



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

**Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos**

THIAGO HENRIQUE DE LIMA LINO

**EFEITO DO ULTRASSOM E *HEAT-MOISTURE* NA DIGESTIBILIDADE IN VITRO
DE AMIDO DE MILHO COMERCIAL**

Londrina

2022

THIAGO HENRIQUE DE LIMA LINO

**EFEITO DO ULTRASSOM E *HEAT-MOISTURE* NA DIGESTIBILIDADE IN VITRO
DE AMIDO DE MILHO COMERCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís de Souza Rocha

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Biz

Londrina

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L758e Lino, Thiago Henrique de Lima.
Efeito do ultrassom e heat-moisture na digestibilidade in vitro de amido de milho comercial / Thiago Henrique de Lima Lino. - Londrina, 2022.
66 f. : il.

Orientador: Thaís de Souza Rocha.
Coorientador: Guilherme Biz.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Modificação de amidos - Tese. 2. Planejamento experimental - Tese. 3. Calorimetria diferencial de varredura - Tese. 4. Microscopia Eletrônica de Varredura - Tese. I. Rocha, Thaís de Souza. II. Biz, Guilherme. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

THIAGO HENRIQUE DE LIMA LINO

**EFEITO DO ULTRASSOM E *HEAT-MOISTURE* NA DIGESTIBILIDADE
IN VITRO DE AMIDO DE MILHO COMERCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís de Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio Yamashita
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Márcio Schmiele
Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Londrina, 30 de setembro de 2022.

Dedico este trabalho a minha família,
amigos e colegas, pelos incentivos e apoios
constantes.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar o primordial agradecimento às cientistas: **Prof^a. Dr^a. Célia Maria Landi franco e Dr^a. Flávia Villas Boas**, pela atenção dedicada e o apoio técnico.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa concedida.

Um agradecimento especial a minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Thaís de Souza Rocha** pelo suporte no tempo que lhe coube, pelas suas correções, incentivos e pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

À secretaria de Pós-graduação, na pessoa **Sandra Rezende**.

Aos responsáveis pelos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, **Marli, Patrícia, Alessandra e Rubens**.

Agradeço à **Universidade Estadual de Londrina**, que forneceu o espaço físico e pela oportunidade de fazer o curso, pelo ambiente criativo e amigável que proporciona, pela infraestrutura e ensino de referência.

Aos **demais Professores do Programa**, que nos presenteiam com suas aulas e conhecimentos, terão os meus eternos agradecimentos.

Gostaria de deixar registrado também o meu reconhecimento a **minha família**, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio.

Agradeço a minha **mãe, Aguida Piai**, minha heroína que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Meus agradecimentos aos **colegas, amigos, companheiros e “irmãos”** que fizeram parte nessa etapa e que vão continuar presentes em vida com certeza.

Enfim, **a todos** que não tiveram seus nomes mencionados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para essa etapa de conhecimento e mudança.

O meu muito obrigado!

LINO, Thiago Henrique de Lima. **Efeito do ultrassom e *heat-moisture* na digestibilidade in vitro de amido de milho comercial**. 2022. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A principal fonte energética da alimentação humana é o amido. Os amidos são utilizados em variadas aplicações, principalmente na indústria de alimentos. Os amidos nativos e/ou modificados por ação enzimática ou física podem ser empregados nos rótulos com o nome genérico “amidos”, sem a necessidade de declarar “modificados”, considerando que estes amidos não passaram por processos químicos que podem de alguma forma conter resíduos. O tratamento físico de amidos pode oferecer uma alternativa aos processos de modificação química, garantindo efetividade sobre as propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, ampliando suas aplicações. Modificações físicas também podem alterar o perfil de digestão dos amidos. Amidos lentamente digeríveis (SDS) proporcionam um aumento lento dos níveis de glicemia pós-prandial e níveis estáveis de glicemia por algum tempo, o amido rapidamente digerível (RDS), apresenta oscilações mais agudas do índice glicêmico. Os benefícios para a saúde do SDS estão ligados a um metabolismo equilibrado da glicose e controle da saciedade. Com o objetivo de ampliar o teor de SDS através de modificações físicas por tratamento com ultrassom (US) seguido por tratamento *heat-moisture* (HMT), foram realizados planejamentos experimentais com amido de milho para verificar as condições ideais dos tratamentos por US e HMT, considerando os fatores, efeitos e interações. A partir daí, foi modificado uma amostra de amido de milho, em diversos níveis das variáveis de amplitude e tempo aplicados no tratamento por US e temperatura e tempo aplicados no tratamento por HMT. Esses amidos foram avaliados quanto a digestibilidade in vitro através de solução enzimática controlada que simula a digestão. Foi possível otimizar o teor de SDS através de modificações físicas por US e HMT utilizando a metodologia de superfície de respostas. O tratamento combinado não provocou alterações estruturais na superfície dos grânulos ou variação significativa nas temperaturas e entalpia de gelatinização após o tratamento. O perfil polimórfico de difração de raios-x do tipo A característico de amido de milho permaneceu inalterado após os diferentes tratamentos. Foi observada uma correlação positiva da cristalinidade relativa com os teores de SDS e amido resistente (RS) somados, sugerindo que o US como tratamento prévio pode favorecer o melhor empacotamento das duplas hélices no HMT, tornando o amido menos suscetível ao ataque de enzimas digestivas. Também foi possível obter teores mais elevados de SDS através da modificação combinadas por tratamento US e HMT, quando comparado ao amido tratado apenas por HMT. O maior teor de SDS ($27,4 \pm 1,9$ %) foi obtido nas condições de 9,0% de amplitude no US por 5,0 minutos, seguido por tratamento HMT à $74,0^{\circ}\text{C}$ por 11,0 minutos. O ponto otimizado obtido pela superfície de resposta, baseando-se nos pontos estacionários, foi observado em 9,0% de amplitude aplicada no tratamento por US durante 4,91 minutos e em $73,51^{\circ}\text{C}$ durante 11,95 minutos tratamento no HMT.

Palavras-chave: Planejamento experimental. Cristalinidade. Raio-X. DSC. Índice glicêmico.

LINO, Thiago Henrique de Lima. **Effect of ultrasound and heat-moisture on the in vitro digestibility of commercial corn starch**. 2022. 66p. Dissertation (Master's in food science) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

The main energy source of human food is starches. Starches are used in a variety of applications, especially in the food industry. Native and / or modified enzymatic or physical starches may be used on labels with the generic name "starches" without the need to declare "modified", considering that these starches have not undergone chemical processes that may in some way contain waste. Physical treatment of starches can offer an alternative to chemical modification processes, ensuring effectiveness on physicochemical properties and consequently improving their functional and technological applications. Physical modifications can also alter the digestion profile of starches. Slowly digestible starches (SDS) provide a slow increase in postprandial blood glucose levels and stable blood glucose levels for some time, while rapidly digestible starch (RDS) exhibits more acute fluctuations in glycemic index. The health benefits of SDS are linked to a balanced glucose metabolism and satiety control. In order to develop SDS through physical modifications by ultrasound (US) treatment followed by heat-moisture treatment (HMT), experimental designs with corn starch were performed to verify the ideal conditions of US and HMT, considering the factors, effects and interactions. From there, a sample of corn starch was modified, at different levels of the variables of amplitude and time applied in the treatment by US and temperature and time applied in the treatment by HMT. These starches were evaluated for in vitro digestibility using enzymatic solution. It was possible to optimize the SDS content through physical modifications by US and HMT, using the response surface methodology. The combined treatment did not cause structural changes on the surface of the granules or significant variation in temperatures and enthalpy of gelatinization after treatment. The type A polymorphic X-ray diffraction profile characteristic of corn starch remained unchanged after the different treatments. A positive correlation of the relative crystallinity with the levels of SDS and resistant starch (RS) was observed, suggesting that the US as a previous treatment, can favor the better packing of the double helices in the HMT, making the starch less susceptible to the attack of digestive enzymes. It was also possible to obtain higher levels of SDS through the combined modification by US and HMT treatment, when compared to starch treated only by HMT. The highest SDS content ($27.4 \pm 1.9\%$) was obtained under conditions of 9.0% amplitude at US for 5.0 minutes, followed by HMT treatment at 74.0°C for 11.0 minutes. The optimized point obtained by the response surface, based on the stationary points, was observed at 9.0% of amplitude applied in the US treatment for 4.91 minutes and at 73.51°C during 11.95 minutes in the HMT treatment.

keywords: Experimental design. Crystallinity. X-ray. DSC. Glycemic Index.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 01		Pág
Figura 1 - Estruturas químicas e representações esquemáticas da amilose (a) e amilopectina (b)		17
Figura 2 - Representação esquemática dos diferentes níveis estruturais do grânulo de amido e envolvimento de amilose e amilopectina		20
Figura 3 - Diagramas de difração de raios X dos tipos A, B e C de amido.....		21
 Capítulo 02		 Pág
Figura 1 - Gráficos de contorno e respectivas superfície de respostas obtida no planejamento. A) tempo no US em min; B) temperatura em °C; e C) tempo no HMT em min.....		51
Figura 2 - Difração de raios X de amido de milho nativo e modificados por ultrassom e <i>heat-moisture</i>		53
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura do milho nativo e tratados (5000x).....		58
 Anexo 01		 Pág
Figura 1 - Recurso Online 2 - Superfície de resposta da interação entre o ponto B e C. B) tempo no US em min; e C) temperatura em °C.....		65
Figura 2 - Recurso Online 3 - Gráfico de contorno. A) Amplitude em %; B) tempo no US em min; C) temperatura em °C; e D) tempo no HMT em min.....		66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 01		Pág
Tabela 1 - Proporções típicas de massa amilose-amilopectina para amidos de milho.....		19
Capítulo 02		Pág
Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis de variação aplicados ao primeiro planejamento.....		44
Tabela 2 - Codificação dos ensaios do planejamento experimental 2 ³ e respectivas respostas.....		50
Tabela 3 - Índices de cristalinidade e propriedades térmicas de amido de milho nativo e modificados por ultrassom e <i>heat-moisture</i> ..		54
Anexo 01		Pág
Tabela 1 - Recurso Online 2 – Codificação dos ensaios do terceiro planejamento e respectivas respostas.....		64
Tabela 2 - Recurso Online 4 – Pontos do steepest ascent, caminho de ascensão da variável dependente.....		66

SUMÁRIO

CAPITULO 1	11
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
1.3 AMIDOS	16
1.3.1 Estrutura dos Grânulos de Amido	17
1.3.2 Modificações em Amidos.....	22
1.3.2.1 Ultrassom	23
1.3.2.2 Tratamento por <i>heat-moisture</i>	26
1.3.3 Digestibilidade de amidos e efeitos no organismo humano.....	27
1.4 PLANEJAMENTO FATORIAL	30
1.4.1 Planejamento Experimental Fracionado.....	31
1.4.2 Superfícies de Resposta	31
1.4.3 Método <i>Steepest Ascent</i>	32
1.4.4 Planejamento: Ajustar o Modelo de Segunda Ordem	33
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO 2	39
2.1 INTRODUÇÃO	41
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.2.1 Materiais.....	43
2.2.2 Modificação por ultrassom (US)	43
2.2.3 Modificação pelo tratamento <i>heat-moisture</i>	43
2.2.4 Otimização da Modificação do amido.....	44
2.2.5 Perfil de digestibilidade in vitro	45
2.2.6 Padrão de difração de raios-X e cristalinidade	46
2.2.7 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	46
2.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura	47
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
2.3.1 Planejamentos prévios	47
2.3.2 Otimização da modificação do amido.....	49
2.3.3 Padrão de difração de raios-X e cristalinidade relativa.....	53
2.3.4. Propriedades Térmicas	55
2.3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.	56
2.4 CONCLUSÃO.....	59
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO 01: Materiais suplementares (Recurso Online).....	64

CAPITULO 1
INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

1.1 INTRODUÇÃO

O amido é o principal carboidrato presente na alimentação humana e supre a maior parte da necessidade energética na alimentação humana, além de fornecer glicose para síntese de compostos estruturais da célula, aminoácidos não essenciais e ácidos graxos (MIAO et al., 2015; HASEK et al., 2018; DING et al., 2020). Os amidos estão disponíveis nas mais variadas origens botânicas e podem ser modificados (CEREDA; VILPOUX, 2005). De todo o amido isolado industrialmente, cerca 50% é consumido após alguma forma de modificação física ou química (ALISTAR; GLYN; PETER, 2006).

Segundo Englyst, Kingman, Cummings (1992) e Miao et al. (2015), o amido pode ser classificado em três categorias conforme a taxa e a extensão da digestibilidade desse carboidrato; amido rapidamente digerível (RDS), amido lentamente digerível (SDS) e amido resistente (RS). O RDS representa a fração do amido digerida em 20 minutos in vitro. O SDS é a porção digerida entre 20 e 120 minutos, e o RS é a fração não digerida até 120 minutos. Alimentos à base de amido, cuja maior porção deste é composta por RS e SDS, são considerados bases alimentícias de baixa carga glicêmica e, por sua vez, reduzem a síntese e o nível plasmático de lipídios, prevenindo o aparecimento de doenças coronárias e diabetes tipo-2 (LI et al., 2019; DING et al., 2020). Sendo assim, tais benefícios têm contribuído para agregar valor aos alimentos à base de amido com alto teor de RS e SDS.

Amidos lentamente digeríveis proporcionam um aumento lento dos níveis de glicemia pós-prandial e níveis estáveis de glicemia pós-prandial, já o amido rapidamente digerível, apresenta oscilações mais agudas do índice glicêmico. Os amidos resistentes, que não são digeridos no trato gastrointestinal, têm funcionalidade semelhante à das fibras alimentares. Os benefícios para a saúde do amido lentamente digerível estão ligados a um metabolismo equilibrado da glicose e controle da saciedade, podendo reduzir o risco de desenvolvimento de diabetes tipo-2 e contribuir para o controle de peso (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; LEHMAN; ROBIN, 2007; LI et al., 2019; DING et al., 2020)

A taxa de digestibilidade do amido pode ser alterada por diversos fatores tais como a proporção de amilose/amilopectina (DING et al., 2020), interação do amido com lipídios e proteínas (AI; HASJIM; JANE, 2013); e por métodos de modificação química, física e enzimática desse carboidrato. O tratamento físico de amidos pode

ser uma alternativa aos processos de modificação química, garantindo efetividade sobre as propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, melhorando suas aplicações tecnológicas e funcionais, alterando sua digestibilidade (XING et al., 2017). Além disso, o amido modificado fisicamente pode ser considerado como natural e um ingrediente seguro, livre de compostos químicos, portanto, pela legislação brasileira (BRASIL, 1997), sua adição em alimentos segue os critérios de amido natural e não de amido modificado. Essa é uma grande vantagem quando comparado aos amidos modificados quimicamente (MENDES et al., 2019), pois podem ser declarados nos rótulos dos alimentos com o termo genérico “amido”, levando em consideração que alterações por processos químicos, os quais possivelmente podem conter resíduos, legalmente devem ser declarados como “amido modificado” nos rótulos dos alimentos (BRASIL, 1997).

Dentre os métodos de modificação física vale destacar o processamento por ultrassom. O processamento de alimentos por ultrassom é altamente eficiente, ecologicamente adequado e é um método que vem se destacando nesse setor industrial. Tal técnica é muito empregada na extração do amido, porém, também pode ser utilizado como um agente modificador deste, devido à capacidade que as forças cavitacionais têm sobre os grânulos de amidos, sendo capaz de partir e até mudar seu perfil de gelatinização (JAMBRAK et al., 2010, DING et al., 2020, HAN et al., 2021). Além disso, o ultrassom pode causar mudanças na estrutura supramolecular do amido, se utilizado com baixa intensidade e curto tempo, podendo promover apenas pequenas alterações estruturais indistinguíveis do amido nativo em alguns aspectos (DING et al., 2020).

O tratamento *heat-moisture* (HMT) é outro método de modificação física que altera as propriedades físico-químicas do amido. Esse procedimento ocasiona aumento da temperatura de gelatinização devido a alteração do perfil cristalino/amorfo do grânulo de amido (MIAO et al., 2015). Essa técnica envolve tratamento do amido em baixos níveis de umidade (<35% w/w) e temperatura entre 84-120°C por um período de 15 minutos a 16 horas (CHUNG; LIU; HOOVER, 2009; BARUA; SRIVASTAV, 2017; XING et al., 2017). É mais aplicado onde se deseja alta estabilidade térmica, porém, resulta em um amido com um baixo poder de inchamento e baixa viscosidade (HOOVER, 2010; KLEIN et al., 2013). Tal técnica tem sido utilizada por muitos autores recentemente para modificar a digestibilidade do amido tornando-o lentamente digerível (YASSAROH et al., 2019; LIAO et al., 2019; HONG

et al., 2019).

Quando os dois tratamentos, ultrassom e HMT são considerados separados, são observados efeitos específicos de cada tratamento, porém, quando associados podem apresentar efeitos positivo no teor de SDS e AR, que, por sua vez, possui interesse funcional, tecnológico e comercial. As pequenas alterações estruturais provocadas pelo tratamento por ultrassom a baixa intensidade (ZUO et al., 2009, 2012), pode permitir que um melhor rearranjo das moléculas de amido ocorra durante o tratamento por *heat-moisture*. Assim, pode-se otimizar a alteração no perfil cristalino do grânulo de amido, tornando-o mais resistente à hidrólise enzimática no processo digestivo (XING et al., 2017; HAN et al, 2021).

Utilizar um planejamento experimental representa uma estratégia para otimizar este efeito, garantido que o ponto de ótimo na resistência à hidrólise seja encontrado. Os estudos de planejamentos fatoriais são mais eficientes do que experimentos de um fator por vez quando utilizados para otimização de resultados e podem predizer quando interações estão presentes evitando conclusões precipitadas, além de permitir estimar os efeitos de um fator em vários níveis dos outros fatores, predizendo uma variedade de condições experimentais (MONTGOMERY, 2017), visando o maior teor de amido lentamente digerível.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Otimizar o teor de amido lentamente digerível em amido de milho, verificando o perfil de digestibilidade do amido, através de um planejamento experimental das modificações físicas combinadas de ultrassom e tratamento *heat-moisture*.

1.2.2 Objetivos Específicos

Verificar as condições ideais dos tratamentos por ultrassom e *heat-moisture* por meio de planejamento experimental considerando os fatores, efeitos e interações para a obtenção de amido lentamente digerível;

Verificar a digestibilidade *in vitro* dos amidos modificados;

Avaliar as alterações estruturais dos amidos que resultaram no aumento da fração de amido lentamente digerível.

1.3 AMIDOS

Um dos grandes grupos de biomoléculas mais abundantes na natureza são os carboidratos, assim denominados devido a sua estrutura constituída de hidratos de carbono. Dentre estes carboidratos a principal fonte energética da alimentação humana é constituída de amidos, cerca de 75% (BLENNOW, 2018; AI; JANE, 2018; PINHEIRO et al., 2005).

Historicamente, o amido é de grande importância para o desenvolvimento dos seres humanos. A introdução de amido de grãos e tubérculos na dieta foi essencial para evolução. Forneceu carboidratos acessíveis para promover aumento significativo no tamanho do cérebro. Já recentemente, o consumo crescente e escalonado de carboidratos glicêmicos, especialmente amido, exige o desenvolvimento de tipos de amidos mais resistentes à digestão e menos glicêmicos. A aplicação de tecnologias em amidos pode ajudar na geração do chamado amido lentamente digerível e/ou resistente (BLENNOW, 2018).

Os amidos estão disponíveis em grande quantidade e são considerados uma matéria-prima renovável, biodegradável e não tóxica. Além dos açúcares simples, o amido é o principal carboidrato produzido por plantas superiores através da fotossíntese (BLENNOW, 2018; CEREDA; VILPOUX, 2005; YASSAROH et al., 2019), que de uma forma resumida, consiste em um processo biológico no qual a energia solar é capturada e armazenada através de uma série de reações que converte a energia da luz em energia bioquímica necessária para sustentar a vida (AI; JANE, 2018; BLANKENSHIP, 2002).

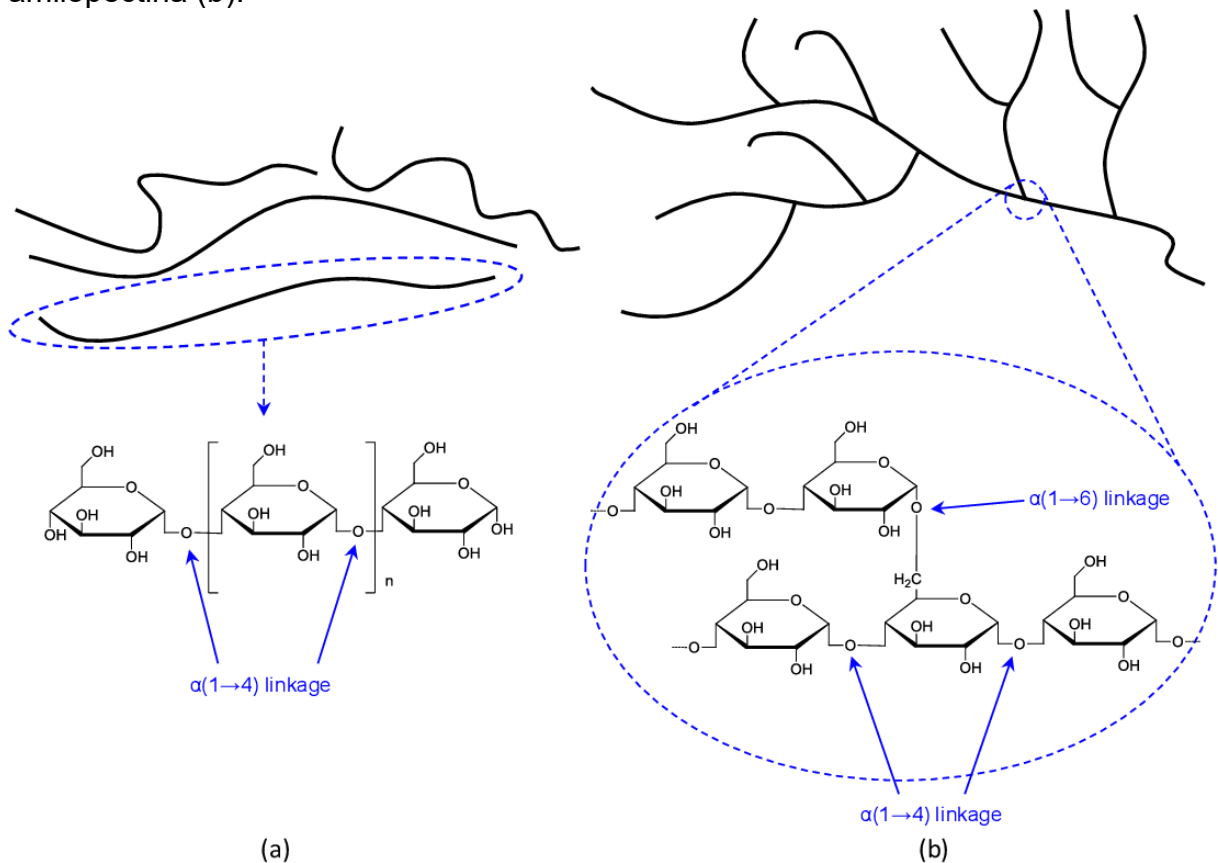
Amidos são comumente encontrados em sementes (cereais e leguminosas), tubérculos e raízes (batata, mandioca, batata doce), frutas (banana e abóbora), caules (sagu) e folhas (tabaco). O amido é o componente predominante dos grãos de cereais, leguminosas, tubérculos e raízes. Por exemplo, grãos de milho moídos podem conter até 80% de amido (base seca). Algumas fontes como cereais, sementes, tubérculos e certos frutos possuem de 30 a 80% de seus sólidos totais em amido (AI; JANE, 2018; SOUZA et al., 2013; ALISTAR; GLYN; PETER, 2006). O milho, que é uma das principais fontes de amido, desde 2005, tem sua produção no mundo em crescimento, e em 2020 superou a marca de 1 bilhão e 420 milhões de toneladas; os Estados Unidos da América lidera como maior produtor mundial, seguido da China e Brasil. No ano de 2020, o Brasil, como terceiro maior produtor, alcançou sozinho a quantia de

104 milhões de toneladas (FAO, 2022).

1.3.1 Estrutura dos Grânulos de Amido

O amido é um homopolímero constituído de resíduos de α -D-glicose e se apresenta de duas formas distintas dentro do grânulo, são elas a amilose e amilopectina representadas na Figura 1 (LIU et al., 2009; AI; JANE, 2018; BERTOFT, 2018; CEREDA 2001).

Figura 1 - Estruturas químicas e representações esquemáticas da amilose (a) e amilopectina (b).



Fonte: Xie et al. (2013).

A amilose é um homopolissacarídeo constituído predominantemente de ligações glicosídicas α -(1-4) e apresenta quase nenhuma ramificação de ligações α -(1-6), o que lhe permite comportamento semelhante às moléculas estritamente lineares. A amilopectina, assim como a amilose, é um homopolissacarídeo formado

por cadeias lineares de ligações α -(1-4), porém, é altamente ramificada, com 5 a 6% de ligações α -(1-6) nos pontos de ramificação. A grande maioria dos amidos apresentam conteúdo de 20 a 30% de amilose e 70 a 80% de amilopectina, essa proporção pode variar em função da fonte botânica (AI; JANE, 2018; BERTOFT, 2018; CEREDA, 2001). No entanto, é possível se obter amidos com diferentes proporções de amilose/amilopectina, através de plantas modificadas geneticamente para produzir estes amidos com características específicas (BERTOFT, 2018; BLENNOW, 2018; AI; JANE, 2018).

O amido organiza-se em uma estrutura microscópica, onde camadas de amilose e amilopectina são continuamente depositadas radialmente em torno de um ponto central denominado hilo, dando origem a uma estrutura parcialmente cristalina. Esta estrutura microscópica é morfologicamente identificável e denominada de grânulo de amido (BERTOFT, 2018; AI; JANE, 2018; CEREDA 2001; ALISTAR; GLYN; PETER, 2006). Os diferentes níveis estruturais do grânulo de amido podem ser observados na Figura 2.

Nas células vegetais, os grânulos são envoltos em uma estrutura de matriz proteica denominada amiloplastos. O formato e tamanho estrutural do grânulo está fortemente ligado ao desenvolvimento na célula viva (CEREDA, 2001). Embora existam diferenças na estrutura pela fonte vegetal, de modo geral, o grânulo é um conjunto esferocristalino de moléculas de amilopectinas dirigidas radialmente e com extremidades externas não redutoras. As cadeias de amilose estão associadas às ramificações da amilopectina na forma de hélices ou associadas à lipídeos estendidos nas regiões mais externas (AI; JANE, 2018).

O monoacilglicerol, presente nos amidos de cereais (difícilmente extraído por solventes orgânicos), e algumas proteínas estão envolvidos na organização dos grânulos, além da água que também é um constituinte natural da estrutura do grânulo e tem participação no processo de hidratação, inchamento e dissolução dos grânulos (ALISTAR; GLYN; PETER, 2006).

Os grânulos de amido de milho (*Zea mays* L.), regularmente apresentam formatos redondo a poligonal, com diâmetro médio de 14 μ m (CEREDA, 2001). A manipulação genética de milho é uma das realizações de sucesso mais destacadas em nosso tempo, e produz características desejáveis a aplicação. O teor de amido do grão de milho é cerca de 75% com uma proporção de aproximadamente de 1:3 entre amilose e amilopectina para a maioria dos amidos comerciais (Tabela 1), no entanto,

é possível grandes variações com a influência genética. Em milho com elevado teor de amilose, a proporção no amido entre amilose e amilopectina pode ser superior a 7:3, já o milho ceroso possui amido composto quase que estritamente de amilopectina (BLENNOW, 2018; ALISTAR; GLYN; PETER, 2006).

Nos amidos, a concentração amilose/amilopectina é um fator que influi nas características viscosográficas, inclusive de amidos modificados (SOUZA et al. 2013).

Tabela 1 - Proporções típicas de massa amilose-amilopectina para amidos de milho.

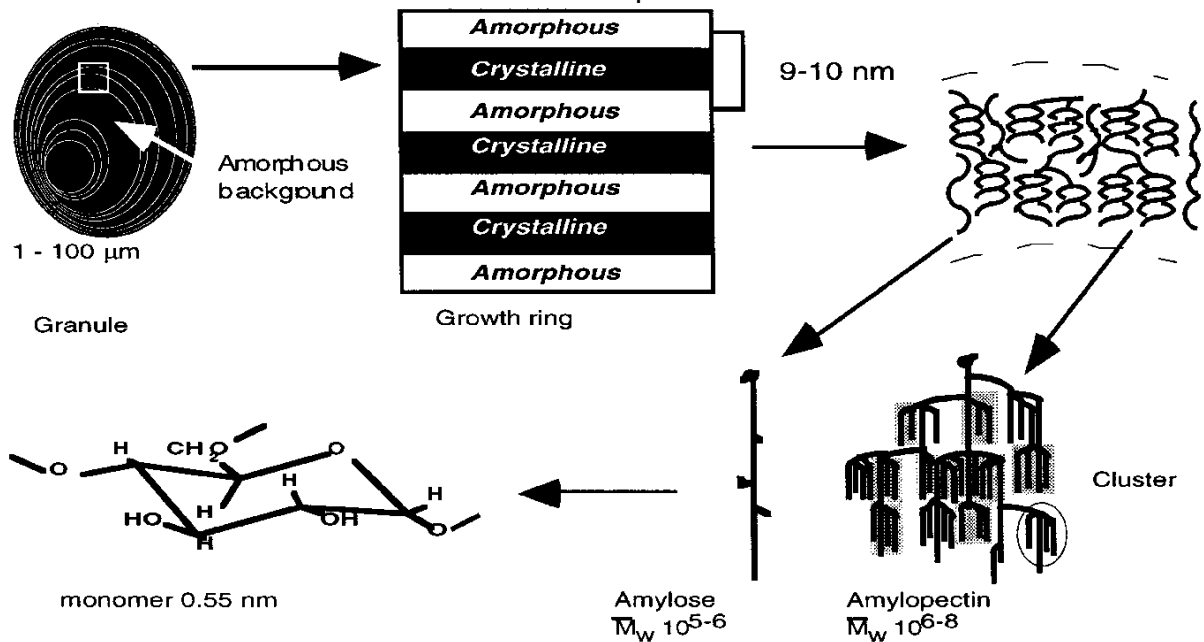
Tipo de amido	Amilose (%)	Amilopectina (%)
Alto teor de amilose	50-85	15-50
Comum	26	74
Ceroso	1	99

Fonte: Alistar, Glyn e Peter (2006).

As regiões cristalinas estão interligadas por cadeias laterais de amilopectina dispostas em duplas hélices que se compactam em uma rede tridimensional produzindo cristalitos orientados radialmente. A fase amorfa é menos ordenada e se localiza nos pontos de ramificação das cadeias laterais da amilopectina com alguma amilose (ALISTAR; GLYN; PETER, 2006). Diferentes características reológicas, térmicas e de solubilidade estão relacionadas às características estruturais dos grânulos de amido. Os grânulos no estado semicristalino, apresentam cristais polimórficos e de diferentes graus de cristalinidade (BULÉON et al., 1998) influenciando na angulatura da difração de raios-X baseado no empacotamento de duplas hélices (ZANELA et al., 2015).

A característica semicristalina do grânulo é resultado da coexistência das moléculas de amilose e amilopectina dentro do grânulo. A cristalinidade é atribuída principalmente à amilopectina pela sua facilidade em formar agregados compactos unidas por ligações de hidrogênio formando estruturas em dupla hélice entre ela ou com a co-cristalização da amilose que esteja estreitamente próxima. A fração amorfa está mais associada às ramificações da amilopectina e amilose (SILVA et al., 2021; JANE, 2009). A composição dos grânulos e a forma que estão arranjados determinam estrutura de camadas com regiões alternadas de alto e baixo índice de refração, densidade, cristalinidade e resistência ao ácido e enzimas (BULÉON et al., 1998; TESTER et al., 2004; JANE, 2006, BERTOOF, 2007, SALMAN et al., 2009).

Figura 2 - Representação esquemática dos diferentes níveis estruturais do grânulo de amido e envolvimento de amilose e amilopectina.



Fonte: Buléon et al. (1998).

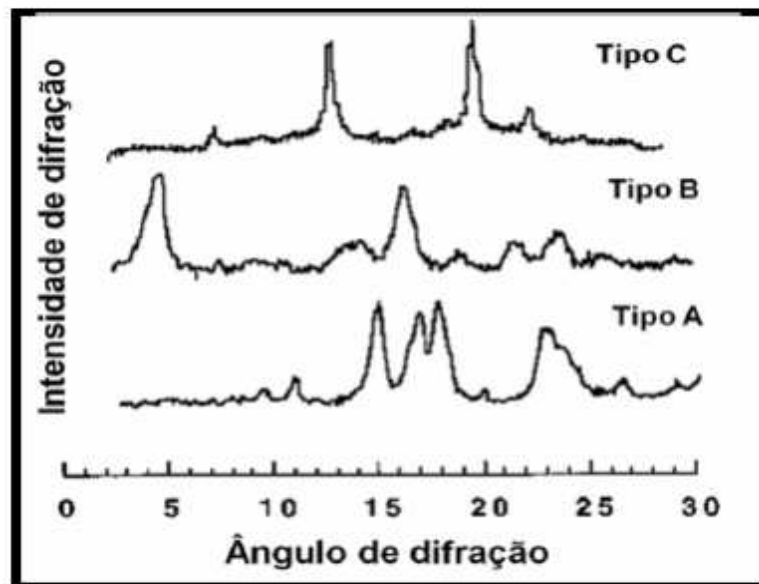
As micelas cristalinas dentro da fração de amilopectina conferem insolubilidade em água fria (devido à presença de numerosas ligações de hidrogênio), ou seja, uma estrutura mais compacta apresenta maior resistência ao rompimento do grânulo e, conseqüentemente, reduz a sua susceptibilidade ao ácido e às enzimas. A região amorfa proporciona locais para absorção de água, facilitando a mobilidade dentro dos grânulos, o que facilita a desorganização estrutural (AI; JANE, 2018; ALISTAR; GLYN; PETER, 2006).

As ligações de hidrogênio entre as hidroxilas das cadeias de amilopectina resultam na formação da estrutura externa de dupla hélice. As cadeias lineares (amilose) são empacotadas formando ligações de hidrogênio com cadeias externas de amilopectina (AI; JANE, 2018; BULÉON et al., 1998; CORRADINI et al., 2005; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; HOOVER, 2010). Os grânulos de amido que necessitam de mais energia para dissociar e solubilizar são os que apresentam mais ligações de hidrogênio e ordens mais elevadas de cristalinidade. Estes apresentam picos mais agudos no padrão de difração de raios-X e temperatura de gelatinização mais elevados (AI; JANE, 2018; CEREDA, 2001).

Os amidos nativos podem ser classificados em três padrões polimórficos de cristalinidade, os do tipo A, os do tipo B e os do tipo C, inclusive podem ser

classificados através da análise de difração de raios-X (Figura 3). Estrutura do tipo A possui comprimentos de cadeia de amilopectina de 23 a 29 unidades de glicose, este padrão é comum em cereais. A estrutura do tipo B consiste em comprimentos de cadeia de amilopectina de 30 a 44 moléculas de glicose com água intercalada, este é o padrão usual de amidos de tubérculos, na batata crua e na banana. A estrutura do tipo C é constituída por comprimentos de cadeia de amilopectina de 26 a 29 moléculas de glicose, é uma combinação do tipo A e do tipo B e é característico de amidos de leguminosas, alguns tubérculos e raízes (AI; JANE, 2018; BULÉON et al., 1998; CORRADINI et al., 2005; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; HOOVER 2010). O amido de tipo A possui uma célula unitária monocíclica, que está empacotada com 4 moléculas de água. O amido de tipo B possui uma célula unitária hexagonal, que é empacotada com 36 moléculas de água por unidade de célula (HOOVER, 2010).

Figura 3 - Diagramas de difração de raios X dos tipos A, B e C de amido.



Fonte: Buléon et al. (1998).

Amidos com cristalinidade do tipo A apresentam picos de intensidade nos ângulos de difração a 2θ em aproximadamente $15,3^\circ$; $17,1^\circ$; $18,2^\circ$ e $23,5^\circ$; tipo B em aproximadamente $5,6^\circ$; $14,4^\circ$; $17,2^\circ$; $22,2^\circ$ e 24° ; tipo C em aproximadamente $5,6^\circ$; $15,3^\circ$; $17,3^\circ$ e $23,5^\circ$ (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006).

1.3.2 Modificações em Amidos

Para atender as demandas dos consumidores por alimentos seguros e de alta qualidade, produzidos por sistemas de produção ecológicos e limpos, novas estratégias são necessárias (BLENNOW; 2018).

O amido não modificado (nativo) possui aplicações limitadas. Amidos modificados, são aqueles que tiveram uma ou mais de suas características estruturais e/ou tecnológicas originais alteradas por um tratamento, observando as boas práticas de fabricação quando estes forem destinados à alimentação. A modificação tem a finalidade de intensificar ou inibir determinadas características, ampliando sua aplicação, além de melhorar seu desempenho, conseguindo melhorar consistência, poder aglutinante, incrementar estabilidade, melhorar palatabilidade, geleificar, dispersar e turvar (SOUZA et al., 2013).

A escolha do amido modificado ou nativo é definida de acordo com as propriedades requeridas numa aplicação (ALISTAR; GLYN; PETER, 2006). As modificações de amidos podem ser genéticas, químicas, físicas, ou enzimáticas, ou ainda uma combinação entre elas (SOUZA et al., 2013).

Modificações físicas dos amidos são as modificações que produzem alterações nas propriedades do amido efetuadas pelo tratamento unicamente físico e que não introduza nenhuma modificação química ao amido. Os tratamentos físicos, geralmente são divididos em térmicos e não térmicos, embora, alguns tratamentos classificados como não térmicos possam ter um componente térmico (BEMILLER, 2018).

As modificações físicas e enzimáticas do amido são de interesse na indústria, pois estes processos não envolvem nenhum produto químico, e seu uso não é restringido pela legislação (XING et al., 2017; BEMILLER, 2018).

As características obtidas nos amidos podem variar em função das diferentes condições de tratamento e alteradas fontes botânicas. Por essa razão as condições sob as quais o amido é tratado pode impactar consideravelmente nos resultados (BEMILLER, 2018).

A modificação física por ultrassom ou *heat-moisture* são interessantes no ponto de vista tecnológico, pois são capazes de alterar o perfil de gelatinização e a fração cristalino/amorfo.

Já foram observados em amidos tratados por *heat-moisture*, mudanças no

padrão de difração de raios-X (B a A + B) e o aumento ou diminuição da susceptibilidade as enzimas digestivas (CHUNG; LIU; HOOVER, 2009), o que fornece evidências de que é possível retardar a digestão destes amidos.

1.3.2.1 Ultrassom

A modificação física de amidos por ultrassom vem sendo bastante estudada (HAN et al., 2021; JAMBRAK et al., 2010; ZUO et al., 2009; SEGUCHI; HIGASA; MORI, 1994; ZUO et al., 2012; WANG; WANG, 2004; LUO et al., 2008).

Ultrassom (US) é o som que está acima do limite do ouvido humano, valores acima de 18 KHz. O ultrassom pode ser dividido em três regiões de frequência, são de 18 a 100 KHz, de 100 KHz até 1 MHz e de 1 até 10 MHz, que são denominados como ultrassom de potência, ultrassom de alta frequência e ultrassom de diagnóstico, respectivamente. Transdutores criam vibrações de alta energia gerando o ultrassom que emite vibrações que são amplificadas e transferidas para o fluido através do contato com uma sonda (*probe*) ou sonotrodo (JAMBRAK et al., 2010).

O tratamento com ultrassom é um processo que gera aquecimento local intenso e altas tensões de cisalhamento. O interesse nos efeitos do ultrassom nos amidos decorre do fato de que o ultrassom de baixa frequência (18 - 100 kHz) pode ser usado no processamento de alimentos. O tratamento ultrassônico de amidos é realizado em sistemas aquosos. As variáveis que interferem nesse processo são: a natureza do meio (pressão de vapor e tensão superficial), concentrações de gases dissolvidos, temperatura, tempo de tratamento, concentração de amido, potência, frequência e amplitude (BEMILLER, 2018).

O tratamento por ultrassom do amido pode oferecer uma alternativa aos processos de modificação química, proporcionando impacto direto sobre as propriedades físico-químicas das suspensões de amidos (BEMILLER, 2018, ZUO et al., 2009). Esta alternativa é considerada livre de efluentes e é de grande interesse na indústria alimentícia, vem se tornando um foco de pesquisa e desenvolvimento, pois possibilita a redução ou substituição de processos químicos com finalidade de substituir, aperfeiçoar ou acelerar processos convencionais (BERNADO et al., 2016; BEMILLER, 2018).

As possíveis alterações incluem danos à superfície do grânulo (erosão,

corrosão e rachaduras), aumento do poder de inchamento, solubilidade, dureza e adesividade do gel, redução da viscosidade da pasta e coeficiente de consistência. Estas mudanças são consistentes com enfraquecimento das estruturas granulares (BEMILLER, 2018).

A energia ultrassônica quando insuficiente para alterar ou distorcer, os cristalitos do grânulo, pode afetar as regiões amorfas e talvez interrompa e/ou destrua a ordem de dupla hélice em regiões amorfa e cristalina. Outro possível resultado do tratamento ultrassom é a despolimerização do amido em dextrinas. Amidos do tipo B podem ser mais suscetíveis ao tratamento ultrassônico do que os amidos do tipo A (BEMILLER, 2018).

A aplicabilidade do ultrassom se dá pelo fato de que o grânulo de amido pode ser modificado pelas forças cavitacionais, além de utilizar menos energia quando comparado aos outros métodos convencionais de modificação de amidos para produtos alimentares (JAMBRAK et al., 2010; BEMILLER, 2018).

O tratamento por ultrassom cria fraturas, poros e trincas nas superfícies granulares, e pode aumentar a área superficial do amido, facilitar a penetração de agentes na estrutura granular, e acelerar as reações químicas (ABEDI; POURMOHAMMADI; ABBASI, 2019). As dispersões de amidos podem ser afetadas de três formas quando submetida ao ultrassom: os grânulos de amidos podem sofrer danos, acarretando em fissuras; a amilose e amilopectina podem sofrer redução de peso molecular devido à ruptura de ligações covalentes entre carbonos reduzindo a viscosidade; e os grânulos agregados ou dilatados podem ser solubilizados (ZUO et al., 2009), inclusive os grânulos que resistem à gelatinização devido à presença de lipídios e proteínas na superfície (DEBET; GIDLEY, 2007). Estes efeitos vão variar de acordo com a frequência, temperatura, tempo, poder do tratamento ultrassom e propriedades do amido, tais como a origem e concentração da dispersão de amido (ZUO et al. 2009).

Jambrak et al. (2010) examinaram o efeito do tratamento de ultrassom nas propriedades físicas e reológicas de amidos. Utilizaram a frequência de 24 KHz através de sonda e banho, em diferentes intensidades em períodos de 15 e 30 minutos. Os autores puderam observar que o tratamento de ultrassom distorce a região cristalina em grânulos de amido, o que resulta no cisalhamento da estrutura granular. Os autores observaram também queda de viscosidade, queda da entalpia de gelatinização e aumento do poder de dilatação nas amostras conforme foram

aumentando a intensidade do ultrassom. A dilatação do grânulo está diretamente associada à capacidade de absorção de água e a solubilidade dos grânulos de amidos. O ultrassom possibilita ao grânulo, facilidade para entrada de água, devido às rupturas mecanicamente ocasionadas pelo colapso das bolhas de cavitação.

Seguchi, Higasa e Mori (1994) estudaram o tratamento de ultrassom na estrutura de amido de trigo sob diferentes tempos (300 a 2700 segundos) e sob a temperatura de 40°C, onde puderam observar que a solução se tornava mais translúcida e a viscosidade diminuía conforme o tempo aumentava. Também foi observado redução do peso molecular sugerindo quebra de ligações durante o processo de sonicação. Os autores também reportam que os grânulos e aglomerados de amido tendem a sofrer fissuras e quebras com o aumento do tempo durante o processo de ultrassom.

Zuo et al (2009) investigou o comportamento aderência de uma suspensão de amido de arroz ceroso submetido ao processo de ultrassom em diferentes temperaturas (25 a 70°C) por períodos de até 60 minutos. Foram aplicadas potências de 2,5 e 4,1 W com uma frequência de 211 KHz. Considerando a área do transdutor utilizado (22,75 cm²), as intensidades de sonicação foram respectivamente 0,11 e 0,18 W/cm². Neste estudo, não foi observado degradação macromolecular nem danos à superfície do grânulo. Os autores também reportam que os efeitos nos grânulos estão ligados ao poder de sonicação, à frequência, à temperatura e ao tempo em que é aplicado nas dispersões de amido.

Suspensões de amidos submetidas sob as frequências próximas de 631 KHz apresentaram as mesmas propriedades de pasta que suspensões não tratadas por ultrassom. Portanto, as frequências baixas são de maior interesse, pois influenciam mais no ponto de vista estrutural (ZUO et al., 2009).

Zuo et al (2012) quantificaram o dano infligido pelo tratamento ultrassom em grânulos de amido de batata utilizando frequência de 20 KHz e potência de 0 a 160W, a 5°C por 30 minutos. Nesse estudo, pode ser observado que os danos sofridos devido à cavitação, aparecem com maior frequência linearmente com a potência aplicada. Os autores também ressaltam que os danos nos grânulos não só são causados pelas ondas cavitacionais, mas também pelo choque entre grânulos e o choque dos grânulos com a parede de vidro do recipiente.

Luo et al (2008) verificaram o efeito do tratamento ultrassom nas propriedades físico-químicas de amidos com diferentes conteúdos de amilose. Utilizaram 30% de

amido em solução aquosa, submetida a 40KHz de frequência com potência de 100W a 30°C por período de 30 minutos, onde observaram porosidades na superfície da estrutura granular. O tratamento também afetou o poder de inchamento, solubilidade e o ponto de gel. Os autores afirmaram ainda que o tratamento por ultrassom agiu degradando preferencialmente as áreas amorfas e atacou a fração linear (amilose) mais facilmente do que a fração ramificada (amilopectina) ressaltando que as mudanças induzidas pelo tratamento por ultrassom não dependiam apenas da estrutura cristalina do amido, mas também do teor de amilose.

Han et al. (2021) caracterizaram o amido da semente de *Agriophyllum squarrosum* modificado por *heat-moisture* (120 °C, 25% umidade b.s.) em conjunto com pré ou pós-tratamento de ultrassom (20 Hz, 300 W) por 20 min. As características morfológicas e cristalinas do amido mantiveram sua estrutura original nativa, porém o teor de amilose, peso molecular da amilopectina e poder de dilatação e solubilidade diminuíram, enquanto o teor de amido resistente aumentou significativamente.

1.3.2.2 Tratamento por *heat-moisture*

O tratamento *heat-moisture* de amidos é definido como a modificação física que envolve tratamento dos grânulos de amido a baixa umidade (menor que 10-40% m/m) sob alta temperatura (84-120°C) por um determinado período (15 minutos a 16 horas) (BEMILLER, 2018; HOOVER, 2010).

O tratamento *heat-moisture* tem um efeito já bem descrito pela literatura, alterando as propriedades físico-químicas dos amidos, no entanto, mantém a estrutura granular e a birrefringência. O tratamento pode ocasionar aumento da temperatura máxima de gelatinização, possivelmente devido à formação de amido resistente e pode ser aplicado em alimentos onde é necessário um baixo poder de inchamento, baixa viscosidade e alta estabilidade térmica (KLEIN et al., 2013).

O *heat-moisture* promove mudança no arranjo estrutural das cadeias de amido nas áreas amorfas e cristalinas dos grânulos, resultando em alterações no padrão de difração de raios-X, cristalinidade, interações de cadeia de amido, inchamento granular, lixiviação de amilose, viscosidade, parâmetros de gelatinização, retrogradação e susceptibilidade à hidrólise de ácido e α -amilase (BEMILLER., 2018; HOOVER, 2010).

As mudanças que ocorrem nos grânulos de amido durante o tratamento com

heat-moisture são provocadas por interrupção dos cristais, interações entre as cadeias do amido e ruptura das duplas hélices na região amorfa (XING et al., 2017).

Os amidos sofrem efeitos variados do tratamento *heat-moisture* conforme varia a fonte botânica e isto está diretamente relacionado com a estrutura cristalina. O tratamento de *heat-moisture* demonstrou alterar o padrão de difração de raios-X dos amidos de tipo B (tubérculo e alta amilose) para um tipo A (característico dos amidos de cereais mais empacotado) ou para um tipo C (característico de leguminosas) (KLEIN et al., 2013; HOOVER, 2010).

Pepe et al. (2015) avaliaram o efeito do *heat-moisture* sobre as características estruturais, físico-químicas e reológicas do amido de araruta a fim de melhorar a estabilidade para diferentes aplicações alimentares. Os autores observaram que o *heat-moisture* causou um rearranjo das moléculas de amilose e amilopectina no grânulo de amido que gerou aumento na cristalinidade. Essas mudanças proporcionaram estabilidade contra cisalhamento, acidez e altas temperaturas (condição de esterilização).

Klein et al. (2013) avaliaram o impacto do tratamento *heat-moisture* em diferentes temperaturas nas propriedades físico-químicas de amidos de arroz, mandioca e pinhão, onde concluíram que o tratamento promoveu mudanças nas intensidades de pico da cristalinidade de difratogramas de raios-X.

Amidos tratados por *heat-moisture* tem susceptibilidade à α -amilase alterada. Os principais fatores que interferem são, teor de umidade, temperatura, duração do aquecimento e fonte de amido. Essa alteração já foi observada em ervilhas, feijão preto e lentilhas, ocasionando a extensão do tempo de hidrólise (BEMILLER, 2018; HOOVER, 2010).

1.3.3 Digestibilidade de amidos e efeitos no organismo humano

A principal fonte de glicose para o organismo humano é a dieta. Entre as refeições, durante jejum, os níveis plasmáticos de glicose são mantidos pela degradação hepática do glicogênio e por gliconeogênese (PRIEBE et al., 2018).

A prevenção da hipoglicemia é fundamental, pois, a glicose é o combustível metabólico predominante no cérebro que por si só não pode sintetizar nem armazenar a glicose mais do que por alguns minutos. Na maioria das pessoas, durante o jejum, as reservas são suficientes para prevenir a hipoglicemia por 8 a 12 horas, ou menos

se a demanda de glicose aumentar (exercício, fome ou doença) (PRIEBE et al., 2018).

O pico de glicose plasmática pós-prandial, que ocorre dentro da primeira hora após o início da refeição, não excede 8,3 mmol/L em pessoas saudáveis, e raramente ultrapassa 120 minutos. Em resposta a esse aumento, o pâncreas aumenta sua secreção de insulina e suprime a liberação de glucagon (hormônio produzido no pâncreas e nas células do trato gastrointestinal relacionadas no metabolismo dos carboidratos), limitando a produção de glicose e promovendo a captação de glicose pelos tecidos muscular e adiposo (PRIEBE et al., 2018).

Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por um elevado nível de glicose no sangue (hiperglicemia), proveniente de secreção/ação de insulina deficiente. Na diabetes tipo-1, existe uma deficiência parcial ou absoluta de insulina, na diabetes tipo-2 a produção de insulina é em grande maioria normal, mas as respostas dos tecidos à insulina são deficientes, causando hiperglicemia crônica, e disfunção em células, tecidos e órgãos (PRIEBE et al., 2018).

A digestão de amidos e outros alimentos em geral, se inicia na boca onde estes alimentos são fragmentados em pedaços menores. Neste momento, já é iniciada a digestão do amido ao entrar em contato com a α -amilase proveniente da saliva que é responsável por romper algumas ligações glicosídicas, produzindo oligossacarídeos de cadeias menores. Ao chegar no estômago, o amido mistura-se com pepsina, lipase gástrica e ácido clorídrico que auxiliam na fragmentação do alimento, no entanto, não apresenta digestão significativa do amido. No intestino, o amido parcialmente digerido, é hidrolisado pela α -amilase pancreática convertendo-se em maltose e dextrinas, as quais são posteriormente transformadas em glicose para serem absorvidas pelo sangue (PEREIRA et al., 2010).

O índice glicêmico (IG) é classificado com base no aumento pós-prandial da glicose no sangue e é utilizado para caracterizar o carboidrato de diferentes alimentos (JENKINS et al., 1982; JENKINS, 2007). O amido pode ser classificado em três tipos, de acordo com sua velocidade de digestão que influencia na taxa de liberação de glicose: amido rapidamente digerível (RDS), amido lentamente digerível (SDS) e amido resistente (RS) (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992; HOOVER, 2010; CHUNG; LIU; HOOVER, 2009).

O amido de rápida digestão é parcialmente hidrolisado na boca, finalizado no intestino delgado e tem um tempo de digestão de no máximo 20 minutos. Geralmente estão em alimentos recentemente cozidos e representa fonte rápida de energia. O

amido lentamente digerível é muito pouco hidrolisado na boca e é totalmente absorvido no intestino delgado, tem um tempo de digestão de 20 a 120 minutos, fornece energia lentamente e estabiliza o índice glicêmico. Esta classe de amido pode ser representada por amido ceroso nativo, milho moído e legumes in natura. Já o amido resistente não é digerido no intestino delgado e chega ao cólon intacto, o que leva mais de 120 minutos. Este amido pode ser encontrado em batata crua e pão amanhecido, e exerce efeito na saúde intestinal desempenhando função como anticarcinogênico e potencial prebiótico (LEHMAN; ROBIN, 2007; ASRANUDIN et al., 2021)

Amidos de rápida digestão podem ser considerados maléficos à saúde pois causam um pico alto da concentração de glicose sanguínea num período curto, ou seja, provocam um alto índice glicêmico. Desta forma, é provável que o RDS aumente o risco de desenvolvimento de diabetes, aumente o risco de doenças cardiovasculares e cause obesidade (ZHANG; HAMAKER, 2012).

Existem muitos estudos que comprovam os benefícios para a saúde de RS na prevenção de câncer de cólon, tendo a funcionalidade como substrato para crescimento de micro-organismos probióticos benéficos ao organismo humano (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006). Alimentos que contêm RS são considerados ricos em fibras e retardam a taxa de digestão. O metabolismo do RS ocorre em média 6 horas após o consumo. A digestão de RS reduz a glicemia pós-prandial e a insulinemia, além de estender o período de saciedade contribuindo para redução do peso corpóreo (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; JENKINS et al., 1982).

No entanto, a ação de SDS e seus benefícios para a saúde não estão bem elucidados. É preconizado que o SDS oferece um aumento lento dos níveis de glicemia pós-prandial e níveis estáveis de glicemia por algum tempo, ao longo de sua passagem pelo intestino delgado. Os benefícios para a saúde do SDS estão ligados a um metabolismo equilibrado da glicose, que se associa à resposta glicêmica de alimentos com baixo índice glicêmico (ZHANG; HAMAKER, 2012) e controle da saciedade (LEHMAN; ROBIN, 2007). A liberação lenta e prolongada de glicose à corrente sanguínea resulta em baixos níveis de insulina ao longo do processo digestivo, desta forma, não é observado hipoglicemia e o pico de glicemia é mais baixo e prolongado. A redução de eventos de hiperglicemia e hipoglicemia são benéficas à saúde e ajudam a prevenir o desenvolvimento de diabetes tipo-2. Além disso, a

liberação prolongada de glicose à corrente sanguínea modula o mecanismo regulatório da glicose sanguínea e da saciedade, onde baixos níveis de glicose no sangue promove a fome (LEHMAN; ROBIN, 2007; HASEK et al., 2018).

Hasek et al (2018) realizou um experimento com ratos obesos, para testar o efeito no comportamento alimentar de dietas hiperlipídicas contendo SDS, em comparação com RDS. A ingestão da dieta contendo SDS por um período de 11 semanas reduziu a ingestão diária de alimentos, enquanto o grupo que consumia a dieta com RDS permaneceu com uma alta ingestão alimentar. Os níveis de expressão do neuropeptídeo hipotalâmico orexigênico Y (NPY) e do peptídeo relacionado à Agouti (AgRP) foram significativamente reduzidos, e o hormônio liberador de corticotropina (CRH) anorexigênico foi aumentado, no grupo alimentado com SDS comparado ao RDS, e ao grupo de controle. Sendo assim, os autores concluíram que uma dieta com SDS reduz a ingestão diária de alimentos e paralelamente suprime a expressão de genes estimuladores neuropeptídeos de apetite quando comparado a dietas com RDS. Esta descoberta apresenta um potencial de desenvolvimento de alimentos funcionais baseados em SDS como uma abordagem para o controle da obesidade e doenças associadas.

1.4 PLANEJAMENTO FATORIAL

Realizar um planejamento fatorial é estudar de todas as combinações dos níveis possíveis das variáveis que se deseja observar. O efeito principal de cada fator é definido como a alteração na resposta gerada pela modificação no nível de um fator. Quando a diferença da resposta entre os níveis de uma variável não é a mesma, isto sugere que exista uma interação com outra variável, podendo indicar que as variáveis exercem efeito acelerador ou inibitório na resposta. O planejamento fatorial é indicado para estudos envolvendo mais de uma variável, onde é possível prever não só o impacto dos níveis destas variáveis nas respostas, mas também se existe alguma interação entre elas (MONTGOMERY, 2017).

Supondo um planejamento fatorial de duas variáveis, as observações podem ser descritas pelo modelo $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \epsilon$. Em que y é a resposta, β s são parâmetros cujos valores devem ser determinados, x_1 é uma variável que representa o fator A, x_2 é uma variável que representa o fator B e ϵ é um termo de

erro aleatório. As variáveis x_1 e x_2 são definidas em uma escala codificada de -1 (nível mais baixo das variáveis) a +1 (o nível mais alto das variáveis) e x_1x_2 representa a interação entre x_1 e x_2 . (MONTGOMERY, 2017).

Dentre as vantagens dos estudos fatoriais podemos citar sua eficiência em prever a resposta acima dos modelos de experimentos um fator por vez; O modelo pode apresentar as interações quando presente e prever o impacto destas alterações na resposta; E os projetos fatoriais permite estimar os efeitos de uma variável em vários níveis e não apenas nos analisados, predizendo uma grande variedade de condições experimentais (MONTGOMERY, 2017).

Quando no estudo se utiliza mais de duas variáveis, cada uma com dois níveis (+1 e -1), a replicação completa desse experimento é chamada de planejamento fatorial 2^k , onde k representa a quantidade de variáveis presente no estudo (MONTGOMERY, 2017).

1.4.1 Planejamento Experimental Fracionado

Em estudos em que é impossível realizar todos os ensaios em um planejamento fatorial completo (2^k) devido ao número de ensaios necessários superar os recursos dos experimentos e assumindo que certas interações de alta ordem são desprezíveis sobre os principais efeitos e interações de baixa ordem, então pode ser executando apenas uma fração do experimento fatorial completo (MONTGOMERY, 2017).

A principal vantagem do método é a possibilidade de prever as respostas de um projeto completo economizando ensaios. Um dos principais usos de planejamentos experimentais fracionados é em experimentos pilotos, que são realizados nos estágios iniciais de um projeto de melhoria, onde as variáveis indicadas como maior impacto na resposta, são investigados em experimentos subsequentes. A principal vantagem em utilizar este método se dá pelo fato de projetos fatoriais fracionados podem ser projetados em experimentos maiores (MONTGOMERY, 2017).

1.4.2 Superfícies de Resposta

A superfície de resposta é uma metodologia que utiliza técnicas de modelagem matemática para solução de problemas, em que se considera várias variáveis com o objetivo de otimizar resposta e encontrar seu ponto de ótimo. Esta metodologia pode auxiliar a encontrar uma relação funcional entre o conjunto de variáveis independentes e a resposta. Muito comumente é empregado uma modelagem de polinômio de baixa ordem. Se a resposta for modelada por uma função linear das variáveis independentes, é possível que a função que mais se aproximará do modelo é de primeira ordem, porém se a superfície apresentar curvatura, um polinômio de ordem maior deve ser utilizado, como por exemplo, uma modelagem de segunda ordem. A análise da modelagem e da superfície de resposta é então realizada usando a superfície ajustada (MONTGOMERY, 2017).

Abedi, Pourmohammadi e Abbasi (2019) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar a esterificação do amido de trigo (acetilação) com alto grau de substituição, por meio de várias concentrações de reagentes (anidrido acético), pHs e temperaturas sob várias frequências de ultrassom (25, 40 e 25 + 40 kHz), temperaturas e pHs. Sendo assim, nos forneceu uma evidência de que a metodologia de superfície de resposta é uma ferramenta eficaz para utilizar em otimização de processos que promovem um rearranjo molecular quantificável, desde que esta resposta apresente variações proporcionais às variáveis aplicadas.

1.4.3 Método *Steepest Ascent*

Este procedimento é utilizado quando o primeiro planejamento apresenta modelagem de primeira ordem (linear) indicando que os níveis definidos das variáveis estão longe da resposta ideal. A vantagem está em ser um procedimento experimental simples e economicamente eficiente.

Aplicando este método, é possível mover rapidamente o foco do planejamento para mais próximo do ponto ótimo da variável dependente (Resposta), este método utiliza o princípio da subida mais íngreme (**Steepest Ascent**). Utilizando as respostas do primeiro planejamento é possível realizar a predição de mais pontos seguindo a subida mais íngreme, até encontrar uma possível curvatura, indicando que os níveis das variáveis estão próximos do ponto de ótimo, neste momento é indicado um modelo de ordem maior, e um novo planejamento é indicado (MONTGOMERY, 2017).

1.4.4 Planejamento: Ajustar o Modelo de Segunda Ordem

Quando um planejamento experimental 2^k foi usado para ajustar-se a um modelo de primeira ordem e este modelo apresenta falta de ajuste, os pontos axiais são adicionados para permitir que os termos quadráticos sejam incorporados ao modelo. O Planejamento Composto Central pode ser utilizado para a montagem de um modelo de segunda ordem. Consiste em um fatorial de 2^k (ou fatorial fracionado) com ensaios fatoriais, axiais (pontos estrela) e ensaios no ponto central (MONTGOMERY, 2017).

Como o objetivo é a otimização e a localização do ponto de ótimo é desconhecida, faz sentido usar um design que fornece precisão de estimativa igual em todas as direções. Isso significa que em todos os pontos axiais estão a mesma distância do centro do planejamento, assim, a variância da resposta prevista é constante em esfera (BOX; HUNTER, 1957; MONTGOMERY, 2017).

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI, E.; POURMOHAMMADI, K.; ABBASI, S. Dual-frequency ultrasound for ultrasonic-assisted esterification. **Food Science & Nutrition**, v. 7, p. 2613-2624, 2019.

AI, Y.; HASJIM, J.; JANE, J. L. Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch. **Carbohydrate Polymers**, V. 92, n. 1, p. 120–127, 2013.

AI, Y.; JANE, J. L. Chapter 3 - Understanding Starch Structure and Functionality. In: AI, Yongfeng., et al. **Starch in Food**. Second Edition. United Kingdom: Woodhead Publishing, p. 151-178, 2018.

ALISTAR, M. S.; GLYN O. P.; PETER A. W. **Food Polysaccharides and Their Applications**. Second ed. USA: Taylor & Francis Group, 2006, 752p.

ASRANUDIN; H.; SYARIFIN, A. N. K.; PURNOMO, A. S.; ANSHARULLAH; FUDHOLI, A. The effect of heat moisture treatment on crystallinity and physicochemical-digestibility properties of purple yam flour. **Food Hydrocolloids**, v. 120, 2021.

BARUA, S.; SRIVASTAV, P. P. Effect of heat-moisture treatment on resistant starch functional and thermal properties of mung bean (*Vigna radiate*) starch. **Journal of Nutritional Health & Food Engineering**, v. 7, n. 4, p. 358–363, 2017.

BEMILLER, J. N. Physical Modification of Starch. **Starch in Food**, p. 223–253, 2018.

BERNARDO, C. O.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. Effect of ultrasound on the extraction and modification of starches. **Ciência Rural**, v. 46, p. 739-746, 2016.

BERTO, E. Composition of building blocks in clusters from potato amylopectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 123-136, 2007.

BLANKENSHIP, R. E. **Molecular mechanisms of photosynthesis**. 1th ed. Arizona: Blackwell Science Ltd, 2002. 336 p.

BLENNOW, A. Starch Bioengineering. **Starch - Stärke**, v. 70, n. 1-2, 2018.

BOX, G. E. P., HUNTER, J. S. “Multifactor Experimental Designs for Exploring Response Surfaces.” **Mathematical Statistics**, v. 28, p. 195–242, 1957.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - Definições, Classificação e Emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 de outubro de 1997.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: Structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.

CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. 1. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 221 p.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. O mercado de amido no mundo. **Revista da ABAM**, Paranaíba, Ano II. n. 9, Jan. - Mar. 2005.

CHUNG, H. J.; LIU, Q.; HOOVER R. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p 436 – 447, 2009.

CORRADINI, E.; LOTTI C.; MEDEIROS, E. S.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELI, A. A. S.; MATTOSO, L.H.C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados de milho com diferentes teores amilose. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.

DEBET, Martine R.; GIDLEY, Michael J. Why Do Gelatinized Starch Granules Not Dissolve Completely? Roles for Amylose, Protein, and Lipid in Granule “Ghost” Integrity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4752 - 4760, 2007.

DING, Y., LIANG, Y., LUO, F., OUYANG, Q., LIN, Q. Understanding the mechanism of ultrasonication regulated the digestibility properties of retrograded starch following vacuum freeze drying. **Carbohydrate Polymers**, v. 228, p. 1-10, 2020.

ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, n. 46, p.33 – 50, 1992.

HAN, L.; WEI, Q.; CAO, S.; YU, Y.; CAO, X.; & CHEN, W. The assisting effects of ultrasound on the multiscale characteristics of heat-moisture treated starch from *Agriophyllum squarrosum* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 471–480, 2021.

HASEK, L. Y.; PHILIPS, R. J.; ZHANG, G.; KINZIG, K. P.; KIM, C. Y.; POWLEY, T. L.; HAMAKER, B. R. Dietary slowly digestible starch triggers the gut-brain axis in obese rats with accompanied reduced food intake. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.62, p. 1-6. 2018.

HONG, J.; LI, L.; LI, L.; LIU, C.; ZHENG, X.; BIAN, K. Effect of Heat–Moisture treatment on physicochemical, thermal, morphological, and structural properties of mechanically activated large A- and small B-wheat starch granules. **Journal of Food Science**. v. 84, n. 10, p. 2795-27805, 2019.

HOOVER, R. The impact of heat–moisture treatment on molecular structures and properties of starches isolated from different botanical sources. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 9, p. 835 – 847, 2010.

JAMBRAK, A. R.; HERCEG, Z.; ŠUBARIĆ, D.; BABIĆ, J.; BRNČIĆ, M.; BRNČIĆ, S. R.; GELO, J. Ultrasound effect on physical properties of corn starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 91 – 100, 2010.

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

JENKINS, D. J. A. The glycemic index: Looking back 25 years. **Cereal Foods World**, v. 52, p. 50-53, 2007.

JENKINS, D. J. A.; THOME, M. J.; CAMELON, K.; JENKINS, A. L.; RAO, A. V.; TAYLOR, R. H., et al. Effect of processing on digestibility and the blood glucose responses: A study of lentils. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 36, p. 1093–1101, 1982.

KLEIN, B.; PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; ZAVAREZEA, E. R.; COLUSSI, R.; EVANGELHOA, J. A.; GUTKOSKI, L. C.; DIAS, A. R. G. Effect of single and dual heat-moisture treatments on properties of rice, cassava, and pinhão starches. **Carbohydrate Polymers**, n. 98, p. 1578 – 1584, Jul. 2013.

LEHMANN, U.; ROBIN, F. Slowly Digestible Starch—Its Structure and Health Implications: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 346-355, 2017.

LI, M. N.; ZHANG, B.; XIE, Y.; CHEN, H. Q. Effecttos of debranching and repeated heat-moisture treatements on structure, physicochemical properties and in vitro digestibility of wheat starch. **Food Chemistry**, v. 294, p. 440-447, 2019.

LIAO, L.; LIU, H.; GAN, Z.; WU, W. Structural properties of sweet potato starch and its vermicelli quality as affected by heat-moisture treatment. **International Journal of food properties**, v. 22, n. 1, p. 1122, 2019.

LIU, H.; XIE, F.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L. Thermal processing of starch-based polymers. **Progress in Polymer Science**. v. 34, n. 12, p. 1348-1368, 2009.

LUO, Z.; FU, X.; HE, X.; LUO, F.; GAO, Q.; YU, S. Effect of Ultrasonic Treatment on the Physicochemical Properties of Maize Starches Differing in Amylose Content. **Starch - Stärke**, v. 60, n. 60, p. 646 - 653, 2008.

MENDES, M. P.; DEMIATE, I. M.; MONTEIRO, A. R. G. Effect of individual and combined physical treatments on the properties of corn starch. **Acta Scientiarum**, v. 40, p. 2-7, 2019.

MIAO, M.; JIAN, B.; CUI, S. W.; ZHANG, T.; JIN, Z. Slowly Digestible Starch - A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 1642-1657, 2015.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. Ed. 9^a, John Wiley & Sons, Inc, 2017.

PEPE, L. S.; MORAES, J.; ALBANO, K. M.; TELIS, V. R. N.; FRANCO, C. M. L. Effect of heat-moisture treatment on the structural, physicochemical, and rheological characteristics of arrowroot starch. **Food Science and Technology International**, v. 3, n. 22, p. 256 – 265, 2015.

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. **Química dos alimentos: carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas e minerais**. 1. ed. Maceió/AL: Edufal, 2005. 54 p.

PRIEBE, M. G.; EELDERINK, C.; WACHTERS-HAGEDOORN, R. E.; VONK, R. J. Starch Digestion and Applications of Slowly Available Starch. **Starch in Food**, p. 805–826, 2018.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant starch – A review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 5, p 1 – 17, 2006.

SALMAN, H.; BLAZEK, J.; LOPES-RUBIO, A.; GILBERT, E. P.; HANLEY, T.; COPELAND, L. Structurefunction relationships in A and B granules from wheat starches of similar amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 420-427, 2009.

SEGUCHI, M.; HIGASA, T.; MORI, T. Study of Wheat Starch Structure by Sonication Treatment. **Cereal Chem**, v. 71, n. 6, p. 636 – 639, 1994.

SILVA, G. P.; BENTO, J. A. C.; SOARES JUNIOR, M. S.; CALIARI, M. Trend of Modification by Autoclave at Low Pressure and by Natural Fermentation in Sweet Potato and Cassava Starches. **Polysaccharides**, v. 2, p. 354-372, 2021.

SOUZA, A. B.; ALMEIDA, D. F.; NETTO, G. G. Importância dos amidos modificados nos alimentos processados: ingredientes em perspectiva. **Insumos**. v. 98, p. 28 - 32, 2013.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch Composition, Fine Structure and Architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.

XIE, F.; POLLET, E.; HALLEY, P. J.; AVÉROUS, L. Starch-based nanobiocomposite. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1590-1628, 2013.

WANG, L.; WANG, Y. J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 291 - 296, 2004.

WANG, B. YU, B. YUAN, C. GUO, L. LIU, P. GAO, W. LI, D. CUI, B. ABD EL-ATY, A.M. An overview on plasticized biodegradable corn starch-based films: the physicochemical properties and gelatinization process. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 10, p. 2569-2579, 2021.

XING, J.; LIU, Y.; LI, D.; WANG L.; ADHIKARI, B. Heat-moisture treatment and acid hydrolysis of corn starch in different sequences. **LWT - Food Science and Technology**, n. 79, p. 11 – 20, 2017.

YASSAROH, Y.; WOORTMAN, A. J. J.; LOOS, K. A new way to improve physicochemical properties of potato starch. **Carbohydrate Polymers**. v 204, p. 1-8, 2019.

ZANELA, J.; SHIRAI, M. A. REIS, M. O.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Mixture design to develop biodegradable sheets with high levels of starch and polyvinyl alcohol. **Starch/Stärke**, n. 67, p. 1011 – 1019, 2015.

ZHANG, P.; HAMAKER, B. R. Banana starch structure and digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1552 – 1558, 2012.

ZUO, J. Y.; KNOERZER, K.; MAWSON, R.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 4, p. 462 - 468, 2009.

ZUO, Y. Y. J.; HÉBRAUD, P.; HEMAR, Y.; & ASHOKKUMAR, M. Quantification of high-power ultrasound induced damage on potato starch granules using light microscopy. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 421 - 426, 2012.

CAPÍTULO 2

**ARTIGO: PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO
DA PRODUÇÃO DE AMIDO LENTAMENTE DIGERÍVEL ATRAVÉS
DE ULTRASSOM E HEAT-MOISTURE**

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMIDO LENTAMENTE DIGERÍVEL ATRAVÉS DE ULTRASSOM E *HEAT-MOISTURE*.

Thiago Henrique de Lima Lino¹; Márcio de Barros¹; Guilherme Biz²; Thais de Souza Rocha^{1*}

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid PR 445 Km 380 Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, CEP 86.057-970, Londrina - PR, Brasil.

² Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid PR 445 Km 380 Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, CEP 86.057-970, Londrina - PR, Brasil.

* Author for correspondence

Agradecimentos: Thiago Henrique de Lima Lino agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. À Universidade Estadual de Londrina, que forneceu o espaço físico e equipamentos para o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

Amidos lentamente digeríveis (SDS) estão ligados a um metabolismo equilibrado e controle da saciedade. Com o objetivo de desenvolver SDS através de modificações físicas por ultrassom (US) e tratamento *heat-moisture* (HMT), foram realizados planejamentos experimentais com amido de milho para verificar as condições ideais dos tratamentos. Para a determinação das condições dos tratamentos em que se obteve a maior concentração possível de SDS, foi necessário utilizar a metodologia *Steepest Ascent*. As amostras obtidas dos ensaios do *Steepest Ascent* com ou sem a utilização do US foram avaliadas quanto às propriedades estruturais. Não foram observadas alterações na superfície dos grânulos ou variação significativa nas temperaturas de gelatinização após os tratamentos. O perfil polimórfico de difração de raios-X do tipo A permaneceu inalterado. Foi observada uma correlação positiva da cristalinidade relativa dos amidos tratados com US e os teores de SDS e RS somados, sugerindo que o US como tratamento prévio, pode favorecer o melhor empacotamento das duplas hélices durante o tratamento HMT, tornando o amido menos suscetíveis à ação de enzimas digestivas. Além disso, também foi possível obter teores mais elevados de SDS através da modificação combinada de US e HMT, quando comparado ao amido tratado apenas por HMT. Foi possível otimizar o teor de SDS através das modificações físicas por US e HMT, utilizando a metodologia de superfície de respostas. O maior teor de SDS ($27,4 \pm 1,9$ %) foi obtido nas condições de 9,0% de amplitude no US por 5,0 minutos, seguido por tratamento HMT à 74,0°C por 11,0 minutos. O ponto otimizado obtido pela superfície de resposta, baseando-se nos pontos estacionários, pode ser encontrado em 9,0% de amplitude aplicada no tratamento por US durante 4,91 minutos e tratamento no HMT em 73,51°C durante 11,95 minutos.

Palavras-chave: Superfície de resposta. Cristalinidade. Raio-X. DSC. Índice glicêmico.

2.1 INTRODUÇÃO

O amido é o principal carboidrato presente na alimentação humana e supre a maior parte da necessidade energética do homem, além de fornecer glicose para síntese de compostos estruturais da célula, aminoácidos não essenciais e ácidos graxos (MIAO et al., 2015; HASEK et al., 2018; DING et al., 2020). Segundo Englyst, Kingman, Cummings (1992) e Miao et al. (2015) o amido pode ser classificado em três categorias, conforme a taxa e a extensão da digestibilidade desse carboidrato; amido rapidamente digerível (RDS), amido lentamente digerível (SDS) e amido resistente (RS). O RDS representa a fração do amido digerida em 20 minutos *in vitro*, já o SDS é a porção digerida entre 20 e 120 minutos, e o RS é a fração não digerida após 120 minutos. Alimentos à base de amido cuja maior porção deste é composta por RS e SDS são considerados de baixa carga glicêmica e, por sua vez, a ingestão reduz o índice glicêmico, a síntese e o nível plasmático de lipídios, previne o aparecimento de doenças coronárias e diabetes tipo-2 (LI et al., 2019; DING et al., 2020). Sendo assim, tais benefícios têm contribuído para agregar valor aos alimentos à base de amido com alto teor de RS e SDS.

A taxa de digestibilidade do amido pode ser alterada por diversos fatores tais como a proporção de amilose/amilopectina (DING et al., 2020), interação do amido com lipídios e proteínas (AI, HASJIM, JANE, 2013); e por métodos de modificação química, física e enzimática desse carboidrato. O tratamento físico de amidos pode ser uma alternativa aos processos de modificação química, garantindo efetividade sobre as propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, melhorando suas aplicações funcionais, tecnológicas e alterando sua digestibilidade (XING et al., 2017). Além disso, o amido modificado fisicamente pode ser considerado como natural e um ingrediente seguro, livre de compostos químicos, portanto, pela legislação brasileira sua adição em alimentos segue os critérios de amido natural e não de amido modificado (BRASIL, 1997). Essa é uma grande vantagem quando comparado aos amidos modificados quimicamente (MENDES et al., 2019).

Dentre os métodos de modificação física, vale destacar o processamento por ultrassom. Segundo Ding et al. 2020, o processamento de alimentos por ultrassom é altamente eficiente, ecologicamente adequado e é um método que vem se destacando nesse setor industrial. Tal técnica é muito empregada na extração de amidos, porém,

também pode ser utilizada como um agente modificador desse, devido à capacidade que as forças cavitacionais têm sobre os grânulos de amidos, sendo capaz de partí-los e até mudar seu perfil de gelatinização (HAN et al., 2021, JAMBRAK et al. 2010). Além disso, o ultrassom causa mudanças na estrutura supramolecular do amido que, por sua vez, pode afetar a suscetibilidade desse carboidrato à hidrólise enzimática, tornando-o um amido lentamente digerível (DING et al. 2020).

O tratamento *heat-moisture* (HMT) é outro método de modificação física que altera as propriedades físico-químicas do amido. Esse procedimento ocasiona aumento da temperatura de gelatinização devido a alteração do perfil cristalino/amorfo do grânulo de amido (Miao et. al. 2015). Essa técnica envolve tratamento do amido em baixos níveis de umidade (<35% w/w) e temperatura entre 84-120°C por um período de 15 minutos a 16 horas (CHUNG; LIU; HOOVER, 2009; BARUA; SRIVASTAV, 2017; XING et al., 2017). Tal técnica tem sido utilizada por muitos autores recentemente para modificar a digestibilidade do amido tornando-o lentamente digerível (YASSAROH et al., 2019; LIAO et al., 2019; HONG et al., 2019).

Vários estudos têm avaliado o efeito combinado de diferentes métodos na modificação de amidos (DEY; SIT, 2017; LI et al., 2019; DING et al., 2020).

Huang et al. (2015) avaliaram o efeito combinado da enzima desramificante pullulanase e do HMT em amido de batata-doce e obtiveram resultados expressivos no aumento de SDS.

Apesar dos efeitos comprovados com uso de enzimas, a aplicação de enzimas na indústria requer grande controle de processo, controle de temperatura, faixa de pH, concentração do substrato, cofatores da matriz e outros possíveis efeitos inibitórios (KUDDUS, 2019). Somando isso à baixa disponibilidade comercial de enzimas funcionais e a dificuldade de implementação comparados a outros métodos, torna a utilização de enzimas na indústria um processo custoso (SPERANZA; LOPES; MARTINS, 2019).

Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo otimizar a produção de amido lentamente digerido, a partir do amido de milho, através de modificações físicas combinadas: ultrassom e HMT. Para atingir tal objetivo foi utilizada a metodologia de superfície de resposta.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Amido de milho (*Zea mays* L.) (Kimimo, Três corações Alimentos S.A, Mossoró, RN., Brasil) foi obtido em comércio na região de Londrina, PR. A amostra apresentou 99% de pureza conforme avaliação da composição proximal através dos métodos da AACCC (2000) (0,25 \pm 0,09% de lipídeos, 0,08 \pm 0,02% de cinzas, 0,61 \pm 0,07% de proteínas).

As enzimas amiloglucosidase de *Aspergillus niger* (A9913) e pancreatina de pâncreas suíno (P3292) utilizadas na digestão do amido foram obtidas da Sigma-Aldrich.

O kit clínico de determinação de glicose (REF10.008.00) foi obtido da BioTécnica (Biotécnica, Varginha, MG., Brasil).

2.2.2 Modificação por ultrassom (US)

O amido de milho foi tratado por ultrassom de acordo com metodologia descrita por Ding et. al. (2019), com adaptações. Foram incididas sobre a suspensão de amido (10% m/v) em água destilada, amplitude (A) e tempo variáveis (B) (Tabela 1), a uma temperatura de 18 \pm 2°C. O ultrassom utilizado foi o da marca Qsonica (Newtown, EUA), modelo q700 com frequência de 20 kHz. O *probe* (sonda) utilizado foi o 4210 de baixa intensidade que consegue atingir uma amplitude máxima de 30 μ m. Após o tratamento, as amostras foram filtradas a vácuo, lavadas com etanol e levadas para secagem em estufa com circulação de ar a 37 \pm 3°C por 72 horas. Depois foram armazenadas em sacos plásticos sob refrigeração até a utilização.

2.2.3 Modificação pelo tratamento *heat-moisture*

Os amidos previamente tratados por ultrassom, foram tratados por *heat-moisture* de acordo com metodologia descrita por Xing et al. (2017), com modificações. Aos amidos foi adicionado água até atingirem umidade 30% através de

conta gotas sob agitação. Os amidos foram homogeneizados e armazenados a 4°C por 24 horas para equilíbrio da umidade. As amostras de amido foram colocadas em potes de vidro 90 mm de altura por 65 mm de diâmetro fechados com tampa de rosca metálica vedadas com fita de politetrafluoretileno, tiveram a temperatura equilibrada a 25°C e levadas a estufa pré-aquecida em temperaturas (C) e períodos (D) variáveis (Tabela 1). Posteriormente, as amostras foram retiradas dos frascos e secas até aproximadamente 10% umidade em estufa com circulação de ar a 37±3°C por 24 horas e foram armazenadas em sacos plásticos até a utilização.

2.2.4 Otimização da Modificação do amido

O amido foi modificado por dois tratamentos combinados, primeiro passou por um tratamento por ultrassom, seguido pelo tratamento *heat-moisture*. Para isto, foi utilizado o delineamento experimental 2³ com 2 níveis cada fator, sendo codificado por -1 e +1, com repetições no ponto central 0 (Tabela 1) realizados de modo aleatório.

Tabela 1 Variáveis independentes e níveis de variação aplicados ao primeiro planejamento.

Fatores	Níveis codificados		
	-1	0	+1
A – Amplitude aplicada no ultrassom (%)	5	9	13
B – Tempo de tratamento no ultrassom (min)	2	3	4
C – Temperatura utilizada no <i>heat-moisture</i> (°C)	90	100	110
D – Tempo de tratamento no <i>heat-moisture</i> (min)	20	30	40

Assim, o amido sofreu variação nos pontos de amplitude (A) e tempo (B) para o tratamento por ultrassom e nas variáveis de temperatura (C) e tempo (D) para o tratamento por *heat-moisture*. As variáveis e os níveis foram definidos em planejamentos experimentais prévios. Foi avaliada como função resposta o teor de amido lentamente digerível (SDS).

Nos experimentos, as variáveis respostas dos ensaios fatorial e fatorial fracionado foram descritas utilizando o modelo de regressão de primeira, segunda ordem e interações duplas (MONTGOMERY, 2017).

Após o planejamento realizado apresentar uma modelagem de primeira ordem significativa (Recurso online – Anexo 01), foi realizado *Steepest Ascent*, seguindo o

caminho de máxima subida de obtenção da variável resposta, e foi realizando novo planejamento em torno do ponto máximo.

Para ajustar o modelo de segunda ordem, foi realizado um delineamento composto central rotacional, para isso, foram incluídos mais dois níveis de variação, $-2^{3/4}$ e $+2^{3/4}$, e novas repetições no ponto central.

A significância dos parâmetros dos modelos de primeira e segunda ordem foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) e teste t. Os pressupostos dos modelos, normalidade e homogeneidade, foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e teste de Breusch-Pagan (BREUSCH; PAGAN, 1979), respectivamente.

A partir da resposta foram avaliados os efeitos das variáveis independentes e suas interações. A análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) foram utilizados para verificar o ajuste dos modelos aos dados experimentais.

Os gráficos de superfície de resposta e a análise de desejabilidade foram usados para avaliar as condições ideais para o tratamento do amido e prever o ponto de máximo teor de SDS.

Todos os cálculos, construção dos gráficos das superfícies de resposta ou curvas de contorno e desejabilidade foram realizados utilizando o software R (R CORE TEAM, 2022).

2.2.5 Perfil de digestibilidade in vitro

A digestibilidade in vitro foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Englyst Kingman e Cummings, (1992). Os tipos de amidos (amido total, amido rapidamente digerível, amido lentamente digerível e amido resistente) foram quantificados de acordo com o conteúdo de glicose, após uma hidrólise enzimática controlada, pelo kit clínico.

As amostras de 0,5 g (b.s) foram colocadas em frascos *schott* com capacidade de 250 ml juntamente com 5 pérolas de vidro (2 a 3 mm de diâmetro), e foram acrescidas de 20 ml de tampão acetato sódio (0,1 M), em seguida foram cozidas em banho as 100 °C por 30 minutos. Na sequência, os fracos foram arrefecidos até 37°C em banho sob agitação. Ao atingir 37°C foram acrescidas às amostras 5 mL da solução enzimática digestiva.

Para solução enzimática de pancreatina, 3,0 g de pancreatina foi acrescida de 20 ml de água ultrapura e agitada por 10 minutos, em seguida, foi recuperado 18,0 ml do sobrenadante por centrifugação a 1500 G por 10 minutos.

A solução enzimática digestiva foi elaborada com a mistura de 18 ml de solução enzimática de pancreatina; 0,2 ml de amiloglucosidase e 2,0 ml de água ultrapura.

Os conteúdos de RDS, SDS e RS foram obtidos usando as seguintes equações:

$$\text{RDS(\%)} = [(G20 - FG)/TS] \times 0.9 \times 100$$

$$\text{SDS(\%)} = [(G120 - G20)/TS] \times 0.9 \times 100$$

$$\text{RS(\%)} = [(TS - G)/TS] \times 0.9 \times 100$$

Em que, G20 e G120 representam teor de glicose após 20 e 120 minutos, respectivamente. FG representa o teor de glicose livre presente no amido, e TS é a massa total do amido digerido em b.s. (CHEN et al., 2018).

2.2.6 Padrão de difração de raios-X e cristalinidade

As amostras obtidas nos ensaios do planejamento experimental e o amido nativo foram avaliados por difração de raios-X seguindo a metodologia descrita por Zanela et al. (2015) utilizando um difratômetro da marca PANalitical modelo X'Pert PRO MPD (Holanda), emitindo radiação de cobre $k\alpha$ ($\lambda = 1.5418$ angstrom). A radiação de ânodo foi gerada a 40 kV e 30 mA, e monocromatizada usando uma corrente de 20 mA. As medidas de intensidade de difração foram realizadas a 1°/min na faixa de 2θ de 3 a 35° a temperatura ambiente. O índice de cristalinidade foi calculado pela razão entre a área da região cristalina e a área total coberta pela curva, composta pela área da região cristalina e a área da região amorfa (dado por: $IC = ((Ac/Ac + Aa) \times 100)$ em que Ac = área cristalina; Aa = área amorfa no difratograma) (Nara e Komiya, 1983).

2.2.7 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As propriedades térmicas foram realizadas nas amostras do último delineamento, como descrito no trabalho de Costa et al. (2018), utilizando um

calorímetro diferencial de varredura (DSC - Pyris 1, Perkin Elmer, Norwalk, USA) e o software Pyris 1 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) para determinar as temperaturas de transição (início - T_0 , pico - T_p e conclusão - T_c) e a variação de entalpia (ΔH). A leitura de cada amostra (aproximadamente 2 mg em base seca e 6 μL) foi realizada na faixa de temperatura de 30 a 120°C, com taxa de aquecimento de 5°C por minuto.

2.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras obtidas nos ensaios do planejamento experimental e o amido nativo foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (FEI Quanta 200, FEI Company, Holanda) com atmosfera de vácuo de 10^6 torr. As amostras previamente secas foram montadas em suportes de alumínio com fita de carbono, pulverizadas com um filme de ouro (BALTEC SDC 050, Sputter Coater, Alemanha) e observadas. As eletromicrografias foram geradas em modo topográfico (elétrons secundários) a 9 kV.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Planejamentos prévios

Partindo da grande gama de parâmetros descritos na literatura de tratamentos de ultrassom e *heat-moisture* (CHUNG; LIU; HOOVER, 2009; BARUA; SRIVASTAV, 2017; XING et al., 2017; YASSAROH et al., 2019; LIAO et al., 2019; HONG et al., 2019), procedeu-se o planejamento de experimentos. No planejamento foram definidas as variáveis presentes na Tabela 1 para um planejamento 2^4 completo com 4 repetições no ponto central.

Para os resultados obtidos para SDS do planejamento (Recurso Online 1 – Anexo 01), o ajuste do modelo de primeira ordem foi realizado, todos os pressupostos foram verificados e atendidos, os resíduos do modelo apresentaram homogeneidade das variâncias e normalidade. Adotou-se o nível de 10% para verificar a significância dos parâmetros do modelo estatístico. O modelo obtido após o ajuste foi:

$$y = 11,36 - 0,197x_1 + 1,1781x_2 + 1,312x_3 - 1,016x_4 - 2,157x_2x_3 + \epsilon.$$

O modelo apresentou um R^2 de 0,4141 e a falta de ajuste não foi significativa, pelo modelo obtido tem-se que a interação entre tempo e temperatura é significativo, apresentando um ponto de cela, conforme apresentado no Recurso Online 2 (Anexo 01).

Para os resultados do planejamento com os pontos axiais (Recurso Online 1), o ajuste do modelo de segunda ordem foi realizado, todos os pressupostos foram verificados e atendidos, os resíduos do modelo apresentaram homogeneidade das variâncias e normalidade. O modelo não apresentou falta de ajuste e nenhuma interação quadrática apresentou impacto significativo no teor de SDS, logo o modelo melhor ajustado é o de primeira ordem.

Eliminando-se os fatores não-significativos, verificou-se a significância da regressão em relação a 95% de confiança ($p \leq 0,5$), pelo teste t, na análise de variância (ANOVA).

O modelo de primeira ordem ajustado após a inclusão dos pontos axiais foi:

$$y = 11,33 - 0,085x_1 + 0,694x_2 + 0,585x_3 - 1,235x_4 - 2,157x_2x_3 + \epsilon.$$

Os gráficos de contorno (Recurso Online 3 – Anexo 01) e o modelo ajustado, direcionaram a busca da obtenção do máximo teor de SDS, indicando que o ponto de ótimo estaria em pontos mais baixos de A e D. Devido a interação negativa apresentada entre B e C. Desta forma, existiam duas alternativas para se atingir o ponto de máximo. Optou-se pelo caminho com maior inclinação, ou seja, B positivo e C negativo.

Partindo do modelo ajustado, foram projetados com o auxílio do software R, o caminho de máxima ascendência, indicando novos ensaios a serem realizados (Recurso Online 4 – Anexo 01) para obtenção do máximo teor de SDS.

Como no *steepest ascent* a variável A (amplitude aplicada no ultrassom) não foi significativo, assim, estabeleceu-se o ponto dessa variável em 9,0%. O ensaio E05 (Recurso Online 4 – Anexo 01) foi o ponto do *steepest ascent* com maior teor de SDS. Um novo planejamento foi elaborado em torno desse ponto para predizer o ponto de ótimo.

2.3.2 Otimização da modificação do amido

O rendimento de SDS é influenciado por diversos fatores tais como: fonte botânica, proporção de amilose/amilopectina, interação do amido com lipídios e proteínas; e por métodos de modificação química, física e enzimática (XING et al., 2017; MENDES et al., 2019; DING et al., 2020).

Partindo dos parâmetros pré-definidos em experimentos prévios de tratamentos de ultrassom e *heat-moisture*, procedeu-se o planejamento de experimentos onde foram definidas as variáveis. Os resultados do planejamento final estão apresentados na Tabela 2.

Os dados obtidos no planejamento final (E01 a E10) foi ajustado à um modelo de primeira ordem onde se pode verificar os efeitos e interações principais. A falta de ajuste do modelo foi significativa, desta forma, fez-se necessário um modelo de ordem maior para prever o ponto de ótimo. Os pontos axiais foram inseridos no planejamento com mais dois pontos centrais (Ensaio E11 ao E18 da Tabela 1), para poder ajustar à um modelo de segunda ordem.

O ajuste do modelo de segunda ordem foi realizado, todos os pressupostos de normalidade e homogeneidade, foram atendidos pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e teste de Breusch-Pagan (BREUSCH; PAGAN, 1979), respectivamente, logo, os resíduos do modelo apresentaram normalidade e homogeneidade das variâncias. O modelo não apresentou falta de ajuste. Todas as variáveis apresentaram interação quadrática no teor de SDS, e o modelo melhor ajustado foi o de segunda ordem com um R^2 de 0,67.

Eliminando-se as interações não-significativas, verificou-se a significância da regressão em relação a 95% de confiança, pelo teste t, na análise de variância (ANOVA).

O modelo de segunda ordem ajustado foi:

$$y = 23,93 - 0,30x_1 - 0,39x_2 + 0,79x_3 - 4,23x_1x_3 - 3,08x_1^2 - 2,55x_2^2 - 3,95x_3^2 + \epsilon,$$

em que y é a variável dependente (SDS), X_{i-j} são as variáveis independentes definidas (A, B e C) em escala codificada, e ϵ é o termo de erro aleatório.

Tabela 2 Codificação dos ensaios do planejamento experimental 2³ e respectivas respostas.

Assay	Variable (Coding)			In vitro digestibility		
	Ultrasound A (X1) Minutes	Heat-moisture B (X2) °C	Heat-moisture C (X3) Minutes	RDS %	SDS %	RS %
Native				75.5	9.2	15.3
E01	4.5 (-1)	67.5 (-1)	6.25 (-1)	68.2	10.0	21.8
E02	5.5 (+1)	67.5 (-1)	6.25 (-1)	55.2	15.6	29.2
E03	4.5 (-1)	80.5 (+1)	6.25 (-1)	61.5	11.1	27.4
E04	5.5 (+1)	80.5 (+1)	6.25 (-1)	49.5	16.1	34.4
E05	4.5 (-1)	67.5 (-1)	15.75 (+1)	43.5	21.0	35.5
E06	5.5 (+1)	67.5 (-1)	15.75 (+1)	67.5	5.3	27.2
E07	4.5 (-1)	80.5 (+1)	15.75 (+1)	63.2	13.6	23.2
E08	5.5 (+1)	80.5 (+1)	15.75 (+1)	63.4	6.5	30.1
E09	5.0 (0)	74.0 (0)	11.00 (0)	55.8	27.4	16.8
E10	5.0 (0)	74.0 (0)	11.00 (0)	60.5	24.2	15.3
E11	4.16 (-2 ^{3/4})	74.0 (0)	11.00 (0)	48.8	15.7	35.5
E12	5.84 (+2 ^{3/4})	74.0 (0)	11.00 (0)	43.7	20.5	35.8
E13	5.0 (0)	63.1 (-2 ^{3/4})	11.00 (0)	42.0	19.9	38.1
E14	5.0 (0)	84.9 (+2 ^{3/4})	11.00 (0)	51.0	19.4	29.6
E15	5.0 (0)	74.0 (0)	3.01 (-2 ^{3/4})	64.5	10.8	24.7
E16	5.0 (0)	74.0 (0)	18.99 (+2 ^{3/4})	46.8	20.9	32.3
E17	5.0 (0)	74.0 (0)	11.00 (0)	62.9	22.0	15.1
E18	5.0 (0)	74.0 (0)	11.00 (0)	55.2	21.0	23.8
Steepest Ascent						
			With ultrasound			
E19	3.0	100.0	30.00	68.1	8.9	23.0
E20	4.0	87.0	20.50	61.5	20.5	18.0
E21	5.0	74.0	11.00	55.8	27.4	16.8
E22	6.0	61.0	1.50	58.0	11.9	30.1
			Without ultrasound			
E23	-	100.0	30.00	57.6	10.0	32.4
E24	-	87.0	20.50	55.7	8.2	36.1
E25	-	74.0	11.00	58.3	10.7	31.0
E26	-	61.0	1.50	56.3	19.2	24.5

A) Tempo de tratamento no Ultrassom; B) Temperatura utilizada no *heat-moisture*; C) Tempo de tratamento no *heat-moisture*; RDS) Amido rapidamente digerível; SDS) Amido lentamente digerível; e RS) Amido resistente.

Os gráficos de contorno (Fig. 1a) e o modelo ajustado, podem nos mostrar as condições das variáveis de obtenção do máximo teor de amido lentamente digerível, indicando que o ponto de ótimo está em $-0,184x_1 - 0,075x_2 e 0,199x_3$, ou seja, o ponto de ótimo de aproximadamente 23,7% de SDS, pode ser encontrado em 9,0% de amplitude aplicada no ultrassom durante 4,91 minutos e no tratamento *heat-moisture* em 73,51°C durante 11,95 minutos. A superfície demonstrando os pontos estacionários pode ser observada na Fig. 1b.

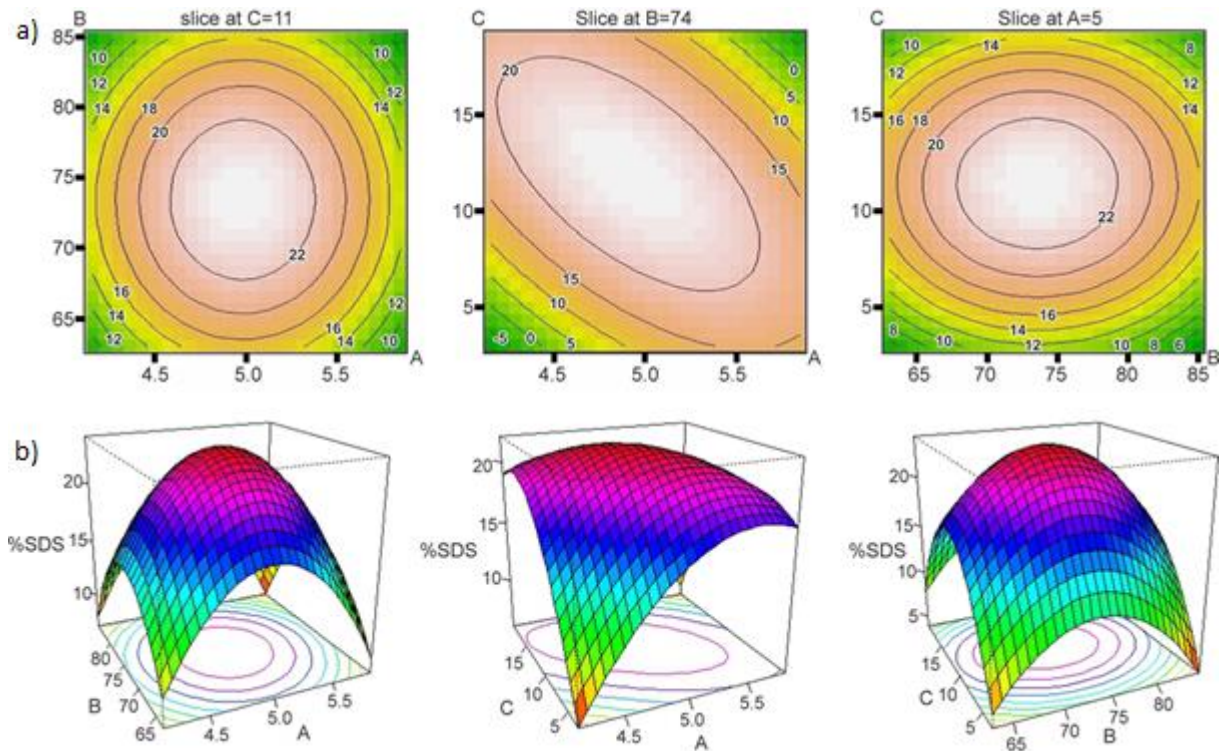


Fig. 1 Gráficos de contorno (a) e respectivas superfícies de respostas (b) obtidas no planejamento. A) tempo no US em min; B) temperatura em °C; e C) tempo no HMT em min.

Como todos os modelos indicaram uma redução no teor de SDS com o tratamento por ultrassom, surgiu a hipótese de que o tratamento por *heat-moisture* sozinho poderia gerar melhores resultados para o teor de SDS. Para verificar esta hipótese, um ensaio comparativo foi realizado avaliando amostras tratadas com e sem ultrassom em diferentes parâmetros. Estes são os ensaios E19 a E26 apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que o tratamento com ultrassom apresentou valores maiores do teor de amido lentamente digerível.

Silva et al. (2018), investigaram os efeitos da modificação dupla do amido de milho combinando ultrassom (1, 2, 4, 8 e 16 min) e tratamento *heat-moisture* em diferentes sequências (US-HMT e HMT-US). Os autores concluíram que o tratamento de dupla modificação causou o rearranjo da estrutura do amido, aumentando o teor de amido resistente (RS) das amostras cruas. Os resultados sugerem que as mudanças estruturais do amido de milho por dupla modificação afetaram a digestibilidade, independentemente da sequência de tratamento. No entanto, discorda dos resultados encontrados deste estudo, pois Silva et al. (2018) afirmaram que a utilização de ambos os métodos apenas reduz o teor de SDS, porém, observa-se que

na utilização de um planejamento experimental, se obtém valores mais elevados de SDS combinando ultrassom e HMT quando comparado ao amido de milho sem tratamento. A técnica de planejamento experimental é mais eficiente para obter amido com maiores níveis de SDS, pois tem maior cobertura de todos os parâmetros e assim podemos afirmar com maior certeza de que o ultrassom é necessário para aumentar o teor de SDS. Além disso, deve se levar em consideração que a avaliação da digestibilidade dos amidos foi realizada com as amostras após cozimento a 100 °C por 30 min. Isto indica que a melhor ordenação estrutural obtida permanece mesmo após a gelatinização do amido, reduzindo sua digestibilidade, o que é excelente para a aplicação em produtos alimentícios que serão processados a quente.

Deve-se observar a intensidade de tratamento de ultrassom aplicada à suspensão de amido, pois pode oferecer o efeito contrário ao desejado. Os danos sofridos devido à cavitação, aparecem com maior frequência linearmente com a potência aplicada (ZUO et al., 2012). Tratamentos mais brandos de ultrassom influenciam menos no aspecto estrutural, conferindo propriedades semelhantes a suspensões não tratadas (ZUO et al., 2009). É possível que o tratamento brando de ultrassom tenha induzido o rompimento de ligações α -1,6 das regiões amorfas dos grânulos de amido resultando em um processo de desramificação semelhante ao observado por Huang et al. (2015) quando avaliaram o efeito combinado da enzima desramificante pullulanase e do HMT na obtenção de SDS em amido de batata-doce.

A região amorfa da amilopectina dificulta o rearranjo das duplas-hélices devido aos efeitos da entropia (XING et al., 2017). A energia ultrassônica quando insuficiente para alterar ou distorcer os grânulos, pode afetar as regiões amorfas, podendo inclusive interromper e/ou destruir a ordem de dupla hélice em regiões amorfa e cristalina. Outro possível resultado do tratamento ultrassom é a despolimerização do amido em moléculas polissacarídeos menores (BEMILLER, 2018), conferindo assim, melhor mobilidade às moléculas sem ocasionar erosão, corrosão e/ou rachaduras na superfície do grânulo.

Para melhor elucidação dos efeitos dos tratamentos combinados de ultrassom e *heat-moisture* nas características estruturais do amido, as amostras obtidas nos ensaios do método *Steepest Ascent* com ou sem ultrassom (Tabela 2) foram avaliadas.

2.3.3 Padrão de difração de raios-X e cristalinidade relativa

O padrão de difração de raios-X e a cristalinidade relativa dos amidos de milho nativo e modificados estão apresentados na Fig. 2 e Tabela 3, respectivamente.

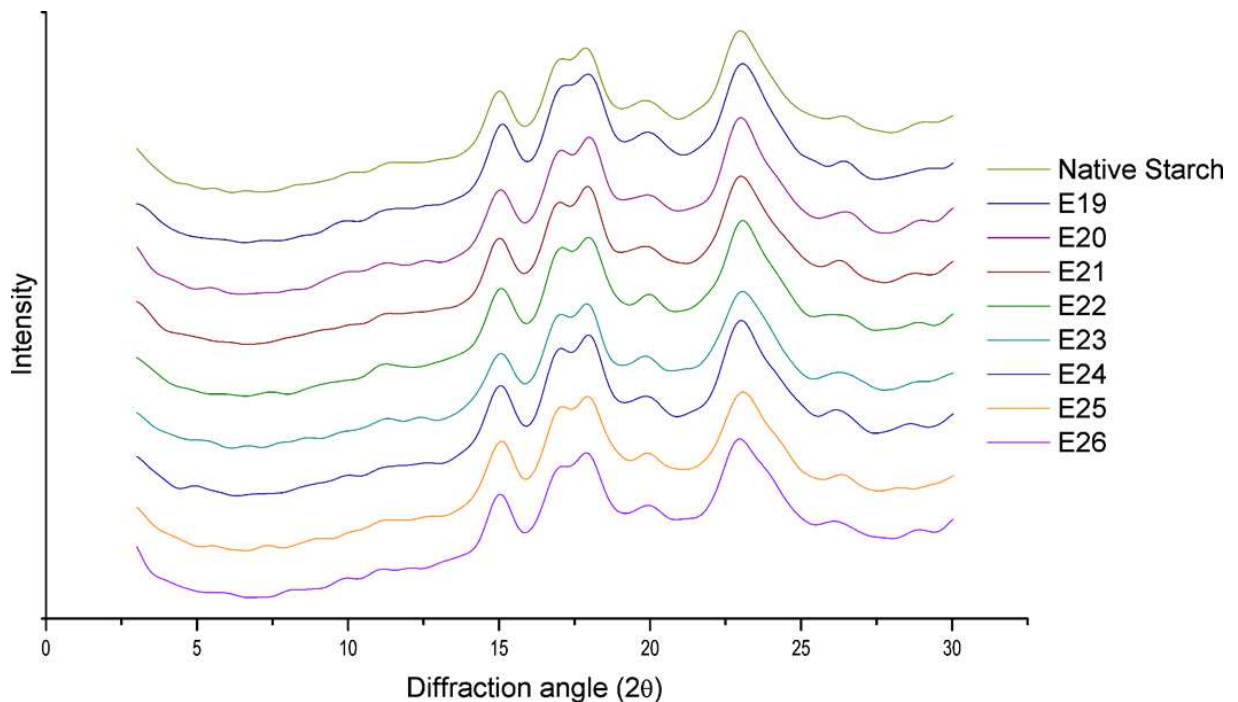


Fig. 2 Difração de raios X de amido de milho nativo e modificados por ultrassom e *heat-moisture*. E19 a E26: amidos de milho modificados por ultrassom e *heat-moisture* nos parâmetros apresentados na Tabela 1.

O amido de milho nativo apresentou padrão polimórfico do tipo A que é característico de amidos de cereais (AI; JANE, 2018; BULÉON et al., 1998; CORRADINI et al., 2005; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; HOOVER, 2010) (Figura 2). Os amidos modificados, apresentaram difractogramas semelhantes ao do amido nativo. Isso faz com que estes amidos também sejam classificados como tipo A (CHUNG; LIU; HOOVER, 2009; AI; JANE, 2018; BULÉON et al., 1998; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006).

Já foram observados em amidos tratados por *heat-moisture*, mudanças no padrão de difração de raios-X (do tipo B ou C para o tipo A) o aumento ou diminuição da susceptibilidade à enzimas e alterações nas intensidades (aumento e diminuição) dos picos em padrões de difração de raios-X do tipo A e do tipo B (CHUNG; LIU; HOOVER, 2009; HOOVER; VASANTHAN, 1994).

Tabela 3 Índices de cristalinidade e propriedades térmicas de amido de milho nativo e modificados por ultrassom e *heat-moisture*.

	<i>Relative crystallinity</i> %	<i>T_o</i> °C	<i>T_p</i> °C	<i>T_c</i> °C	ΔH J/g
<i>Native Starch</i>	31.99 ^b ±1.32	65.34 ^b ±0.30	69.74 ^b ±0.00	73.89 ^a ±0.41	11.22 ^a ±0.84
<i>E19</i>	27.70 ^d ±1.32	65.59 ^b ±0.10	69.66 ^b ±0.11	73.82 ^a ±0.08	12.56 ^a ±0.48
<i>E20</i>	31.08 ^{bc} ±1.75	65.32 ^b ±0.05	69.57 ^b ±0.00	73.86 ^a ±0.04	12.02 ^a ±0.54
<i>E21</i>	31.71 ^{bc} ±0.47	64.61 ^b ±0.08	68.94 ^b ±0.26	73.49 ^a ±0.70	13.21 ^a ±0.40
<i>E22</i>	33.06 ^{ab} ±0.44	64.79 ^b ±0.06	69.27 ^b ±0.04	73.48 ^a ±0.23	11.54 ^a ±1.25
<i>E23</i>	34.12 ^a ±1.19	66.66 ^a ±0.35	70.95 ^a ±0.28	74.61 ^a ±0.30	12.17 ^a ±0.96
<i>E24</i>	31.65 ^{bc} ±0.56	65.28 ^b ±0.03	69.58 ^b ±0.16	73.58 ^a ±0.32	11.73 ^a ±0.64
<i>E25</i>	30.31 ^c ±0.84	65.40 ^b ±0.21	69.63 ^b ±0.23	73.99 ^a ±0.24	12.43 ^a ±0.08
<i>E26</i>	32.40 ^b ±0.51	64.87 ^b ±0.04	69.16 ^b ±0.04	73.80 ^a ±0.22	13.60 ^a ±0.01

^a Letras iguais na coluna não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de significância utilizando a diferença menos significativa de Fisher.

E19 a E26: amidos de milho modificados por ultrassom e *heat-moisture* nos parâmetros apresentados na Tabela 1.

O perfil polimórfico dos amidos está associado ao empacotamento, conteúdo de água nas células unitárias de duplas hélices, formação de complexos lipídicos, e proporção de cadeias curtas mais frequentes em perfis do tipo A (CHUNG; LIU; HOOVER, 2009; HOOVER; VASANTHAN, 1994).

Hoover e Vasanthan (1994) indicam que as alterações que são ocasionadas nos perfis polimórficos no momento do tratamento *heat-moisture* estão associadas à umidade presente na amostra previamente ao tratamento e estas podem induzir a mudança das células unitárias de duplas hélices modificando o perfil de cristalinidade do tipo B para o tipo A. O amido de milho já apresenta o padrão polimórfico tipo A, que possui empacotamento das cadeias do amido bastante denso e, desta forma, mudanças não eram esperadas.

Porém quando associamos a utilização do ultrassom à presença de umidade utilizada nas amostras, os efeitos de entropia da região amorfa poderiam induzir a formação de células unitárias entre duplas hélices características do perfil polimórfico de cristalinidade do tipo B (XING et al., 2017; BEMILLER, 2018), o que não foi observado nos tratamentos do presente estudo. O padrão cristalino tipo A possui empacotamento das cadeias em duplas-hélices bastante denso, com poucas moléculas de água envolvidas na célula unitária. Os tratamentos brandos de ultrassom

utilizados neste estudo não foram capazes de alterar esta estrutura densa e, desta forma, novas moléculas de água não foram introduzidas nas células unitárias, mantendo o padrão polimórfico do tipo A.

Foi observada uma forte correlação linear positiva da cristalinidade relativa com os teores de SDS e RS somados para as amostras tratadas com US e HMT (Pearson $r = 0,90$). Já para as amostras tratadas apenas com HMT, esta correlação é fraca (Pearson $r = 0,13$). Isto pode estar relacionado à maior mobilidade das cadeias durante o tratamento HMT proporcionado pela despolimerização das cadeias do amido provocada pelo tratamento US, especialmente nas regiões amorfas, permitindo melhor empacotamento e dificultando o processo de digestão por enzimas. O US como tratamento prévio, pode favorecer a formação de duplas hélices, o que faz com que as regiões cristalinas sejam reordenadas de forma mais compacta e menos suscetíveis ao ataque de enzimas digestivas, de modo que o teor de SDS e RS do amido aumenta em relação ao amido nativo (HAN et al, 2021).

O ultrassom quando aplicado em suspensões de amidos, faz com que a cristalinidade diminua com o aumento gradual do tratamento (BERNARDO et al., 2016). Acredita-se que o ultrassom ocasionou rompimento de algumas interações entre cadeias internas da amilopectina, entre as duplas hélices e nas regiões amorfas da amilopectina principalmente, deixando-a fragilizada, aliviando os efeitos da entropia espacial. O enfraquecimento da cadeia, combinado com a energia térmica e umidade durante o HMT desacopla as hélices duplas do esqueleto amorfo da amilopectina. Essa dissociação torna as duplas hélices suficientemente móveis para se organizar em cristaltos mais perfeitos / maiores. Conseqüentemente, estes cristais mais perfeitos dificulta a ação das enzimas e, por isso, se torna mais lentamente digerível. (XING et al., 2017).

2.3.4. Propriedades Térmicas

As propriedades térmicas dos amidos de milho nativo e modificados foram avaliadas e as temperaturas de início (T_o), pico (T_p) e conclusão (T_c) da gelatinização e a entalpia de gelatinização (ΔH) estão apresentadas na Tabela 3.

Não foi observado variação significativa nas temperaturas de gelatinização das amostras (Tabela 3), exceto pela amostra E23 tratada apenas por *heat-moisture* nas

condições mais intensas de tempo e temperatura. Também não foram observadas alterações na entalpia de gelatinização das amostras modificadas em relação à amostra nativa.

O tratamento HMT tende a elevar as temperaturas de início (T_0), de pico (T_p) e de conclusão (T_c) em diferentes tipos de amidos (KLEIN. Et al, 2013; GUNARATNE. HOOVER, 2002; KAUR. GILL, 2018; HAN et al, 2021; XING et al., 2017; YASSAROH et al., 2019) devido à recombinação estrutural das cadeias do amido, incluindo interações de amilose-lipídeos, que dificultam a mobilidade da cadeia de amido dentro da lamela amorfa (ALI; DASH; ROUTRAY, 2020) e conseqüentemente, aumenta as temperaturas para fusão dos cristalitos de amido (BEMILLER, 2018), fato observado para a amostra E23. No entanto, o tratamento combinado de US e HMT, o efeito despolimerizante provavelmente causado pelo US pode ter permitido maior mobilidade das cadeias permitindo que a fusão dos cristalitos ocorresse em temperaturas menores, semelhantes às do amido nativo.

O ΔH reflete a perda da ordem helicoidal das cadeias do amido durante o processo de gelatinização. Muitos trabalhos que trataram amidos de diferentes fontes em diversas condições de HMT, observaram aumento no ΔH após a modificação (ALI; DASH; ROUTRAY, 2020; LI et al., 2019; LIAO et al., 2019), indicando que uma estrutura helicoidal melhor organizada foi obtida com o HMT. No tratamento combinado de US e HTM, a não alteração do ΔH em relação ao amido nativo pode ser um indicativo de despolimerização das cadeias, como também observado por Han et al. (2021), especialmente nas regiões amorfas, já que, mesmo havendo maior dificuldade de ação das enzimas digestivas devido ao melhor empacotamento das duplas hélices, menor energia foi requerida para a fusão dos cristalitos.

2.3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.

Os amidos de milho nativo e modificados foram observados em microscópio eletrônico de varredura (Figura 3). Tanto os grânulos do amido de milho nativo e os amidos modificados apresentaram grande parte das superfícies lisas com uma geometria poliédrica típica (REYES et al., 2021) e alguns grânulos de maior diâmetro com algumas Irregularidades na superfície. não sendo possível observar diferenças estruturais na superfície dos grânulos.

Estas características morfológicas já foram observadas em amidos de milho nativos por outros autores (REYES et al., 2021; ZHANG et al., 2021; RODRIGUES et al. 2020). Naturalmente, pequenos fenômenos de erosão podem ser causados na camada superficial dos grânulos por efeitos térmicos e de oxidação (REYES et al. 2021). Alguns autores atribuem estes defeitos de superfície nos grânulos ao processo utilizado para sua extração, através da lixiviação da amilose durante a hidratação (ZHANG et al., 2021) ou que envolve procedimentos como agitação, filtragem, moagem e secagem, e que afetam a qualidade e resistência superficial dos grânulos (RODRIGUES et al. 2020).

Tratamentos mais brandos de ultrassom influenciam menos no aspecto morfológico dos grânulos de amido, conferindo propriedades semelhantes à suspensões não tratadas (ZUO et al., 2009), inclusive podem não apresentar alteração na superfície do grânulo, já que estas rupturas nas superfícies do grânulo podem funcionar como ponto de acesso para as enzimas digestivas hidrolisarem o amido, e isto pode elevar o teor de RDS menos desejável e diminuir os teores de SDS e RS (ZUO et al., 2012; LUO et al., 2008).

As porosidades e rachaduras quando ocorrem nestes grânulos, podem elevar a suscetibilidade à digestão enzimática, considerando que estas imperfeições na superfície do grânulo funcionam como acesso facilitando a penetração das enzimas no interior dos grânulos (ZUO et al., 2012; LUO et al., 2008) elevando a área de contato com as enzimas e acelerando o processo de digestão (ABEDI; POURMOHAMMADI; ABBASI, 2019).

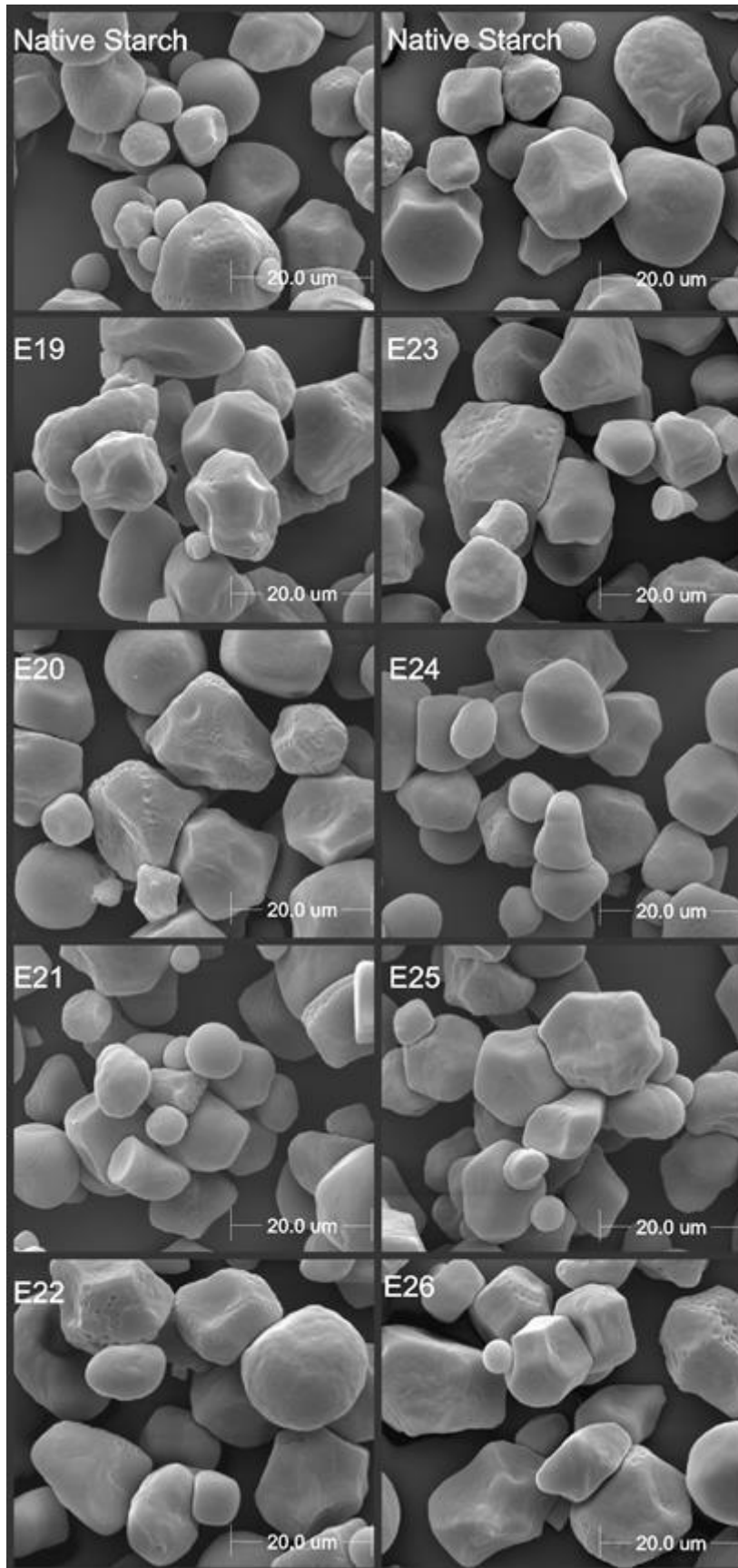


Fig. 3 Microscopia eletrônica de varredura do milho nativo e tratados (5000x).

2.4 CONCLUSÃO

Foi possível otimizar o teor de amido lentamente digerível através de modificações físicas por ultrassom e tratamento *heat-moisture*, utilizando a metodologia de superfície de respostas. O maior teor de amido lentamente digerível ($23,7 \pm 2,2$ %), após o cozimento da amostra, foi obtido no ponto central do planejamento, nas condições de 9,0% de amplitude no ultrassom por 5,0 minutos, seguido por tratamento no *heat-moisture* à 74,0°C por 11,0 minutos. O ponto de ótimo obtido pela superfície de resposta, baseando-se nos pontos estacionários, aproximadamente 23,7%, foi encontrado em 9,0% de amplitude aplicada no tratamento por ultrassom durante 4,91 minutos e tratamento no *heat-moisture* em 73,51°C durante 11,95 minutos. As alterações estruturais observadas para os amidos tratados foram mínimas em relação à morfologia dos grânulos, perfil polimórfico de difração de raios-X, variação nas temperaturas e entalpias de gelatinização. Uma correlação positiva entre cristalinidade relativa e os teores de SDS e RS somados, permitiu melhor elucidação da necessidade do US como tratamento prévio, favorecendo o melhor empacotamento das duplas hélices no HMT, tornando os amidos menos suscetíveis às enzimas digestivas.

Este estudo fornece uma abordagem potencial para regular a digestão de alimentos ricos em amido com a digestibilidade desejada por meio de tratamento ultrassônico associado ao tratamento *heat-moisture*.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDI, E.; POURMOHAMMADI, K.; ABBASI, S. Dual-frequency ultrasound for ultrasonic-assisted esterification. **Food Science & Nutrition**, v. 7, p. 2613–2624, 2019.
- AI, Y.; HASJIM, J.; JANE, J. L. Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch. **Carbohydrate Polymers**, V. 92, n. 1, p. 120–127, 2013.
- AI, Y.; JANE, J. L. Chapter 3 - Understanding Starch Structure and Functionality. In: AI, Yongfeng., et al. **Starch in Food**. Second Edition. United Kingdom: Woodhead Publishing, p. 151-178. 2018.
- ALI, N. A.; DASH, K. K.; ROUTRAY, W. Physicochemical characterization of modified lotus seed starch obtained through acid and heat moisture treatment. **Food Chemistry**, v. 319, n. 126513, 2020.
- BARUA, S.; SRIVASTAV, P. P. Effect of heat-moisture treatment on resistant starch functional and thermal properties of mung bean (*Vigna radiate*) starch. **Journal of Nutritional Health & Food Engineering**, v. 7, n. 4, p. 358–363, 2017.
- BEMILLER, J. N. Physical Modification of Starch. **Starch in Food**, p. 223–253, 2018.
- BERNARDO, C. O.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. Effect of ultrasound on the extraction and modification of starches. **Ciência Rural**, v. 46, p. 739-746, 2016.
- BRASIL. Portaria SVS/MS nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - Definições, Classificação e Emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 de outubro de 1997.
- BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. A Simple Test for Heteroscedasticity and Random Coefficient Variation. **Econometrica**, v. 47, n. 5, p. 1287-1294, 1979.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: Structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.
- CHEN, B.; JIA, X.; MIAO, S.; ZENG, S.; GUO, Z.; ZHANG, Y.; ZHENG, B. Slowly digestible properties of lotus seed starch-glycerine monostearin complexes formed by high pressure homogenization. **Food Chemistry**, v. 252, p. 115–125, 2018.
- CHUNG, H. J.; LIU, Q.; HOOVER R. Impact of annealing and heat-moisture treatment on rapidly digestible, slowly digestible and resistant starch levels in native and gelatinized corn, pea and lentil starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p 436 – 447, 2009.
- CORRADINI, E.; LOTTI C.; MEDEIROS, E. S.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELI, A. A. S.; MATTOSO, L.H.C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados de milho com diferentes teores amilose. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.

COSTA, M. S.; VOLANTI, D. P.; GROSSMANN, M. V. E.; FRANCO, C.M.L. Structural, thermal, and morphological characteristics of cassava amyloextrins. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 98, p. 2751-2760, 2018.

DEY, A.; SIT, N. Modification of foxtail millet starch by combining physical, chemical and enzymatic methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 314–320, 2017.

DING, Y., LIANG, Y., LUO, F., OUYANG, Q., LIN, Q. Understanding the mechanism of ultrasonication regulated the digestibility properties of retrograded starch following vacuum freeze drying. **Carbohydrate Polymers**, v. 228, p. 1-10, 2020.

DING, Y., LUO, Feijun. LIN, Qinlu. Insights into the relations between the molecular structures and digestion properties of retrograded starch after ultrasonic treatment. **Food Chemistry**, v. 294, p. 248-259, 2019.

ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, n. 46, p.33 – 50, 1992.

GUNARATNE, A.; HOOVER, R. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches, **Carbohydrate Polymers**. v. 49, n. 4, p. 425 – 437, 2002.

HAN, L.; WEI, Q.; CAO, S.; YU, Y.; CAO, X.; & CHEN, W. The assisting effects of ultrasound on the multiscale characteristics of heat-moisture treated starch from *Agriophyllum squarrosum* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 471–480, 2021.

HASEK, L. Y.; PHILIPS, R. J.; ZHANG, G.; KINZIG, K. P.; KIM, C. Y.; POWLEY, T. L.; HAMAKER, B. R. Dietary slowly digestible starch triggers the gut- brain axis in obese rats with accompanied reduced food intake. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.62, p. 1-6. 2018.

HONG, J.; LI, L.; LI, L.; LIU, C.; ZHENG, X.; BIAN, K. Effect of Heat–Moisture treatment on physicochemical, thermal, morphological, and structural properties of mechanically activated large A- and small B-wheat starch granules. **Journal of Food Science**. v. 84, n. 10, p. 2795-27805. 2019.

HOOVER, R. The impact of heat–moisture treatment on molecular structures and properties of starches isolated from different botanical sources. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Canada, v. 50, n. 9, p. 835 – 847, 2010.

HOOVER, R.; VASANTHAN, T. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of cereal, legume, and tuber starches. **Carbohydrate Research**, p. 33–53, 1994.

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

JAMBRAK, A. R.; HERCEG, Z.; ŠUBARIĆ, D.; BABIĆ, J.; BRNČIĆ, M.; BRNČIĆ, S. R.; GELO, J. Ultrasound effect on physical properties of corn starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 91 – 100, 2010.

KAUR, H.; GILL, B. S. Effect of high-intensity ultrasound treatment on nutritional, rheological and structural properties of starches obtained from different cereals, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 367 – 375, 2019.

KLEIN, B.; PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; ZAVAREZE, E. R.; COLUSSI, R.; EVANGELHO, J. A.; GUTKOSKI, L. C.; DIAS, A. R. G. Effect of single and dual heat-moisture treatments on properties of rice, cassava, and pinhao starches, **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1578–1584, 2013.

KUDDUS, M. Introduction to Food Enzymes. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 1–18, 2019.

LI, J.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R.; ROSSNAGEL, B. Starch from hull-less barley: V. In vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidases. **Food Chemistry**, v.84, p.621-632, 2004.

LI, M. N.; ZHANG, B.; XIE, Y.; CHEN, H. Q. Effectos of debranching and repeated heat-moisture treatments on structure, physicochemical properties and in vitro digestibility of wheat starch. **Food Chemistry**, v. 294, p. 440-447. 2019.

LIAO, L.; LIU, H.; GAN, Z.; WU, W. Structural properties of sweet potato starch and its vermicelli quality as affected by heat-moisture treatment. **International Journal of food properties**, v. 22, n. 1, p. 1122, 2019.

LUO, Z.; FU, X.; HE, X.; LUO, F.; GAO, Q.; YU, S. Effect of Ultrasonic Treatment on the Physicochemical Properties of Maize Starches Differing in Amylose Content. **Starch - Stärke**, China, v. 60, n. 60, p. 646 - 653, 2008.

MENDES, M. P.; DEMIATE, I. M.; MONTEIRO, A. R. G. Effect of individual and combined physical treatments on the properties of corn starch. **Acta Scientiarum**, v. 40, p. 2-7, 2019.

MIAO, M.; JIAN, B.; CUI, S. W.; ZHANG, T.; JIN, Z. Slowly Digestible Starch - A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 1642-1657, 2015.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. Ed. 9^a, John Wiley & Sons, Inc, 2017.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.r-project.org/>. 2022.

REYES, I.; HERNANDEZ-JAIMES, C.; VERNON-CARTER, E. J.; BELLO-PEREZ, L. A.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Air Oxidation of Corn Starch: Effect of Heating Temperature on Physicochemical Properties and In Vitro Digestibility. **Starch - Stärke**, v. 73 (3-4), n. 2000237, p. 1 – 9, 2021.

RODRIGUES, S. C. S.; SILVA, A. S.; CARVALHO, L. H.; ALVES, T. S.; BARBOSA, R. Morphological, structural, thermal properties of a native starch obtained from babassu mesocarp for food packaging application. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n. 6, p. 15670 – 15678, 2020.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant starch – A review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 5, p 1 – 17, 2006.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**,v. 52, n. 3/4, 1965.

SILVA, P. C. F.; RAMIREZ, J. A.; PEREZ, L. A. B. Effect of Dual Modification Order with Ultrasound and Hydrothermal Treatments on Starch Digestibility. **Starch - Stärke**, v. 70, n. 5-6, 2018.

SPERANZA, P., LOPES, D. B., & MARTINS, I. M. Development of Functional Food From Enzyme Technology: A Review. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 263 - 286. 2019.

XING, J.; LIU, Y.; LI, D.; WANG L.; ADHIKARI, B. Heat-moisture treatment and acid hydrolysis of corn starch in different sequences. **LWT - Food Science and Technology**, n. 79, p. 11 – 20, 2017.

YASSAROH, Y.; WOORTMAN, A. J. J.; LOOS, K. A new way to improve physicochemical properties of potato starch. **Carbohydrate Polymers**. v 204, p.1-8, 2019.

ZANELA, J.; SHIRAI, M. A. REIS, M. O.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Mixture design to develop biodegradable sheets with high levels of starch and polyvinyl alcohol. **Starch/Stärke**, n. 67, p. 1011 – 1019, 2015.

Zhang, Y.; Zhao, X.; BAO, X.; XIAO J.; LIU, H. Effects of pectin and heat-moisture treatment on structural characteristics and physicochemical properties of corn starch. **Food Hydrocolloids**, v. 117, n. 106664, p. 1 – 10, 2021.

ZUO, J. Y.; KNOERZER, K.; MAWSON, R.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 4, p. 462 - 468, 2009.

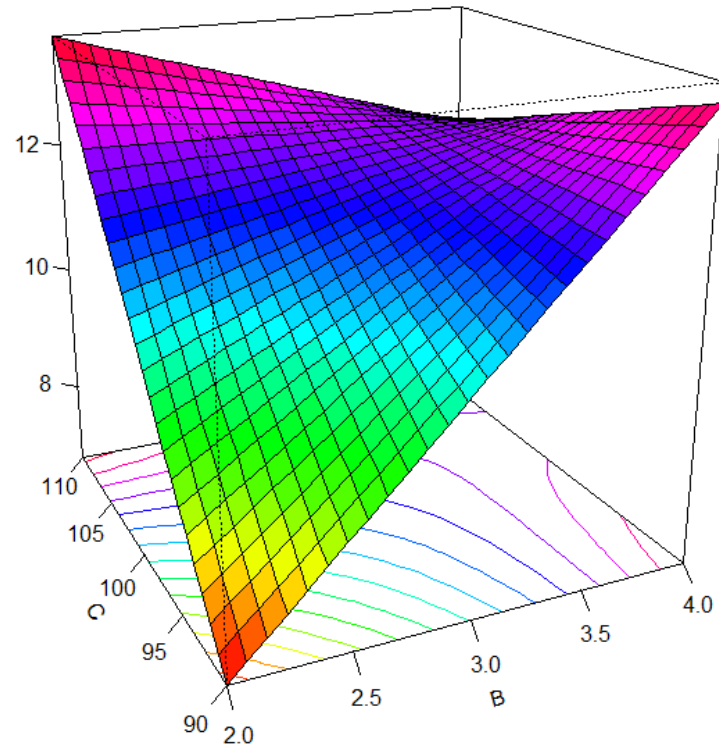
ZUO, Y. Y. J.; HÉBRAUD, P.; HEMAR, Y.; & ASHOKKUMAR, M. Quantification of high-power ultrasound induced damage on potato starch granules using light microscopy. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 421 - 426, 2012.

ANEXO 01: Materiais suplementares (Recurso Online)

Recurso online 1 – Codificação dos ensaios do terceiro planejamento e respectivas respostas.

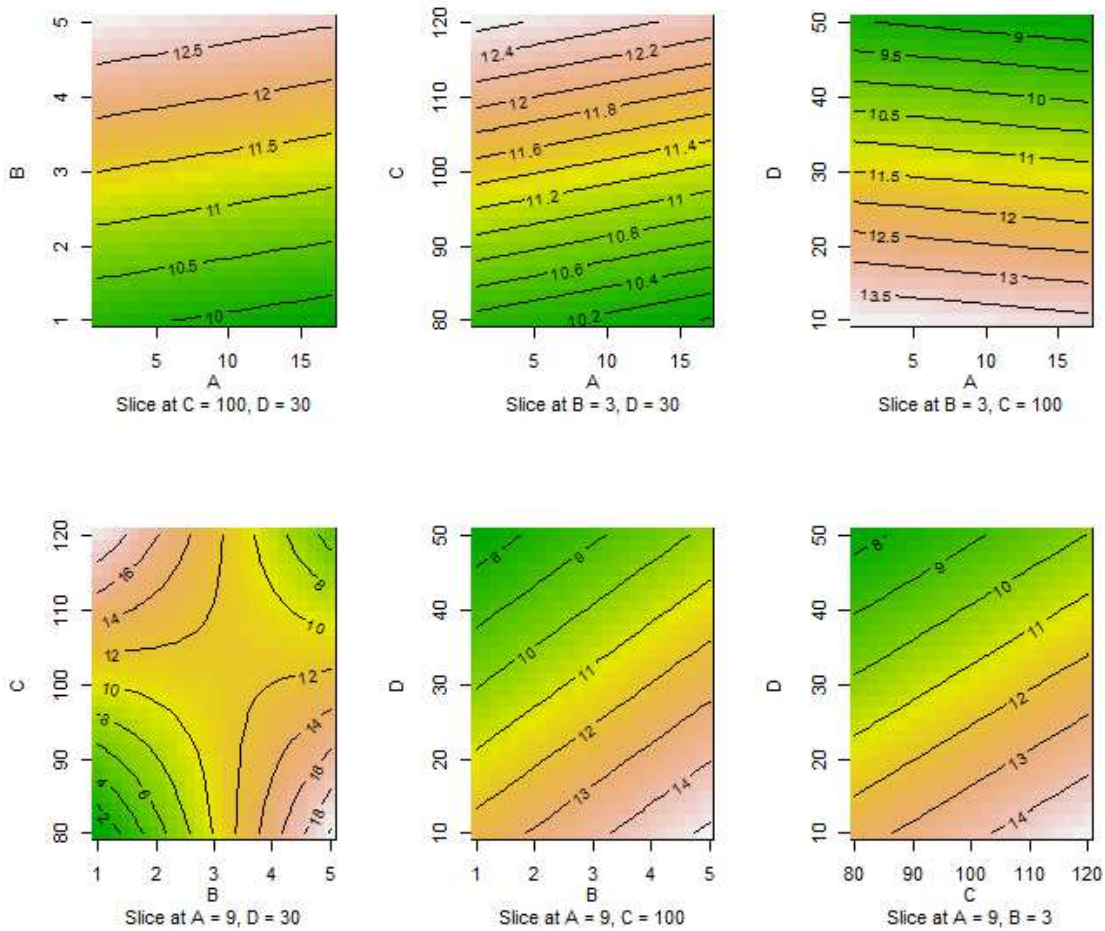
Ensaio	Variáveis (Codificação)				Digestão in vitro		
	A %	B Min	C °C	D min	RDS %	SDS %	RS %
E01	5 (-1)	2 (-1)	90 (-1)	20 (-1)	69,0	6,9	24,1
E02	13 (+1)	2 (-1)	90 (-1)	20 (-1)	66,1	12,7	21,2
E03	5 (-1)	4 (+1)	90 (-1)	20 (-1)	58,8	14,4	26,8
E04	13 (+1)	4 (+1)	90 (-1)	20 (-1)	63,0	15,5	21,5
E05	5 (-1)	2 (-1)	110 (+1)	20 (-1)	63,2	11,2	25,6
E06	13 (+1)	2 (-1)	110 (+1)	20 (-1)	65,6	14,5	19,9
E07	5 (-1)	4 (+1)	110 (+1)	20 (-1)	64,0	19,7	16,3
E08	13 (+1)	4 (+1)	110 (+1)	20 (-1)	70,1	4,4	25,5
E09	5 (-1)	2 (-1)	90 (-1)	40 (+1)	71,2	5,8	23,0
E10	13 (+1)	2 (-1)	90 (-1)	40 (+1)	66,7	1,5	31,8
E11	5 (-1)	4 (+1)	90 (-1)	40 (+1)	65,8	11,2	23,0
E12	13 (+1)	4 (+1)	90 (-1)	40 (+1)	66,0	12,6	21,4
E13	5 (-1)	2 (-1)	110 (+1)	40 (+1)	64,9	13,3	21,8
E14	13 (+1)	2 (-1)	110 (+1)	40 (+1)	63,0	15,7	21,3
E15	5 (-1)	4 (+1)	110 (+1)	40 (+1)	65,9	10,2	23,9
E16	13 (+1)	4 (+1)	110 (+1)	40 (+1)	66,9	12,6	20,5
E17	9 (0)	3 (0)	100 (0)	30 (0)	63,6	12,5	23,9
E18	9 (0)	3 (0)	100 (0)	30 (0)	69,6	9,3	21,1
E19	9 (0)	3 (0)	100 (0)	30 (0)	63,5	13,1	23,5
E20	9 (0)	3 (0)	100 (0)	30 (0)	60,7	10,0	29,3
E21	1 (-2)	3 (0)	100 (0)	30 (0)	63,5	13,2	23,3
E22	17 (+2)	3 (0)	100 (0)	30 (0)	67,3	13,8	19,0
E23	9 (0)	1 (-2)	100 (0)	30 (0)	66,7	10,9	22,4
E24	9 (0)	5 (+2)	100 (0)	30 (0)	68,1	9,8	22,1
E25	9 (0)	3 (0)	80 (-2)	30 (0)	62,2	11,4	26,5
E26	9 (0)	3 (0)	120 (+2)	30 (0)	59,2	7,9	32,9
E27	9 (0)	3 (0)	100 (0)	10 (-2)	65,3	14,8	19,8
E28	9 (0)	3 (0)	100 (0)	50 (+2)	63,3	8,1	28,6

A) Amplitude aplicada no ultrassom; B) Tempo de tratamento no Ultrassom; C) Temperatura utilizada no *heat-moisture*; D) Tempo de tratamento no *heat-moisture*; RDS) Amido rapidamente digerível; SDS) Amido lentamente digerível; e RS) Amido resistente.



Slice at A = 9, D = 30

Recurso online 2 - Superfície de resposta da interação entre o ponto B e C. B) tempo no US em min; e C) temperatura em °C.



Recurso Online 3 - Gráfico de contorno. A) Amplitude em %; B) tempo no US em min; C) temperatura em °C; e D) tempo no HMT em min.

Recurso Online 4 – Pontos do *steepest ascent*, caminho de ascensão da variável dependente.

Ensaio	Variáveis (Codificação)				Digestão in vitro		
	A %	B Min	C °C	D min	RDS %	SDS %	RS %
E01	9,0	3,0	100,0	30,00	68,1	8,9	22,9
E02	9,0	3,5	93,5	25,25	57,2	20,4	22,4
E03	9,0	4,0	87,0	20,50	61,5	20,5	18,0
E04	9,0	4,5	80,5	15,75	63,2	13,6	23,2
E05	9,0	5,0	74,0	11,00	55,8	27,4	16,8
E06	9,0	5,5	67,5	6,25	55,2	15,6	29,2