



PRÉ-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE AMIDO MODIFICADO

Enzymatic pre-hydrolysis in the production of modified starch

Vânia Zanella PINTO^{1*}, Vandressa ALVES², Sandra Gomes de AMORIN³, Gustavo Henrique Fidelis dos SANTOS⁴, Vinícius Gonçalves DEON⁵

RESUMO: O emprego de amidos não convencionais em alimentos e embalagens biodegradáveis, bem como modificações físicas, química ou enzimáticas, possibilitam ampliar as aplicações do amido e agregar valor às matérias-primas. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da pré-hidrólise com a enzima α -amilase, na produção de amido ácido-tratados ou amidos hidrolisados, avaliando-se a cinética da hidrólise ácida, o rendimento do processo e a estrutura molecular dos amidos de pinhão e feijão carioca. O percentual da pré-hidrólise com α -amilase foi 7% e 3% para o amido de pinhão e feijão, respectivamente. A cinética de hidrólise ácida com H_2SO_4 foi maior no amido de pinhão que no de feijão e a pré-hidrólise teve leve efeito em ambos os amidos. O modelo linear apresentou 2 etapas na hidrólise ácida, sendo a primeira fase mais rápida e sensível à pré-hidrólise enzimática. O rendimento da hidrólise foi superior no amido de feijão e a pré-hidrólise aumentou o rendimento no amido de pinhão ácido-tratado somente após 5 dias. A pré-hidrólise enzimática promoveu alterações na estrutura molecular dos amidos, porém após a hidrólise ácida, o efeito predominante foi o do ácido sulfúrico. A ordem molecular de curto alcance específico se perdeu e a proporção de $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ e $1022/995\text{ cm}^{-1}$ reduziram com a hidrólise ácida. O amido de feijão carioca se mostrou promissor para a produção de amido ácido-tratado, principalmente pelo elevado rendimento ($>35\%$), sendo 180% maior do que o verificado na literatura com a mesma metodologia.

Palavras-chave: α -amilase, ácido sulfúrico, amido hidrolisado, *Araucaria angustifolia*, hidrólise ácida, *Phaseolus vulgaris*

ABSTRACT: The non-conventional starch uses in biodegradable food and packaging, as well as its physical, chemical, or enzymatic modifications, make possible to expand applications and add value to raw materials. The objective was to evaluate the effect of α -amylase pre-hydrolysis, in the production of acid-treated starches or hydrolyzed starches, evaluating the acid hydrolysis kinetics, process yield and the molecular structure of pinhão and carioca beans starch. The percentage of pre-hydrolysis with α -amylase was 7% and 3% for pinhão and bean starches, respectively. The H_2SO_4 hydrolysis kinetics was higher in pinhão starch than in bean starch and the pre-hydrolysis had a slight effect on both starches. The linear model presented 2 stages in acid hydrolysis, the first stage being faster and more sensitive to enzymatic pre-hydrolysis. The yield of hydrolysis was higher in bean starch and pre-hydrolysis increased the yield in acid-treated pinhão starch only after 5 days. Enzymatic pre-hydrolysis promoted changes in the starches molecular structure, however after the acid hydrolysis its effects was predominant. The specific short-range molecular order was lost and the proportion of $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ and $1022/995\text{ cm}^{-1}$ decreased with acid hydrolysis. Carioca bean starch proved to be promising to produce acid-treated starch, mainly due to its high yield ($>35\%$), being 180% higher than that verified in the literature with the same methodology.

Key words: α -amylase, sulfuric acid, hydrolyzed starch, *Araucaria angustifolia*, acid hydrolysis, *Phaseolus vulgaris*.

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021, aprovado em 05/06/2021

¹Dra. Professora, Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR; 42 3635 8654; vania_vzp@hotmail.com

²Mestre, Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul; 42 3635 8654, vandressa_a@hotmail.com.

³Mestranda, Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul; 42 3635 8654, amorinuffs@gmail.com

⁴Dr. Professor, Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR; 42 3635 8654, Gustavo.santos@uffs.edu.br

⁵Mestre, Professor, Instituto Federal de Santa Catarina, Xanxerê, PR; vinicius.deon@yahoo.com

INTRODUÇÃO

O amido, um polímero natural, pode ser usado em diversas aplicações alimentícias e não alimentícias, sendo encontrado em diferentes fontes vegetais como cereais, raízes, tubérculos, sementes entre outras (BARROS *et al.*, 2021; CASTANHA *et al.*, 2018; KLEIN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2021). Os grânulos de amido são compostos por macromoléculas ramificadas (amilopectina) e não ramificadas (amilose) e variam quanto a sua forma, tamanho, estrutura e composição química, as quais dependem da origem botânica e características genéticas das plantas (SMITH, 2001).

As propriedades funcionais, reológicas e físico-químicas dos amidos de fontes não convencionais têm sido estudadas com recorrência, afim de verificar a sua aplicabilidade nos segmentos industriais (HOOVER, 2000; MOORTHY, 2002; RUPOLLO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2005). Dentre essas fontes não convencionais de amido, pode-se destacar as leguminosas como o feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.), que são cariopses comestíveis ricas em amido e produzidas em todo o mundo e as sementes de pinhão oriundas da araucária (*Araucaria angustifolia*), espécie arbórea predominante da floresta ombrófila mista da região sul do Brasil, e que possuem cerca de 68-72% de amido (BELLO-PÉREZ *et al.*, 2006; BICUDO *et al.*, 2009; HOOVER *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2012).

As propriedades do amido nativo são frequentemente modificadas por diferentes processos físicos, químicos ou enzimáticos com a finalidade de aprimorar e ampliar suas aplicações, sendo os métodos químicos os mais empregados para a funcionalização do amido (QIU *et al.*, 2020). Os ácidos como o clorídrico e o sulfúrico, alteram a estrutura e as propriedades do amido nativo, principalmente nas regiões amorfas do grânulo, as quais são mais suscetíveis à hidrólise ácida (HAO *et al.*, 2018; HOOVER, 2000).

Nägeli (1874), ao fazer um tratamento de amido de batata com 15% de H₂SO₄, por 30 dias em temperatura ambiente, verificou que uma fração, a qual ficou conhecida como amilodextrina de Naegeli, era resistente à hidrólise ácida e solúvel em água quente. Essa mistura de dextrinas demonstrou ser de baixo peso molecular, linear e ramificada e com um grau médio de despolimerização (DP), cerca de 25 a 30%. Já Lintner (1886), utilizou uma modificação ácida com uma suspensão aquosa de amido de batata e 7,5% de HCl por 7 dias à temperatura ambiente. O produto da hidrólise possuía alto peso molecular, com formação de uma solução límpida em água quente, amplamente usada como parâmetro para a análise enzimática.

Na indústria, amidos modificados por hidrólise ácida são preparados a partir da mistura da pasta de amido (40%) com HCl ou H₂SO₄ e diluídos a 25-55 °C (HOOVER, 2000). Contudo, fatores como a viscosidade da pasta fria e quente e a textura do gel, influenciam na hidrólise ácida, fazendo com que os tempos das hidrólises sejam muito longos, o que faz com que haja a necessidade de um pré-tratamento que permita uma melhor difusão do ácido através dos grânulos do amido nativo.

Uma alternativa a isso é o uso de enzimas, uma vez que são amplamente utilizadas na indústria de processamento de amido (LECORRE; BRAS; DUFRESNE, 2011). A hidrólise enzimática, fazendo uso das α -amilases, tem como principal função modificar as propriedades do amido, como viscosidade e grau de polimerização (DP) e, consecutivamente, espera-se que ao aplicar a hidrólise enzimática como pré-tratamento ou

pré-hidrólise ocorra a redução no tempo de processamento ou ainda que esta altere as características do amido modificado.

Com base nisso, objetivou-se avaliar o efeito da pré-hidrólise com a enzima α -amilase na produção de amido de pinhão e feijão carioca ácido-tratados ou hidrolisados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As sementes de pinhão e os grãos de feijão Carioca, foram adquiridos em comércio local da cidade de Laranjeiras do Sul, PR, Brasil. O amido de pinhão foi isolado de acordo com a metodologia de Pinto *et al.* (2012) e o amido de feijão foi isolado de acordo com a metodologia de Rupollo *et al.* (2011), com pureza de 98% e 97%, respectivamente.

A enzima α -amilase pancreática foi adquirida da Megazyme (150.000 U g⁻¹), bem como as enzimas pululanase (29 U mg⁻¹) e isoamilase (260 U mg⁻¹) (Megazyme International, Bray, Ireland). Todos os demais reagentes empregados na pesquisa foram de grau analítico (ACS).

Pré-hidrólise enzimática (ENZ)

A pré-hidrólise enzimática foi conduzida com o emprego da enzima α -amilase de origem pancreática, conforme descrito por Kim, Park & Lim (2008), com modificações. A quantidade de material utilizado foi adaptado para manter a mesma razão da atividade enzimática/amido (804 U.g⁻¹ de amido) proposto por Kim, Park & Lim (2008) e também empregado por LeCorre *et al.*, (2012b). A enzima α -amilase foi dissolvida em tampão fosfato 20 mM (pH 6,9) contendo NaCl 6,7 mM. O amido (100 g, base seca (bs)) foi disperso na solução contendo a enzima (3000 mL) e a suspensão foi incubada a 37°C por 2h com agitação constante. Ao final da hidrólise foi adicionado etanol (1:2 v/v) para inativar a enzima e parar a reação. O amido hidrolisado foi recolhido por filtração utilizando papel filtro de média porosidade com o auxílio de funil de Büchner e bomba à vácuo. O amido recuperado foi lavado duas vezes com etanol 50% (500 mL), colocado em bandejas, seco a 40°C e na sequência moído e armazenado. O sobrenadante foi analisado para quantificar os carboidratos solúveis resultantes da hidrólise, a cada 30 min. e a quantificação foi realizada utilizando a reação fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

Cinética da hidrólise ácida e rendimento

O grau de hidrólise ácida foi determinado pela quantificação dos carboidratos solúveis, durante a reação de hidrólise ácida em 7 dias. Alíquotas de 20 μ L foram coletadas a cada 24 horas, diluídas em 10 mL de água deionizada e centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 1 mL do sobrenadante foi utilizado para quantificar os carboidratos solúveis resultantes da hidrólise pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). O grau de hidrólise foi determinado a partir dos carboidratos solúveis totais formados. O rendimento da hidrólise foi determinado pela diferença entre o amido hidrolisado de recuperação (após lavagem e liofilização) e o peso inicial do amido. Os dados de hidrólise ácida foram expressos como amido residual (%) e descritos usando o modelo de reação de primeira ordem (Equação 1).

$$C_p = C_0 (1 - e^{-kt}) \quad \text{Eq. 1}$$

Em que C_p é o tempo de hidrólise do amido; C_0 é a porcentagem inicial de amido hidrolisado; t é o tempo de reação em dias e k é a constante da reação de primeira ordem (dia^{-1}).

Cromatografia de permeação em gel (GPC) em Sepharose CL-2B e CL- 6B

A cromatografia de permeação em gel (GPC) foi realizada para verificar a distribuição de tamanho das cadeias do amido, antes e depois da desramificação, com o emprego de colunas contendo gel de agarose Sepharose CL-2B (1,6 x 32 cm) e gel de agarose Sepharose CL-6B (1,6 x 90 cm) (Pharmacia, Uppsala, Suécia). As amostras de amido (4 e 8 mg) foram dissolvidas em DMSO a 90%, com agitação e aquecimento (5 minutos) e deixadas à temperatura ambiente por 16 h (Bertoft et al., 2008). Para a análise em Sepharose CL-6B foi adicionado 100 μL de tampão acetato de sódio 0,01 mol L^{-1} (pH 5,5) com posterior adição de 1 μL das enzimas pululanase e isoamilase para a desramificação do amido. Uma fração de 0,3 mL de amido dissolvido foi eluído através de cada coluna com NaOH 0,01 e 0,5 mol L^{-1} , a uma taxa de 0,5 e 1 mL min^{-1} , respectivamente. Frações de 1 mL foram coletadas a cada 1 minuto e o teor de carboidratos totais foi determinado pela reação de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). As amostras eluídas na coluna em gel com CL-2B foram ainda adicionadas de 0,1 mL de soluções I_2 (0,1 M) / KI (0,01 M) e posteriormente neutralizadas com HCl 0,01 M. O teor de amilose (AM) das amostras de amido foi definida de acordo com Sargeant & Wycombe (1982). A quantificação das frações F1 – cadeias glicose lineares longas, F2 – material intermediário e F3 – cadeias de glicose lineares curtas, (CL-6B) foi realizada pela soma das fações equivalentes que formam os picos.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

A organização molecular dos amidos foi avaliada por um FTIR-ATR (IRTracer-100, Shimadzu, Tóquio, Japão). O amido seco foi usado para análise e os espectros FTIR-ATR foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 4000-800 cm^{-1} e foram a média de 100 leituras. Os espectros foram então corrigidos na linha de base e deconvoluídos na região de 1200-900 cm^{-1} (Fityk Free Software, 1.3.1, Warsaw, Polônia). As intensidades de absorbância das bandas em cerca de 1047, 1022 e 995 cm^{-1} foram usadas para investigar as estruturas cristalinas (Soest et al., 1995; Zhang et al., 2013).

Difração de Raio-X

O padrão de difração de raio-X dos amidos antes e após a hidrólise com ácido sulfúrico foi obtido com difratômetro de raio-X (Rigaku Powder Diffractometer, Rigaku Co., Tokyo, Japan). A região de varredura variou de 5° até 30° , com uma tensão de voltagem de 30 kV, corrente de 30 mA e velocidade de 1°min^{-1} , utilizando $\text{CuK}\alpha 1$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) como fonte de radiação e o ângulo de difração 2θ . A cristalinidade relativa (CR) das amostras foi calculada pela seguinte razão entre a área cristalina e a área total (cristalina + amorfa) dos difratogramas.

Análise estatística

Os dados do rendimento da hidrólise ácida do amido de feijão carioca e de pinhão foram analisados por meio de uma análise de variância (ANOVA) e os valores médios foram

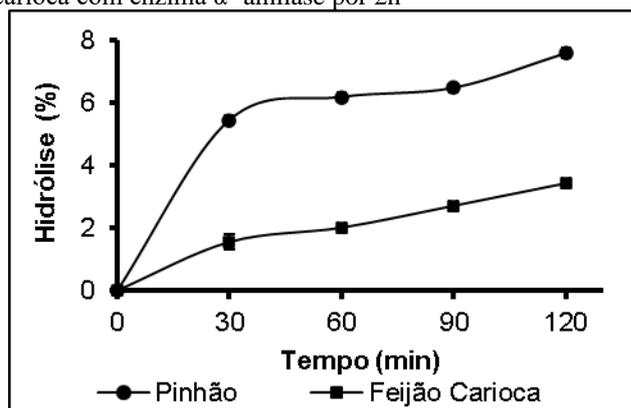
comparados por um teste de Tukey e um teste t a um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pré-hidrólise enzimática (ENZ)

A pré-hidrólise enzimática com α -amilase por duas horas a 37°C apresentou um percentual de hidrólise de aproximadamente 7% para o amido de pinhão e 3% para o amido de feijão (Figura 1). A hidrólise enzimática por α -amilase ocorre randomicamente nas ligações α , (1-4) e preferencialmente na região amorfa (TESTER; QI; KARKALAS, 2006). Comparando os resultados da hidrólise do amido de pinhão e de feijão Carioca (Figura 1), observa-se que o amido de feijão é mais resistente à hidrólise por α -amilase. Este comportamento pode ser atribuído à origem botânica dos amidos, à razão amilose:amilpectina de cada amido, à cristalinidade relativa e à organização das cadeias laterais da amilopectina presentes nos amidos (BLAZEK; GILBERT, 2010; GALLANT *et al.*, 1992; KIM; PARK; LIM, 2008; LECORRE *et al.*, 2012; O'BRIEN; WANG, 2008; UTHUMPORN; ZAIDUL; KARIM, 2010; ZHU; WANG; WANG, 2013).

Figura 1. Perfil de hidrólise dos amidos de pinhão e feijão carioca com enzima α -amilase por 2h



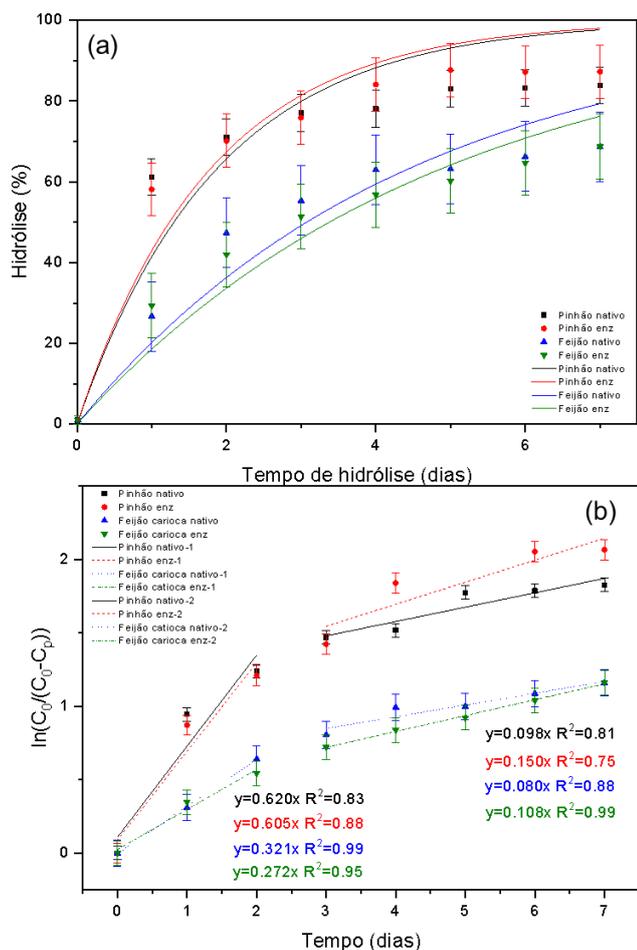
Cinética da hidrólise e rendimento

As amostras de amido de pinhão e feijão nativos e pré-tratadas com ENZ foram submetidas à hidrólise ácida com H_2SO_4 3M a 40°C por 7 dias. O comportamento desta hidrólise foi monitorado a cada 24 horas e está representado na Figura 2a. Observa-se que todas as amostras de amido apresentaram o mesmo perfil de hidrólise, descritos por uma equação de primeira ordem. O amido de feijão apresentou menor velocidade na hidrólise ácida, sendo que a pré-hidrólise não alterou o comportamento geral da hidrólise tanto para o feijão ($k \sim 0,21$) quanto para o pinhão (0,53 - 0,56) (Tabela 1). Para avaliar a velocidade de cada etapa da hidrólise ácida no amido, aplicou-se a seguinte equação (Eq. 2) à Eq. 1.

$$\ln \frac{C_0}{C_0 - C_p} = kt \quad \text{Eq. 2}$$

As curvas de hidrólise ácida demonstram que o processo pode ser dividido em duas fases devido aos valores relativamente diferentes de k . A primeira fase descreve uma hidrólise relativamente rápida (k') até o segundo dia, seguida de uma fase com menor velocidade (k'') até o final da hidrólise ácida (Figura 2b).

Figura 2 Cinética de hidrólise por ácido sulfúrico após 7 dias de hidrólise dos amidos de pinhão e feijão carioca nativos e pré-hidrolisados com α -amilase. (a) Modelo de primeira ordem; (b) Modelo linear (ln) de primeira ordem com duas etapas no processo de hidrólise



O amido de pinhão apresentou maior velocidade na primeira fase da hidrólise ácida, enquanto na segunda fase da hidrólise, ambos apresentaram redução da velocidade, sendo $k'' \sim 0,1$. A pré-hidrólise enzimática aumentou levemente a velocidade de hidrólise (k') dos amidos de pinhão e feijão carioca. Porém o amido de feijão apresentou maior resistência à pré-hidrólise com α -amilase (Figura 1b), o que também se confirmou em menor velocidade da hidrólise ácida na primeira fase em relação ao amido de pinhão (Tabela 1).

O comportamento bifásico na hidrólise ácida do amido tem sido atribuído como a hidrólise das regiões mais amorfas dos grânulos de amido na fase rápida enquanto que durante a fase lenta, o material cristalino é degradado lentamente (DAI; ZHANG; CHENG, 2019; HOOVER, 2000; KRISTO; BILIADERIS, 2007; PINTO *et al.*, 2020).

A pré-hidrólise enzimática também apresenta duas fases, sendo uma rápida, que ocorre preferencialmente na região amorfa (0 a 9h de reação) dos grânulos de amido e uma fase mais lenta, na qual a enzima promove erosões na região cristalina, causando alterações na cristalinidade, propriedades térmicas dos cristais e a presença de poros dos grânulos (Kim; Park & Lim, 2008) A presença destes poros pode ser maior no amido de pinhão, o que pode ter facilitado o acesso do ácido ao interior dos grânulos e, conseqüentemente, aumentado a velocidade de hidrólise ácida para o amido de pinhão. O amido de feijão foi mais resistente, tanto à pré-hidrólise, quanto à hidrólise com H_2SO_4 (Figura 1, Figura 2, Tabela 1).

Ao final de 5 e 7 dias, obteve-se o rendimento da hidrólise que está apresentado na Tabela 1. O amido de feijão apresentou rendimento cerca de 3 vezes superior que o amido de pinhão. Este amido apresentou rendimento cerca de 180% maior do que o verificado na literatura empregando outras fontes de amido e a mesma metodologia de hidrólise ácida (Le Corre & Angellier-Coussy, 2014; Pinto *et al.*, 2020).

A pré-hidrólise enzimática aumentou o rendimento do processo após 5 dias de hidrólise ácida do amido de pinhão. No entanto, a pré-hidrólise no amido de feijão carioca não foi suficiente para promover melhoras no rendimento. Independentemente do uso de pré-hidrólise, todas as amostras apresentaram uma redução no rendimento da hidrólise de 5 para 7 dias de reação, não diferindo dos amidos nativos. Desta forma, a pré-hidrólise de 2h horas com α -amilase somente foi eficiente no amido de pinhão, pois foi mais intensa, quando comparada ao amido de feijão (Figura 1) e, desta forma, contribuiu para o aumento do rendimento do processo após 5 dias de hidrólise ácida.

Tabela 1. Rendimento da hidrólise ácida nos amidos nativo de pinhão e com pré-tratamentos

T ¹	k	k'	k''	Rendimento da hidrólise (%)	
				5 dias	7 dias
Amido de pinhão					
Nativo	0,53	0,62	0,10	10,2±0,9 ^{*c}	8,2±0,2 ^b
ENZ	0,56	0,64	0,15	11,5±0,2 ^{*b}	8,6±0,1 ^b
Amido de feijão carioca					
Nativo	0,22	0,27	0,10	35,9±0,6 ^{*a}	30,13±0,9 ^a
ENZ	0,21	0,32	0,11	36,3±0,4 ^{*a}	31,10±0,6 ^a

¹Os resultados são a média de duas determinações. Os valores com diferentes letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. * e ns na mesma linha representam diferença e não diferença significativa, respectivamente, entre as médias submetidas ao teste t a 5% de probabilidade de erro.

Cromatografia de permeação em gel (GPC)

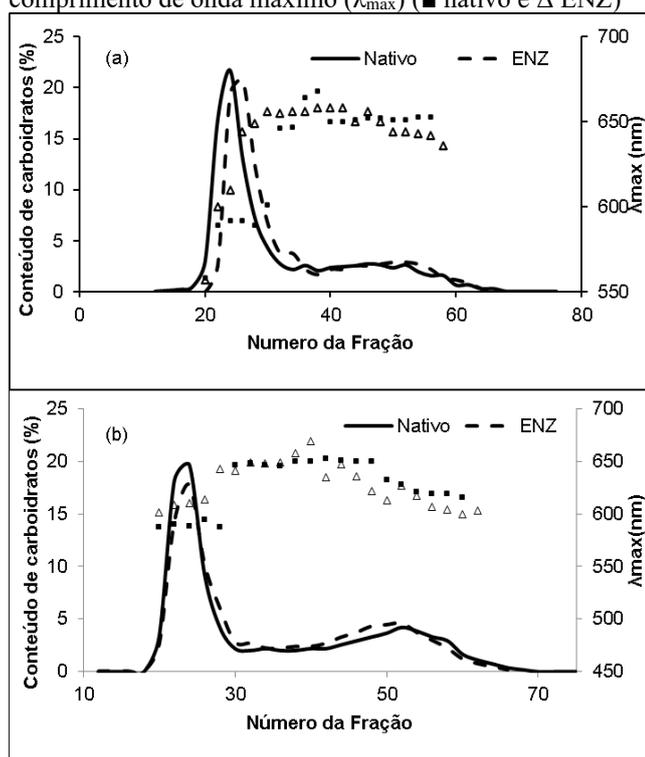
A distribuição do peso molecular das frações amilopectina e amilose, respectivamente, deslocaram-se para a direita após a pré-hidrólise enzimática do amido de pinhão com α -amilase, quando comparada ao amido nativo (Figura 3a).

Pode-se verificar pequenas alterações na concentração de carboidratos para o amido de feijão, no entanto, não foi possível verificar alterações no perfil de distribuição nas cadeias e nem no λ_{max} (Figura 3b). O maior λ_{max} é resultado das ligações do iodo com as longas cadeias de amilose dos amidos (Pinto *et al.*, 2015) e indica que o amido de feijão apresenta cadeias de amilose mais longas que as presentes no amido de pinhão.

As curvas de exclusão de tamanho após a separação por GPC em gel de agarose CL-6B revelou a presença de três frações que incluem longas cadeias lineares (F1), materiais intermediários (F2) e cadeias curtas de glicose (F3). Após a desramificação as cadeias longas representam a amilose e as cadeias curtas são as cadeias laterais das ramificações da amilopectina (VAMADEVAN *et al.*, 2014). O amido de pinhão apresentou cerca de 26% de amilose (F1+F2) e o amido de feijão carioca 39%.

Figura 3. Cromatografia de exclusão de tamanho em gel Sepharose CL 2B (GPC) dos amidos de pinhão (a) e feijão carioca (b) nativos e pré-hidrolisados pela enzima α -amilase

(ENZ). No eixo principal o conteúdo total de carboidratos (linhas contínua e tracejada) e no eixo secundário o comprimento de onda máximo (λ_{max}) (■ nativo e Δ ENZ)



Este comportamento é esperado ao se observar o perfil de hidrólise (Figura 1), bem como o grau de hidrólise (pinhão 7% e feijão 3%) sofrido pelos amidos quando submetidos à ação da enzima. Esta enzima promove a hidrólise das moléculas de amido aleatoriamente nas ligações α ,(1,4) (LECORRE *et al.*, 2012), ocasionando redução no peso molecular das cadeias de amilopectina e de amilose. Como a pré-hidrólise foi branda, o seu efeito é reduzido.

O deslocamento da F3 na curva de GPC da amostra ENZ é mais acentuado no amido de pinhão (Figura 4a) do que a curva GPC no amido de feijão. O menor percentual de hidrólise do amido de feijão mostra a reduzida ação enzimática no amido de feijão, confirmada pela pequena variação na fração F1 do amido desramificado (Figura 4b). Este comportamento indica que a hidrólise enzimática promoveu redução no peso molecular das cadeias de amilopectina no amido de pinhão, e sutilmente nas cadeias de amilose no amido de feijão, em relação ao amido nativo.

Após 5 e 7 dias de hidrólise, verificou-se que as amostras tiveram o mesmo comportamento quanto a distribuição de cadeias diante da hidrólise ácida. A separação por GPC revelou a presença de duas frações apenas, que incluem uma pequena porcentagem de materiais intermediários (F2) e uma grande quantidade de cadeias curtas (F3) (Figura 5 e 6). O desaparecimento da fração F1 é verificada após a hidrólise ácida e representa a remoção de boa parte das cadeias longas da amilopectina (F2) e a totalidade das cadeias de amilose (F1) pela ação do ácido sulfúrico.

Figura 4. Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B dos amidos de pinhão (a) e feijão carioca (b), nativos e pré-hidrolizados com a enzima α -amilase (ENZ), desramificados com pululanase e isoamilase. No eixo principal o conteúdo total de carboidratos. F1 – cadeias de

glicose lineares longas; F2 - materiais intermediários; F3 - cadeias de glicose lineares curtas

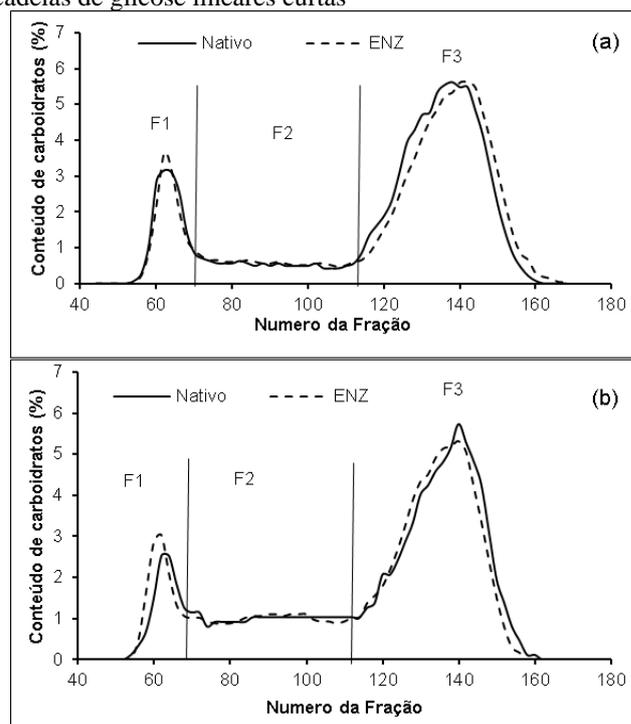
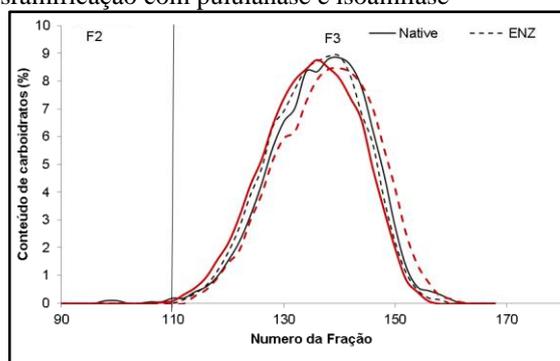


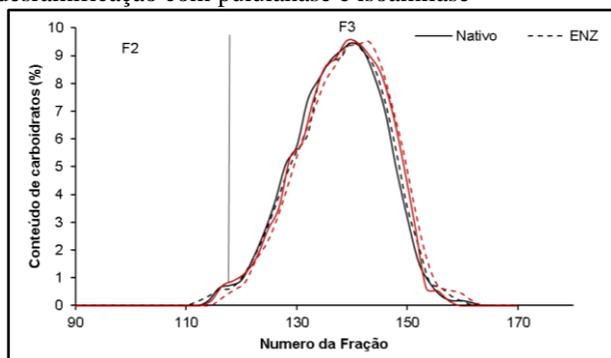
Figura 5 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B (GPC) dos amidos de pinhão nativo e pré-hidrolizado com a enzima α -amilase (ENZ) após hidrólise ácida de 5 dias (linhas pretas) e 7 dias (linhas vermelhas), após a desramificação com pululanase e isoamilase



As curvas da amostra ENZ do amido de pinhão deslocaram-se levemente para a direita. Este comportamento demonstrou que aos 7 dias de hidrólise, o ácido começa a degradar a região cristalina do amido previamente hidrolisado com enzima, e que os tratamentos realizados antes da hidrólise favoreceram este ataque nas cadeias curtas da amilopectina (LECORRE *et al.*, 2012).

O maior teor de amilose (Figura 4) e a organização cristalina do amido de feijão contribuíram para a sua resistência à hidrólise enzimática (Figura 1). Após hidrólise de 5 dias com H_2SO_4 , a curva de GPC deslocou-se para a direita, nos amidos pré-tratados (Figura 5). Este comportamento demonstrou que aos 5 dias de hidrólise, o amido de pinhão e feijão pré-hidrolizados apresentam o mesmo comportamento. No entanto, após 7 dias, a curva de GPC dos amidos de feijão foi levemente deslocada para a direita e o efeito independe da pré-hidrólise (Figura 6). O rendimento da hidrólise reduziu com o aumento do tempo de hidrólise, e as amostras de feijão apresentaram rendimento superior que as amostras de amido de pinhão (Tabela 1).

Figura 6 Cromatografia de exclusão de tamanho em gel (GPC) Sepharose CL 6B (GPC) dos amidos de feijão carioca nativo e pré-hidrolizado com a enzima α -amilase (ENZ) após hidrólise ácida de 5 dias (linhas pretas) e 7 dias (linhas vermelhas), após a desramificação com pululanase e isoamilase



Este comportamento diferenciado entre o 5º e o 7º dia de hidrólise e os amidos de diferentes fontes botânicas podem estar relacionados com a menor acessibilidade do ataque dos prótons hidrolíticos na lamela cristalina das diferentes amostras (HOOVER, 2000). Ambigaipalan et al. (2014), não verificaram diferença significativa durante os primeiros nove dias de hidrólise com HCl entre os amidos nativos de fava, feijão preto e feijão pinto. Os autores concluíram que a redução da hidrólise depois do nono dia refletiu as alterações interplanárias entre a orientação cristalina, o tamanho dos cristais e o realinhamento das duplas hélices.

As cadeias de amilose e as longas cadeias de amilopectina são mais susceptíveis à hidrólise ácida, provavelmente porque estas cadeias estão localizadas principalmente na região amorfa dos grânulos, enquanto as cadeias curtas da amilopectina que compõem a região cristalina são mais organizada e de difícil acesso pelo ácido (Hoover et al., 2010; Kim et al., 2012).

Espectroscopia FTIR-ATR

Todos os espectros de FTIR-ATR das amostras foram semelhantes antes e depois da pré-hidrólise enzimática, bem como antes e depois da hidrólise ácida com H_2SO_4 (Figura 7). A ausência de alterações dos espectros sugere que não houve mudança na composição química dos amidos em função dos processos de hidrólise enzimática e ácida. No entanto, a intensidade de bandas características idênticas nas amostras hidrolisadas aumentou/diminuiu em comparação com os picos presentes nos amidos de pinhão e feijão nativos.

Na região fundamental, os espectros apresentam forte banda de absorção em torno de 3300 cm^{-1} e 2928 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento -OH (IRUDAYARAJ; YANG, 2002; WILSON et al., 1987; WOLKERS et al., 2004) e a sua largura indica a extensão da formação de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. À medida que estas bandas mudam para um comprimento de onda ainda maior (3330 cm^{-1}) indica que as ligações de hidrogênio nas amostras foram mais fortes. As variações nesta banda podem ser atribuídas à presença de água

e à ruptura da estrutura cristalina e à exposição de grupos -OH das moléculas de amido devido ao processo de hidrólise enzimática e/ou ácida (Pinto et al., 2015; Sun et al., 2017). O amido de pinhão e feijão carioca não apresentaram variações nestas bandas.

A absorção em torno de 1637 cm^{-1} é atribuída à presença de água limitada no amido e não foi verificada alterações na intensidade da banda ou o seu deslocamento após a pré-hidrólise ou o processamento ácido dos amidos de pinhão e feijão.

Os espectros de infravermelho de amido têm demonstrado sensibilidade às mudanças na ordem molecular de curto alcance, tais como presença de estruturas em dupla hélice, conformação das cadeias e forma cristalina do amido (Wu & Seib, 1990).

As bandas de absorção observadas na região de $1045\text{--}1047\text{ cm}^{-1}$ e $1018\text{--}1022\text{ cm}^{-1}$ correspondem às estruturas cristalinas e amorfas do amido (CHAVEZ-MURILLO; ORONA-PADILLA; DE LA ROSA MILLAN, 2019). As bandas em torno de $993\text{--}995\text{ cm}^{-1}$ referem-se à vibração do C-OH dos amidos, associadas à interação da ligação de hidrogênio entre o amido e a água (VAN SOEST et al., 1995). Assim, os espectros de FTIR-ATR de todas as amostras foram deconvoluídos na faixa de $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (Figura 7) e foram usados para determinar a ordem molecular de curto alcance do amido, caracterizando as mudanças ocorridas na região semicristalina e amorfa dentro de grânulos/partículas de amido antes e após a hidrólise/fragmentação ácida. Estas bandas apresentaram pequenas variações após o tratamento ácido tanto no amido de pinhão quanto no amido de feijão.

A razão/proporção de $1045/1022$ e de $995/1022$ foram obtidas a partir do ATR-FTIR deconvoluído (Tabela 2). A razão entre as absorvâncias $1047/1022$ pode ser usada para estimar a mudança de amido ordenado para amido amorfo e a razão de absorvância $995/1022\text{ cm}^{-1}$ pode ser usada como uma medida do grau de hélices duplas (SUN et al., 2017).

Esses resultados também foram consistentes com aqueles relatados por (van Soest et al. 1995), ao mudar o amido de semicristalino para amorfo. O ambiente molecular específico se perde e, como resultado, os espectros dos amidos amorfos mostram mudanças na forma e intensidade das bandas. A proporção de $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ aumentou gradualmente com o aumento do tempo de tratamento ácido, enquanto a proporção de $1022/995\text{ cm}^{-1}$ foi menor do que a do amido nativo, refletindo que as regiões externas do amido tratado com ácido-etanol foram mais ordenadas do que o do amido nativo (SUN et al., 2017).

A grande intensidade de absorvância em torno de 995 cm^{-1} indicou grande quantidade de ligações de hidrogênio intramoleculares dos grupos hidroxila em C-6, o que contribuiu para maior ordem das duplas hélices (ordem de curto alcance). Isso sugere que as moléculas de amido após a hidrólise ainda estavam ligadas por ligações de hidrogênio. Porém, não foi possível identificar um padrão na ordem das duplas hélices, provavelmente devido aos diferentes processos e tempos de hidrólise.

Figura 7 Espectros de FTIR-ATR dos amidos nativos de pinhão e feijão com destaque para a região entre 1200-900 cm^{-1} e a representação dos espectros deconvoluídos

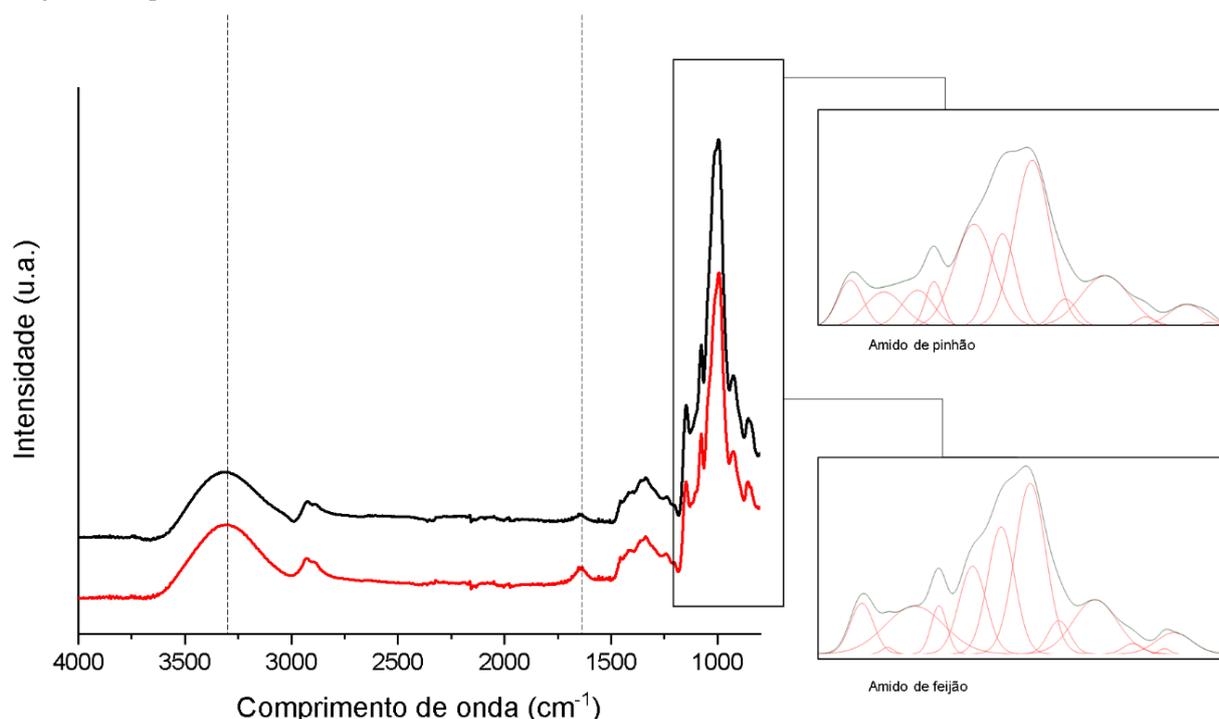


Tabela 2. Razão entre os comprimentos de onda 1045/1022 cm^{-1} e 995/1022 cm^{-1} , resultante da deconvolução dos espectros de FTIR-ATR

Tratamentos ¹	Razão 1045/1022 cm^{-1}			Razão 995/1022 cm^{-1}		
	Antes da hidrólise H_2SO_4	5 dias de hidrólise H_2SO_4	7 dias de hidrólise H_2SO_4	Antes da hidrólise H_2SO_4	5 dias de hidrólise H_2SO_4	7 dias de hidrólise H_2SO_4
Amido de pinhão						
Nativo	1,58±0,17*	0,41±0,03*	0,15±0,00	2,28±0,26 ^{ns}	0,61±0,08*	0,03±0,00
ENZ	2,86±0,25	0,23±0,05	0,41±0,03*	2,86±0,25	0,29±0,07	0,72±0,10*
Amido de feijão carioca						
Nativo	0,79±0,08	0,18±0,00	0,22±0,02	1,80±0,20	0,24±0,01	0,34±0,04
ENZ	0,85±0,11 ^{ns}	0,30±0,02*	0,35±0,02*	1,85±0,29 ^{ns}	0,49±0,06*	0,59±0,06*

¹Razão de 1047/1022 cm^{-1} : medida da quantidade de amido ordenado para a lamela amorfa; Razão 995/1022 cm^{-1} : medida do grau de duplas hélices. * e ns na mesma linha representam diferença e não diferença significativa, respectivamente, entre as médias submetidas ao teste t a 5% de probabilidade de erro

A análise de GPC (Figura 4) e de FTIR-ATR (Tabela 2) demonstraram alterações estruturais moleculares causadas pela pré-hidrólise com a enzima α -amilase nos amidos de pinhão e feijão carioca (Figura 7). No entanto, a hidrólise ácida com H_2SO_4 durante 5 ou 7 dias resultou em alterações moleculares e na ordem molecular de curto alcance do amido (Tabela 2). Assim, a estrutura cristalina foi estudada por difração de raio-X das amostras antes e após 7 dias de hidrólise (Figura 8).

A pré-hidrólise enzimática aumentou, de forma sutil, a CR dos amidos de pinhão e de feijão (Tabela 3), resultado da ação da enzima que ocorre em duas etapas. Na fase rápida a hidrólise ocorre preferencialmente na região amorfa (0 a 9h de reação) dos grânulos de amido, favorecendo a cristalinidade do amido. Por outro lado, na fase mais lenta, a enzima promove erosões na região cristalina, causando alterações nas propriedades térmicas dos cristais, pela facilidade de acesso pela água através dos poros formados nos grânulos (Kim et al., 2008). O elevado conteúdo de amilose favorece interações do tipo amilose-amilose e amilose-amilopectina, sendo reportado como fator responsável pela dificuldade na ação enzimática e assim na redução da hidrólise (O'Brien; Wang, 2008).

A hidrólise ácida com H_2SO_4 promoveu aumento na CR dos amidos nativos e pré-hidrolisados (Tabela 3). O amido nativo de pinhão apresentou o menor CR inicial e maior incremento da CR (90%), enquanto o amido de pinhão pré-hidrolisado apresentou CR inicial superior ao nativo e o menor incremento da CR (~30%) após a hidrólise ácida. Por outro lado, o amido de feijão carioca, mesmo com CR diferente para o amido nativo e pré-hidrolisado, antes da hidrólise, resultou no aumento de ~60% para ambas as amostras.

Tabela 3. Cristalinidade relativa (CR) dos amidos de pinhão e feijão nativos e modificados

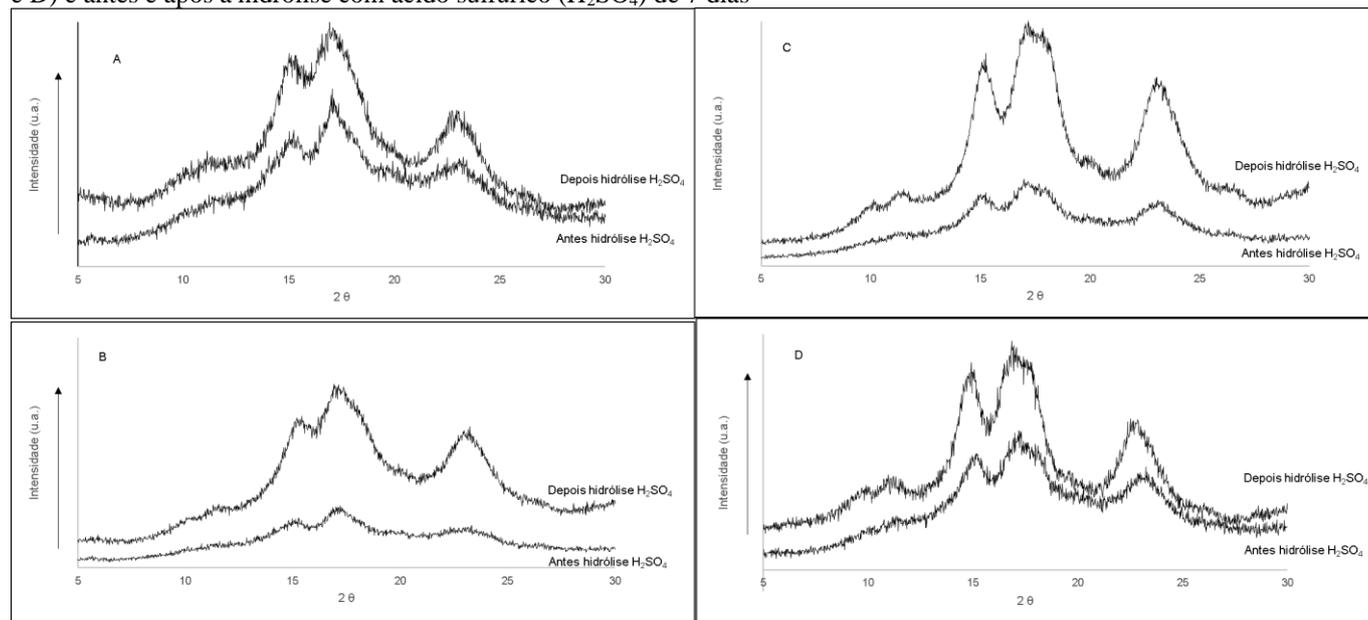
Tratamentos ¹	Cristalinidade Relativa (%)	
	Antes da hidrólise H_2SO_4	7 dias de hidrólise H_2SO_4
Amido de pinhão		
Nativo	22,09	42,00
ENZ	22,95	29,68
Amido de feijão carioca		
Nativo	25,17	42,14
ENZ	26,18	42,06

O resíduo da hidrólise de amidos de cereais, depois de diferentes tempos de hidrólise, sugere um mecanismo de hidrólise “lado-a-lado” nas camadas concêntricas da organização semicristalina dos grânulos, produzindo um alargamento de canais dos anéis de crescimento semicristalinos, a fragmentação dos grânulos e resíduos piramidais (Zhang, Ao & Hamaker, 2006). A digestibilidade lenta dos amidos de cereal é determinada pela estrutura supramolecular da estrutura cristalina tipo-A, incluindo a

distribuição e a perfeição nas regiões cristalinas (Zhang, Venkatachalam & Hamaker, 2006).

Além disso, Vermeylen et al. (2004), mostraram que existe uma diferença menor entre a densidade na lamela amorfa e cristalina dos amidos tipo-A, quando comparado aos amidos tipo-B. Ainda, a lamela amorfa dos amidos tipo-A apresentam um grande número de ramificações (α , (1,6)) (GÉRARD *et al.*, 2000). A presença das ramificações da amilopectina na região amorfa, pode explicar o aumento na cristalinidade do amido de pinhão após a hidrólise enzimática (Tabela 3).

Figura 8 Difratomogramas de raio-X dos amidos de pinhão (A e B) e feijão carioca (C e D), nativos (A e C) e pré-hidrolisados (B e D) e antes e após a hidrólise com ácido sulfúrico (H_2SO_4) de 7 dias



A presença de picos intensos no difratogramas de raio-x no ângulo de difração 2θ em 15° , 17° , e 23° e um leve pico em $5,7^\circ$ nos amidos nativos de pinhão e feijão carioca indicam o padrão de difração de raio-X tipo-C (A+B) (Figura 8). Os amidos tipo-A são caracterizados pela presença de picos no ângulo de difração 2θ e, 15° , 17° , 18° e 23° enquanto os amidos tipo-B se caracterizam pela presença de picos em $5,6^\circ$, 15° , 20° , 22° e 24° (Zhang, Ao & Hamaker, 2006; Zhang, Venkatachalam & Hamaker, 2006). O amido tipo-C é caracterizado pela mistura dos tipos A e B (Cai et al., 2014; Cheetham & Tao, 1998), com picos nas mesmas regiões os quais foram verificados para o amido de pinhão e feijão, em $5,7^\circ$, 15° , 17° , e 23° (Figura 8).

Os picos verificados no padrão de difração de raio-X dos amidos de pinhão hidrolisados, no ângulo de difração 2θ foram em 15° , 17° , 18° e 23° (Figura 8). Isso indica que a hidrólise ácida promoveu uma alteração do padrão de difração do tipo-C (amido nativo) para o tipo-A (amido hidrolisado). Este comportamento também foi verificado no amido de feijão carioca e concluiu-se que os cristais tipo-A presentes nos amidos pareceram ser mais resistentes à hidrólise ácida que os cristais tipo-B, ressaltando que tanto o amido de pinhão quanto o amido de feijão apresentam cristalinidade tipo-C (A+B).

CONCLUSÕES

A pré-hidrólise com α -amilase aplicada nos amidos de pinhão e feijão carioca apresentou pouca influência na cinética

da hidrólise ácida de forma geral (k). Na primeira fase da hidrólise (k') a pré-hidrólise aumentou a velocidade apenas do amido de pinhão e promoveu aumento no rendimento da produção de amido de pinhão ácido-hidrolisado (5 dias).

O amido de feijão carioca se mostrou promissor para a produção de amido ácido-tratado, principalmente pelo elevado rendimento ($> 35\%$) após a hidrólise com ácido sulfúrico, sendo 180% maior do que o verificado na literatura com a mesma metodologia. A pré-hidrólise enzimática e a hidrólise ácida causaram desordem na estrutura cristalina dos amidos. A razão $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ aumentou com a pré-hidrólise do amido de pinhão e feijão, indicando maior organização da ordem cristalina e maior razão $995/1022\text{ cm}^{-1}$ do amido de pinhão, indicando maior grau de duplas hélices.

A hidrólise ácida reduziu a razão $1047/1022\text{ cm}^{-1}$ e $995/1022\text{ cm}^{-1}$ tanto do amido de pinhão quanto de feijão. Desta forma, confirmou-se as alterações, na ordem cristalina, causadas pela hidrólise ácida por meio da difração de raio-X. O padrão de difração de raio-X alterou-se do tipo-C para o tipo-A sugerindo que os cristais tipo-A, presentes no amido de pinhão e feijão carioca, são mais resistentes à hidrólise ácida que os cristais tipo-B.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa foi financiada pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) (PES-2019-0547) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (432181/2018-0).

REFERÊNCIAS

- AMBIGAIPALAN, P. *et al.* Starch chain interactions within the amorphous and crystalline domains of pulse starches during heat-moisture treatment at different temperatures and their impact on physicochemical properties. *Food Chemistry*, v. 143, p. 175–184, 2014.
- BARROS, D. R. *et al.* Ariá (*Goeppertia allouia*) Brazilian Amazon tuber as a non-conventional starch source for foods. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 168, p. 187–194, 2021.
- BELLO-PÉREZ, L. A. *et al.* Isolation and characterization of starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: A novel starch for application in food industry. *Starch/Stärke*, v. 58, n. 6, p. 283–291, 2006.
- BICUDO, S. C. W. *et al.* Thermoanalytical study and characterization of native starches of Paraná pine seeds (*Araucaria angustifolia*, Bert O. Ktze) and European chestnut seeds (*Castanea sativa*, Mil). *Ecletica Quimica*, v. 34, p. 7–12, 2009.
- BLAZEK, J.; GILBERT, E. P. Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. *Biomacromolecules*, v. 11, n. 12, p. 3275–3289, 2010.
- CAI, J. *et al.* Structural and functional properties of C-type starches. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 289–300, 2014.
- CASTANHA, N. *et al.* Structure and properties of starches from Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) roots. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 117, p. 1029–1038, 2018.
- CHAVEZ-MURILLO, C. E.; ORONA-PADILLA, J. L.; DE LA ROSA MILLAN, J. Physicochemical, functional properties and ATR-FTIR digestion analysis of thermally treated starches isolated from black and bayo beans. *Starch/Stärke*, v. 71, n. 3–4, p. 1–25, 2019.
- CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*, v. 36, p. 277–284, 1998.
- DAI, L.; ZHANG, J.; CHENG, F. Succeeded starch nanocrystals preparation combining heat-moisture treatment with acid hydrolysis. *Food Chemistry*, v. 278, n. November 2018, p. 350–356, 2019.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- GALLANT, D. J. *et al.* Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymic degradation.pdf. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 46 (suppl.), p. S3–S16, 1992.
- GÉRARD, C. *et al.* Relationship between branching density and crystalline structure of A- and B-type maize mutant starches. *Carbohydrate research*, v. 326, n. 2, p. 130–44, 2000.
- HAO, Y. *et al.* Preparation of starch nanocrystals through enzymatic pretreatment from waxy potato starch. *Carbohydrate Polymers*, v. 184, n. September 2017, p. 171–177, 2018.
- HOOVER, R. Acid-treated starches. *Food Reviews International*, v. 16, n. 3, p. 369–392, 2000.
- HOOVER, R. *et al.* Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food Research International*, v. 43, n. 2, p. 399–413, 2010.
- IRUDAYARAJ, J.; YANG, H. Depth profiling of a heterogeneous food-packaging model using step-scan Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, v. 55, n. 1, p. 25–33, 2002.
- KIM, H.-Y. *et al.* Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. *Starch - Stärke*, v. 64, n. 5, p. 367–373, 2012.
- KIM, J.-Y.; PARK, D.-J.; LIM, S.-T. Fragmentation of Waxy Rice Starch Granules by Enzymatic Hydrolysis. *Cereal Chemistry*, v. 85, n. 2, p. 182–187, 2008.
- KLEIN, B. *et al.* Effect of single and dual heat-moisture treatments on properties of rice, cassava, and pinhao starches. *Carbohydrate polymers*, v. 98, n. 2, p. 1578–84, 2013.
- KRISTO, E.; BILADERIS, C. G. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, p. 146–158, 2007.
- LE CORRE, D.; ANGELLIER-COUSSY, H. Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review. *Reactive and Functional Polymers*, v. 85, p. 97–120, 2014.
- LECORRE, D. *et al.* Enzymatic pretreatment for preparing starch nanocrystals. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 1, p. 132–137, 2012.
- LECORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Influence of botanic origin and amylose content on the morphology of starch nanocrystals. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 13, n. 12, p. 7193–7208, 2011.
- LI, Y. *et al.* Comparison of structural features of reconstituted doughs affected by starches from different cereals and other botanical sources. *Journal of Cereal Science*, v. 93, p. 102937, 2020.
- LINTNER, C. J. Studien uber diastase. *J. Prakt chem*, v. 34, p. 378–386, 1886.
- MOORTHY, N. S. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: A review. *Starch - Stärke*, v. 54, p. 559–592, 2002.
- NÄGELI, C. W. Beitrage zur naheren Kenntnis der Starkegruppe. *Annalen der Chemie*, v. 173, p. 218–227, 1874.
- O'BRIEN, S.; WANG, Y.-J. Susceptibility of annealed starches to hydrolysis by α -amylase and glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, v. 72, n. 4, p. 597–607, 2008.
- PINTO, V. Z. *et al.* Physicochemical, crystallinity, pasting and thermal properties of heat-moisture-treated pinhão starch. *Starch/Stärke*, v. 64, n. 11, p. 855–863, 2012.
- PINTO, V. Z. *et al.* Molecular structure and granule morphology of native and heat-moisture-treated pinhão starch. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 282–289, 2015.
- PINTO, V. Z. *et al.* Effect of physical pretreatments on the structural and physicochemical properties of pinhão starch nanocrystals. Under Review, 2020.
- QIU, C. *et al.* Advances in research on preparation, characterization, interaction with proteins, digestion and delivery systems of starch-based nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 152, p. 117–125, 2020.
- RUPOLLO, G. *et al.* Pasting, morphological, thermal and crystallinity properties of starch isolated from beans stored under different atmospheric conditions. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, n. 3, p. 1403–1409, 2011.
- SARGEANT, J. G. Determination of Amylose: Amylopectin Ratios of Starches. *Starch - Stärke*, v. 34, n. 3, p. 89–92, 1982.
- SMITH, A. M. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*, v. 2, n. 2, p. 335–341, 2001.

- SUN, B. *et al.* Effect of reaction solvents on the multi-scale structure of potato starch during acid treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 97, p. 67–75, 2017.
- TESTER, R. F.; QI, X.; KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, v. 130, n. 1–2, p. 39–54, 2006.
- UTHUMPORN, U.; ZAIDUL, I. S. M.; KARIM, A. A. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Food and Bioprocess Processing*, v. 88, n. 1, p. 47–54, 2010.
- VAMADEVAN, V. *et al.* Hydrothermal treatment and iodine binding insights into the organization of glucan chains within the semi-crystalline lamella of corn starch granules. *Biopolymers*, n. 612, p. in proof, 2014.
- VAN SOEST, J. J. G. *et al.* Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, v. 279, n. 95, 1995.
- VERMEYLEN, R. *et al.* Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch. *Biomacromolecules*, v. 5, n. 5, p. 1775–1786, 2004.
- WILSON, R. H. *et al.* A Fourier-transform infrared study of the gelatin and retrogradation of waxy-maize starch. *Carbohydrate Polymers*, v. 28, n. 44, p. 5241–5244, 1987.
- WOLKERS, W. F. *et al.* A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. *Carbohydrate Research*, v. 339, n. 6, p. 1077–1085, 2004.
- WU, Y.; SEIB, P. A. Acetylated and hydroxypropylated distarch phosphates from waxy barley: paste properties and freeze-thaw stability. *Cereal Chemistry*, v. 67, n. 2, p. 202–208, 1990.
- ZHANG, B. *et al.* Supramolecular structure of A- and B-type granules of wheat starch. *Food hydrocolloids*, v. 31, n. 1, p. 68–73, 2013.
- ZHANG, G.; AO, Z.; HAMAKER, B. R. Slow digestion property of native cereal starches. *Biomacromolecules*, v. 7, n. 11, p. 3252–8, 2006.
- ZHANG, G.; VENKATACHALAM, M.; HAMAKER, B. R. Structural Basis for the Slow Digestion Property of Native Cereal Starches. *Biomacromolecules*, p. 3259–3266, 2006.
- ZHANG, Z. *et al.* Sonication Enhanced Cornstarch Separation. *Starch/Stärke*, p. 240–245, 2005.
- ZHOU, Y. *et al.* Effects of repeated and continuous dry heat treatments on the physicochemical and structural properties of quinoa starch. *Food Hydrocolloids*, v. 113, p. 106532, 2021.
- ZHU, F.; WANG, S.; WANG, Y. Physical properties and enzyme susceptibility of rice and high-amylose maize starch mixtures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v 93, n. March, 2013.