

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

Modificação física em amido de batata: efeito nas propriedades físicas, térmicas, morfológicas, de cristalinidade e digestibilidade *in vitro*

Rosana Colussi

Pelotas, 2016

Rosana Colussi

Modificação física em amido de batata: efeito nas propriedades físicas, térmicas, morfológicas, de cristalinidade e digestibilidade *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias - UFPel
Prof. Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze - UFPel
Prof. Dr. Jaspreet Singh – Massey University

Pelotas, 2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alvaro Renato Guerra Dias

Prof. Dr^a. Elizabete Helbig

Prof. Dr^a. Leonor Almeida de Souza Soares

Prof. Dr. Nathan Levien Vanier

Prof. Dr^a. Shanise Lisie Mello El Halal

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Agradecimentos

A Deus por me proteger e sempre ter me dado saúde para conseguir alcançar meus objetivos.

A meus pais Sérgio e Teresinha e ao meu irmão André família maravilhosa, carinhosa que sempre esteve ao meu lado me ajudando e incentivando continuar estudando mesmo que eu fosse do outro lado do mundo.

Aos amigos, orientadores professores Dr. Álvaro Renato Guerra Dias e Dr^a. Elessandra da Rosa Zavareze, pela orientação, incentivo, apoio, confiança e amizade. Ao longo desses 4 anos vocês me ajudaram a crescer tanto o pessoalmente quanto profissionalmente. É muito bom trabalhar com quem gosta do que faz, e com certeza vocês são minha inspiração para continuar nessa jornada acadêmica.

Ao orientador Dr. Jaspreet Singh e a pesquisadora Dr^a. Lovedeep Kaur por terem me recebido tão bem no Riddet Institute, pela orientação, confiança e amizade.

A minha amiga Vânia Zanella Pinto pela amizade, confiança, brigas, incentivo e apoio. Boa parte das coisas boas que aconteceram comigo durante este doutorado só aconteceram porque você acreditava mais em mim do eu mesma. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos Shanise Lisie Mello El Halal, Ana Claudia Langaro, Jarine Amaral do Evangelho, Barbara Biduski, Jessica Hoffmann, Carlos Montoya e Prateek Sharma pela amizade e pelo apoio nas mais diversas situações.

Ao professor Luiz Carlos Gutkoski pela amizade e disponibilidade desde a graduação.

Aos colegas de Pós graduação do Laboratório de Grãos e do Riddet Institute muito obrigada pelo apoio e a amizade.

Aos professores do DCTA Moacir Cardoso Elias, Maurício de Oliveira, Manoel Artigas Schirmer e Cesar Valmor Rombaldi pelas contribuições ao longo do período de mestrado e doutorado.

Aos estagiários dos Laboratórios de Grãos e de Cereais pela amizade e auxílio nas análises.

À Universidade Federal de Pelotas, à Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), a SCT-RS (Secretaria da Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul), ao Polo de Inovação Tecnológica em Alimentos da Região Sul e ao programa Ciência sem fronteiras (CsF) agradeço pelo apoio financeiro.

RESUMO

COLUSSI, Rosana. **Modificação física em amido de batata: efeito nas propriedades físicas, térmicas, morfológicas, de cristalinidade e de digestibilidade *in vitro***. 2016. 88p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O principal componente da batata é o amido, que pode ser aplicado em diversos produtos. Entretanto, na forma nativa o amido de batata nem sempre apresenta as características desejadas para determinados usos. Considerando a importância do amido de batata o presente trabalho foi dividido em dois estudos, onde objetivou-se com o primeiro estudo analisar o tempo de armazenamento e reaquecimento em micro-ondas de géis de amido de batata e verificar a influência sobre as características de teor de amilose, sinerese, opacidade, cristalinidade relativa, propriedades térmicas e reológicas, digestibilidade *in vitro* e morfologia dos géis. No segundo estudo foi verificado se o processo de modificação por ultra pressão hidrostática altera as propriedades físicas, químicas, reológicas, morfológicas, de cristalinidade e de digestibilidade *in vitro* de amido de batata. Onde foi verificado que no primeiro estudo a opacidade dos géis de amido de batata diminuiu progressivamente durante o armazenamento. O teor de amilose foi significativamente maior em comparação com os géis de amido nativo. Os géis apresentaram diferenças na morfologia após o armazenamento. A digestibilidade do amido diminuiu significativamente durante o armazenamento devido a retrogradação do gel de amido, no entanto, com o processo de reaquecimento do gel em micro-ondas a digestibilidade foi superior ao gel de fresco. No segundo estudo foi verificado que a aplicação de alta pressão hidrostática (APH) associada ou não ao armazenamento refrigerado (retrogradação) em amido de batata promove modificações na morfologia e nas propriedades de pasta, térmicas e de cristalinidade, estrutura dos géis e na digestibilidade *in vitro*. O uso de de 6 ciclos de 10 minutos a pressão de 600 MPa associada a retrogradação promoveu as maiores modificações no amido, reduzindo sua viscosidade da pasta e digestibilidade, no entanto, aumentou a cristalinidade do amido de batata. A alta pressão hidrostática (APH) associada a retrogradação permite a produção de amido com características diferenciadas, que após cozimento proporciona uma menor digestibilidade *in vitro*, assim como menor taxa de liberação de glicose ao longo da digestão, podendo ser uma técnica de processamento de alimentos para consumidores que necessitam de uma menor e mais lenta digestão do amido.

Palavras chave: amido de batata, retrogradação, armazenamento, alta pressão hidrostática, digestibilidade *in vitro*.

Abstract

COLUSSI, Rosana. **Physical modification in potato starch: effect on physical, thermal, morphological, crystallinity and *in vitro* digestibility.**2016. 88p. . Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The main component of potato is the starch, which can be applied in various products. However, native potato starch does not always have the desired characteristics for certain uses. Considering the importance of the potato starch, the present work was divided in two studies, which the objective was in the first study analyzing the time of storage and microwave heating of potato starch gels and the influence on the characteristics of amylose content, syneresis, opacity, relative crystallinity, thermal and rheological properties, *in vitro* digestibility and morphology of gels. In the second study was verified if the modification process by high hydrostatic pressure changes the physical, chemical, rheological, morphological, crystallinity and *in vitro* digestibility of potato starch. Where it was found that in the first study opacity of potato starch gels decreased progressively during storage. The amylose content was significantly higher in comparison with native starch gels. The gels showed differences in morphology after storage. The starch digestibility decreased significantly during storage due to retrogradation of the starch gel, However, with a reheating process of the gel in microwave digestibility was higher than the fresh gel. In the second study it was found that the application of high hydrostatic pressure (HHP) associated or not with cold storage (retrogradation) in potato starch promotes changes in the morphology and in the pasting properties, thermal and crystallinity, structure of the gels and *in vitro* digestibility. The use of 6 cycles of 10 minutes at 600 MPa pressure associated retrogradation promoted the greatest changes in the starch, reducing its pasting viscosity and digestibility, however, increased potato starch crystallinity. The high hydrostatic pressure (HHP) associated with retrogradation allows the production of starch with different characteristics, that after cooking provides a lower *in vitro* digestibility, as well as lower glucose release rate throughout the digestion, It may be a food processing technique for consumers needing a smaller and slower digestion of the starch.

Keywords: potato starch, retrogradation, storage, high hydrostatic pressure, *in vitro* digestibility.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular da amilose.....	19
Figura 2. Estrutura molecular da amilopectina	19
Figura 3. Esquema de organização da cadeia de amilopectina. A) Classificação das cadeias da amilopectina em cadeias tipo A, B e C; B) Formação das regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido; C) Modelo da estrutura interna do grânulo de amido com a visualização dos anéis de crescimento e centro ou hilum.....	20
Figura 4. - Difractogramas de raio-X de diferentes amidos. (A) refere-se ao padrão tipo A de amidos de cereais, (B) tipo B de amidos de tubérculos, (C) tipo C de amidos de leguminosas.....	21
Figura 5. Efeito do processo de aquecimento, resfriamento e armazenamento do amido.....	23
Figura 6. Esquema de gelatinização do amido com calor e água e por alta pressão..	25
Figura 7. Morfologia de amido de batata modificado a 600 MPa por 3 min.	26
Figura 8. Estrutura polimórfica de cristalinidade de amido do tipo A e B.	27
Figura 9. Processo digestivo de seres humanos. Adaptado de Guerra et al., (2012)	29
Figura 10. Padrões de difração de raios-X de (a) amido nativo e gel fresco (b) armazenados durante 2 e 7 dias e (c) géis reaquecidos por 1 e 2 vezes...	43
Figura 11. Curva de RVA do amido de batata nativo.	44
Figura 12. Módulo de armazenamento G' em função da frequência de gel de amido de batata fresco e géis armazenados durante 2 e 7 dias.	45
Figura 13. Módulo de perda G'' em função da frequência de gel de amido de batata fresco e géis armazenados durante 2 e 7 dias.	46
Figura 14. Efeito da retrogradação e reaquecimento sobre a hidrólise de amido (%) durante a digestão gástrica e intestinal simulado.	49
Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura do gel de amido de batata (a) gel fresco, (b) gel armazenado por 2 dias a 4°C e (c) gel armazenado por 2 dias a 4°C e reaquecido em micro-ondas por 2 vezes.	50
Figura 16. Fluxograma da digestão <i>in vitro</i> de amido de batata nativo e modificados.	57

Figura 17. Propriedades de pasta de amido de batata nativo e modificado por alta pressão hidrostática com uso de 3 e 6 ciclos de 400 MPa (a) e 3 e 6 ciclos de 600 Mpa (b).	60
Figura 18. Difrátogramas de raios X de amidos de batata nativo e modificados por 3 e 6 ciclos de 400 MPa e associados a retrogradação (a) e modificados por 3 e 6 ciclos de 600 MPa e associados a retrogradação (b).....	62
Figura 19. Microscopia com luz polarizada de amido de batata modificado (a, b) 3 ciclos de 400 MPa por 10 min; (c, d) 3 ciclos de 400 MPa por 10 min+ retrogradação; (e, f) 6 ciclos de 400 MPa por 10 min; (g, h) 6 ciclos de 400 MPa por 10 min+ retrogradação.	67
Figura 20. Microscopia com luz polarizada de amido de batata modificado (a, b) 3 ciclos de 600 MPa por 10 min; (c, d) 3 ciclos de 600 MPa por 10 min+ retrogradação; (e, f) 6 ciclos de 600 MPa por 10 min; (g, h) 6 ciclos de 600 MPa por 10 min+ retrogradação.	69
Figura 21. Morfologia do amido de batata nativo (a), modificados por 3 ciclos de 10 minutos a 400 MPa (b), 3 ciclos de 10 minutos a 400 MPa associado a retrogradação (c), 6 ciclos de 10 minutos a 400 MPa (d), 6 ciclos de 10 minutos a 400 MPa associado a retrogradação (e).	71
Figura 24. Morfologia do amido de batata nativo (a), modificados por 3 ciclos de 10 minutos a 600 MPa (b), 3 ciclos de 10 minutos a 600 MPa associado a retrogradação (c), 6 ciclos de 10 minutos a 600 MPa (d), 6 ciclos de 10 minutos a 600 MPa associado a retrogradação (e).	73
Figura 23. Morfologia dos géis de amido de batata nativo (a) e modificados a 6 ciclos de 10 min a 600 MPa (b); 6 ciclos de 10 min a 600 MPa associado a 7 dias de retrogradação	75
Figura 24. Digestibilidade de amido de batata nativo e modificado por 3 ciclos de 400 MPa e 3 ciclos de 400 MPa associados a retrogradação.	76
Figura 25. Digestibilidade de amido de batata nativo e modificado por 6 ciclos de 400 MPa e 6 ciclos de 400 MPa associados a retrogradação.	77
Figura 26. Digestibilidade de amido de batata nativo e modificado por 3 ciclos de 600 MPa e 3 ciclos de 600 MPa associados a retrogradação.	78
Figura 27. Digestibilidade de amido de batata nativo e modificado por 6 ciclos de 600 MPa e 6 ciclos de 600 MPa associados a retrogradação.	79

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição centesimal da batata.....	18
Tabela 2. Sinerese e opacidade de géis de amido de batata fresco e armazenados por 2 e 7 dias.....	39
Tabela 3. Amilose, propriedades térmicas e cristalinidade relativa de géis de amido de batata armazenados por 2 e 7 dias e reaquecidos por 1 e 2 vezes	41
Tabela 4. Propriedades reológicas de géis de amido de batata fresco e armazenados durante 2 e 7 dias.....	47
Tabela 5. Propriedades de pasta de amido de batata modificado por 400 Mpa e 600 MPa por 3 e 6 ciclos de 10 min e submetidos à retrogradação por 7 dias.	59
Tabela 6. Propriedades térmicas de amido de batata nativo e modificado por 3 e 6 ciclos de 400 MPa e 600 MPa e submetidos ao processo de retrogradação.	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. HIPÓTESES	16
1.2. OBJETIVOS.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Batata	17
2.2. Amido.....	18
2.2.1. Gelatinização e retrogradação do amido	22
2.3. Amidos modificados.....	24
2.3.1. Modificação do amido por alta pressão hidrostática	24
2.4. Digestibilidade do amido.....	27
2.4.1 Digestibilidade <i>in vitro</i>	28
3. CAPÍTULO 1 – Digestão <i>in vitro</i> de amido de batata: Efeito do armazenamento refrigerado e o reaquecimento em micro-ondas.....	32
3.1. Introdução	32
3.2. Material e Métodos	34
3.2.1. Material.....	34
3.2.2. Métodos.....	34
3.2.2.1. Preparação da amostra	34
3.2.2.2. Determinação de amilose.....	34
3.2.2.3. Sinérese	35
3.2.2.4. Opacidade	35
3.2.2.5. Índice de Cristalinidade Relativa (Raio-X).....	35
3.2.2.6. Propriedades térmicas.....	36
3.2.2.7. Propriedades reológicas.....	36
3.2.2.8. Digestibilidade <i>in vitro</i>	37
3.2.2.9. Morfologia dos géis	38
3.2.2.10. Análise estatística.....	38
3.3. Resultados e Discussão	38
3.3.1. Teor de amilose, sinerese e opacidade	38
3.3.2. Propriedades térmicas.....	40
3.3.3. Difração de raios-X	42
3.3.4. Propriedades reológicas	44

3.3.5. Digestibilidade <i>in vitro</i>	48
3.3.6. Morfologia dos géis.....	50
3.4. Conclusões	51
4. CAPÍTULO 2 – Alta pressão hidrostática associada à retrogradação: Efeitos sobre as características de pasta, térmicas, cristalinidade e de digestibilidade <i>in vitro</i> em amido de batata	52
4.1. Introdução	52
4.2. Material e Métodos	53
4.2.1. Material.....	53
4.2.2. Métodos.....	53
4.2.2.1. Modificação por alta pressão hidrostática	53
4.2.2.2. Propriedades pasta	54
4.2.2.3. Índice de Cristalinidade Relativa (Raio-X).....	54
4.2.2.4. Propriedades térmicas.....	54
4.2.2.5. Morfologia dos amidos e dos géis	55
4.2.2.5.1. Microscopia ótica com luz polarizada	55
4.2.2.5.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	55
4.2.2.6. Digestibilidade <i>in vitro</i>	55
4.2.2.7. Análise estatística	57
4.3. Resultados e Discussão	58
4.3.1. Propriedades de Pasta	58
4.3.2. Cristalinidade relativa.....	60
4.3.3. Propriedades térmicas	63
4.3.4. Microscopia com luz polarizada	66
4.3.5. Morfologia dos amidos.....	70
4.3.6. Morfologia dos géis.....	74
4.3.7. Digestibilidade <i>in vitro</i>	76
4.4. Conclusões	80
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é o quarto alimento vegetal mais produzido no mundo, de fácil preparo e com excelentes características nutricionais. O principal componente da batata é o amido e corresponde de 12 a 20% do seu peso, sendo considerado o constituinte mais importante para a funcionalidade da batata em aplicações alimentares.

A qualidade e as propriedades nutricionais dos alimentos à base de amido são em grande parte determinadas pelas mudanças que o amido sofre durante o processamento/cozimento e subsequente armazenamento. Quando o amido é aquecido na presença de água, sua estrutura granular é desestruturada, e com subsequente arrefecimento, as cadeias de amilose e de amilopectina tendem a reassociar-se gradualmente em uma estrutura ordenada, diferente do material original, em um processo chamado de retrogradação.

A retrogradação do amido é normalmente acompanhada por uma série de mudanças físicas, tais como aumento na viscosidade e turbidez de pastas, formação de gel, a exsudação de água e aumento do grau de cristalinidade, com a aparência de polimorfos cristalinos de tipo B. A retrogradação é um processo contínuo, que envolve inicialmente recristalização rápida de moléculas de amilose seguido por uma recristalização lenta de moléculas de amilopectina.

Os amidos nativos nem sempre são os mais adequados para os diferentes tipos de processamentos. As modificações no amido são feitas para obter-se produtos amiláceos com propriedades necessárias para usos específicos. Os amidos podem ser modificados fisicamente. As modificações físicas apresentam como vantagem a simplicidade e o baixo custo. Além disso, são seguras, pois não requerem produtos químicos ou agentes biológicos.

Dentre as modificações físicas, a que utiliza alta pressão hidrostática (APH), vem sendo bastante investigada, pois não envolve tratamento térmico. O mecanismo desta modificação basicamente consiste na hidratação reversível da fase amorfa seguida por uma distorção irreversível da região cristalina dos grânulos de amido. As ramificações da amilopectina são desestruturadas e conseqüentemente a estrutura granular do amido é rompida.

O efeito da APH sobre o mecanismo de gelatinização do amido é diferente quando comparado ao tratamento hidrotérmico, uma vez que o mecanismo de

gelatinização é diferente, acredita-se que o mecanismo de retrogradação também seja, sendo que há relatos na literatura que a retrogradação é observada imediatamente após o tratamento com APH.

Os diferentes tipos de processamentos de produtos que contenham amido fazem com que sua absorção no organismo seja modificada, podendo esta ser avaliada diretamente no organismo vivo (digestibilidade *in vivo*) ou em laboratório, em ambiente controlado, simulando o processo de digestão no aparelho digestório (digestibilidade *in vitro*).

A digestão *in vitro* objetiva simular o processo digestivo de seres humanos. É uma técnica que utiliza a hidrólise enzimática para caracterizar alimentos ricos em amido em frações diferentes em termos que refletem a velocidade de liberação de glicose e da sua absorção no trato gastrointestinal, tais como amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR). O sistema *in vitro* geralmente usado para estudar a digestão do amido simula as condições do estômago simulando um suco gástrico e intestinal. A digestibilidade de amidos é influenciada por diversos fatores, como o processo de cocção dos grânulos, o armazenamento dos géis de amido e até mesmo o processo de modificação do amido.

Devido à importância da batata como alimento e dos diferentes tipos de processamento a que é submetida, o presente estudo visou avaliar a digestibilidade *in vitro* de amido de batata submetido ao armazenamento refrigerado e reaquecimento em micro-ondas, assim como o efeito da alta pressão hidrostática associada à retrogradação sobre as características físicas, químicas e de digestibilidade *in vitro* em amido de batata.

1.1. HIPÓTESES

O processo de armazenamento e reaquecimento altera o teor de amilose, a sinerese e opacidade dos géis de amido de batata. Além disso, modifica a cristalinidade relativa, as propriedades térmicas e reológicas, a digestibilidade *in vitro* e a morfologia dos géis.

O processo de modificação por ultra pressão hidrostática (APH) altera as propriedades físicas, reológicas, de cristalinidade, morfológicas, e de digestibilidade *in vitro* de amido de batata

1.2. OBJETIVOS

Estudar o efeito do tempo de armazenamento e reaquecimento em micro-ondas de géis de amido de batata e verificar a influência nas características de digestibilidade *in vitro*, cristalinidade relativa, propriedades térmicas e reológicas, amilose, morfologia dos géis, sinerese e transmitância.

Verificar se o processo de modificação por alta pressão hidrostática altera as propriedades físicas, reológicas, de cristalinidade, morfológicas, e de digestibilidade *in vitro* de amido de batata.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Batata

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é originária dos Andes peruanos e bolivianos onde é cultivada há mais de 7.000 anos. Em 1520 foi introduzida na Europa e então através da colonização realizada pelos países europeus se disseminou para outros continentes (ABBA, 2016).

A cadeia produtiva da batata constitui-se na maior e mais complexa da olericultura, tendo em vista o elenco de atividades, desde a produção de sementes até o cultivo de tubérculos, para a produção de alimentos e seus derivados (batatas: fritas, cozidas, palhas, purês e chips) (FILHO, CAMARGO e ÂNGELO, 2008). De acordo com a Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT), a batata é o quarto alimento mais consumido no mundo, depois de arroz, trigo e milho. Dada a sua relevância, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), declarou 2008 o Ano Internacional da Batata. Segundo a FAO (2015) a produção mundial de batata em 2013 foi de 368.096.000 toneladas. O Brasil é o vigésimo produtor, tendo produzido neste mesmo ano 3.570.350 toneladas de batata.

O principal componente da batata é o amido, mas fornece quantidades significativas de proteínas, com um bom equilíbrio de aminoácidos, vitaminas C, B6 e B1, folato, potássio, fósforo, cálcio e magnésio, ferro e zinco (Tabela 1) (BRADSHAW e RAMSAY, 2009). Sua composição química pode ser influenciada por fatores como manejo de adubação, época de plantio, cultivar empregada e formas de armazenamento (FILGUEIRA, 2000). A Tabela 1 apresenta a composição centesimal da batata.

Tabela 1. Composição centesimal da batata.

Constituintes	Concentração
Água	82,9%
Carboidratos	11,9%
Fibra	1,2%
Proteína	1,8%
Cinzas	0,6%
Tiamina	0,10 mg
Piridoxina	0,15 mg
Vitamina C (ácido ascórbico)	31,10 mg
Cobre	0,09 mg
Magnésio	15,00 mg
Manganês	0,10 mg
Zinco	0,20 mg
Potássio	302,00 mg
Cálcio	4,00 mg
Ferro	0,40 mg
Fósforo	39,00 mg

Fonte: TACO, (2011)

2.2. Amido

O amido é o produto final do processo fotossintético e reserva de carbono das plantas superiores. As fontes comerciais de amido mais importantes são os grãos de cereais, onde o amido representa de 40% a 90% do peso seco dos grãos, e as tuberosas com um teor de amido entre 65% a 85% da matéria seca. As cinco principais fontes comerciais mundiais de amido são milho, trigo, arroz, batata e mandioca (BAO et al., 2004). Estruturalmente o amido se apresenta na forma de grânulos com tamanho variável. Os tamanhos dos grânulos de amido de batata podem variar de 5 - 100 μm e os formatos podem ser ovais e/ou esféricos (GROMMERS e KROGT, 2009).

O amido é um polímero com massa molecular elevada, formado de unidades de D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas, organizadas em duas frações de homopolímeros, a amilose e a amilopectina. A amilose (Figura 1) apresenta uma

cadeia pouco ramificada, quase linear, composta de unidades ligadas de α -D-glucopiranosose por ligações glicosídicas α 1-4. A amilose apresenta tamanho médio de cadeia de aproximadamente 103 unidades de glicose e sua forma predominantemente linear resulta na formação de hélices com interior hidrofóbico, que pode acomodar moléculas pequenas como ácidos graxos, álcool e iodo. Além de formar um complexo com iodo, resultando em uma coloração azul, a amilose é instável em soluções aquosas diluídas (BILIADERIS et al., 1991; BULÉON et al., 1998).

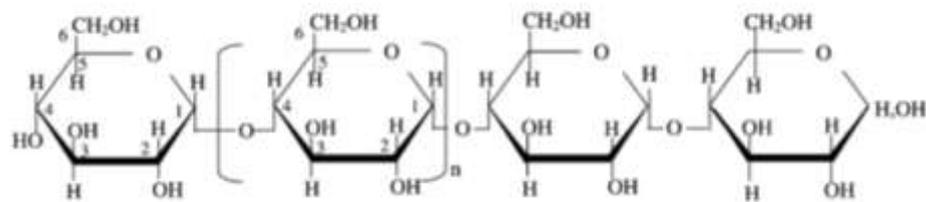


Figura 1. Estrutura molecular da amilose. (Fonte: TESTER, KARKALAS e QI, 2004)

A amilopectina apresenta cadeia ramificada composta de unidades de α -D-glucopiranosose unidas por ligações α 1-4, mas contendo 5 a 6% de ligações α 1-6 entre um grupo hidroxila de uma cadeia de glicose e o carbono 6 da glicose de outra cadeia (Figura 2). A amilopectina apresenta um tamanho médio das ramificações de aproximadamente 20 ou 30 unidades de glicose (DP), que em presença de iodo resulta em uma coloração avermelhada e é estável em soluções aquosas diluídas (BILIADERIS et al., 1991; BULÉON et al., 1998).

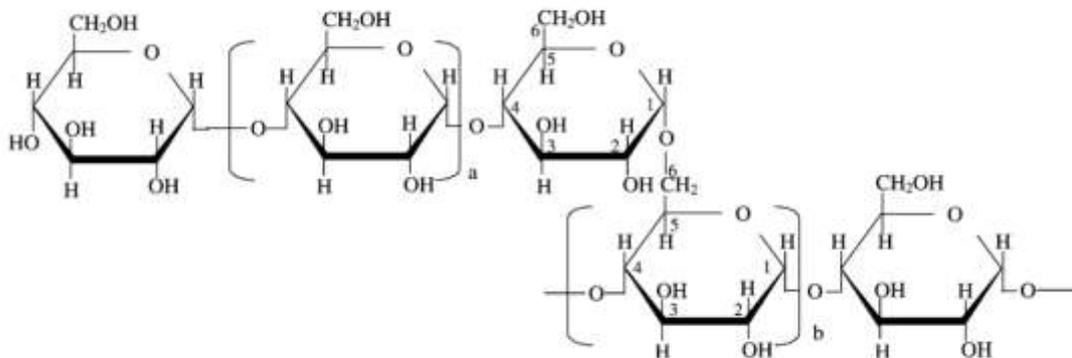


Figura 2. Estrutura molecular da amilopectina (Fonte: TESTER et al., 2004)

As cadeias de amilopectina dentro dos grânulos estão radialmente arranjadas com seus grupos terminais não redutores em direção à superfície e estas são organizadas alternando áreas amorfas e cristalinas. A molécula de amilopectina consiste de uma cadeia principal C, que carrega o grupo redutor e várias cadeias ramificadas A e B (Figura 3). As cadeias de uma ou mais moléculas interligam-se, formando duplas hélices (CEREDA et al., 2002).

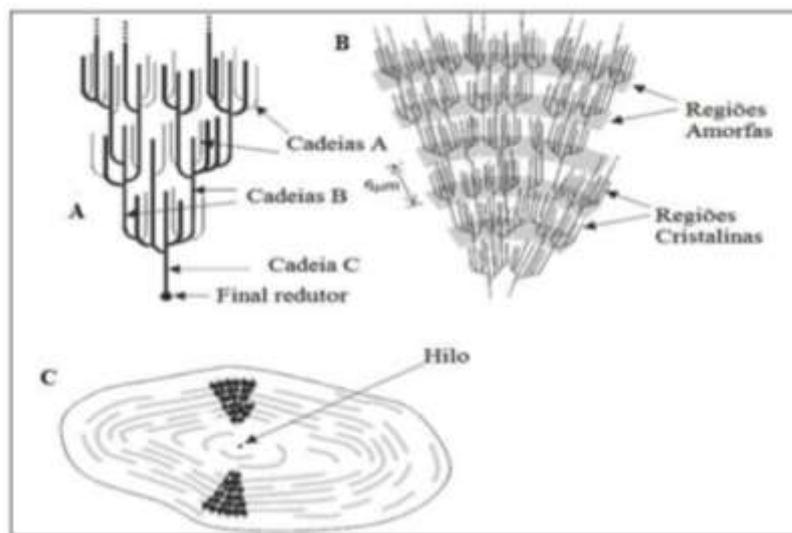


Figura 3. Esquema de organização da cadeia de amilopectina. A) Classificação das cadeias da amilopectina em cadeias tipo A, B e C; B) Formação das regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido; C) Modelo da estrutura interna do grânulo de amido com a visualização dos anéis de crescimento e centro ou hilum. (Fonte: PARKER e RING, 2001).

A maioria dos grânulos de amidos contém em torno de 20 a 30% de amilose e 70 a 80% de amilopectina. Estas quantidades variam conforme a fonte botânica e cultivar, o que confere características específicas a cada amido (CEREDA et al., 2002). O arranjo da amilose e da amilopectina nos grânulos leva à formação de zonas de deposição mais ou menos densas. A região onde se concentra a amilopectina é mais densa ou cristalina onde sua parte linear é responsável pela origem desta cristalinidade. As áreas amorfas são formadas pelas cadeias de amilose e ramificações (ligações α 1,6) da amilopectina.

Os grânulos de amido nativos contêm entre 15 e 45% de material cristalino analisados com modelos de difração de raios-X, que correspondem a dois tipos de polimorfismo (A ou B) ou uma forma intermediária (C), as quais têm a sua

classificação baseada em variações no conteúdo de água e na configuração de empacotamento de duplas hélices (IMBERTY et al., 1991). Os padrões de cristalinidade (Figura 4) são definidos com base nos espaços interplanares e intensidade relativa das linhas de difração de raio-X (CEREDA, 2001; BRIASSOULIS, 2004).

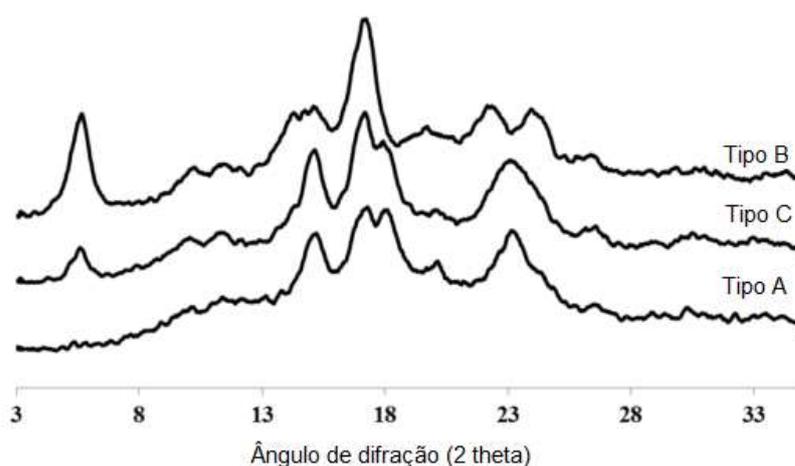


Figura 4. - Difractogramas de raio-X de diferentes amidos. (A) refere-se ao padrão tipo A de amidos de cereais, (B) tipo B de amidos de tubérculos, (C) tipo C de amidos de leguminosas.

O padrão de cristalinidade tipo B, do amido de batata apresenta um pico de intensidade forte a 5,2 Å e vários picos de intensidade média de 15,8; 6,2; 4,0 e 3,7 Å (BILIADERIS, 1991). A estrutura de padrão tipo B é definida por ser composta por uma unidade básica de cadeias que são empacotadas em um arranjo hexagonal, onde a unidade celular tem duas duplas hélices no sentido anti-horário, alinhadas e arranjadas em paralelo. Essa estrutura contém 36 moléculas de água (27%) para cada 12 resíduos de glicose, sendo que a metade dessa água é fortemente ligada às duplas hélices, e a outra metade é concentrada em um eixo em parafuso (ELIASSON, 2004).

A técnica de difração de raio-X, detecta as repetições ordenadas regulares das hélices, refletindo a ordem tridimensional dos cristais do amido. Através desta classificação pode-se agrupar a maioria dos amidos de acordo com as suas propriedades físicas (DONNALD et al., 2004). Esta técnica é o melhor método para estimar a cristalinidade relativa do amido.

Tanto o baixo custo quanto a alta disponibilidade e a biodegradabilidade do amido fazem com que este polímero seja bastante estudado (ROSA et al., 2001;

PRADELLA, 2013). O amido de batata, assim como outros amidos, desempenha um papel importante na alimentação e na indústria, onde suas propriedades de espessamento e de formação de gel são fundamentais.

2.2.1. Gelatinização e retrogradação do amido

A qualidade e as propriedades nutricionais dos alimentos à base de amido são em grande parte determinada pelas mudanças que o amido sofre durante o processamento/cozimento e subsequente armazenamento. Estas alterações que determinam as propriedades funcionais do amido envolvem absorção de água, o inchamento dos grânulos, a formação de uma pasta visco elástica durante o aquecimento seguido pela reassociação das cadeias de amido dispersas durante o arrefecimento e a formação de gel (WANG e COPELAND, 2013).

Quando aquecido em água, os grânulos de amido hidratam-se e são transformados em pasta. Ocorre a quebra na estrutura do grânulo devido à fusão de cristais, desenrolamento das hélices duplas e a quebra das ligações de hidrogênio. Todas estas características são referidas coletivamente como gelatinização do amido e são acompanhados pela perda da birrefringência de grânulos intactos (WANG et al., 2015)

Quando o amido é aquecido na presença de água e, subsequentemente arrefecido, as cadeias de amilose e de amilopectina tendem a reassociar-se gradualmente em uma estrutura ordenada diferente, em um processo chamado de retrogradação (WANG et al., 2015).

As modificações que ocorrem no amido durante o processo de aquecimento, arrefecimento e armazenamento podem ser verificados na Figura 5. Onde: (I) grânulos de amido nativo; (II) processo de gelatinização (intumescimento do grânulo); (III) processo de gelatinização onde ocorre lixiviação de amilose e parcial ruptura dos grânulos; (IV) formação de uma rede devido a gelificação/retrogradação amilose durante o arrefecimento da pasta de amido; (V) formação de moléculas de amilopectina ordenados ou cristalinas (retrogradação da amilopectina durante o armazenamento).

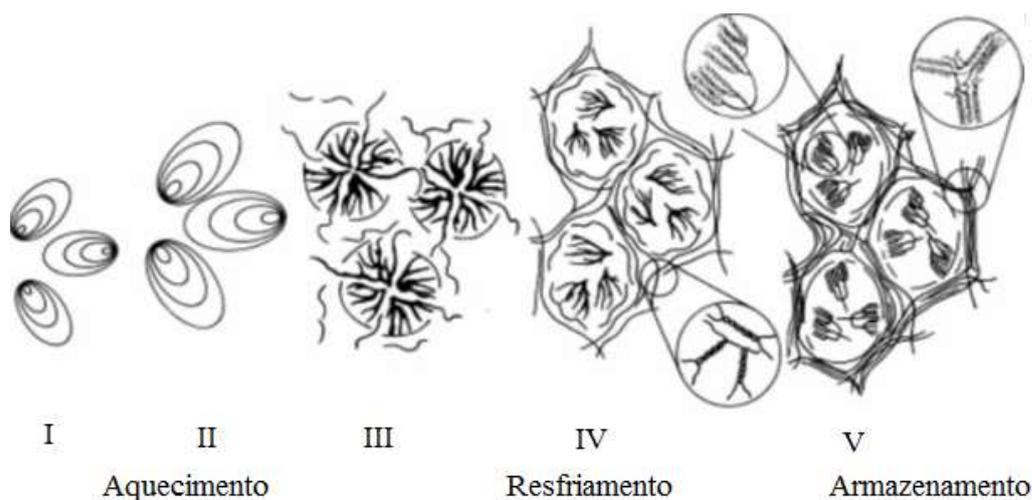


Figura 5. Efeito do processo de aquecimento, resfriamento e armazenamento do amido. Fonte: Adaptado de (WANG et al., 2015).

A retrogradação do amido é normalmente acompanhada por uma série de mudanças físicas, tais como aumento na viscosidade e turbidez de pastas, formação de gel, a exsudação de água e aumento de grau de cristalinidade, com a aparência de polimorfos cristalinos de tipo B (HOOVER et al., 2010).

Retrogradação é um processo contínuo, que envolve inicialmente recristalização rápida de moléculas de amilose seguido por uma recristalização lenta de moléculas de amilopectina. A retrogradação da amilose determina a dureza inicial de um gel de amido, viscosidade e digestibilidade dos alimentos processados (WANG et al., 2015). O desenvolvimento em longo prazo de estrutura de gel e a cristalinidade do amido processado são os responsáveis pelo endurecimento de pães e bolos (FADDA, et al., 2014) e por isso são continuamente investigados.

Várias técnicas têm sido empregadas para avaliar o comportamento dos grânulos frente à gelatinização e retrogradação. Dentre elas estão a difração de raios X, dispersão de nêutrons de pequeno ângulo, microscopia com luz polarizada e calorimetria diferencial de varredura. Além disso, alguns equipamentos também avaliam a viscosidade de pastas de amido, como o viscoamilógrafo Brabender, o visco analisador rápido (RVA - Rapid Visco-Analyser) e os viscosímetros de rotação, os quais mostram o comportamento do amido na gelatinização e retrogradação (ELIASSON, 2004).

2.3. Amidos modificados

As modificações no amido nativo são feitas para obter produtos amiláceos com propriedades necessárias para usos específicos (CEREDA, 2001). Os amidos são modificados com a finalidade de alterar as características de gelatinização, diminuir a retrogradação, reduzir a tendência de gelificação das pastas, aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e ao congelamento, aumentar a transparência de pastas e géis, melhorar a textura dos géis e melhorar a adesão entre superfícies diferentes, ou ainda melhorar as características de digestibilidade (BeMILLER, 1997).

Há uma série de modificações que podem ser feitas para mudar as características dos amidos, estas podem ser fisiológicas, enzimáticas, químicas e físicas. Dentre elas, a modificação física é simples, barata e segura, pois não requer produtos químicos ou agentes biológicos. As modificações físicas as mais populares são a pré-gelatinização, annealing e o tratamento térmico de baixa umidade. Recentemente novos métodos de modificações físicas de amidos de diferentes fontes botânicas têm sido investigados, como o sobreaquecimento (STEENEKEN et al., 2009); sinérese iterada (LEWANDOWICZ e SORAL SMIETANA, 2004); tratamento térmico inibido (aquecimento seco) (LIM et al., 2002); tratamento de pressão osmótica (PKKAHUTA, SHOBSNGGOBI e VARAVIMIT, 2007); múltiplo congelamento e descongelamento (SZYMONSKA et al., 2003); ativação mecânica com agitação em moinho de bola (HUANG et al., 2007); tratamento com campos elétricos pulsados (PEF) (HAN et al., 2009); descargas elétricas (NEMTANU e MINEA, 2006); irradiação γ (ZHU, 2016); ultrassom. (SUJKA e JAMROZ, 2013); radiação UV (EL-SHEIKH, RAMADAN e EL-SHAFIE, 2010); pré-gelatinização usando secagem em tambor (MAJZOOBI, et al., 2011); modificação por micro-ondas (SZEPEŠ et al., 2005) e modificação por alta pressão hidrostática (APH) (KAWAI, FUKAMI e YAMAMOTO, 2007a, 2007b; LI et al., 2011; NASEHI e JAVAHERI, 2012; TIAN et al., 2014).

2.3.1. Modificação do amido por alta pressão hidrostática

Entre os vários métodos físicos de modificação, a alta pressão hidrostática (APH) é uma tecnologia de processamento que não envolve tratamento térmico. O

mecanismo de modificação por APH basicamente consiste na hidratação reversível da fase amorfa seguida por distorção irreversível da região cristalina dos grânulos de amido, as ramificações da amilopectina são desestruturadas e conseqüentemente a estrutura granular do amido é rompida.

A forma das cadeias dos polímeros de amido embaladas na estrutura do grânulo são consideradas decisivas para o comportamento do amido sob APH (PEI-LING, XIAO-SONG e QUN, 2010).

Buckow et al. (2007) sugerem que sob pressão a desintegração da macromolécula é incompleta, uma vez que a estabilização da pressão de ligações de hidrogênio favorece a conformação da hélice. Sugerem ainda um esquema (Figura 6) de como ocorre o processo de gelatinização dos grânulos quando submetidos a alta pressão em comparação ao processo de gelatinização pelo calor.

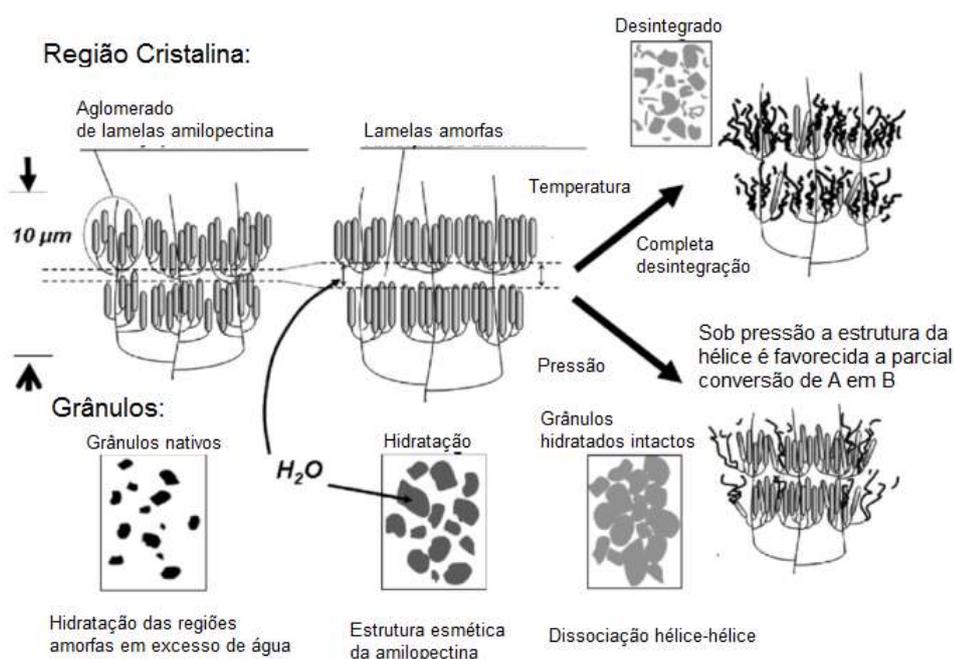


Figura 6. Esquema de gelatinização do amido com calor e água e por alta pressão. (Fonte: Adaptado de BUCKOW, HEINZ e KNORR, 2007).

Na modificação por APH algumas variáveis são muito importantes, como a fonte de amido, a concentração da suspensão, a pressão, o tempo e a temperatura do tratamento (BeMILLER e HUBER, 2015). Sendo assim, quando monitorados estes fatores, após a modificação por APH, a maioria dos grânulos de amido pode apresentar estrutura granular intacta (KATOPO et al., 2002a). A parte externa do grânulo de amido difere significativamente da parte interior quanto à uniformidade e

é susceptível por ser composto principalmente de amilopectina, tendo também uma ampla gama de fragmentos de alta massa molecular. A parte interna do grânulo é mais susceptível devido a amilopectina ser sintetizada mais rapidamente do que a amilose durante as fases iniciais de crescimento do grânulo devido a alta atividade de SSS (Sintase de amido solúvel) e SBE (enzimas de ramificação de amido) que diminuem durante os estágios posteriores (SINGH, KAUR e McCARTHY, 2009). Quando submetido a APH a parte exterior dos grânulos apresenta uma camada compacta e na parte interna do grânulo, algumas estruturas fibrilares são claramente visíveis como pode ser observado na Figura 7. Neste estudo os autores investigaram o efeito da APH sobre a morfologia de grânulos de amido de batata tratado por 600 Mpa a 3 min. Estas alterações na estrutura do grânulo estão relacionadas com a interação das partes amorfas e cristalinas (BŁASZCZAK, et al., 2005)

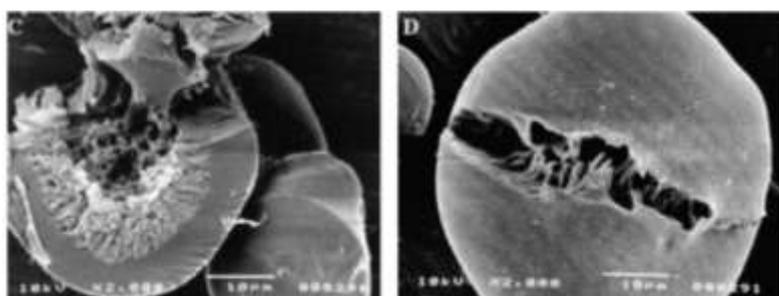


Figura 7. Morfologia de amido de batata modificado a 600 MPa por 3 min. Fonte: (BŁASZCZAK et al., 2005)

De maneira geral os amidos tipo A são mais sensíveis à APH do que os amidos tipo B e os amidos tipo C são intermediários aos amidos A e B. Esta sensibilidade pode ser explicada pelo empacotamento das duplas hélices dentro da estrutura polimórfica (cristalino) do amido tipo A ser relativamente compacta e com baixo teor de água, enquanto que a estrutura polimórfica de tipo B tem uma estrutura mais aberta que contém um núcleo helicoidal hidratada. As estruturas polimórficas de cristalinidade de amido dos tipos A e B são apresentadas esquematicamente na Figura 8.

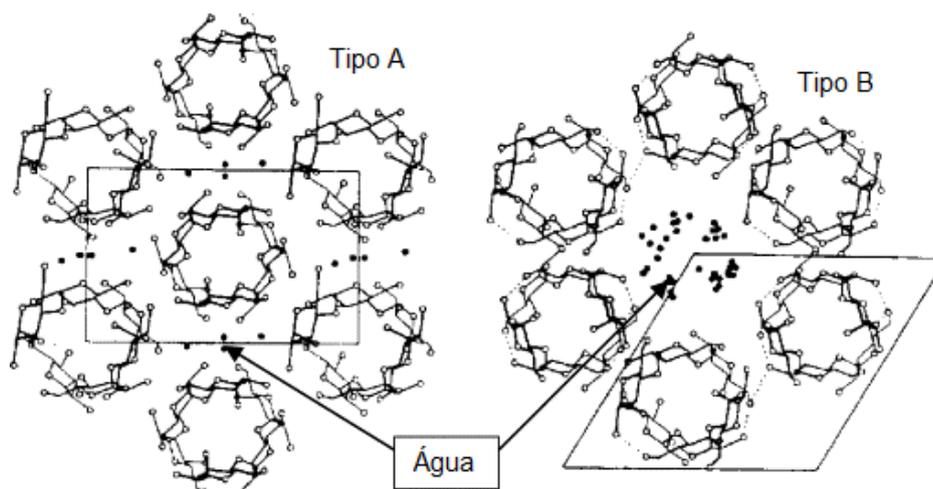


Figura 8. Estrutura polimórfica de cristalinidade de amido do tipo A e B. Adaptado de Tester et al., (2004)

O efeito da APH sobre o mecanismo de gelatinização é diferente quando comparado ao tratamento com calor e água (RUBENS e HEREMANS, 2000). Além disso, é altamente dependente da composição e fonte de amido, e o tipo de padrão de cristalinidade (PEI-LING et al., 2010). Já a retrogradação é observada imediatamente após o tratamento com APH (RUBENS e HEREMANS, 2000; KATOPO, 2002b). Jouppila et al., (1998) reportaram que a fonte botânica do amido, o teor de água, o armazenamento e a temperatura são fatores importantes na retrogradação do amido termicamente tratado, entretanto, não é relatado se o amido modificado por APH apresenta o mesmo comportamento.

2.4. Digestibilidade do amido

A importância nutricional dos carboidratos atualmente se estende muito além de seu papel como uma importante fonte de alimento para seres humanos. Graças à agricultura moderna, o transporte, a tecnologia e a economia voltada ao mercado em que o apetite é impulsionado muito além das necessidades nutricionais e sobrevivência, o consumo de energia acaba superando em muito as necessidades de energia. Como resultado, o mundo "desenvolvido" enfrenta uma crise de obesidade (MISHRA, HARDACRE e MONRO, 2012).

A digestibilidade de carboidratos tem recebido muita atenção devido a sua contribuição para obesidade, que também origina a síndrome metabólica a qual é

caracterizada pela intolerância à glicose - uma diminuição da capacidade de controlar as concentrações de glicose no sangue após uma refeição de carboidratos (MISHRA, HARDACRE e MONRO, 2012).

A taxa de digestão do amido é importante, uma vez que o grau em que a elevada concentração de glicose no sangue e a eliminação desta determinam a intensidade do aumento da concentração de glicose. Consequentemente a intensidade da resposta de insulina necessária para remover a sobrecarga de glicose e restaurar sangue às concentrações normais de glicose. A taxa de digestão também determina quão constante será o suprimento de glicose através da continuada digestão no intestino e, por conseguinte, quão prolongada será sua contribuição para retardar a vontade de comer novamente (SINGH, DARTOIS e KAUR, 2010).

2.4.1 Digestibilidade *in vitro*

A digestão *in vitro* objetiva simular o processo digestivo de seres humanos (Figura 9). Entretanto, a digestão em humanos é muito complexa, por isso perfeitas simulações ainda não são possíveis (SINGH, BERG, HARDACRE e BOLAND, 2014). As enzimas presentes no corpo humano são difíceis de extrair e/ou apresentam alto custo, por isso outras enzimas de mamíferos, como por exemplo, a pepsina e pancreatina obtida a partir de suínos ou de micro-organismos são normalmente utilizados em sistemas *in vitro* (DARTOIS et al., 2010; KAUR et al., 2010a).

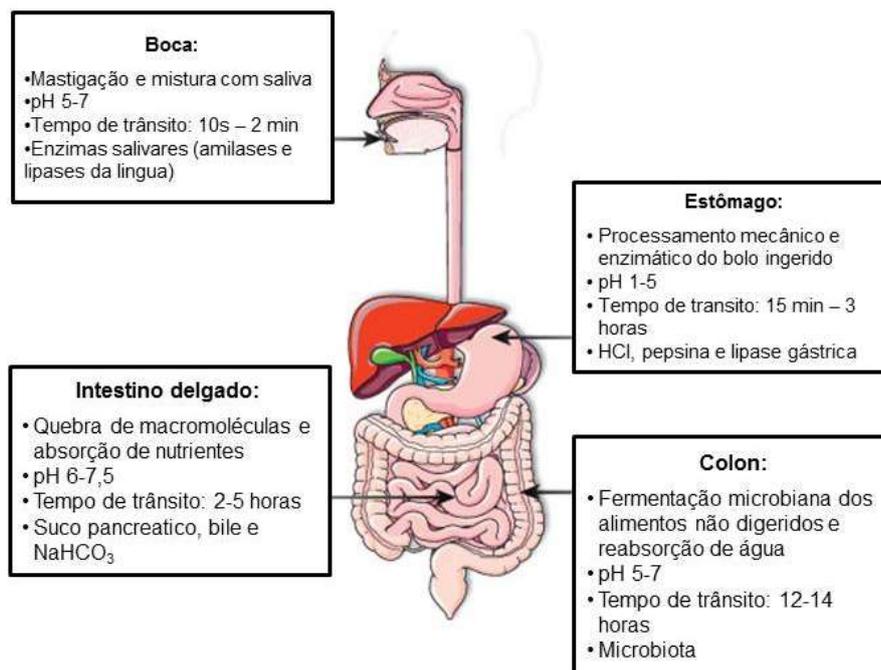


Figura 9. Processo digestivo de seres humanos. Adaptado de Guerra et al., (2012)

O sistema *in vitro* geralmente usado para estudar a digestão do amido baseia-se nas condições do estômago e do intestino delgado usando fluido gástrico e intestinal simulado (BERG et al., 2012). O fluido gástrico simulado (FGS), é composto por pepsina dissolvida em tampão pH 1,2. O ensaio *in vitro* continua com condições simulando o intestino delgado.

O fluido intestinal simulado (FIS) é composto de pancreatina dissolvida em tampão de fosfato de potássio (DARTOIS et al., 2010). A pancreatina utilizada é um extrato de pâncreas suíno, composto por diferentes enzimas, que podem ser classificados como proteolítica, lipolítica, amilolítica e enzimas da divisão de ácidos nucleicos. A α -amilase (EC 3.2.1.1), a principal enzima amilolítica na pancreatina, é uma endo hidrolase específica para ligações glicosídicas α -1,4 (SIM et al., 2008). Além disso, para simular as enzimas da borda em escova no intestino delgado humano, amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) e invertase (EC 3.2.1.26) são adicionadas. A amiloglicosidase é uma exo enzima que atua nas ligações α -1,4 e α -1,6 hidrolisando a partir das extremidades não redutoras (SIM et al., 2008).

Na literatura encontramos diversos trabalhos que focam tanto em analisar o comportamento do amido na matriz do alimento quanto o amido de forma isolada e o efeito das modificações químicas e físicas sobre esta propriedade. Tamura et al., (2015) estudaram o efeito do grau de cocção do amido de arroz sobre a

digestibilidade *in vitro* e verificaram que ocorreram diferenças cinéticas entre o arroz cru e o arroz cozido. Também verificaram que as características estruturais dos grãos de arroz, influenciam significativamente a digestibilidade do amido, mais que o grau de cozimento. Berg et al. (2012) estudaram o papel da estrutura celular de cotilédones durante a digestão *in vitro* de amido em feijões (navy beans) e relataram que as paredes celulares dos cotilédones restringem o inchamento e a completa gelatinização dos grânulos durante o cozimento. Os autores relatam que a gelatinização incompleta reduz a taxa e a extensão da hidrólise do amido quando medida a liberação de glicose durante 120 min de digestão *in vitro* com fluido gástrico e intestinal simulados.

Chung, Shin e Lim (2008) estudaram a digestibilidade *in vitro* e o índice glicêmico estimado de amidos de milho modificados quimicamente e verificaram que tanto a digestibilidade *in vitro*, quanto o índice glicêmico estimado podem ser alteradas pelas modificações de oxidação, acetilação, hidroxipropilação e ligação cruzada. Segundo estes autores, a hidroxipropilação, a acetilação e a oxidação contribuíram no aumento da quantidade de amido resistente diminuindo o teor de amido rapidamente digerível em amidos gelatinizados. Entre todos os amidos estudados, os autores citam a hidroxipropilação como a modificação mais eficaz para retardar a digestão enzimática, mostrando então, que as modificações químicas não só melhoram as propriedades físicas, mas também controlam a digestibilidade do amido.

Tian et al. (2014) estudaram o efeito de alta pressão hidrostática em amidos de arroz sobre a formação de amido lentamente digerível e verificaram que o amido ceroso de arroz tem digestibilidade mais lenta do que quando o grânulo é submetido ao calor. Reportaram ainda que o percentual de amido lentamente digerível mais elevado foi atribuído principalmente aos grânulos de amido intactos retidos pelo tratamento APH e a maior proporção de cristais imperfeitos para cristalitos perfeitos.

Além disso vários estudos foram feitos analisando o efeito da modificação física e adição de compostos como gomas e polissacarídeos sobre a digestibilidade do amido. Chen et al. (2015) estudaram o efeito do tratamento térmico de baixa umidade na digestão e verificaram que os tratamentos com teores de umidade mais elevados produziram maiores teores de amido resistente. Wang et al., (2014) não verificaram diferenças na digestibilidade *in vitro* de amidos de milho de baixa, média e alta amilose, modificados por annealing em tratamentos de 24 e 72 horas.

Dartois et al., (2010) verificaram o efeito da adição de goma guar em suspensões de amido sobre a digestibilidade e observaram que goma guar na matriz dos alimentos diminui a digestibilidade inicial bem como reduz a extensão da hidrólise do amido. Assim como Dartois et al. (2010), Bordoloi, Singh e Kaur (2012) verificaram o efeito da adição de goma guar em batatas cozidas e relataram que a adição da goma guar à matriz da batata cozida, não só atrasou como diminuiu a extensão da hidrólise do amido durante a digestão *in vitro*. Ambos os autores relatam que as informações das investigações podem ajudar a indústria de alimentos para escolher cultivares de batata adequados e recomendam o uso de goma de guar para o desenvolvimento de produtos alimentares à base de batata e amido com propriedades de digestão lenta.

3. CAPÍTULO 1 – Digestão *in vitro* de amido de batata: Efeito do armazenamento refrigerado e o reaquecimento em micro-ondas

3.1. Introdução

O amido é o carboidrato de reserva mais comum nas plantas e a maior fonte de carboidratos para alimentação humana. O principal componente de tubérculos de batata é o amido, o que na batata corresponde de 12 a 20% do seu peso. Com isso, o amido é considerado o fator mais importante para a funcionalidade deste tuberculo em aplicações alimentares (BERTOFT e BLENNOW, 2009).

O aquecimento de suspensões de amido em excesso de água causa uma transição irreversível chamada de gelatinização, que é caracterizada pela perda da birrefringência dos grânulos de amido. A gelatinização pode ser observada por microscópio óptico sob luz polarizada; pelo desaparecimento de cristalinidade, utilizando difratômetro de raio-X; pelo aumento da viscosidade e formação de uma pasta viscosa. O arrefecimento da pasta promove uma reassociação molecular, formando uma estrutura ordenada, e este fenômeno chama-se de retrogradação. A retrogradação do amido tem sido empregada para descrever mudanças no comportamento físico após à gelatinização. A retrogradação do amido, tanto em curto prazo quanto em longo prazo, é um fenômeno inevitável e ocorre rapidamente durante o armazenamento de alimentos ricos em amidos tratados termicamente (TIAN et al., 2009).

Quando armazenados, os géis obtidos por arrefecimento de dispersões aquosas concentradas de amido gelatinizadas sofrem alterações em sua reologia, propriedades de textura, cristalinidade e capacidade de retenção de água. Estas mudanças referidas como retrogradação são as mais influentes sobre a digestibilidade, textura e, conseqüentemente, sobre a aceitabilidade de produtos à base de amido.

A digestibilidade *in vitro* é uma técnica que utiliza a hidrólise enzimática para caracterizar alimentos ricos em amido, em diferentes frações em termos que refletem a velocidade de liberação de glicose e da sua absorção no trato gastrointestinal, tais como amido rapidamente digerível (ARD), amido lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR) (ENGLYST, KINGMAN e CUMMINGS,

1992). O sistema *in vitro*, geralmente usado para estudar a digestão do amido, simula as condições do estômago usando suco gástrico e intestinal (BORDOLOI, KAUR e SINGH, 2012; DARTOIS et al., 2010; SINGH et al., 2014). A taxa de digestão do amido é diferente em diferentes tipos de alimentos ou alimentos com processamento diferentes. As dietas que contêm quantidades elevadas de amido rapidamente digerível aumentam a glicose no sangue mais rápido do que aqueles que contêm amido resistente e amido lentamente digerível (LEHMANN e ROBIN, 2007).

A digestibilidade enzimática de diferentes amidos é influenciada pela fonte, pelo tamanho dos grânulos, pela cristalinidade, e pela proporção amilose: amilopectina (SINGH, DARTOIS e KAUR, 2010). Vários estudos têm sido realizados para avaliar os diferentes fatores que podem influenciar no processo de digestibilidade *in vitro* do amido. Bordoloi, Singh e Kaur, (2012) avaliaram a influência da adição de goma guar em batatas cozidas. Bordoloi et al., (2012) e Dartois et al., (2010) também investigaram a influência da adição de goma guar em suspensões de amido de milho ceroso. Outros estudos, como o papel da estrutura celular de cotilédones de amido de feijão branco (BERG et al., 2012); grau de cozimento do amido de arroz (TAMURA et al., 2015) e o efeito de modificação química em amidos de milho (CHUNG, SHIN e LIM, 2008) sobre as propriedades de digestibilidade *in vitro* simulando a digestão gástrica e intestinal também foram estudados.

O objetivo deste estudo foi avaliar géis de amido de batata armazenados por 2 e 7 dias e submetidos ao reaquecimento em micro-ondas por uma ou duas vezes, visando entender o comportamento deste amido em alimentos pré-prontos armazenados sob refrigeração, bem como o processo de reaquecimento em micro-ondas. Os géis foram avaliados por digestibilidade *in vitro*, cristalinidade relativa, propriedades térmicas e reológicas, teor de amilose, morfologia, sinerese, e transmitância.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material

Foi utilizado amido de batata comercial, Para a digestibilidade *in vitro* foram utilizadas pepsina (porcine gastric mucosa, 800–2,500 U/mg proteína), pancreatina (hog pancreas, 4x USP) e invertase (Invertase, Grade VII from bakers yeast, 401 U/mg solid) que foram adquiridas da Sigma-Aldrich Ltd. (St Louis, USA). Foi utilizada também a enzima amiloglicosidase (3,260 U/mL) foi adquirida da Megazyme International Ireland Ltd. (Ireland). Todos os demais reagentes químicos utilizados eram de grau analítico.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Preparação da amostra

O amido de batata foi dissolvido em água (3% p/v) e aquecido a 90 °C durante 20 minutos para obtenção dos géis. Os géis foram armazenados durante 2 e 7 dias a 4 °C. Após 2 dias de armazenamento, o gel foi submetido a reaquecimento em micro-ondas (Panasonic, 1100 watts) durante 90 seg. até atingir a temperatura de aproximadamente 90 °C. Um gel foi analisado imediatamente após o aquecimento e a outra fracção foi armazenada novamente por 24h. Após as 24 h, o gel foi submetido ao mesmo processo de aquecimento de 90 seg. em forno de micro-ondas. Os géis foram liofilizados para a realização do teor de amilose, índice de cristalinidade relativa e da morfologia. A análise da digestibilidade *in vitro* foi feita do gel imediatamente após o cozimento e os processos de reaquecimento, não sendo submetidos ao processo de liofilização.

3.2.2.2. Determinação de amilose

O teor de amilose do amido nativo e dos géis foram determinado por método colorimétrico com iodo, conforme método de McGrane; Cornell e Rix (1998). Aproximadamente 20 mg de amido desengordurado ou gel de amido (b.s) juntamente com 8 mL de DMSO à 90% (dimetilsulfóxido) foram agitados durante 20

min e posteriormente acondicionado em banho de 85 °C por 15 min. Após arrefecimento, o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 25 mL e homogeneizado e o volume completado com água destilada. Uma alíquota de 1 mL da solução foi adicionada de 5 mL de solução de I₂/KI (0,0025 mol. L⁻¹ de I₂ e 0,0065 mol. L⁻¹ de KI) e o volume completado para 50 mL. A solução resultante foi homogeneizada e mantida em repouso por 15 min previamente a leitura da absorbância em 600 nm. Para a realização da curva de calibração foram utilizados 20 mg de amilose de batata pura submetida ao mesmo processo descrito para o amido, sendo retiradas alíquotas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mL para determinação da absorbância.

3.2.2.3. Sinérese

As suspensões de amido com 2% (p/v) foram aquecidos a 90 °C durante 30 min em banho-maria com temperatura controlada e agitação constante (75 rpm), seguido de arrefecimento rápido num banho de água com gelo até à temperatura ambiente. As amostras foram armazenadas durante 2 e 7 dias a 4 °C. A sinérese foi medida como porcentagem de água liberada após centrifugação a 3000 x g durante 15 min.

3.2.2.4. Opacidade

A opacidade dos géis de amido foi medida conforme método proposto por Craig et al. (1989). Suspensões de amido com 1% (p/v) foram aquecidas em banho-maria a 90°C por 1 h com agitação constante. A suspensão foi arrefecida durante 1 h a 30 °C. As amostras foram armazenadas durante 2 e 7 dias a 4 °C e a transmitância foi determinada medindo a absorbância a 640 nm, utilizando espectrofotômetro Genesys 10-UV (Thermo Electron Corporation, Madison, WI). Água foi utilizada como branco.

3.2.2.5. Índice de Cristalinidade Relativa (Raio-X)

Os padrões de difração de raio-X foram obtidos com um difractômetro de raio-X GBC® eMMA X-ray Diffractometer (GBC, VIC, Australia). A região de varredura da

difração variou de 5 a 40°, com uma tensão de 35 kV, uma corrente de 28.2 mA e uma velocidade de varredura de 1° por minuto. O índice de cristalinidade relativa (IC) dos grânulos de amido foi quantitativamente estimado de acordo com método proposto por Rabek (1980). O IC é definido como a razão entre a área da região cristalina (Ac) e a área total coberta pela curva (Ac + Aa), composta pela área da região cristalina (Ac) e a área da região amorfa (Aa), a partir da equação:

$$IC (\%) = \frac{Ac \times 100}{Ac + Aa} \quad (1)$$

3.2.2.6. Propriedades térmicas

As características de gelatinização de amostras foram determinadas utilizando calorimetria diferencial de varredura (DSC) (DSC; TA Q100, TA Instruments, Newcastle, DE). Foram pesados aproximadamente 5,0 mg de amido em cadinhos de alumínio e misturados com água destilada na proporção de 1:3 (m/m). Após a mistura os cadinhos foram selados e deixados em repouso à temperatura ambiente por uma hora para equilíbrio. A amostra foi aquecida com taxa de 10 °C.min⁻¹ de 30 a 100 °C. Um cadinho vazio foi usado como referência. Foram identificadas as temperaturas de transição vítrea (To), temperatura de cristalização (Tp), temperatura de fusão (Tc) e entalpia (ΔH) dos amidos.

3.2.2.7. Propriedades reológicas

As propriedades de pasta dos amidos foram analisadas com Rapid Visco-Analyzer (RVA, Newport Scientific, Sydney, Austrália). A amostra foi avaliada usando a Metodologia 7.7 RVATM Potato Starch que utiliza 2,0 g de amido e base de umidade de 14%.

Após RVA, as suspensões de amido de 8% (p/v) de concentração foram colocadas na placa do reômetro (pré-aquecido a 35 °C) e as bordas da amostra coberta com uma fina camada de óleo de silicone de baixa densidade (para minimizar as perdas por evaporação). A medição reológica foi dada pela medição da pequena amplitude de oscilação feita para o gel de amido fresco, e armazenado durante 2 a 7 dias com um reômetro dinâmico (Carri-Med CSL2-100, TA Instruments

Ltd, Surrey, England) equipado com sistema de placas paralelas (4 centímetros de diâmetro). A dimensão do intervalo foi fixada em 1000 mm. A frequência foi fixada em 0,5% e 1 Hz, para todas as determinações. Parâmetros reológicos dinâmicos, como módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G''), módulo complexo (G^*), tangente de perda ($\tan \delta$), viscosidade complexa (η^*), e a viscosidade dinâmica (η) foram determinados para todos os géis em função da frequência.

3.2.2.8. Digestibilidade *in vitro*

A digestão *in vitro* foi simulada de acordo com método proposto por Dartois et al. (2010), utilizando modelo de digestão de duas fases, simulando condições gástricas e do intestino delgado. Foram adicionados 170 g de gel de amido de batata (preparada conforme secção 3.2.2.1) a um reator de vidro encamisado (500 ml de capacidade) e agitou-se mecanicamente a 300 rpm. O reator encamisado foi ligado a um banho de circulação de água para manter a temperatura a 37 ± 1 °C. Os géis de amidos de batata foram digeridos por 30 minutos em fluido gástrico simulado (SGF), contendo pepsina, pH 1,2. Para realizar o segundo passo de digestão, fluido intestinal simulado (SIF) contendo pancreatina, amiloglicosidase e a invertase foram adicionados à mistura de reação para simular a digestão no intestino delgado, durante 90 minutos, mantendo o pH 6,8.

Alíquotas (0,5 mL) foram retiradas nos tempos 0, 15 e 30 min de digestão durante a fase gástrica e a 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 min de digestão durante fase intestinal e misturada com etanol absoluto (3 mL) para paralisar a reação. As amostras foram incubadas com uma solução de amiloglucosidase / invertase como descrito por Dartois et al. (2010) antes de analisar a glicose utilizando o ensaio D-glucose assay (GOPOD-FORMAT, K-GLUC 05/2008, Megazyme International Ireland Ltd., Ireland). Os resultados foram expressos como percentagem de hidrólise do amido utilizando as seguintes equações:

$$\% SH = \frac{Sh}{Si} \quad (2)$$

$$= 0,9 \times \frac{Gp}{Si} \quad (3)$$

Onde: %SH é o percentual de hidrólise do amido (total); Sh é a quantidade de amido hidrolisado (g), Si é a quantidade inicial de amido (g); GP é a quantidade de glicose produzida (g). Um fator de conversão (a partir do amido em glucose) de 0,9 o qual é geralmente calculada a partir do peso molecular do monômero de amido / peso molecular de glicose ($162/180 = 0,9$) foi utilizado (BORDOLOI et al., 2012; DARTOIS et al., 2010; GOÑI et al., 1997).

3.2.2.9. Morfologia dos géis

Uma pequena quantidade dos géis de amido liofilizados foram colocados diretamente sobre a superfície do stub. Subsequentemente, todas as amostras foram revestidas com ouro e examinadas em microscópio eletrônico de varredura sob uma tensão de aceleração de 20 kV e a ampliação de 250 x.

3.2.2.10. Análise estatística

Todas as determinações analíticas das amostras foram realizadas em triplicata, com exceção de raio x e MEV. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, utilizando uma análise da variância (ANOVA).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Teor de amilose, sinerese e opacidade

Os valores de sinerese estão apresentados na Tabela 2. Quando armazenado durante 2 dias não foi verificada diferenças significativas na sinérese em relação ao gel fresco. No entanto houve um aumento na sinerese do gel armazenados durante 7 dias, indicando assim que o armazenamento prolongado traz influência negativa neste parâmetro. As diferenças observadas nas características de sinerese podem estar relacionadas com as diferenças na qualidade dos cristais de amilopectina recristalizados (FRESCHI et al., 2014). Estes autores reportaram que uma alta sinerese é observada durante o congelamento e armazenamento de gel de amido de batata. A sinerese evidencia a reorganização da amilopectina que ocorre no interior

do sistema após a sua reorganização significativa durante o período de aquecimento da formação de gel. De fato, grânulos de amido de batata incluem cadeias longas de amilopectina, com estrutura relativamente compacta e elevado teor de água; resultando assim em elevada mobilidade molecular durante a gelatinização do amido de batata e uma chance para rearranjos nos cristais da cadeia de amilopectina após o armazenamento em condições de congelamento.

Tabela 2. Sinerese e opacidade de géis de amido de batata fresco e armazenados por 2 e 7 dias.

Avaliação*	Gel fresco	Gel armazenado 2 dias	Gel armazenado 7 dias
Sinerese (%)	45,7 ± 0,4 ^B	46,1 ± 0,4 ^B	50,8 ± 0,1 ^A
Opacidade (nm)	71,0 ± 0,7 ^A	64,4 ± 0,2 ^B	35,4 ± 0,3 ^C

* Valores com mesma letra na mesma linha não diferem significativamente em $P \leq 0.05$.

Durante o arrefecimento, as cadeias de amido na pasta gelatinizada beneficiam a formação de uma estrutura mais ordenada o que provoca efeitos de turbidez e reduz a transmitância de luz na pasta de amido (PERERA e HOOVER, 1999). A opacidade dos géis armazenados durante 2 e 7 dias está apresentada na Tabela 2. Os valores de opacidade do gel de amido de batata diminuiu progressivamente durante o armazenamento, de 71,03 nm no gel fresco para 35,40 nm no gel armazenado durante 7 dias.

De acordo com Kaur, Singh e Sodhi (2002) o desenvolvimento da turbidez de géis de amidos armazenados podem ser devido ao inchaço dos grânulos, grânulos remanescentes, lixiviação ou comprimento de cadeia da amilose e amilopectina. Estes baixos valores podem ser devidos à presença de alguns grânulos remanescentes na pasta de amido.

O teor de amilose no amido de batata nativo foi de 32,94% (Tabela 3). O teor de amilose do amido de batata varia entre 23% a 34% para os genótipos normais de batata (SINGH et al., 2009). Entretanto, em genótipos de batata cerosa, essencialmente sem amilose têm sido reportado na literatura (HERMANSSON e SVEGMARK, 1996). O teor de amilose de géis de amido foram estatisticamente ($p \leq 0,05$) superiores ao amido nativo (Tabela 3).

3.3.2. Propriedades térmicas

Os resultados de DSC do amido de batata e dos géis de amido de batata frescos e armazenados durante 2 e 7 dias e reaquecido por 1 e 2 vezes estão apresentados na Tabela 3. Os valores T_o , T_p , T_c do amido de batata nativo foram 62,0; 66,3 e 75,7 °C, respectivamente, devido ao pico endotérmico de gelatinização. O gel fresco não apresentou picos endotérmicos. Após 2 e 7 dias de armazenamento dos géis, verificou-se a presença de um pico endotérmico, responsável pela recristalização das moléculas de amido devido à retrogradação. Houve um aumento no ΔT passando de 13,7 °C no amido nativo para 21,6 °C no gel armazenado por 2 dias e 22,9 °C no gel armazenado por 7 dias. Este aumento no ΔT significa maior heterogeneidade na região cristalina.

O amido nativo apresentou ΔH de 16,4 J.g⁻¹ entretanto os géis apresentaram valores muito baixos pelo fato do amido já estar gelatinizado. O ΔH reflete principalmente na perda da ordem das duplas hélices, e a perda da cristalinidade do grânulo. Este baixo valor de ΔH sugere uma menor percentagem de estruturas organizadas, e diminuição da estabilidade das áreas cristalinas.

Várias pesquisas têm reportado que as variações de T_o , T_p , T_c e ΔH estão fortemente relacionadas a cristalinidade, estrutura e composição de amidos. A temperatura e tempo de armazenamento são os principais determinantes da extensão da retrogradação do amido. Em geral, a retrogradação é rápida inicialmente e, em seguida, desacelera. A temperatura de início e variação de entalpia para a fusão das moléculas de amido retrogradado aumenta com o tempo de armazenamento a uma temperatura constante, enquanto que a temperatura final exibe pouca mudança.

Tabela 3. Amilose, propriedades térmicas e cristalinidade relativa de géis de amido de batata armazenados por 2 e 7 dias e reaquecidos por 1 e 2 vezes

Amido de batata	Amilose (%)	To (°C)	Tp (°C)	Tf (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)	CR (%)
Nativo	32,9±2,0 ^e	62,0±0,3 ^a	66,3±0,3 ^a	75,7±1,3 ^a	13,7±1,2 ^b	16,4±1,2 ^a	19,1
Gel fresco	65,3±0,1 ^c	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2 dias armazenado	68,6±0,1 ^a	54,9±0,3 ^b	64,8±0,6 ^b	76,5±1,2 ^a	21,6±1,3 ^a	1,7±1,3 ^b	nd
7 dias armazenado	68,5±0,4 ^{ab}	52,5±0,4 ^c	64,5±0,3 ^b	75,4±1,8 ^a	22,9±2,0 ^a	1,5±2,0 ^b	nd
Gel reaquecido 1 vez	66,1±0,9 ^{bc}	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Gel reaquecido 2 vez	62,6±0,3 ^d	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* Valores com a mesma letra na mesma coluna não diferiram significativamente ($P \leq 0.05$); nd= não determinado; To= temperatura de transição vítrea Tp= temperatura de cristalização, Tc=temperatura de fusão, ΔH = variação de entalpia; CR= cristalinidade relativa

3.3.3. Difração de raios-X

A técnica de difração de raios-X é amplamente utilizada para identificação das fases de um material cristalino e para fornecer informações sobre a estrutura cristalina. Os resultados de difração de raios-X e cristalinidade relativa são mostrados na Figura 10 e na Tabela 2. O amido nativo mostrou cristalinidade relativa de 19,1%, e padrão de difração típico de tubérculos (Tipo B).

A análise de difração de raio-X detecta estruturas ordenadas de longo alcance, envolvendo arranjo regular e repetido de duplas hélices, refletindo assim na ordem tridimensional de cristalinidade do amido.

Durante a gelatinização, a estrutura cristalina do amido granular foi interrompida (Figura 10), sendo verificado por uma região amorfa nos padrões de raio-X das amostras de amido totalmente gelatinizados. Os difratogramas de raio-X mostraram que os géis reaquecidos por 1 e 2 vezes apresentaram estruturas completamente amorfas (Figura 10). No entanto, o gel armazenado por 7 dias, embora sem picos definidos, mostrou um abaulamento na região de difração 2θ de 15° a 30° . O desenvolvimento de polimorfismo cristalino também é influenciado pela temperatura de retrogradação. O armazenamento a baixa temperatura resulta na formação de polimorfos do tipo B, enquanto a elevada temperatura conduz à formação de polimorfismo tipo A e do tipo V (SHAMAI et al., 2004).

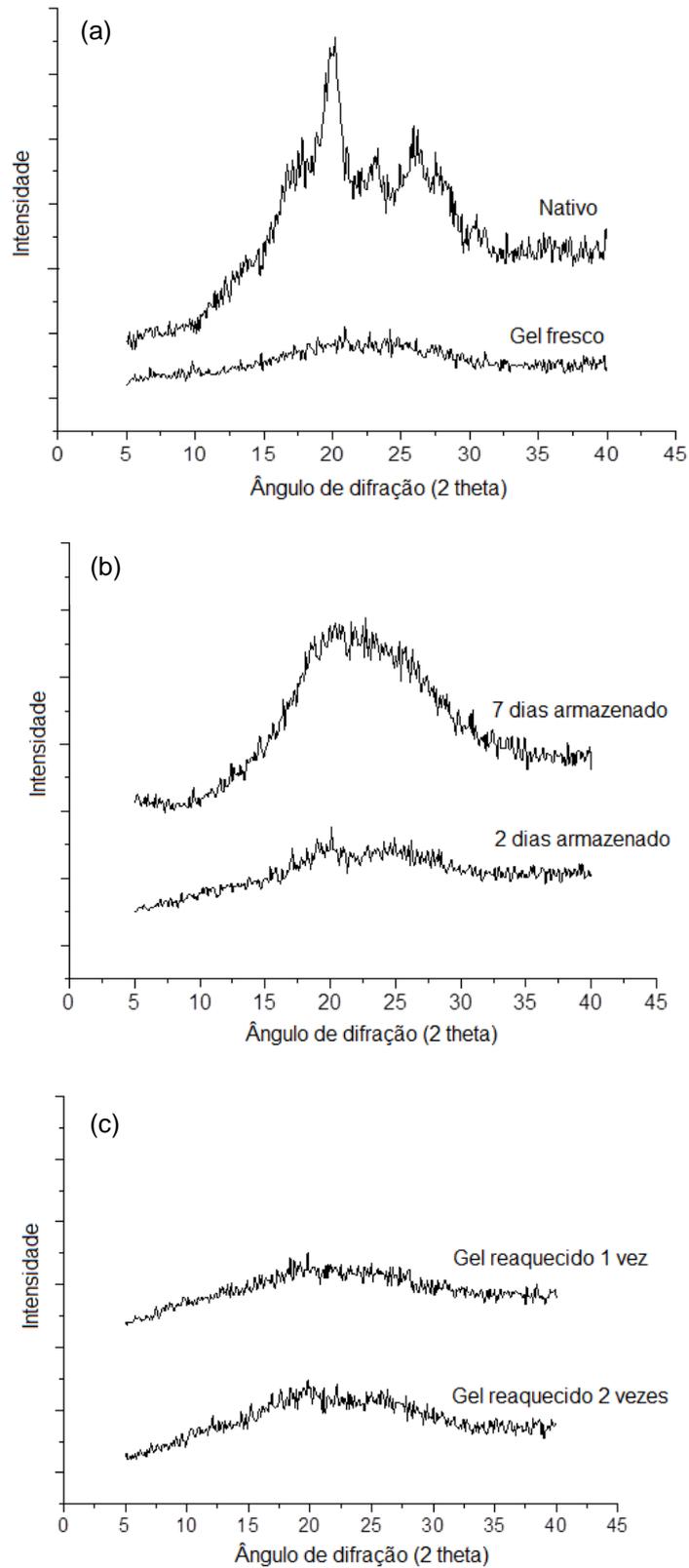


Figura 10. Padrões de difração de raios-X de (a) amido nativo e gel fresco (b) armazenados durante 2 e 7 dias e (c) géis reaquecidos por 1 e 2 vezes.

De acordo com Wang et al., (2015), Fu et al., (2013), Hoover et al., (2010), a medida em que os cristaltos desenvolvidos bem como o tipo de polimorfismo formado pela retrogradação são influenciados por muitos fatores tais como a temperatura de armazenagem, o teor de água das amostras de amido gelatinizadas, grau de gelatinização, e o comprimento das cadeias de amilopectina.

3.3.4. Propriedades reológicas

A curva obtida por RVA para o amido da batata nativo está apresentada na Figura 11. As propriedades de pasta de amido de batata podem variar dependendo do teor de amilose, cultivar, clima, o cultivo entre outros (SINGH, et al., 2013).

A forma do pico obtido na análise de RVA é um reflexo dos processos que ocorrem durante o ciclo de pasta. A altura do pico na concentração dada reflete a habilidade dos grânulos para inchar livremente antes do seu colapso físico. Os amidos de batata são capazes de inchar a um grau mais elevado do que os amidos de cereais e também são menos resistentes à degradação no cozimento e, por conseguinte, sua viscosidade diminui consideravelmente depois de atingir o valor máximo (SINGH, KAUR e MCCARTHY, 2009).

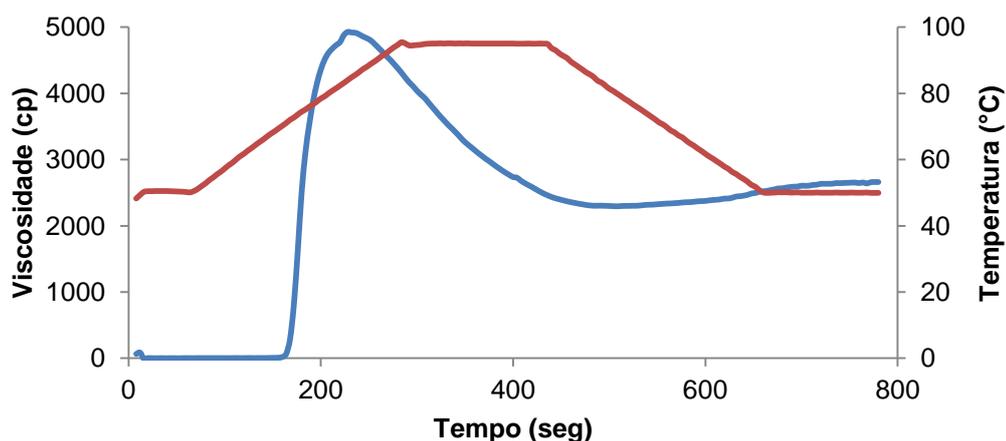


Figura 11. Curva de RVA do amido de batata nativo.

O desenvolvimento de propriedades visco-elásticas do amido durante a retrogradação pode ser monitorada utilizando técnicas reológicas ou mecânicas para medir deformações grandes ou pequenas (Wang et al. 2015). As propriedades reológicas dinâmicas estão apresentadas como uma função da frequência nas

Figuras 12 e 13 e Tabela 4. O valor do módulo de armazenamento (G') foi significativamente mais elevado no amido retrogradado durante 2 a 7 dias quando comparado ao gel fresco, no entanto o tempo de retrogradação não influenciou neste parâmetro.

Assim como no G' , o módulo de perda (G'') e complexo (G^*) apresentaram o mesmo comportamento. O complexo (G^*), módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') decresceram a uma ordem de $G^* > G' > G''$, como comumente observado em géis de amido nativo (KAUR et al., 2007b).

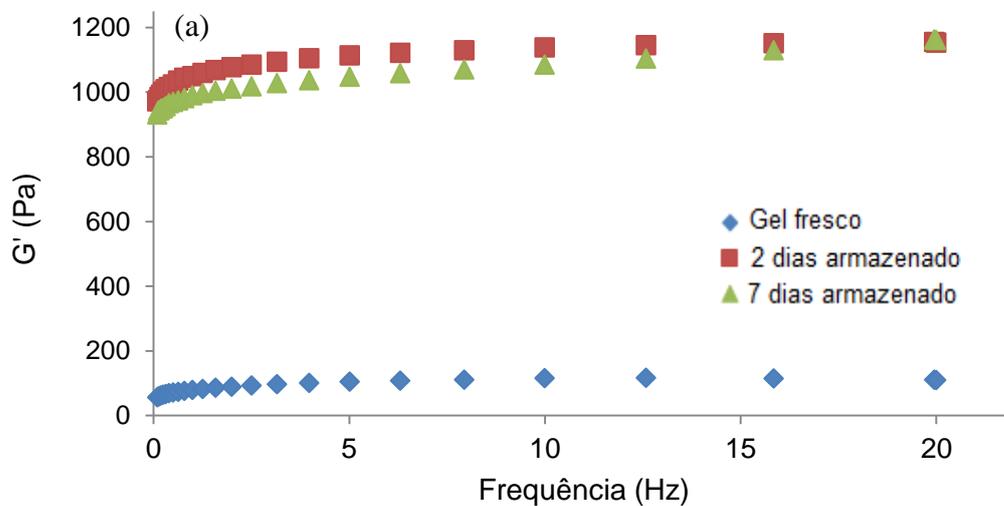


Figura 12. Módulo de armazenamento G' em função da frequência de gel de amido de batata fresco e géis armazenados durante 2 e 7 dias.

Os valores de tangente de perda ($\tan \delta$) apresentaram comportamento contrário ao G' , G'' e G^* , indicando a formação de estruturas de rede mais forte e mais sólida em géis retrogradados. O complexo de viscosidade (η^*) e dinâmica de viscosidade (η') aumentaram significativamente nos géis armazenados por 2 e 7 dias.

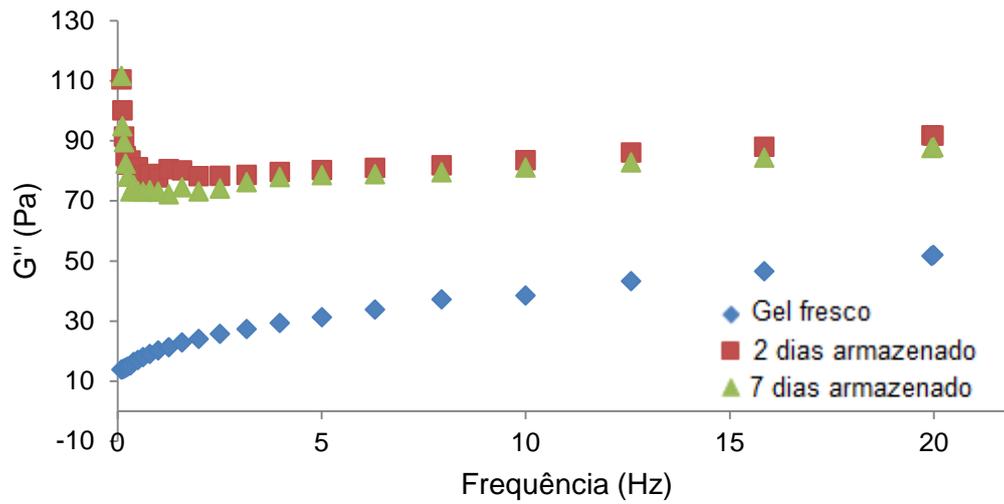


Figura 13. Módulo de perda G'' em função da frequência de gel de amido de batata fresco e géis armazenados durante 2 e 7 dias.

A frequência é dependente função de viscosidade determinada durante oscilação harmônica forçada de tensão de cisalhamento. A frequência está relacionada com o módulo de cisalhamento complexo e representa o ângulo entre a tensão da viscosidade e a tensão de corte. A função viscosidade complexa é igual à diferença entre a viscosidade dinâmica e a viscosidade fora-de-fase.

Tabela 4. Propriedades reológicas de géis de amido de batata fresco e armazenados durante 2 e 7 dias.

Amostra	Propriedades reológicas durante varredura de frequência					
	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tan δ	G* (Pa)	η^* (Pa s)	η' (Pa s)
Gel fresco	115,9±8,3 ^b	54,8±2.6 ^b	0,4±0,0 ^a	125,7±8,3 ^b	81,8±10,4 ^b	21,1±1,6 ^b
2 dias armazenado	1248,0±93,0 ^a	124,4±12.1 ^a	0,1±0,0 ^b	1344,5±186,5 ^a	1469,9±205,5 ^a	192,5±16,7 ^a
7 dias armazenado	1070,7±92,2 ^a	120,8±9.3 ^a	0,1±0,0 ^b	1104,8±105,7 ^a	1761,5±86,0 ^a	192,3±14,8 ^a

* Valores com a mesma letra em na mesma coluna não diferem significativamente ($P \leq 0.05$).

3.3.5. Digestibilidade *in vitro*

O percentual de hidrólise dos géis de amido de batata durante a digestão *in vitro* é apresentado na Figura 14. Na simulação da digestão gástrica (primeiros 30 minutos), não foi verificada liberação de glicose a partir de amido de batata. Foram detectados níveis muito baixos de glicose. No entanto, quando o fluido intestinal simulado (SIF) foi adicionado à mistura o amido foi rapidamente digerido pelas amilases.

Imediatamente após a adição de SIF (I0) pode-se verificar o efeito de retrogradação dos géis sobre a hidrólise, enquanto que o gel de fresco apresentou cerca de 26,3% de hidrólise, nos géis retrogradado esse valor foi significativamente reduzido para 16,7% e 18,4%, respectivamente, enquanto o gel reaquecido no micro-ondas durante 1 vez mostrou valores mais elevados (31,2%).

Nos primeiros 10 min da digestão simulando o intestino delgado (I 10) foram observados valores elevados de digestibilidade, sendo verificado no gel fresco em torno de 83,00% de hidrólise. O armazenamento dos géis por 2 e 7 dias promoveu redução na percentagem de hidrólise de 65,1% e 61,1%, respectivamente. Como neste estudo, Berg et al. (2012) estudaram o efeito do armazenamento de géis de amido de feijão (navy beans) em temperatura ambiente e observaram uma clara redução dos valores finais da hidrólise. Apesar dos valores diminuírem significativamente estes ainda exibiram elevada hidrólise inicial. Kim, Park e Lim, (2008) explicam que a hidrólise ocorre em duas fases devido à α -amilase ter uma maior acessibilidade à região amorfa do que a região cristalina do grânulo. Tendo uma maior acessibilidade à região amorfa, esta seria a primeira a ser hidrolisada, após ocorre a hidrólise na região cristalina. Embora, não exibam cristalinidade os géis estudados, com o processo de retrogradação a estrutura molecular tenta retornar para uma fase mais ordenada, o qual pode ter limitado acesso para enzimas e, como consequência, diminuído a digestibilidade.

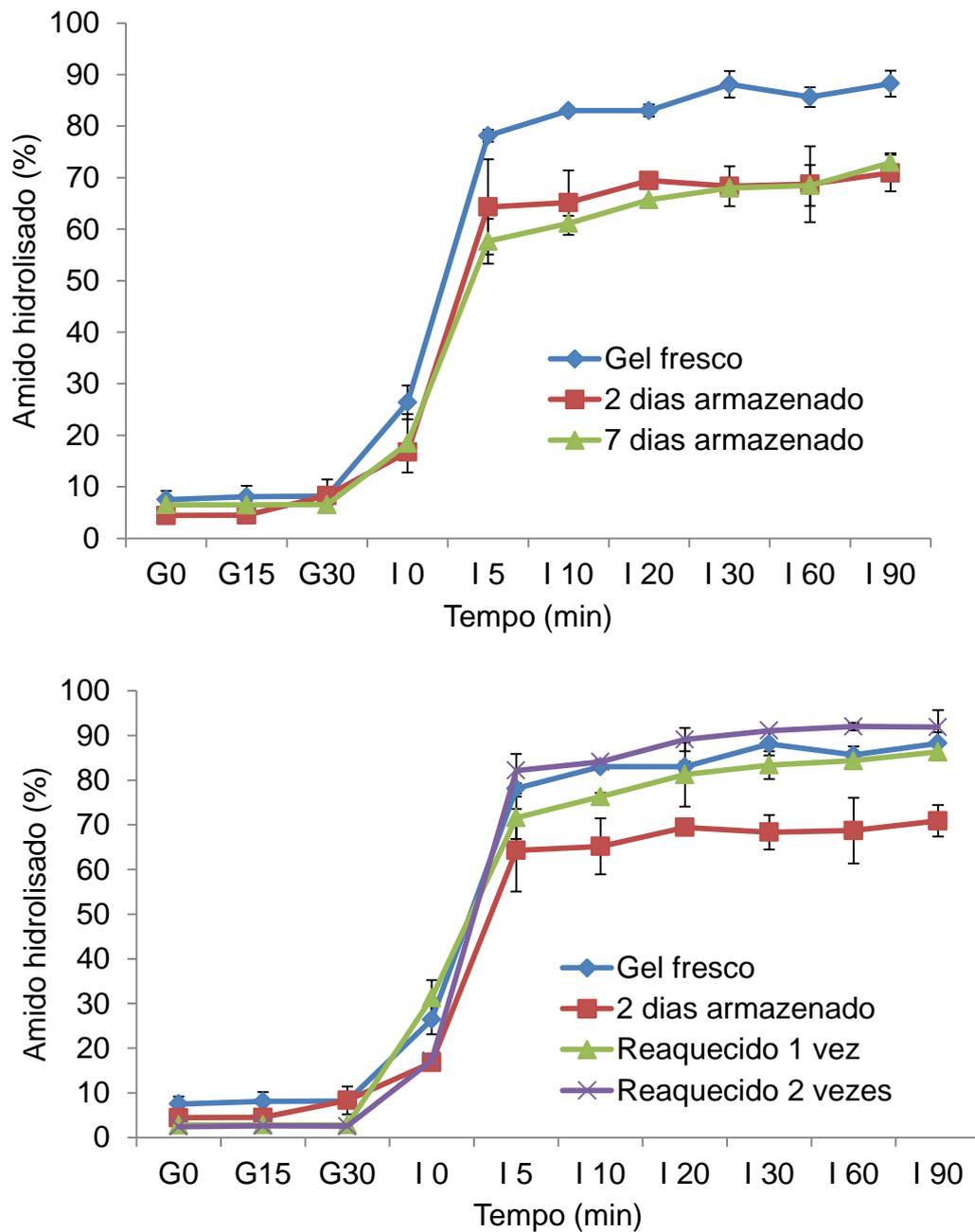


Figura 14. Efeito da retrogradação e reaquecimento sobre a hidrólise de amido (%) durante a digestão gástrica e intestinal simulado.

O reaquecimento tornou o amido mais suscetível à hidrólise enzimática, resultando em valores finais mais elevados do que os obtidos a partir de géis de amido de batata fresco. De acordo com Berget al., (2012) este fato pode ser explicado pela presença de grânulos de amido não completamente gelatinizados, e com o processo de reaquecimento estes grânulos são totalmente gelatinizados. Outra hipótese seria o afrouxamento da estrutura do amido durante o aquecimento

inicial e subsequente período de exploração resultando numa estrutura mais permeável após o segundo aquecimento. A combinação desses fatores pode ter levado ao aumento das taxas de hidrólise. Como resultado final, após 90 minutos de digestão simulada no intestino delgado os géis reaquecidos duas vezes no micro-ondas mostraram valores mais elevados quando comparado com o gel de fresco.

3.3.6. Morfologia dos géis

As micrografias eletrônicas de varredura dos géis fresco, armazenados por 2 dias e reaquecido por 2 vezes estão apresentadas na Figura 15. A morfologia do gel recém-preparado diferiu consideravelmente do gel armazenado e o reaquecido em micro-ondas. O gel fresco mostrou uma rede uniforme de fragmentos de grânulo de amido rompido. O ponto de ruptura do grânulo é consideravelmente mais elevado para o gel de amido de fresco.

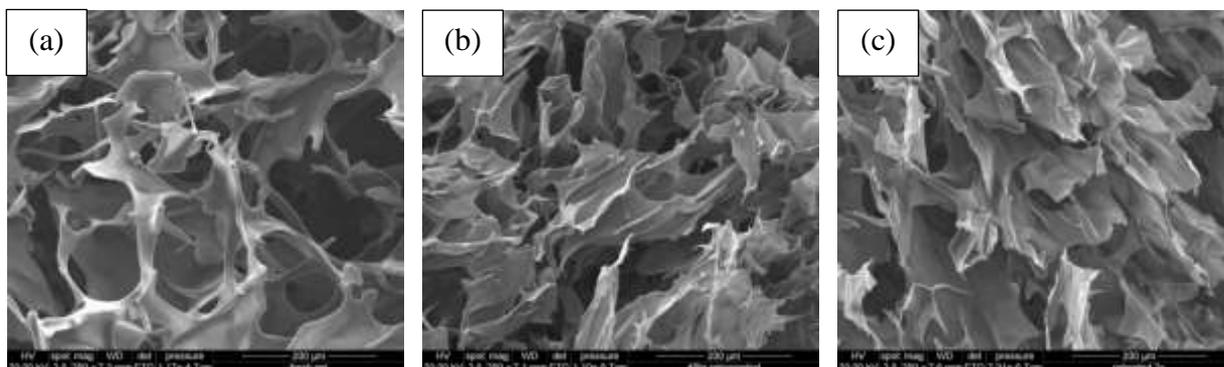


Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura do gel de amido de batata (a) gel fresco, (b) gel armazenado por 2 dias a 4°C e (c) gel armazenado por 2 dias a 4°C e reaquecido em micro-ondas por 2 vezes.

O gel armazenado por 2 dias mostrou extensa agregação, resultando em diferenças na porosidade (Figura 15). Esta agregação é o efeito de retrogradação, neste processo as cadeias de amilose e de amilopectina interrompidos gradualmente tentam reassociar-se em uma estrutura ordenada diferente. No entanto, quando o gel foi aquecido por 2 vezes, o espaço entre a estrutura de gel diminuiu quando comparado ao amido retrogradado, indicando que o processo de

reaquecimento tende a destruir a estrutura de gel. Além disso, verificou-se que a estrutura tornou-se mais frágil.

3.4. Conclusões

Os valores de opacidade dos géis de amido de batata diminuíram progressivamente durante o armazenamento e o teor de amilose foi significativamente maior em comparação com os géis de amido nativo. O amido retrogradado durante 7 dias pode ser visto de uma curva obtida por abaulamento de difração de raios-X, no entanto, não foi verificado picos definidos. A análise por microscopia eletrônica de varredura permitiu observar as diferenças entre a estrutura dos géis durante o armazenamento. A digestibilidade do amido diminuiu significativamente durante o armazenamento devido a retrogradação do gel de amido, no entanto, com o processo de reaquecimento do gel em micro-ondas a digestibilidade foi superior ao gel fresco.

Estes resultados contribuem para a compreensão do fenômeno retrogradação do amido durante o armazenamento refrigerado do amido cozido; os seus efeitos sobre a digestão do amido e cinética da liberação de glicose; e a estabilidade do amido retrogradado durante os ciclos de reaquecimento.

4. CAPÍTULO 2 – Alta pressão hidrostática associada à retrogradação: Efeitos sobre as características de pasta, térmicas, cristalinidade e de digestibilidade *in vitro* em amido de batata

4.1. Introdução

O amido é um dos polímeros naturais mais abundantes na natureza sendo uma forma de reserva energética dos vegetais. O amido tem sido amplamente usado na indústria de alimentos como espessante, agente de volume, agente estabilizador coloidal, além de apresentar outras aplicações industriais (PEI-LING et al., 2010). No entanto, os amidos nativos apresentam algumas limitações, como baixa estabilidade à altas temperatura, ao cisalhamento, ao pH e às condições de refrigeração.

Para isso, existe uma série de modificações que podem ser feitas para modificar as características dos amidos, estas podem ser fisiológicas, enzimáticas, químicas, físicas e combinadas. Dentre elas, a modificação física é largamente utilizada por ser geralmente um processo simples, de baixo custo e seguro, pois não requer produtos químicos ou agentes biológicos.

Entre os vários métodos de modificação físicos de amido, a alta pressão hidrostática (APH) é uma tecnologia de processamento não térmico que vem sendo investigada. Este processo pode ser considerado como uma técnica apropriada para a produção de alimentos minimamente processados, e que apresenta potencial utilização em novos produtos (FARR, 1990).

O mecanismo de gelatinização promovido pela APH é diferente quando comparado ao tratamento com calor e água, portanto acredita-se que o mecanismo de retrogradação também seja, a literatura relata que a retrogradação é observada imediatamente após o tratamento com APH.

Além das propriedades físicas, químicas, térmicas e morfológicas muito estudadas em amidos modificados é importante entender o processo de digestibilidade dos mesmos, pois possibilita a produção de alimentos diferenciados, com índice glicêmico reduzido, alto conteúdo de amido resistente ou com elevada liberação de glicose.

A digestão *in vitro* de amido simula o processo digestivo de seres humanos. É uma técnica que utiliza a hidrólise enzimática para caracterizar alimentos ricos em

amido em frações diferentes em termos que refletem a velocidade de liberação de glicose e da sua absorção no trato gastrointestinal. Este sistema *in vitro* imita as condições do estômago usando um suco gástrico e intestinal simulado.

Os efeitos da APH sobre as propriedades físico-químicas de vários amidos foram estudados nas últimas décadas, entretanto poucos destes estudos avaliaram o efeito desta modificação sobre a digestibilidade *in vitro* do amido, bem como o efeito da retrogradação pós-processo de modificação por APH. Neste sentido este estudo objetivou avaliar o efeito de ciclos de APH associados a retrogradação sobre as propriedades pasta, índice de cristalinidade relativa, propriedades térmicas, morfológicas e digestibilidade *in vitro* do amido de batata.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material

Foi utilizado amido de batata comercial. As enzimas utilizadas foram pepsina (porcine gastric mucosa, 800–2,500 U/mg proteína), pancreatina (hog pancreas, 4x USP) e invertase (Invertase, Grade VII from bakers yeast, 401 U/mg solid) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Ltd. (St Louis, USA). A enzima amiloglicosidase (3,260 U/mL) foi adquirida da Megazyme International Ireland Ltd. (Ireland). Todos os demais produtos químicos utilizados foram de grau analítico.

4.2.2. Métodos

4.2.2.1. Modificação por alta pressão hidrostática

Amostras de 75g de amido foram dispersas em 225 mL de água e submetidas a 400 MPa e 600 MPa em 3 e 6 ciclos de 10 minutos em equipamento multivac HHP002 R&D, High pressure Technologies – Thyssenkrupp a 21°C com tempo de pressurização de 21 segundos. Após o processo de pressurização uma fração da dispersão foi centrifugada a 3000 g por 15 min e resuspenso em água, esta operação foi realizada por 3 vezes. O amido centrifugado foi seco em estufa de circulação de ar por 24 h a 40°C. A outra fração da dispersão tratada foi colocada

em refrigerador a 4°C por 7 dias. Transcorrido esse período de tempo, a amostra foi submetida ao mesmo processo de centrifugação e secagem citados anteriormente.

4.2.2.2. Propriedades pasta

As propriedades de pasta dos amidos foram analisadas com o auxílio do Rapid Visco-Analyzer (RVA, Newport Scientific, Sydney, Austrália). A amostra de 2,5 g de amido foi avaliada usando a Metodologia 7.7 RVATM Potato Starch. As amostras foram aquecidas a 50 °C em 1 min e, posteriormente levada a 95 °C em 3,5 min, sendo mantidas a 95 °C durante 2,5 min. A seguir, as amostras foram resfriadas para 50 °C em 3,8 min e mantidas a 50 °C por 2 min. A velocidade de rotação foi mantida a 960 rpm durante 10 s e então mantida a 160 rpm durante o restante do processo. Foram avaliadas a temperatura de início de formação de pasta, a viscosidade de pico, a viscosidade mínima, a quebra da viscosidade, a viscosidade final e a tendência à retrogradação.

4.2.2.3. Índice de Cristalinidade Relativa (Raio-X)

Os padrões de difração de raio-X foram obtidos com um difractômetro de raios-X GBC® eMMA X-ray Diffractometer (GBC, VIC, Australia). A região de varredura da difração variou de 5 a 40°, com uma tensão de 35 kV, uma corrente de 28.2 mA e uma velocidade de digitalização de 1° por min. A cristalinidade relativa (CR) dos grânulos de amido foi quantitativamente estimado de acordo com método proposto por Rabek (1980). A CR é definido como a razão entre a área da região cristalina (Ac) e a área total coberta pela curva (Ac + Aa), composta pela área da região cristalina (Ac) e a área da região amorfa (Aa), a partir da equação $CR (\%) = (Ac \times 100) / (Ac + Aa)$

4.2.2.4. Propriedades térmicas

As características de gelatinização de amostras foram determinadas utilizando calorimetria diferencial de varredura (DSC) (DSC; TA Q100, TA Instruments, Newcastle, DE). Foram pesados aproximadamente 5,0 mg de amido em cadinhos de alumínio e misturados com água destilada na proporção de 1:3, (m/m). Após a

mistura os cadinhos foram selados e deixados em repouso a temperatura ambiente por uma hora. A amostra foi aquecida a razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 30 a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um cadinho vazio foi usado como referência. Foram identificadas as temperaturas de transição vítrea (T_0), temperatura de cristalização (T_p), temperatura de fusão (T_c) e entalpia (ΔH) dos amidos.

4.2.2.5. Morfologia dos amidos e dos géis

4.2.2.5.1. Microscopia ótica com luz polarizada

A morfologia dos grânulos de amidos foi analisada por microscopia ótica. As imagens foram obtidas em microscópio óptico com luz polarizada Olympus modelo BX50 (Olympus America Inc., New York, EUA), acoplado a uma câmara fotográfica Olympus.

4.2.2.5.2. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de amido foram inicialmente suspensas em acetona para se obter uma suspensão 1% (m/v) e mantidos em banho ultrassônico durante 15 min. Uma pequena quantidade de cada amostra foi espalhado diretamente sobre a superfície do topo do stub e secou-se em estufa a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante uma hora. Os géis de amido liofilizados foram colocados diretamente sobre a superfície do stub. Subsequentemente, todas as amostras foram revestidas com ouro e examinadas em microscópio eletrônico de varredura sob uma tensão de aceleração de 20 kV e a ampliação de 250 x para os amidos e 30 kV e 800 x para os géis.

4.2.2.6. Digestibilidade *in vitro*

A digestão *in vitro* do amido foi simulada de acordo com metodologia proposta por Dartois et al., (2010) utilizando um modelo de digestão de duas fases, simulando condições gástricas e do intestino delgado conforme ilustrado na Figura 16.

Os géis de amido de batata foram preparados a concentração de 3% e cozidos a 90° durante 15 min. Amostras de 170 g de gel foram adicionados a um reator de vidro encamisado (500 mL) e agitadas mecanicamente a 300 rpm. O reator foi

conectado a um banho com circulação de água para manter a temperatura em 37 ± 1 °C. A digestão foi realizada em duas etapas. Na primeira, simulando a digestão estomacal, os géis foram digeridos por 30 min em fluido gástrico simulado (SGF), contendo pepsina e com pH 1,2. Para realizar a segunda etapa de digestão, para simular a digestão no intestino delgado, fluído intestinal simulado (SIF) contendo pancreatina, amiloglicosidase e a invertase foram adicionados à mistura de reação para, durante 90 minutos, mantendo o pH 6,8.

Alíquotas (0,5 mL) foram retiradas nos tempos 0, 15 e 30 min de digestão durante a fase gástrica e a 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 min de digestão durante fase intestinal e misturada com etanol absoluto (3 mL) para paralisar a reação. As amostras retiradas incubadas por 10 min em uma solução de amiloglicosidase / invertase como descrito por Dartois et al., (2010). Após foi quantificada a glicose disponível utilizando o ensaio D-glucose assay (GOPOD-FORMAT, K-GLUC 05/2008, Megazyme International Ireland Ltd., Ireland). Os resultados foram expressos como percentagem de hidrólise do amido utilizando as seguintes equações:

$$\% SH = \frac{Sh}{Si} \quad (4)$$

$$= 0,9 \times \frac{Gp}{Si} \quad (5)$$

Onde: %SH é o percentual de hidrólise do amido (total); Sh é a quantidade de amido hidrolisado (g), Si é a quantidade inicial de amido (g); GP e a quantidade de glicose produzida (g). Um fator de conversão (a partir do amido em glicose) de 0,9 o qual é geralmente calculada a partir do peso molecular do monómero de amido / peso molecular de glicose ($162/180 = 0,9$) foi utilizado (Bordoloi, Singh, et al., 2012; Dartois et al., 2010; Goñi et al., 1997).

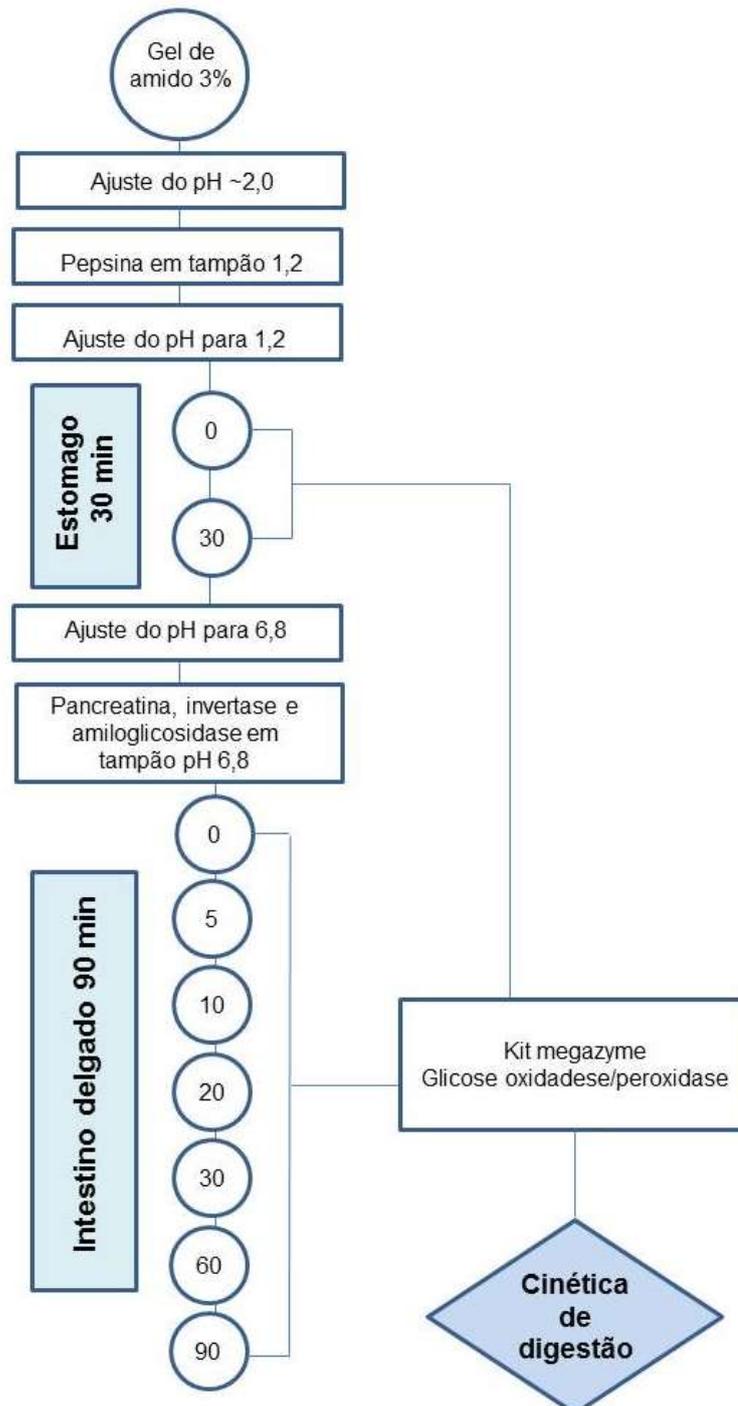


Figura 16. Fluxograma da digestão *in vitro* de amido de batata nativo e modificados.

4.2.2.7. Análise estatística

Todas as determinações analíticas das amostras foram realizadas em triplicata, com exceção de raio x, microscopia eletrônica de varredura e propriedades térmicas. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, para um nível de significância de 5%, utilizando uma análise da variância (ANOVA).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Propriedades de Pasta

As propriedades de pasta do amido de batata nativo e modificado por 400 MPa e 600 MPa estão apresentadas na Tabela 5 e Figura 17. O aumento da pressão fez com que o pico de viscosidade diminuísse. Estes resultados sugerem que o tratamento de APH a 600 MPa limitou a hidratação do grânulo de amido e o inchaço durante a gelatinização, enquanto o tratamento APH em 400 MPa tem um efeito completamente oposto para o amido de batata. Quando comparado ao amido nativo também não foram verificadas diferenças significativas, com exceção do amido modificado por 6 ciclos de 400 MPa que apresentou valores significativamente superiores. Lí et al. (2011), verificaram que quando foram utilizadas pressões de até 480 MPa os valores de pico de viscosidade aumentaram; entretanto, quando foram aplicadas pressões mais elevadas os resultados apresentaram o mesmo comportamento obtidos neste estudo, ou seja, decresceram.

Os demais parâmetros avaliados como a quebra de viscosidade, viscosidade final, retrogradação e tempo de pico em alguns tratamentos apresentaram diferenças significativas, entretanto não apresentaram um comportamento linear que pudéssemos associar à intensidade da modificação.

O aumento da viscosidade que ocorre durante o aquecimento da suspensão de amido é devido, principalmente, ao aumento de volume dos grânulos, e a quebra da viscosidade, que é causada pela ruptura dos grânulos inchados. A viscosidade de pico indica a habilidade dos grânulos para inchar livremente antes da quebra física do grânulo. A viscosidade final indica a estabilidade da pasta cozida a frio sob baixa tensão de corte. As alterações na viscosidade durante um período de cozimento dão indicações de estabilidade de pasta, e as mudanças que ocorrem durante o resfriamento (retrogradação) podem mostrar a consistência do gel e envolvem retrogradação da molécula de amido (Li et al. 2011).

Tabela 5. Propriedades de pasta de amido de batata modificado por 400 Mpa e 600 MPa por 3 e 6 ciclos de 10 min e submetidos à retrogradação por 7 dias.

Pressão	Ciclos	Pico (cP)	Quebra (cP)	Viscosidade final (cP)	Retrogradação (cP)	Tempo de pico (cP)	Temperatura de pasta (cP)
	Nativo	4919,5±85,6 ^b	2618,5±17,7 ^b	2637,0±87,7 ^b	336,0±19,8 ^b	3,8±0,1 ^b	69,7±0,6 ^{bc}
400 Mpa	3	5025,5±94,0 ^b	2789,5±159,1 ^{ab}	2589,0±42,4 ^b	353,0±22,6 ^{ab}	4,0±0,1 ^{ab}	69,8±0,5 ^{bc}
	3 + Retrogradação	4975,0±140,0 ^b	2382,5±234,5 ^b	2932,0±179,6 ^a	339,5±12,0 ^{ab}	4,6±0,5 ^a	70,7±0,6 ^{abc}
	6	5444,5±27,6 ^a	3241,5±60,1 ^a	2578,5±23,3 ^b	375,5±9,2 ^{ab}	3,9±0,0 ^b	69,4±0,1 ^c
	6 + Retrogradação	4755,0±159,8 ^b	2294,0±151,3 ^b	2804,5±27,6 ^{ab}	343,5±19,1 ^{ab}	4,5±0,1 ^{ab}	69,8±0,6 ^{bc}
600 Mpa	3	4722,5±40,3 ^b	2484,0±58,0 ^b	2614,5±17,7 ^b	376,0±0,0 ^{ab}	4,1±0,1 ^{ab}	71,0±0,0 ^{ab}
	3 + Retrogradação	4880,5±33,2 ^b	2643,0±34,6 ^b	2622,0±29,7 ^b	384,5±31,1 ^{ab}	4,1±0,0 ^{ab}	71,0±0,1 ^{ab}
	6	4949,5±105,4 ^b	2732,5±89,1 ^{ab}	2622,0±21,2 ^b	405,0±4,9 ^a	4,03±0,0 ^{ab}	70,3±0,1 ^{ab}
	+ Retrogradação	4976,5±82,7 ^b	2777,0±75,0 ^{ab}	2579,5±4,2 ^b	380,0±3,5 ^{ab}	4,1±0,1 ^{ab}	71,5±0,0 ^a

* Letras minúsculas distintas na mesma coluna representam diferença significativa entre as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

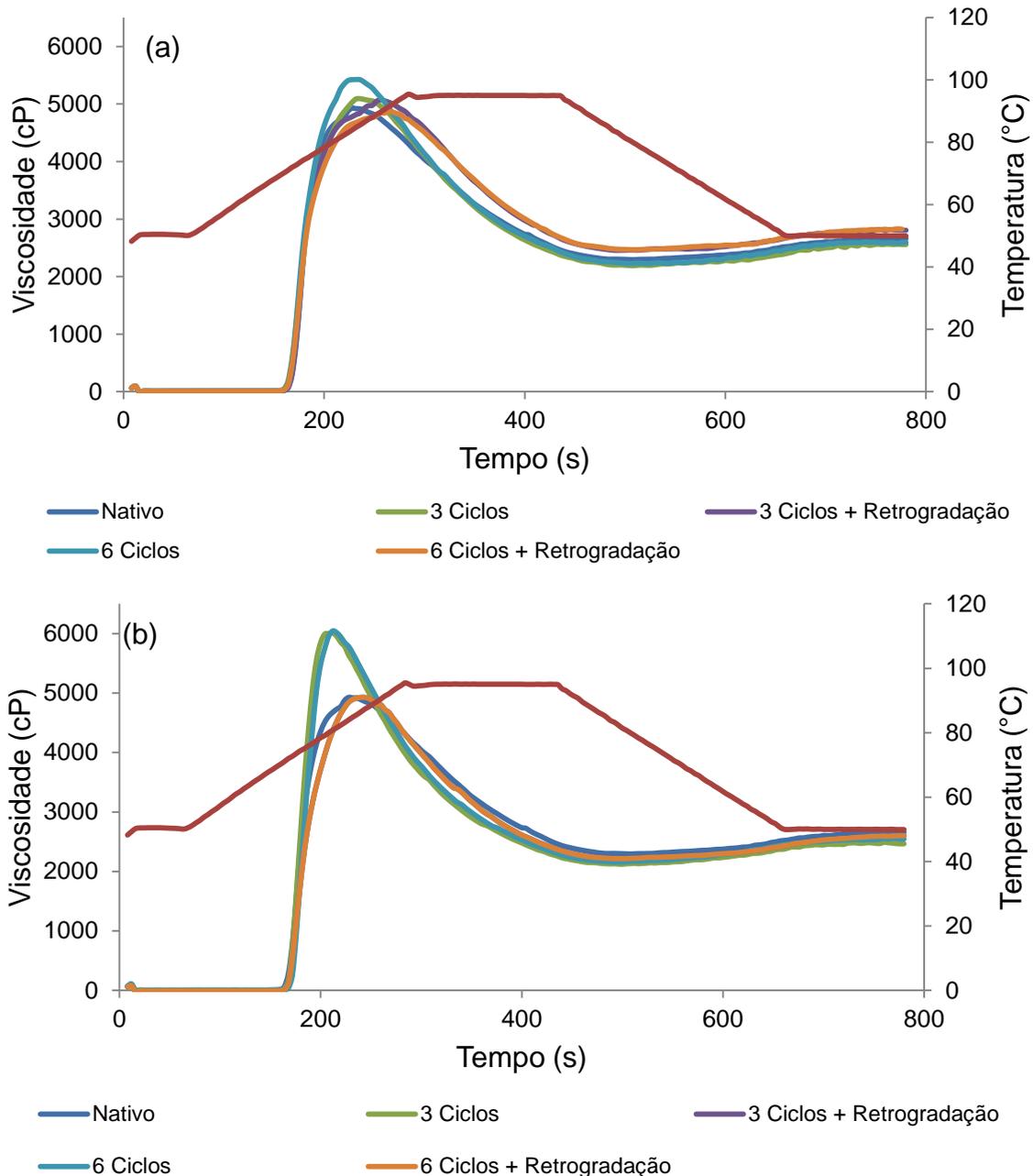


Figura 17. Propriedades de pasta de amido de batata nativo e modificado por alta pressão hidrostática com uso de 3 e 6 ciclos de 400 MPa (a) e 3 e 6 ciclos de 600 Mpa (b).

4.3.2. Cristalinidade relativa

Técnicas de difração de raios-X são amplamente utilizadas para a identificação da fase de um material cristalino e para fornecer informações sobre a estrutura cristalina e dimensões da célula unitária (BLAZEK e GILBERT, 2011). Na Figura 18a

estão apresentados os difratogramas de raios-X e a cristalinidade relativa do amido de batata nativo e modificado por 3 e 6 ciclos de 400 MPa e 400 MPa e submetidos a retrogradação. O uso da pressão diminuiu a cristalinidade relativa do amido de batata, apesar da literatura reportar que o amido de batata é o mais resistente aos tratamentos de APH isso indica que as pressões e tempos utilizados foram suficientes para promover parcial gelatinização dos grânulos.

Com a gelatinização, a estrutura cristalina dos grânulos de amido de batata foi alterada. A completa gelatinização do amido é normalmente detectada por um halo amorfo nos padrões de difração de raios-X das amostras, entretanto, como a pressão utilizada não foi suficiente para gelatinizar totalmente os grânulos de amido, este apresentou apenas um leve decréscimo dos valores de cristalinidade relativa.

O uso da retrogradação posterior ao APH promoveu incremento nos valores de cristalinidade relativa, passando de 13,5% no amido modificado por 3 ciclos de 400 MPa para 14,2% no amido modificado por 3 ciclos 400 MPa + retrogradação; e 14,6% amido modificado por 6 ciclos 400 MPa para 16,2% no modificado por 6 ciclos de 400 MPa + retrogradação indicando que o aumento nos ciclos promoveu maiores alterações à cristalinidade dos grânulos (Figura 18).

A forma em que os cristalitos se desenvolvem e o tipo de polimorfos formados resultantes da retrogradação é influenciado por muitos fatores, tais como temperatura de armazenamento, o teor de água das amostras de amido gelatinizadas, teor de gelatinização e o comprimento das cadeias de amilopectina (WANG et al., 2015).

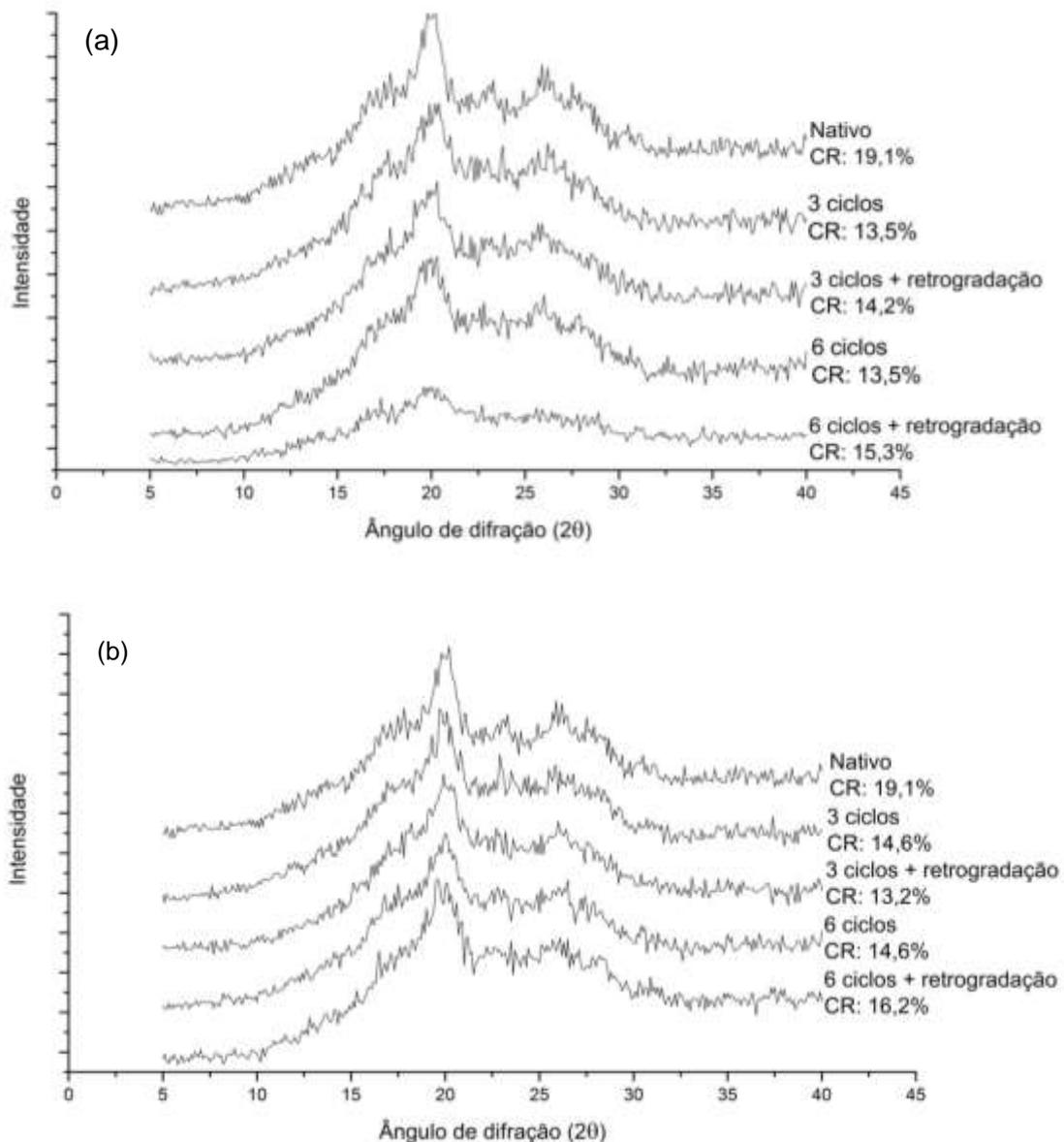


Figura 18. Difrátogramas de raios X de amidos de batata nativo e modificados por 3 e 6 ciclos de 400 MPa e associados a retrogradação (a) e modificados por 3 e 6 ciclos de 600 MPa e associados a retrogradação (b).

Na Figura 18b estão apresentados os difratogramas de raios x e cristalinidade relativa do amido de batata nativo e modificado por 3 e 6 ciclos de 600 MPa e submetidos ou não a retrogradação. O aumento da pressão não proporcionou maior redução da cristalinidade quando comparado ao amido modificado por 400 MPa, pelo contrário, foi verificado 14,6% tanto no amido modificado por 3 ciclos quanto no modificado por 6 ciclos.

Os valores de cristalinidade relativa mais altos nos amidos modificados com 600 Mpa em relação aos amidos modificados com 400 MPa pode ter ocorrido pela

maior gelatinização do amido com imediata retrogradação, proporcionando um rearranjo mais intenso e mais rápido das moléculas de amido.

Quando submetido a retrogradação o amido modificado por 3 ciclos apresentou valor inferior ao de 6 ciclos, sugerindo que 3 ciclos promoveu uma menor gelatinização e posterior menor retrogradação. O uso 6 ciclos de 600 MPa + retrogradação proporcionou aumento na cristalinidade relativa (CR=16,2%) indicando a gelatinização do grânulo e posterior recristalização promovida pelo processo de retrogradação. A baixa cristalinidade do amido modificado por 3 ciclos de 600 MPa + retrogradação quando comparado ao 3 ciclos de 400 MPa + retrogradação pode ter ocorrido pelo fato de o padrão de difração de raios x ser uma média de muitos grânulos e, portanto, essa determinação não diferencia a variabilidade entre e dentro dos grânulos.

Osella et al., (2005) referiram que o tipo de cristais desenvolvidos em géis de amido de cereais armazenados é dependente do teor de água. As amostras contendo mais de 43% de água apresentaram padrão do tipo B após o armazenamento, enquanto que aqueles que continham menos de 29% de umidade apresentaram padrão do tipo A. Já as amostras com teor compreendido entre 29% e 43% de umidade apresentaram padrão de tipo C. O desenvolvimento de polimorfos cristalinos também é influenciado pela temperatura retrogradação. O armazenamento a baixa temperatura resulta na formação de polimorfos do tipo B, enquanto que a alta temperatura leva à formação de A e do tipo V (SHAMAI et al., 2004).

4.3.3. Propriedades térmicas

As propriedades térmicas do amido nativo e modificado por APH estão apresentados na Tabela 6. A pressão de 400 MPa em diferentes ciclos e submetidos a retrogradação não influenciaram as propriedades de T_o , T_p e T_f dos amidos, bem como o tratamento de retrogradação posterior. Já o amido tratado com 600 MPa apresentou maior temperatura inicial T_o comparado ao amido nativo. Os demais valores de temperatura de pico (T_p) e temperatura final (T_f) em todos os tratamentos analisados não apresentaram diferenças quando comparados ao amido nativo. Błaszczak et al., (2005) verificaram significativo decréscimo nos valores de T_p , T_c e T_f em amidos de batata modificados a 600 MPa, entretanto os autores verificaram

que apenas a pressão teve efeito sob as propriedades térmicas, o tempo de modificação não influenciou neste parâmetro. Acredita-se que neste estudo não foram verificadas diferenças pelo fato de que foi usada a concentração de 33,3% de amido para o processo de modificação, enquanto estes autores usaram apenas 10%. De acordo com Pei-Ling et al. (2010) a concentração de amido durante o processo de modificação é um dos fatores mais importantes para a eficiência do processo.

Kawai et al. (2007), estudaram as propriedades de gelatinização de misturas de amido de batata em água de 10 - 70% (p/p) a uma pressão de 700 a 1200 MPa a 40 °C durante 1 h e verificaram por calorimetria diferencial de varredura que a pressão necessária para o tratamento de gelatinização completa com a pressão e nas concentrações de misturas de 10-50% (p/p) foram completamente gelatinizadas em todas as pressões utilizadas. Além disso, verificaram que quando usado concentrações de 30-60%, estes apresentaram retrogradação maior que os demais tratamentos. Os autores sugerem ainda que a temperatura de gelatinização influencia altamente no processo de modificação.

Foi verificada pequena redução nos valores de ΔT nos amidos modificados por APH. Entretanto, quando associado à retrogradação estes valores voltaram a aumentar. A variação de entalpia aumentou para os amidos tratados com 400 MPa em ambos os ciclos; entretanto, quando submetido a retrogradação, o amido tratado com 3 ciclos apresentou ΔH mais baixo que os demais modificados, enquanto que o modificado por 6 ciclos + retrogradação apresentou valores superiores.

Os amidos tratados por 3 e 6 ciclos de 600 MPa apresentaram menores valores de ΔH , entretanto, quando submetido a posterior retrogradação os valores voltaram a aumentar (Tabela 6). Este aumento na variação de entalpia comprova a gelatinização e posterior retrogradação do amido tratado a 600 MPa. De acordo com Karim et al. (2000) no amido retrogradado as endotermas de DSC fornecem medidas quantitativas de mudança e transição temperaturas de entalpia para a fusão da amilopectina recristalizada.

Tabela 6. Propriedades térmicas de amido de batata nativo e modificado por 3 e 6 ciclos de 400 MPa e 600 MPa e submetidos ao processo de retrogradação.

Amostra	Ciclos	T _o (°C)*	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔT (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
	Nativo	61,90	66,41	76,65	14,75	16,10
400 MPa	3	61,70	65,80	74,71	12,91	19,43
	3 + Retrogradação	61,33	65,75	74,60	13,27	17,10
	6	60,58	65,32	75,83	15,25	20,78
	6 + Retrogradação	61,24	65,37	76,20	14,96	22,64
	3	62,56	66,19	76,42	13,86	15,14
600 MPa	3 + Retrogradação	62,29	66,13	77,32	15,05	20,28
	6	62,72	66,31	75,64	12,92	15,59
	6 + Retrogradação	62,45	66,30	76,78	14,33	16,08

*T_o= temperatura inicial; T_p=temperatura de pico; T_f=temperatura final; ΔT= (T_f-T_o) variação de temperatura; ΔH=variação de entalpia.

4.3.4. Microscopia com luz polarizada

Para avaliar o efeito da APH sobre a morfologia dos grânulos de amido modificados por 3 e 6 ciclos de 400 MPa e 600 MPa estes foram analisados com microscópio ótico e microscópico ótico com luz polarizada (Figuras 19 e 20). Quando observado em luz polarizada, grânulos de amido nativo mostraram birrefringência sob a forma típica de "Cruz de Malta", onde se verificou a organização cristalina dos grânulos. Os amidos modificados em todos os tratamentos apresentaram parcial gelatinização nos grânulos de amido de batata, principalmente nos grânulos grandes em todos os tratamentos. Esta diferença de comportamento entre grânulo grande e grânulo pequeno pode ser explicada pelo processo de formação do grânulo e pela distribuição e proporção de amilose e amilopectina dentro do grânulo (SINGH et al., 2009).

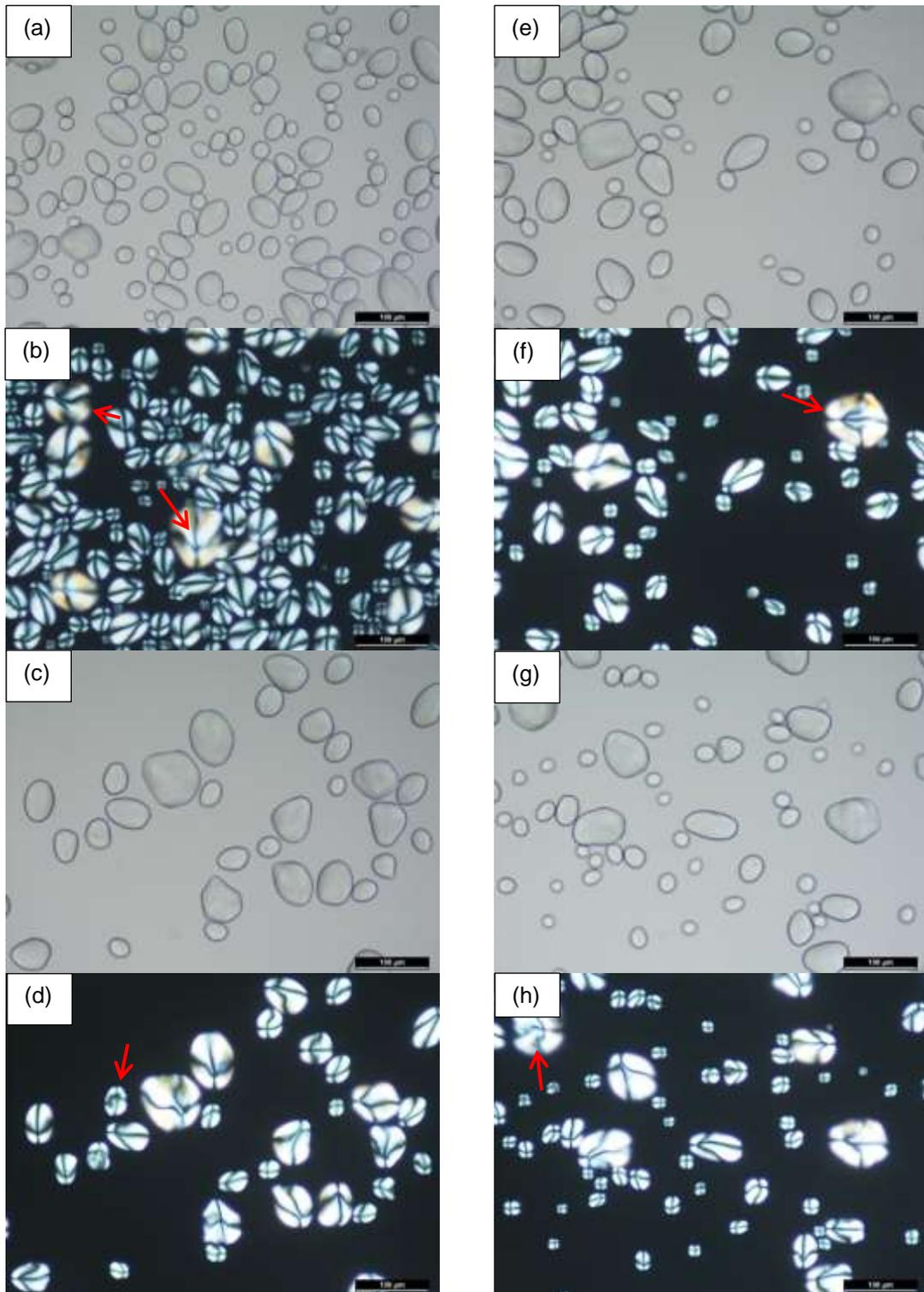


Figura 19. Microscopia com luz polarizada de amido de batata modificado (a, b) 3 ciclos de 400 MPa por 10 min; (c, d) 3 ciclos de 400 MPa por 10 min+ retrogradação; (e, f) 6 ciclos de 400 MPa por 10 min; (g, h) 6 ciclos de 400 MPa por 10 min+ retrogradação.

O uso de 400 MPa e 600 MPa associado ou não ao período de armazenamento, não causou grandes mudanças morfológicas nos grânulos de amido. Li et al., (2011) em estudo com amido de arroz reportaram que o uso de APH acima de 480 MPa resulta em perda parcial da cruz malta, e em pressões mais elevadas de até 600 MPa os grânulos de amido mostraram perda completa da birrefringência, indicando a gelatinização completa. Oh et al., (2008) encontraram o mesmo comportamento ao estudar estas pressões. Os autores sugerem que deve haver um nível de pressão crítica entre 480 MPa e 600 MPa, para o amido para chegar a gelatinização completa.

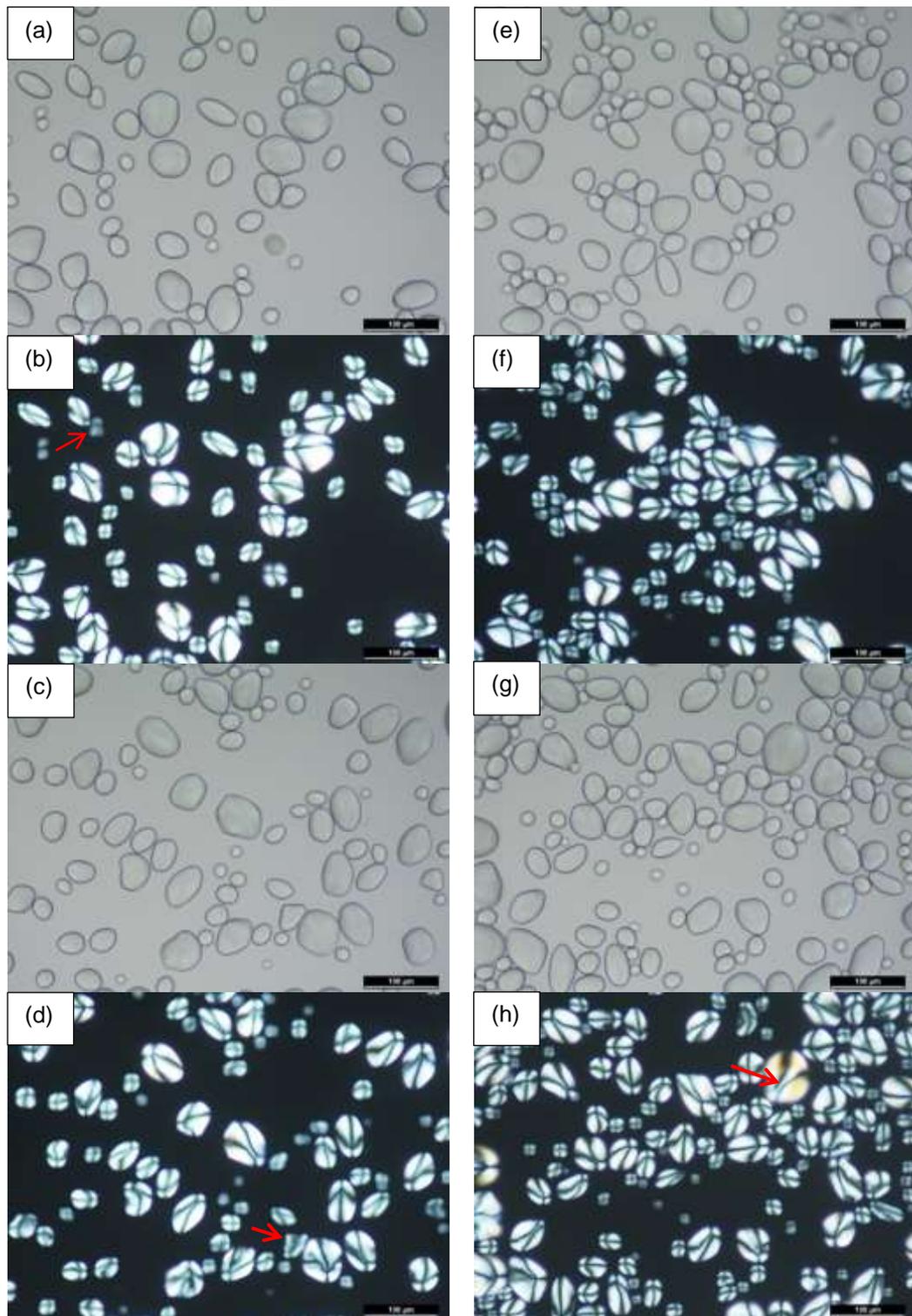


Figura 20. Microscopia com luz polarizada de amido de batata modificado (a, b) 3 ciclos de 600 MPa por 10 min; (c, d) 3 ciclos de 600 MPa por 10 min+ retrogradação; (e, f) 6 ciclos de 600 MPa por 10 min; (g, h) 6 ciclos de 600 MPa por 10 min+ retrogradação.

Diferentes fontes de amido tem sido estudadas para a obtenção de amido modificado por APH. O amido de cevada perde quase toda sua birrefringência após

o tratamento de alta pressão a 450 MPa por 15 min (Stolt et al., 2001), e amido de milho com alto teor de amilose têm perda parcial de birrefringência somente após tratamento de pressão a 600 MPa (Stute et al., 1996), enquanto que em amidos de tipo B como no caso deste estudo, a birrefringência ainda foi observada em luz polarizada com 600 MPa.

A cruz de malta resulta da orientação radial dos cristais formados por hélices duplas de cadeias de polissacarídeos, sendo assim, pressão pode aumentar a difusão de água para dentro da região cristalina para interromper a forma helicoidal da amilopectina. Isto leva à ruptura estrutural dos grânulos de amido, observadas no microscópio sob luz polarizada, como a perda da birrefringência (BLASZCZAK et al., 2005)

4.3.5. Morfologia dos amidos

A morfologia dos amidos de batata nativo e modificados com 3 e 6 ciclos de 400 MPa e submetidos a retrogradação estão apresentados na Figura 21. O amido de batata nativo apresentou distribuição de tamanho bimodal e superfície lisa típica de amido de batata. Os grânulos de amido modificados por 3 ciclos de 400 MPa e 400 MPa + retrogradação não apresentaram diferenças morfológicas, entretanto quando os ciclos aumentaram para 6 pode ser verificada algumas irregularidades na superfície do grânulo, mas sem destruição do mesmo. O amido submetido ao processo de retrogradação não apresentou diferenças quando comparado ao amido somente modificado com APH.

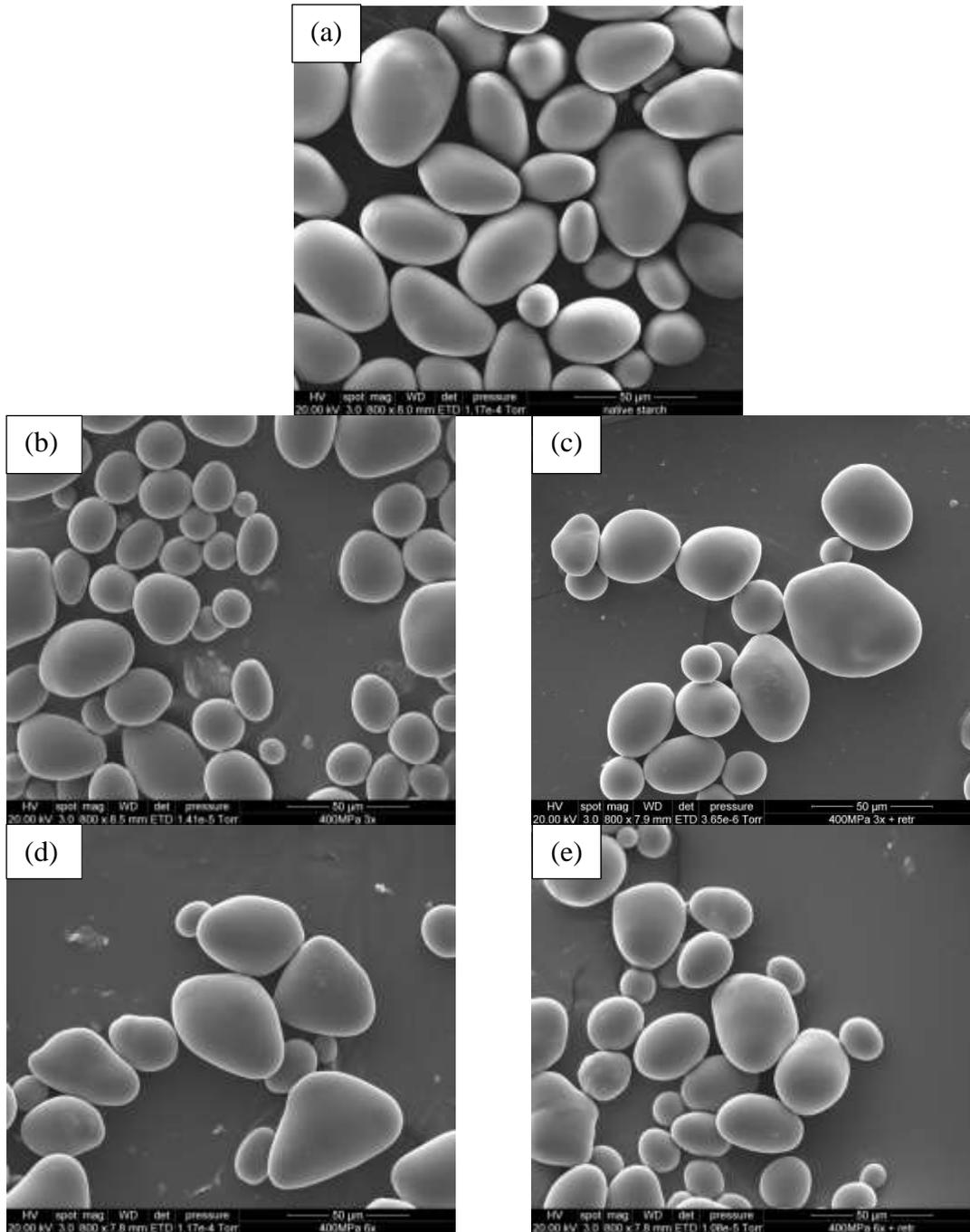


Figura 21. Morfologia do amido de batata nativo (a), modificados por 3 ciclos de 10 minutos a 400 MPa (b), 3 ciclos de 10 minutos a 400 MPa associado a retrogradação (c), 6 ciclos de 10 minutos a 400 MPa (d), 6 ciclos de 10 minutos a 400 MPa associado a retrogradação (e).

A morfologia dos amidos de batata nativo e modificados por 3 e 6 ciclos de 600 MPa e submetidos a retrogradação estão apresentados na Figura 22. O uso de 3 ciclos de 600 MPa (Figura 22b) promoveu alterações na superfície dos grânulos mais intenso do que a 400 MPa. Neste tratamento, ocorreu leves erupções superficiais na maioria dos grânulos, algumas escamações e grandes rupturas em alguns grânulos. Acredita-se que maiores diferenças podem ser encontradas no interior do grânulo, uma vez que já foi relatado pela literatura que o interior do mesmo é mais susceptível ao processo de APH (PEI-LING et al., 2010). Conforme esperado não foram encontradas diferenças nos grânulos submetidos a retrogradação.

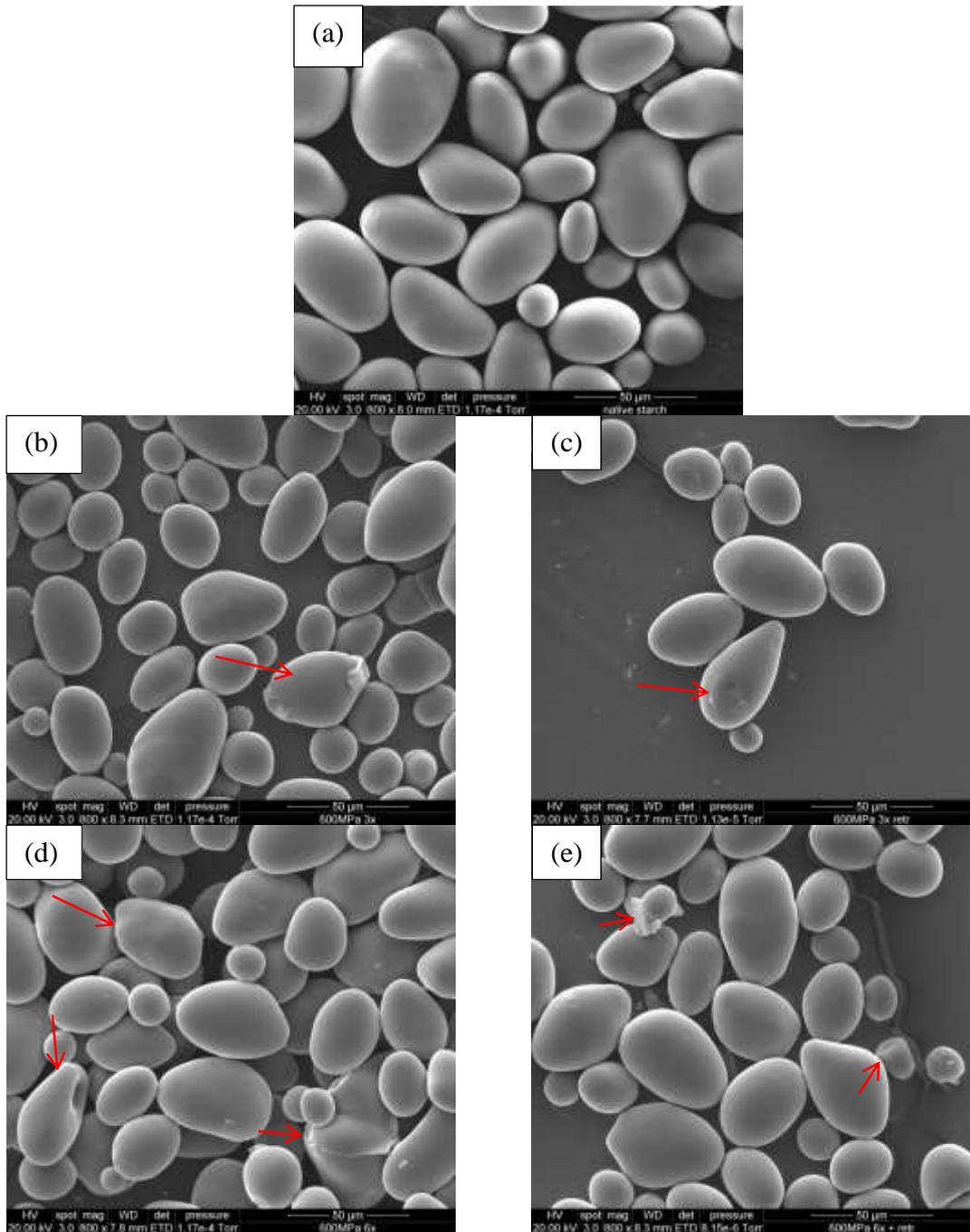


Figura 22. Morfologia do amido de batata nativo (a), modificados por 3 ciclos de 10 minutos a 600 MPa (b), 3 ciclos de 10 minutos a 600 MPa associado a retrogradação (c), 6 ciclos de 10 minutos a 600 MPa (d), 6 ciclos de 10 minutos a 600 MPa associado a retrogradação (e).

A concentração de amido influencia no nível de gelatinização durante o processo de modificação por APH. Błaszczak et al. (2005) modificaram amido de batata por 2 e 3 minutos a 600 MPa, mas a uma concentração de 10% de amido e verificaram completa ruptura dos grânulos (Figura 7) entretanto os mesmos ainda

apresentavam estrutura granular. Outros autores como Stute et al. (1996) e Stolt et al. (2001) ao modificar amidos nas mesmas condições verificaram que apesar de alterações na morfologia os amidos ainda apresentavam estrutura granular. Além da concentração outros fatores como concentração de amilose e genótipo da batata, da qual o amido foi extraído podem interferir na intensidade das alterações sob as características dos grânulos. Pei-Ling et al. (2010) reporta em sua revisão que alguns autores verificaram que a gelatinização (completa perda da cruz de malta) e desestruturação do grânulo de amido de batata ocorre quando o amido é tratado a 700 MPa, enquanto outros reportam que a completa gelatinização ocorre acima de 900 MPa. Além disso, todos os autores afirmam que os grânulos de amido de batata são formados por um material denso que é resistente ao tratamento e a estrutura exterior de grânulos de batata e amido de milho de alta amilose é mais ordenada nas suas regiões exteriores.

4.3.6. Morfologia dos géis

Os géis dos amidos de batata nativo e modificados por 6 ciclos de 600 MPa e 6 ciclos de 600 MPa + retrogradação estão apresentados na Figura 23. A morfologia do gel do amido nativo diferiu consideravelmente do gel dos amidos modificados por 6 ciclos 600 Mpa, e 6 ciclos + retrogradação. O gel do amido nativo (Figura 23a) apresentou uma rede uniforme de fragmentos de grânulo de amido rompido com grande espaçamento entre a estrutura (Figura 23a). No amido modificado (Figura 23b) podem-se observar algumas partes com menor espaçamento e uma estrutura não muito uniforme. No gel com 6 ciclos de 600 MPa + retrogradação (Figura 23c) observa-se uma estrutura mais compacta, e aproximada, que poderia dificultar o acesso de enzimas comparado a outros tratamentos. Como com a retrogradação as cadeias de amilose e de amilopectina interrompidos gradualmente tentam reassociar-se em uma estrutura ordenada a estrutura tende a reaproximar-se.

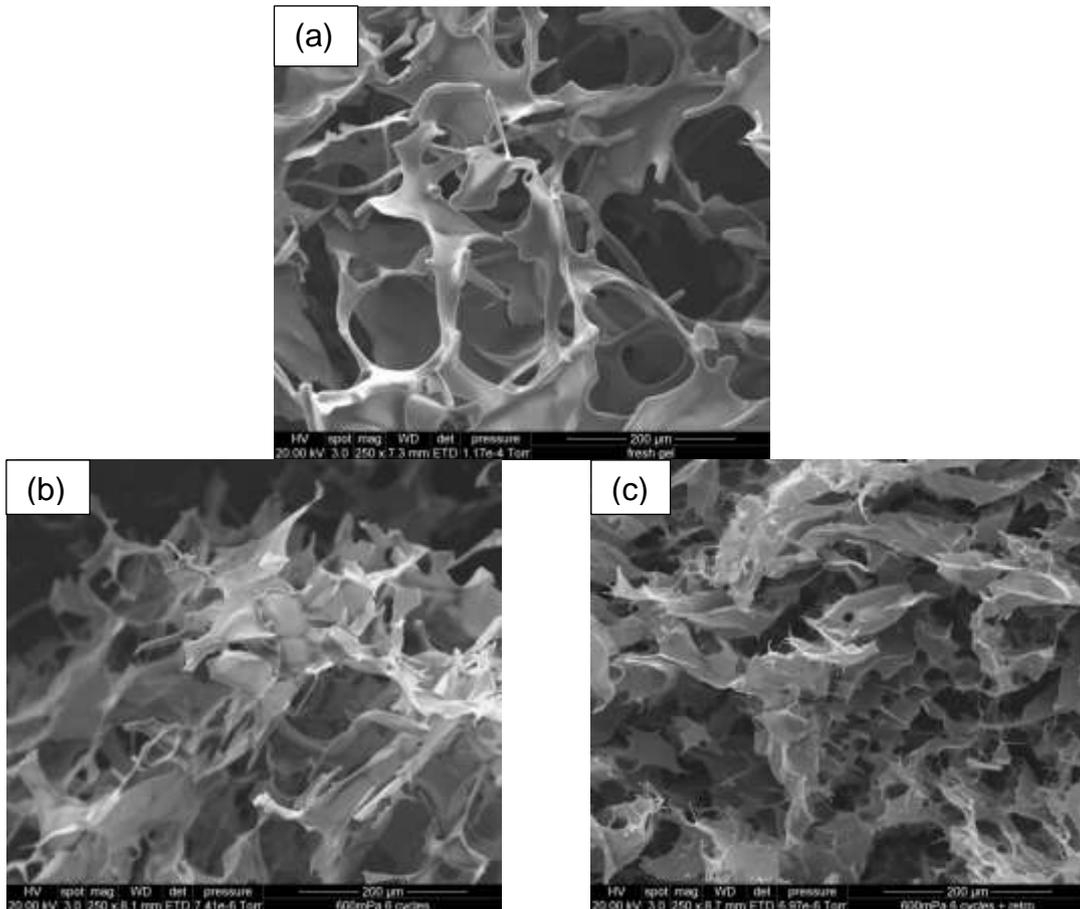


Figura 23. Morfologia dos géis de amido de batata nativo (a) e modificados a 6 ciclos de 10 min a 600 MPa (b); 6 ciclos de 10 min a 600 MPa associado a 7 dias de retrogradação

As mudanças que o amido sofre durante a gelatinização e a retrogradação são os principais determinantes de suas propriedades funcionais para processamento de alimentos, durante a digestão, e em aplicações industriais. Essas propriedades determinam a qualidade, a aceitabilidade, o valor nutricional e o prazo de validade dos alimentos acabados (WANG e COPELAND, 2013). A retrogradação do amido é muitas vezes considerada a ter efeitos indesejáveis, devido à sua contribuição importante para o endurecimento do pão e outros alimentos ricos em amido, que podem causar reduzida vida de prateleira e menor aceitação do consumidor, colocando desafios significativos para quem processa alimentos (COLLAR e ROSELL, 2013).

No entanto, a retrogradação do amido é desejável em algumas aplicações, tais como na produção de cereais matinais, arroz parboilizado e purê de batatas desidratadas, devido à modificação da estrutura, propriedades mecânica e

propriedades sensoriais (WANG et al., 2015), além disso, pela formação de amido resistente e amido lentamente digerível.

4.3.7. Digestibilidade *in vitro*

Há uma série de técnicas utilizadas pela indústria para o processamento de diferentes matérias-primas alimentares. O processamento conduz a uma alteração na estrutura do alimento e também influencia as características nutricionais do mesmo, incluindo a digestibilidade do amido. Na Figura 24 está apresentado o percentual de hidrólise dos amidos modificados por 3 ciclos de 400 MPa e 400 MPa + retrogradação e comparados com amido nativo. Não foi verificada digestibilidade durante os 30 primeiros minutos de digestão gástrica devido à ausência de enzimas que hidrolisam o amido. Quando adicionado o suco intestinal ao sistema imediatamente obteve-se 26,4% de amido hidrolisado no amido nativo, enquanto que os amidos modificados por 3 ciclos de 400 MPa foi encontrado 17,7% e no submetido a retrogradação 16,5%. O amido modificado por APH apresentou redução de aproximadamente 10% a hidrólise no início da digestão no intestino delgado. Entretanto, com o tempo de digestão o amido modificado por 3 ciclos de 400 MPa não apresentou diferenças significativas quando comparado ao amido nativo, já o submetido a retrogradação apresentou valores levemente inferiores.

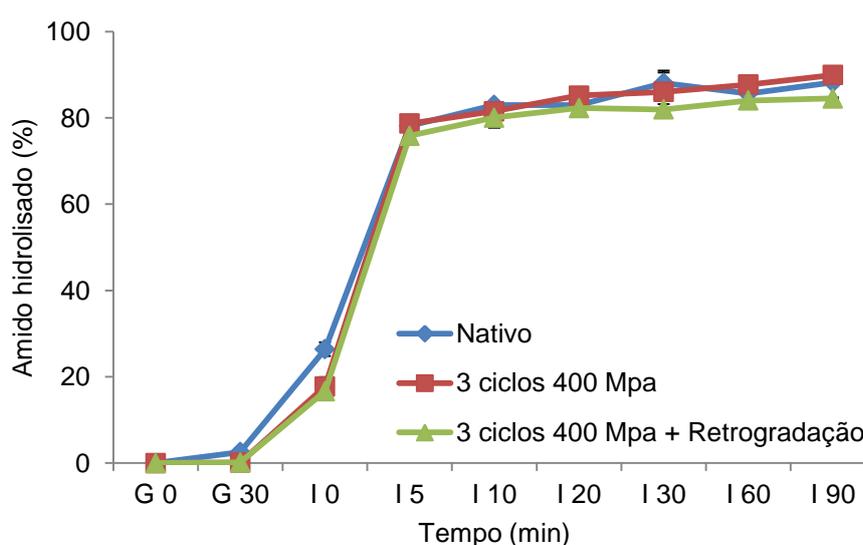


Figura 24. Digestibilidade de amido de batata nativo e modificado por 3 ciclos de 400 MPa e 3 ciclos de 400 MPa associados a retrogradação.

Ao aplicar 6 ciclos de 400 MPa (Figura 25) ocorreu a redução da hidrólise do amido quando simulada a digestão no intestino delgado. Imediatamente ao adicionar o suco intestinal à reação (I 0) a hidrólise do amido passou de 26,3% do amido nativo para 17,4% no amido modificado por 6 ciclos de 400 MPa e 9,4% no amido modificado submetido a retrogradação. Durante o período de digestão no intestino delgado o amido submetido a retrogradação após o processo de APH continuou a apresentar menor percentual de hidrólise, sendo que após 20 min de digestão (I 20) obteve-se uma curva linear até os 90 min de reação (I 90), continuando a ser observado em torno de 10 a 15% menor hidrólise que o amido nativo e o modificado sem retrogradação.

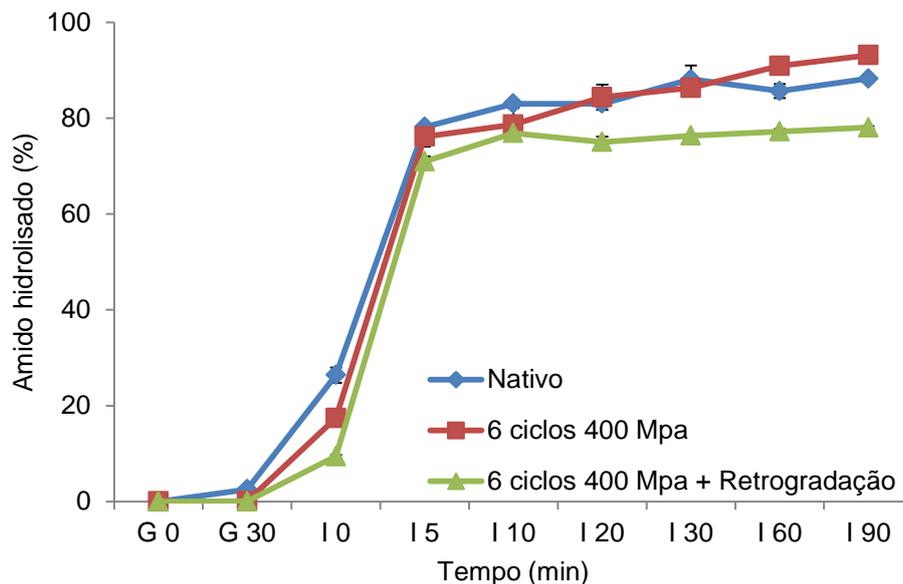


Figura 25. Digestibilidade de amido de batata nativo e modificado por 6 ciclos de 400 MPa e 6 ciclos de 400 MPa associados a retrogradação.

A modificação do amido por 3 ciclos de 600 MPa apresentou o mesmo comportamento que o amido modificado por 3 ciclos de 400 MPa, ou seja, menor hidrólise do amido apenas no início da digestão intestinal (I 0), agora passando de 26,3% do amido nativo para 16,4% no amido modificado e 13,2% no amido modificado e submetido a retrogradação (Figura 26). A literatura reporta que o processo de APH confere maior resistência à digestão devido aos amidos serem parcialmente gelatinizados durante a pressurização, seguido pela liberação da câmara de pressão, o que promove retrogradação espontânea, levando à formação de amido resistente (PEI-LING et al. 2010). Entretanto, verificamos neste estudo que a prolongada retrogradação podem aumentar o percentual destes valores.

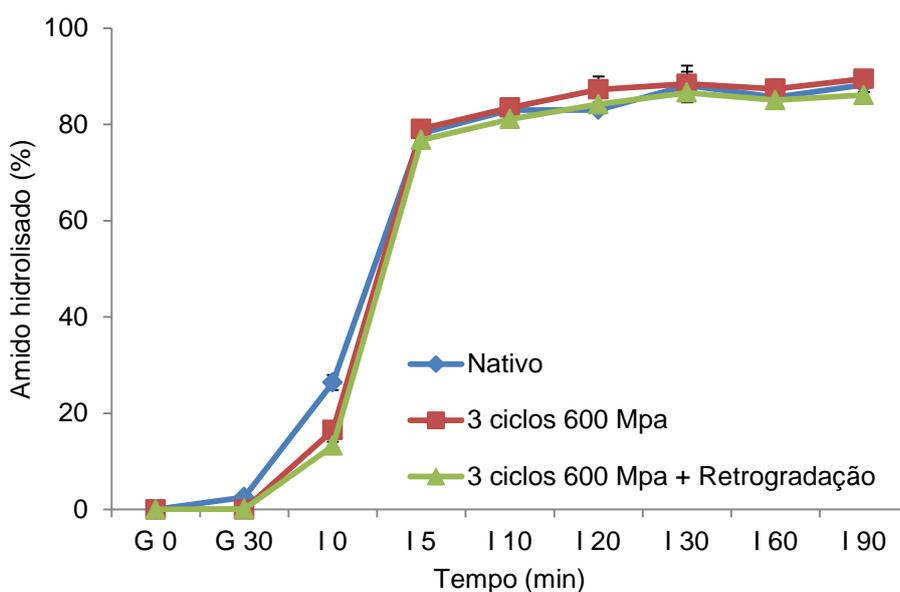


Figura 26. Digestibilidade de amido de batata nativo e modificado por 3 ciclos de 600 MPa e 3 ciclos de 600 MPa associados a retrogradação.

O uso de 6 ciclos de 600 MPa ao amido também apresentou o mesmo comportamento que o modificado por 6 ciclos de 400 MPa (Figura 27). O amido submetido a APH não diferenciou do amido nativo, enquanto que o submetido ao APH associada a retrogradação apresentou valores inferiores de digestibilidade. Neste caso, os valores foram inferiores desde o início da digestão simulada ao intestino delgado, após uma rápida liberação de glicose no início dos 5 minutos de digestão intestinal o amido mostrou estabilidade, sendo hidrolisado após 85 minutos de reação (entre I 5 – I 90) apenas 8,68% de amido. Ao final da etapa simulando o intestino delgado (I 90) nos amidos modificados por 6 ciclos de 400 MPa e 600 MPa associado ao armazenamento refrigerado apresentaram liberação de glicose 10% menor que o amido nativo. Esta baixa liberação de glicose sugere que o processo de modificação por APH associado a retrogradação em níveis mais elevados promova a formação de amido resistente e amido lentamente digerível.

A taxa e a extensão da hidrólise do amido no intestino delgado são dependentes de vários fatores intrínsecos e extrínsecos. A presença de amido lentamente digerível têm sido relatada para melhorar a resposta pós-prandial em indivíduos com diabetes tipo 2 e pode também prolongar a saciedade (LEHMANN e ROBIN, 2007).

Os valores obtidos estão em acordo com o reportado por Hayashi e Hayashida (1989) que relatam que a retrogradação imediata dos amidos modificados por APH está relacionada à diminuição da digestibilidade enzimática do amido gelatinizado APH.

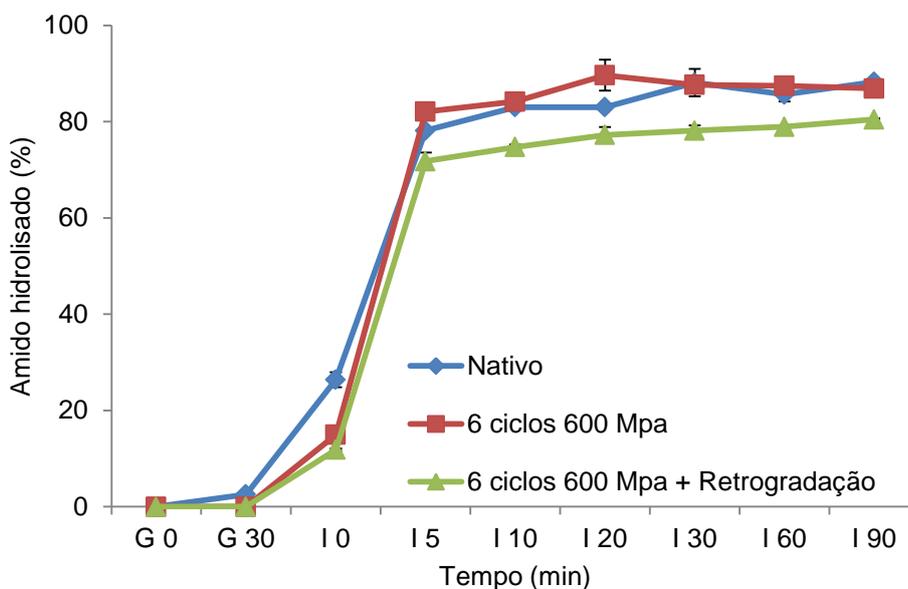


Figura 27. Digestibilidade de amido de batata nativo e modificado por 6 ciclos de 600 MPa e 6 ciclos de 600 MPa associados a retrogradação.

A digestibilidade também pode estar relacionada à viscosidade. De acordo com Dartois et al. (2010) a diminuição na glicemia pós-prandial de gomas após a ingestão de alimentos ricos em amido pode ser devido à sua capacidade de produzir produtos de alta viscosidade no lúmen do intestino, afetando assim significativamente a absorção de nutrientes e os níveis de nutrientes no plasma pós-prandial. A taxa mais lenta de hidrólise do amido na presença de goma guar pode ser atribuída à capacidade de gomas para aumentar a viscosidade da digesta devido ao alargamento de cadeias galactomanana totalmente hidratados.

No entanto, esta percentagem não pode ser interpretada como a percentagem de hidrólise de alimentos ricos em amido *in vivo*, que é bem mais complexa do que a *in vitro*. Outros componentes alimentares como proteínas ou ácidos graxos têm sido demonstrados que têm efeito inibitório sobre a hidrólise de amido.

4.4. Conclusões

A aplicação de alta pressão hidrostática (APH) associada ou não ao armazenamento refrigerado (retrogradação) em amido de batata promove modificações na morfologia e nas propriedades de pasta, térmicas e de cristalinidade, estrutura dos géis e na digestibilidade *in vitro*.

A pressão de 600 MPa com 6 ciclos de 10 minutos associada a retrogradação promoveu as maiores modificações no amido. A alta pressão hidrostática (APH) associada a retrogradação permite a produção de amido com características diferenciadas, que após cozimento proporciona uma menor digestibilidade *in vitro*, assim como menor taxa de liberação de glicose ao longo da digestão, podendo ser uma técnica de processamento de alimentos para consumidores que necessitam de uma menor e mais lenta digestão do amido.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No primeiro estudo a digestibilidade do amido de batata diminuiu significativamente durante o armazenamento devido a retrogradação do gel, no entanto, com o processo de reaquecimento do gel em micro-ondas a digestibilidade foi superior ao gel fresco, indicando que o aquecimento de alimentos em micro-ondas pode proporcionar um maior aporte energético para o organismo.

No segundo estudo a modificação do amido de batata por 200 MPa por até 6 ciclos de 10 apresentou apenas um acréscimo na viscosidade dos amidos modificados. O uso da APH nas pressões de 400 MPa e 600 MPa interrompeu parcialmente a cristalinidade do amido de batata e o posterior processo de retrogradação promoveu recristalização e conseqüentemente, novo acréscimo na cristalinidade relativa. Os amidos tratados por 3 e 6 ciclos de 600 MPa apresentaram menor valor de ΔH , entretanto, quando submetido a retrogradação os valores voltaram a aumentar.

Pela análise de microscopia eletrônica de varredura verificou-se que o uso de 6 ciclos de 400 MPa e 600 MPa promoveu leves erupções superficiais na maioria dos grânulos, algumas escamações e grandes rupturas em alguns grânulos; e quando analisado a morfologia dos géis verificou-se uma estrutura mais compacta, e aproximada nos amidos modificados. O processo de armazenamento associado à APH diminuiu significativamente a hidrólise dos amidos modificados por 6 ciclos.

As mudanças que o amido sofre durante gelatinização, retrogradação e modificação são os principais determinantes de suas propriedades funcionais para processamento de alimentos e durante a digestão *in vitro*. Estes resultados contribuem para a compreensão da retrogradação do amido durante o armazenamento refrigerado de géis, e a modificação por alta pressão hidrostática e os seus efeitos sobre a digestão do amido e cinética da liberação de glicose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBA, 2016. **História da batata**. Disponível em: <http://abbabatatabrasileira.com.br/historia.htm>. Acesso em: 18 dez. 2015.
- BAO, J.; KONG, X.; XIE, J., XU, L. Analysis of genotypic and environmental effects on rice starch. 1. Apparent amylose content, pasting viscosity, and gel texture. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 6010-6016, 2004.
- BeMILLER, J. N. Starch modification: Challenges and prospects. **Starch/Starke**, v. 49, p. 127–131, 1997.
- BeMILLER, J. N., HUBER, K. C. Physical modification of food starch functionalities. **Food Science and Technology**, v. 6, p. 19–69, 2015.
- BERG, T.; SINGH, J.; HARDACRE, A.; BOLAND, M. J. The role of cotyledon cell structure during *in vitro* digestion of starch in navy beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1678-1688, 2012.
- BERTOFT, E.; BLENNOW, A. (2009). Structure of Potato Starch. In: SINGH, J.; KAUR, L. **Advances in Potato Chemistry and Technology**. 1 ed. Cap. 4, Elsevier. 2009. p. 83-98.
- BILLIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food constituents, **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, n.1, p. 60-78, 1991.
- BŁASZCZAK, W.; VALVERDE, S.; FORNAL, J. Effect of high pressure on the structure of potato starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n.3, p. 377–383, 2005.
- BLAZEK, J.; GILBERT, E. P. Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 281–293, 2011.
- BORDOLOI, A.; KAUR, L.; SINGH, J. Parenchyma cell microstructure and textural characteristics of raw and cooked potatoes. **Food Chemistry**, v. 133, n.4, p. 1092–1100, 2012.
- BORDOLOI, A.; SINGH, J.; KAUR, L. *In vitro* digestibility of starch in cooked potatoes as affected by guar gum: Microstructural and rheological characteristics. **Food Chemistry**, v. 133, n.4, p. 1206-1213, 2012b.
- BRADSHAW, J. E.; RAMSAY, G. Potato Origin and production. In: **Advances in Potato Chemistry and Technology**. 1 ed. Elsevier. Cap. 1, 2009. p. 1-26.
- BRIASSOULIS, D. An overview on the mechanical behaviour of biodegradable agriculture films. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 12, p. 65-81, 2004.
- BUCKOW, R.; HEINZ, V.; KNORR, D. High pressure phase transition kinetics of maize starch. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n.2, p. 469–475, 2007.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure

and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

CEREDA, M. P. (org.). **Propriedades gerais de amido**. (Série: Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas, v. 1), São Paulo, Fundação Cargill, 2001, v. 1. Cap. 8. 221p.

CHEN, X.; HE, X.; FU, X.; HUANG, Q. *In vitro* digestion and physicochemical properties of wheat starch/flour modified by heat-moisture treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 63, p. 109–115, 2015.

CHUNG, H.-J.; SHIN, D.-H.; LIM, S.-T. *In vitro* starch digestibility and estimated glycemic index of chemically modified corn starches. **Food Research International**, v. 41, n.6, p. 579–585, 2008.

COLLAR, C.; ROSELL, C.M. Bakery and confectioneries. In: Chandrasekaran M, editor. Valorization of by products from plant-based food processing industries. 2013. Boca Raton, Fla.: CRC Press, Taylor & Francis Group. p 554–82.

CRAIG, S. A. S., MANINGAT, C. C., SEIB, P. A., HOSENEY, R. C. Starch paste clarity. **Journal of Cereal Chemistry**, v. 66, p. 173-182. 1989.

DARTOIS, A.; SINGH, J.; KAUR, L.; SINGH, H. Influence of guar gum on the *in vitro* starch digestibility-rheological and Microstructural characteristics. **Food Biophysics**, v.5, n. 3, p. 149–160, 2010.

DONNALD, A. M.; Understanding starch structure and functionality In: ELIASSON, A. C. **Starch in food: structure function and applications**. Boca Raton: CRC Press, cap.5, p.156-184, 2004.

EL-SHEIKH, M. A.; RAMADAN, M. A.; EL-SHAFIE, A. Photo-oxidation of rice starch. Part I: Using hydrogen peroxide. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 266–269, 2010.

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. S33–S50, 1992.

FADDA, C.; SANGUINETTI, A. M.; DEL CARO, A.; COLLAR, C.; PIGA, A. Bread Staling: Updating the View. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 473–492, 2014.

FARR, D., High pressure technology in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 1, p. 14-17, 1990.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV: 2000, 402p.

FILHO, W. P. C.; CAMARGO, F. P.; ÂNGELO, J. A. **Comercialização-Análise da Produção e do Mercado Atacadista de Batata em São Paulo**. Batata Show. Disponível em:

http://www.abbabatatabrasileira.com.br/2008/revista.asp?id_REVCAT=32&id_REVCAT=717. Acesso: 07 jan. 2016.

FRESCHI, J.; DORAN, L.; MALUMBA, P.; BLECKER, C. Impact of freezing and thawing processes on wheat and potato starch gel syneresis. **Starch/Starke**, v. 66, n.1-2, p. 208–215, 2014.

FU, Z.; WANG, L.; LI, D.; ZHOU, Y.; ADHIKARI, B. The effect of partial gelatinization of corn starch on its retrogradation. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 512-517, 2013.

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

GROMMERS, H. E.; KROGT, D. A. Potato Starch: Production, Modifications and Uses. In BeMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch**, p. 511–539, 2009.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.

HAN, Z.; ZENG, X.; ZHANG, B.; YU, S. Effect of pulsed electric fields (PEF) treatment on the properties of corn starch. **Journal of Food Engineering**, v.93, p. 318–323, 2009.

HAYASHI, R.; HAYASHIDA, A. A new approach of food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 330–335, 1989.

HELLMAN, N. N.; FAIRCHILD, B.; SENTI, F. R. The bread staling problem molecular organization of starch upon aging of concentrated starch gels at various moisture levels. **Cereal Chemistry**. v. 31, p.495–505, 1954.

HERMANSSON, A.-M.; SVEGMARK, K. Developments in the understanding of starch functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 11, p. 345–353, 1996.

HOOVER, R.; HUGHES, T.; CHUNG, H. J. J.; LIU, Q. Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 399-413, 2010.

HUANG, Z.-Q.; LU, J.-P.; LI, X.-H.; TONG, Z. F., Effect of mechanical activation on physicochemical properties and structure of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 128-135, 2007.

IMBERTY, A.; BULEON, A.; TRAN, V.; PERES, S.; Recent advances in knowledge of starch structure. **Starch/Stärke**, v.43, n.10, p.375-384, 1991.

JOUPPILA, K.; KANSIKAS, J.; ROOS, Y. H., Factors affecting crystallization and crystallization kinetics in amorphous corn starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 143–149, 1998.

KARIM, A. A.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch

retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, p. 9–36, 2000.

KATOPO, H. Effect and mechanism of ultrahigh hydrostatic pressure on the structure and properties of starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, n. 3, p. 233-244, 2002a.

KATOPO, H.; SONG, Y.; JANE, J. Effect and mechanism of ultrahigh hydrostatic pressure on the structure and properties of Starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 233–244, 2002b.

KAUR, L.; RUTHERFURD, S.M.; MOUGHAN, P.J.; DRUMMOND, L.N.; BOLAND, M.J. Actinidin enhances gastric protein digestion as assessed using an *in vitro* gastric digestion model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5068-5073, 2010a.

KAUR, L.; SINGH, J.; MCCARTHY, O. J.; SINGH, H. Physico-chemical, rheological and structural properties of fractionated potato starches. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 3, p. 383–394, 2007b.

KAUR, L.; SINGH, N.; SODHI, N. S. Some properties of potatoes and their starches II. Morphological, thermal and rheological properties of starches. **Food Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 183-192, 2002.

KAWAI, K.; FUKAMI, K. YAMAMOTO, K. Effects of treatment pressure, holding time, and starch content on gelatinization and retrogradation properties of potato starch-water mixtures treated with high hydrostatic pressure. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 590–596, 2007a.

KAWAI, K.; FUKAMI, K.; YAMAMOTO, K. State diagram of potato starch–water mixtures treated with high hydrostatic pressure. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 4, p. 530–535, 2007b.

KIM, J. Y.; PARK, D. J.; LIM, S. T. Fragmentation of waxy rice starch granules by enzymatic hydrolysis. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 2, 182–187, 2008.

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

LEWANDOWICZ, G.; SORAL-SMIETANA, M., Starch modification by iterated syneresis. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 403– 413, 2004.

LI, W.; BAI, Y.; MOUSAA, S. A. S.; ZHANG, Q.; SHEN, Q. Effect of High Hydrostatic Pressure on Physicochemical and Structural Properties of Rice Starch. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n.6, p. 2233–2241, 2011.

LI, W.; ZHANG, F.; LIU, P.; BAI, Y.; GAO, L.; SHEN, Q. Effect of high hydrostatic pressure on physicochemical, thermal and morphological properties of mung bean (*Vigna radiata* L.) starch. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 4, p. 388–393, 2011.

LIM, S.-T.; HAN, J.-A.; LIM, H. S.; BEMILLER, J. N. Modification of starch by dry heating with ionic gums. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 601–606, 2002.

MAJZOABI, M., RADI, M., FARAHNAKY, A., JAMALIAN, J. TONGTANG, T.; MESBAHI, Gh. Physicochemical properties of pre-gelatinized wheat starch produced by a twin drum drier. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 13, p. 193–202, 2011.

MCGRANE, S. J.; CORNELL, H.J.; RIX, C.J. A simple and rapide colourimetric method for determination of amylose in starch products. **Starch/Stärke**, v. 50, n. 1 58-163, 1998.

MISHRA, S.; HARDACRE, A.; MONRO, J. **Food Structure and Carbohydrate Digestibility, Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotechnology/food-structure-and-carbohydrate-digestibility>. Acesso em 17 nov. 2015.

NASEHI, B.; SAEIDEH, J. Application of High Hydrostatic Pressure in Modifying Functional Properties of Starches : A Review. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 11 n.7, p. 856–861, 2012.

NEMTANU, M. R.; MINEA, R., Functional properties of corn starch treated with corona electrical discharges. **Macromolecular Symposia**. v. 245-246, p. 525-528, 2006.

OSELLA, C.A.; SANCHEZ, H. D.; CARRARA, C.R.; DELA TORRE, M. A.; PILAR BUERA, M. Water redistribution and structural changes of starch during storage of a gluten-free bread. **Starch/Stärke**, v. 57, p. 208–216, 2005.

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

PEI-LING, L.; XIAO-SONG, H.; QUN, S. Effect of high hydrostatic pressure on starches: A review. **Starch - Stärke**, v. 62, p. 615–628, 2010.

PERERA, C.; HOOVER, R. Influence of hydroxypropylation on retrogradation properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. **Food Chemistry**, v. 64 n. 3, p. 361–375 1999.

PKKAHUTA, C.; SHOBSNGGOBI, S.; VARAVIMIT, S. Effect of osmotic pressure on starch: New method of physical modification of starch. **Starch/Stärke**, 2007, v. 58, p. 78–90, 2003.

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e intermediários químicos. **Relatório Técnico do Centro de Tecnologia de Processos e Produtos – LBI/CTPP**. Disponível em <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf>, acesso dia 03 de dezembro de 2013.

ROSA, D. S.; FRANCO, L. M.; CALIL, M. R. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 82-88, 2001.

RUBENS, P.; HEREMANS, K., Pressure-temperature gelatinization phase diagram of starch: An *in situ* fourier transform infrared study. **Biopolymers**, v. 54, p. 524–530,

2000.

SHAMAI, K.; SHIMONI, E.; BIANCO-PELED, H. Small angle X-ray scattering of resistant starch type III. **Biomacromolecules**, n.5, p. 219–23, 2004.

SIM, L.; QUEZADA-CALVILLO, R.; STERCHI, E.E.; NICHOLS, B.L.; ROSE, D.R., Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 375, p. 782-792, 2008.

SINGH, J., BERG, T., HARDACRE, A., BOLAND, M. J. Cotyledon Cell Structure and *In Vitro* Starch Digestion in Navy Beans. In: BOLAND, M.; GOLDING, M.; SINGH, H. **Food Structures, Digestion and Health**, Elsevier, Cap. 8. 223–242, 2014.

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

SINGH, J.; KAUR, L.; MCCARTHY, O. J. Potato starch and its modification. In: SINGH, J.; KAUR, L. *Advances in Potato Chemistry and Technology*, 2009. Elsevier, Cap. 9 p. 273–318.

SINGH, N.; KAUR, A.; SHEVKANI, K.; EZEKIEL, R. Potato : Production, Composition and Starch Processing. **Advances in Food Science and Nutrition**, v. 2, p. 23–48, 2013.

STEENEKEN, P. A. M., WOORTMAN, A. J. J., Superheated starch: A novel approach towards spreadable particle gels. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 394–405, 2009.

STOLT, M.; OINONEN, S.; AUTIO, K. Effect of high pressure on the physical properties of barley starch. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.1, p. 167–175, 2001.

STUTE, R.; KLINGLER, R. W.; BOGUSLAWSKI, S. Effects of high pressures treatment on starches. **Starch/Starke**, v. 48, p. 399–408, 1996.

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

SZEPES, A.; HASZNOS-NEZDEI, M.; KOVÁCS, J.; FUNKE, Z.; ULRICH, J.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Microwave processing of natural biopolymers-studies on the properties of different starches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, p. 166–171, 2005.

SZYMONSKA, J., KROK, F., KOMOROWSKA-CZEPIRSKA, E., REBILAS, K., Modification of granular potato starch by multiple deep-freezing and thawing. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 1–10, 2003.

TABELA Brasileira de Composição de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: <[http:// www.unicamp.br/nepa/taco/](http://www.unicamp.br/nepa/taco/)>. Acesso em: nov. 2015

TAMURA, M.; SINGH, J.; KAUR, L.; OGAWA, Y. Impact of the degree of cooking on starch digestibility of rice – An *in vitro* study. **Food Chemistry**, v. 191, p. 98–104, 2015.

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

TIAN, Y.; LI, D.; ZHAO, J.; XU, X.; JIN, Z. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) on slowly digestible properties of rice starches. **Food Chemistry**, v. 152, p. 225-229, 2014.

TIAN, Y.; LI, Y.; JIN, Z.; XU, X. A novel molecular simulation method for evaluating the endothermic transition of amylose recrystallite. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 853–858, 2009.

WANG, S.; COPELAND, L. Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review. **Food & Function**, v.11, p. 1564–1580, 2013.

WANG, S.; LI, C.; COPELAND, L.; NIU, Q.; WANG, S. Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 568–585, 2015.

WANG, S.; WANG, J.; YU, J.; WANG, S. A comparative study of annealing of waxy, normal and high-amylose maize starches: The role of amylose molecules. **Food Chemistry**, v. 164, p. 332–338, 2014.

ZHU, F. Impact of γ -irradiation on structure, physicochemical properties, and applications of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 201-212, 2016.