado a 20W por 5 min desramificado com pululanase e retrogradado; 20/25 = sonicado a 20 por 25 min desramificado com pululanase e retrogradado; 30/15 = sonicado a 30W por 15 min desramificado com pululanase e retrogradado; 40W5 = sonicado a 40W por 5 min desramificado com pululanase e retrogradado; 40/25 sonicado a 40W por 25 min desramificado com pululanase e retrogradado.

A cisão das moléculas do amido pelo ultrassom antes da desramificação e retrogradação reduziu significativamente a digestibilidade dos amidos. As condições de sonicação não mostraram efeito linear com o ALD (dados não mostrados), enquanto houve efeito linear positivo da potência sobre a formação do AR3 para SPS e CAS, e negativo para HAS (Tabela 3). O conteúdo de AR3 atingiu 64,1 e 62% para SPS e CAS sonificados a 40W/5min e 40W/25 min, respectivamente e 69,5% para HAS sonificado a 20W/25 min, indicando que essas amostras possuíam comprimentos de cadeias mais adequados para a retrogradação. Amidos com alto teor de amilose são geralmente utilizados para a produção de AR3, devido a capacidade dessa molécula em formar cristais resistentes (SONG et al., 2010; LU et al., 2018), no entanto, o

ultrassom potencializou a formação dessa fração, tanto nesse tipo de amido quanto nos amidos de raízes com relativamente baixos teores de amilose.

O teor de ALD também aumentou com a sonicação, especialmente no SPS tratado por 30W/15 min e no CAS sonicado a 20W/5 min, que atingiram 21,3% e 16,7% respectivamente. O ALD é formado por cristais imperfeitos, assim estruturas com baixa ordem molecular pode ser digerida lentamente (ZHANG; HAMAKER, 2009; DING et al., 2019). Os teores de ALD e principalmente de AR3 encontrados no presente estudo são tão ou mais expressivos que aqueles obtidos pela hidrólise enzimática precedendo a desramificação (capítulo anterior), mostrando assim que o ultrassom é uma excelente alternativa para utilização na redução da digestibilidade do amido, pois é uma tecnologia limpa que demanda menores tempos de tratamentos.

Sabe-se que o teor de amilose e o comprimento das cadeias do amido afetam diretamente a digestibilidade de amidos retrogradados (EERLINGEN et al., 1993). No entanto, um comprimento de cadeia adequado é necessário para formação de maiores teores de AR3 (LUCKETT; WANG, 2012; VILLAS-BOAS; FRANCO, 2016). Forte correlação positiva foi encontrada entre teor de AR3 e a fração IV ($r = 0,92$, $r = 0,95$ e $r = 0,91$ para SPS, CAS e HAS, respectivamente). O teor de AR3 também foi negativamente correlacionado com a fração I para SPS e CAS ($r = -0,85$, $r = -0,93$ respectivamente), e com as frações I' e II para HAS ($r = -0,92$ e $r = -0,83$ respectivamente). Gidley e Bulpin (1988) mostraram que a retrogradação de cadeias com $250 < DP < 660$ ocorre por alinhamento, o que forma uma estrutura mais fortemente ligada pois as ligações de hidrogênio entre as duplas hélices ocorrem ao longo de toda a extensão das cadeias, contribuindo para o aumento da resistência do amido retrogradado. Assim, a redução na proporção das cadeias muito longas e do GP_{pico} das cadeias da fração II de ~ 720 para valores entre ~ 580 e ~ 630 , aliado ao aumento na proporção das cadeias com GP 13-30, potencializa a formação de AR3. Adicionalmente podemos inferir que o comprimento de cadeia mais adequado para

potencializar a retrogradação e a formação de uma estrutura mais resistente seria de GP 20-23, principalmente naqueles amidos regulares. Os resultados de teor de AR3 corroboram com os resultados obtidos para CR e ΔH , mostrando forte correlação positiva entre AR3 e CR ($r = 0,98$, $r = 0,96$ e $r = 0,99$ para SPS, CAS e HAS) e entre AR3 e ΔH ($r = 0,96$, $r = 0,91$ e $r = 0,96$ para SPS, CAS e HAS).

3.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C em estado sólido

A análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi aplicada às amostras de amidos gelatinizados (amorfos), desramificados com posterior retrogradação e sonicados antes da desramificação e retrogradação que apresentaram os maiores teores de AR3 para cada fonte botânica (Tabela 6). De acordo com os espectros CPMAS apresentados na Figura 3, observa-se significativa alteração nos perfis dos sinais C1 e C4, os quais estão envolvidos com o arranjo conformacional a curtas distâncias e, conseqüentemente, com o empacotamento das cadeias a longas distâncias (MUTUNGI et al., 2012).

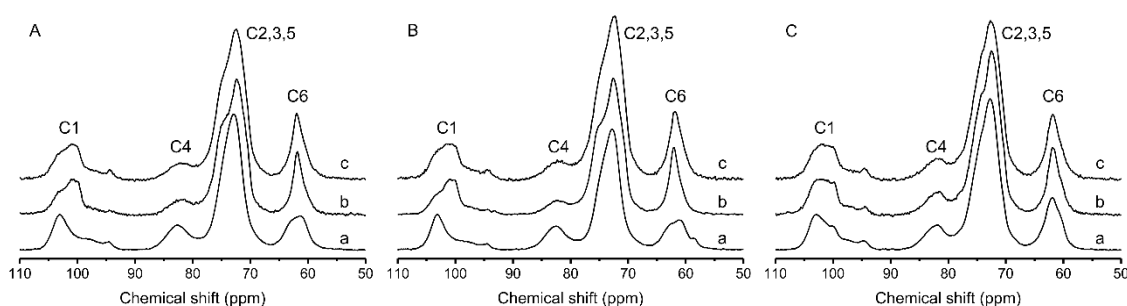


Figura 3 - Espectros ^{13}C CPMAS obtidos a 10 kHz das amostras de amido SPS (A), CAS (B) e HAS (C); amorfos (a), desramificados e retrogradados (b) sonicados, desramificados e retrogradados (c).

A partir do tratamento por deconvolução do sinal C1, observa-se uma crescente contribuição em área dos sinais centrados em 101 e 100 ppm, em detrimento da área do sinal em 103 ppm, indicando um aumento da concentração de fases ordenadas dos amidos desramificados para os respectivos amidos sonicados (ATICHOKUDOMCHAI

et al., 2004; PARIS et al., 1999). Como consequência disso, o aumento na CR é observado (Tabela 7). Tais resultados corroboram com os observados para a CR calculada por difração de raios-X (Figura 2), assim como também reportado em estudos anteriores para amidos de diferentes fontes botânicas (MUTUNGI et al., 2012; ZENG et al., 2015; ZHANG et al., 2014).

Tabela 7 - Cristalinidade relativa dos amidos calculada a partir dos padrões de raios-X e espectros CPMAS, conteúdo relativo de duplas hélices calculado a partir dos espectros CPMAS e teor de AR3 dos SPS, CAS e HAS.

Amostras	CR (%)		Duplas Hélices (%)	AR3 (%)
	Raios-X	CPMAS		
SPS P	32,9	38,5	36,3	23,4
SPS40/5	46,34	58,7	56,1	64,1
CAS P	34,6	43,1	39,6	31,9
CAS4025	45,10	56,4	54,1	62,0
HAS P	35,7	43,8	36,6	41,5
HAS20/25	49,44	63,0	56,6	69,5

P = desramificado e retrogradado; 20/25 = sonificado a 20/25 min, desramificado e retrogradado; 40W5 = sonificado a 40W/5 min, desramificado e retrogradado; 40/25 = sonificado a 40W/25 min, desramificado e retrogradado

Já o sinal do carbono C4 centrado em 82 ppm, comumente associado ao conteúdo de cadeias amorfas, é utilizado como indicativo indireto para o cálculo da concentração de duplas hélices formadas dos amidos retrogradados quando considerado o perfil espectral dos amidos gelatinizados como referência externa (ATICHOKUDOMCHAI et al., 2004; BOGRACHEVA et al., 2001). O conteúdo de duplas hélices aumentou quando a sonicação precedeu a desramificação e retrogradação sendo a maior proporção de duplas hélices encontradas para o HAS seguido pelo SPS e CAS. De forma análoga, e assim como indicado na Tabela 7, o aumento na proporção de duplas hélices foi proporcional ao aumento da fase cristalina estimada por ambas as técnicas (Raios-X e CPMAS), uma forte correlação entre a proporção de duplas hélices e CR foi observada ($r = 0,99$).

A maior concentração de duplas hélices é responsável pela formação de estruturas macromoleculares mais estáveis e mais cristalinas (PARIS et al., 1999;

BOGRACHEVA et al., 2001; ZHANG et al., 2014). De acordo com os resultados do presente estudo, é possível conceber que o efeito da cavitação a partir do ultrassom de alta intensidade aumentou o número de cadeias com maior mobilidade possibilitando que novos empacotamentos fossem gerados, o que contribuiu fortemente para o aumento no teor de AR3 desses amidos. A proporção de duplas hélices foi fortemente correlacionada com o teor de AR3 para esses amidos ($r = 0,95$) confirmando que o aumento na proporção de duplas hélices aumenta a resistência às enzimas digestivas.

4. CONCLUSÃO

O ultrassom provoca a cisão das ligações glicosídicas das cadeias de amido em fragmentos de menor massa molecular promovendo aumento na tendência dessas moléculas e se retrogradarem. Isso acontece devido às forças mecânicas da cavitação e aos radicais OH e átomos de hidrogênio gerados. Os cristais formados após a retrogradação dessas cadeias são mais estáveis termicamente e mais cristalinos, portanto mais resistentes às enzimas digestivas. Teores de AR3 maiores que 60% foram obtidos, mostrando a eficiência dessa técnica. O aumento no teor de AR3 é atribuído à redução do GP das cadeias de amilose com GP ~700 para ~ 580 e 630, principalmente para o HAS, aliado ao aumento na proporção das cadeias com GP 13-30, especialmente aquelas com GP 20-23, as quais foram determinantes na formação de maiores níveis de AR3 nos amidos de raízes. Os amidos de batata-doce e mandioca que são oriundos de fontes convencionais largamente produzidas no Brasil, tiveram teores de AR3 tão expressivos quanto aqueles encontrados no amido de milho com alto teor de amilose que é obtido de milho geneticamente modificado de maior custo e processo de extração mais complexo. Além disso, o ultrassom apresenta inúmeras vantagens sobre outras técnicas, por reduzir o tempo processamento, ser uma tecnologia limpa, segura, ambientalmente amigável e economicamente viável.

5. REFERÊNCIAS

ATICHOKUDOMCHAI, N.; VARAVINIT, S.; CHINACHOTI, P. A study of ordered structure in acid-modified tapioca starch by ^{13}C CP/MAS solid-state NMR. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p. 383–389, 2004.

AZHAR, A.; HAMDY, M. K. Sonication effect on potato and sweet potato powder. **Journal of Food Science**, v.44, p. 802-806, 1979.

BABU, A. S.; MOHAN, R. J.; PARIMALAVALLI, R. Effect of single and dual-modifications on stability and structural characteristics of foxtail millet starch. **Food Chemistry**, v. 271, p. 457-465, 2019.

BOGRACHEVA, T. Y.; WANG, Y. L.; HEDLEY, C. L.; The effect of water content on the ordered/disordered structures in starches. **Biopolymers**, v. 58, p. 247-259, 2001.

CHEN, P.; XIE, F.; ZHAO, L., QIAO, Q.; LIU, X. Effect of acid hydrolysis on the multi-scale structure change of starch with different amylose content. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 359-368, 2017.

CZECHOWSKA-BISKUP, R.; ROKIT, B.; LOTFY, S.; ULANKI, P., ROSIAK, J. M. Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 175-184, 2005.

DING, T.; LUO, F.; LIN, Q. Insights into the relations between the molecular structures and digestion properties of retrograded starch after ultrasonic treatment. **Food Chemistry**, v.294, p. 248-259.

DUPUIS, J. H.; LIU, Q.; YADA, R. Methodologies for increasing the resistant starch content of food starches: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p. 1219-1234.

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., 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.

FALSAFI, P. S.; MAGHSOUDLOU, Y.; ROSTAMABADI, H.; MAHDI, M.; HAMED, H.; HOSSEINI, S. M. H. Preparation of physically modified oat starch with different sonication treatments. **Food Hydrocolloids**, p. 98, p. 311-320, 2019.

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

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.

GIDLEY, M. J.; BULPIN, P. V. Aggregation of amylose in aqueous systems: The effect chain length on phase behavior and aggregation kinetics. **American Chemical Society**, v. 22, p. 341-346, 1988

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.23–3, 1995.

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.

HUANG, T. T.; ZHOU, D. N.; JIN, Z. Y.; XU, X. M.; HEN, H. Q. Effect of debranching and heat-moisture treatments on structural characteristics and digestibility of sweet potato starch. **Food Chemistry**, v. 187, p.218-224, 2015

IIDA, Y.; TUZIUTI, T.; YASUI, K.; TOWATA, A.; KOZUKA, T. Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, p.140-146, 2008.

JIANG, H.; MIAO, M.; JIANG, F. Y. B.; ZHANG, T. Enzymatic modification of corn starch with 4- α - glucanotransferase results in increasing slow digestible and resistant starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 208-214, 2014.

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

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

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

Krauser, M. O.; Oliveira, H. H. S.; Cebim, M. A.; Davolos, M. R. Relationship between scintillation properties and crystallite sizes in Y2O3:Eu3+. **Journal of Luminescence**, v. 203, p. 100–104, 2018.

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

LI, M.; LI, J.; ZHU, C. Effect of ultrasound pretreatment on enzymolysis and physicochemical properties of corn starch. **International Journal of Biologicas Macromolecules**, v. 111, p. 848-896, 2018.

LIN, L.; GUO, D.; HUANG, J.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; WEI, C. Molecular structure and enzymatic hydrolysis properties of starches from high-amylose maize inbred lines and their hybrids. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 246–254, 2016.

LU, Z. H.; BELANGER, N.; DONNES, E.; LIU, Q. Debranching of pea starch using pullulanase and ultrasonication synergistically to enhance slowly digestible and resistant starch. **Food Chemistry**, v. 268, p. 533-541, 2018.

LUCKETT, C.R.; WANG, Y.J. Effects of β -amylolysis on the resistant starch formation of debranched corn starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4751-4757, 2012.

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

MONROY, Y.; RIVERO, S.; GARCIA, M. A. Microstructural and techno-functional properties of cassava starch modified by ultrasound. **Ultrasonics- Sonochemistry**, v. 42, p. 795-804, 2018.

MUTUNGI, C.; PASSAUER, L.; ONYANGO, C.; JAROS, D.; ROHM, H. Debranched cassava starch crystallinity determination by Raman spectroscopy: Correlation of features in Raman spectra with X-ray diffraction and ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 598–606, 2012.

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

NIE, H.; LI, C.; LIU, P. H.; LEI, C. Y.; LI, J. B. Retrogradation, gel texture properties, intrinsic viscosity and degradation mechanism of potato starch paste under ultrasonic irradiation. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 590-600, 2019.

PARIS, M.; BIZOT, H.; EMERY, J.; BUZARÉ, J. Y.; Buléon, A. Crystallinity and structuring role of water in native and recrystallized starches by ^{13}C CP-MAS NMR spectroscopy. 1: Spectral decomposition. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 327–339, 1999.

PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; DEON, V. G.; MOOMAND, K.; HALAL, S. L. M.; ZAVAREZE, E. R.; LIM, L. T.; DIAS, A. R. G. Effects of single and dual physical modifications on pinhao starch. **Food Chemistry**, v. 187, p. 98-105, 2015.

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.

REDDY, C. K.; SURIYA, M.; VIDYA, P. V.; HARIPRIYA, S. Synthesis and physico-chemical characterization of modified starches from banana (*Musa AAB*) and its biological activities in diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 500-507, 2017.

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.

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

SONG, D.; JANASWAMY, S.; YAO, Y. Structure and in vitro digestibility of normal corn starch: effect of acid treatment, autoclaving, and β -amylolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9753-9758, 2010.

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

VILLAS-BOAS, F.; FRANCO, C. M. L. Effect of bacterial β -amylase and fungal α -amylase on the digestibility and structural characteristic of potato and arrowroot starches. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 795-803, 2016.

VILLAS-BOAS, F.; YAMAUTI, Y.; MORETTI, M. M. S.; FRANCO, C. M. L. Influence of molecular structure on the susceptibility of starch to α -amylase. **Carbohydrate Research**, v. 479, p. 23-30, 2019.

Wang, D.; Ma, X.; Yan, L.; Chantapakul, T.; Wang, W.; Ding, T.; Yea, X.; Liu, D. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of starch catalyzed by glucoamylase: Investigation on starch properties and degradation kinetics. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 47-54, 2017.

WU, C.; ZHOU, X.; WEI, B.; TIAN, Y.; XU, X.; JIN, Z. Effects of α -maltotriohydrolase hydrolysis prior to debranching on the structure and digestibility of normal maize starch. **Starch/Staerke**, v. 68, p. 1-8, 2017.

XU, X.; CHEN, Y.; LUO, Z.; LU, X. Different variations in structures of A- and B-type starches subjected to microwave treatment and their relationships with digestibility. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p.179-187, 2019.

YANG, Q, Y.; LU, X. X.; CHEN, Y. Z.; LUO, Z.G.; XIAO, Z. G. Fine structure, crystalline and physicochemical properties of waxy corn starch treated by ultrasound irradiation. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 51, p. 350-358, 2019.

ZENG, S.; WU, X.; LIN, S.; ZENG, H.; LU, X.; ZHANG, Y.; ZHENG, B. Structural characteristics and physicochemical properties of lotus seed resistant starch prepared by different methods. **Food Chemistry**, v. 186, p. 213-222, 2015.

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.

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.

ZHU, F. Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. **Food Science & Technology**, v. 43, p. 1-17, 2015.

CONCLUSÃO GERAL

A estrutura molecular do amido influencia na sua suscetibilidade à amilólise. A alta proporção de cadeias curtas (GP 6-12) do amido de mandioca aumenta sua suscetibilidade tanto à α -amilase fúngica quanto à α -amilase maltogênica. Por outro lado, o alto teor de amilose e alta proporção de cadeias muito longas da amilopectina presentes no amido de milho com alto teor de amilose influenciam diretamente na sua resistência a ambas as enzimas. Todos os amidos foram hidrolisados com α -amilase fúngica em uma única fase, enquanto os amidos de raízes tratados com α -amilase maltogênica tiveram dois estágios de hidrólise. Os principais malto-oligossacarídeos liberados pela ação da α -amilase fúngica são maltose e maltotriose, enquanto a α -amilase maltogênica produz, além da maltose, pequenas quantidades de maltotriose e maltotetraose que são quebrados em glicose e maltose com o aumento no tempo de reação.

O ultrassom de alta intensidade com frequência de 30 kHz provocou a cisão das ligações glicosídicas das cadeias de amido, independentemente da combinação potencia/tempo utilizada. A cisão é causada pelas altas forças de cisalhamento e turbulência provocadas pela cavitação e pelos radicais OH e átomos de hidrogênio livres gerados.

A redução da massa molecular dos amidos pelos tratamentos enzimáticos e físico precedendo a desramificação potencializa a retrogradação e consequentemente a redução da digestibilidade de amidos de diferentes fontes botânicas. Níveis de AR3 maiores que 60% e de ALD em torno de 20% foram obtidos, independentemente do tratamento utilizado. No entanto, o tratamento ultrassônico promove a formação de teores de AR3 tão ou mais expressivos em tempos significativamente menores quando comparados aos obtidos por amilases.

A formação de AR3 é atribuída a dois principais fatores. i) redução do GP das cadeias muito longas e longas da amilose que são mais propensas à reassociação.

ii) aumento na proporção de cadeias com GP 13-30 especialmente aquelas com GP 20-23 que também possuem maior mobilidade e tendência a retrogradação. A amilose é a principal matéria prima para a reassociação, assim, para o amido de milho com alto teor de amilose, o principal fator que rege a formação de AR3 é a redução na proporção das cadeias muito longas e longas de amilose, enquanto que para amidos regulares, devido a seu menor teor de amilose, o aumento na proporção de cadeias com GP13-30 é fator determinante para aumentar a recristalização. A forte correlação entre teor de AR3, cristalinidade e ΔH indica que a resistência desse tipo de amido se dá pela formação de uma estrutura mais cristalina, densamente empacota e fortemente ligada composta por cristalitos maiores, mais perfeitos e com maior estabilidade térmica.

Os pré-tratamentos enzimáticos e físico na formação de AR3 são excelentes opções para a valorização dos amidos de fontes botânicas convencionais como a batata-doce e mandioca que são largamente produzidas no Brasil, com baixos custo e facilidade para isolamento do amido. O ultrassom se apresenta como uma técnica promissora, visto que além de reduzir o tempo de processamento é uma tecnologia limpa, segura, ambientalmente amigável e economicamente viável.