

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 06/09/2023



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 - Difractogramas 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.

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.; FERNÁNDEZLÓPEZ, 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.