

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Amido Resistente: Estudo da Estrutura, Ocorrência e
Propriedades Nutricionais em Amido de Milho e de
Banana
Tese de mestrado**

Maria Aparecida Vieira Teixeira
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. César F. Ciacco
Orientador

Prof. Dra. Débora Q. Tavares
Co-orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por MARIA APARECIDA VIEIRA TEIXEIRA aprovada pela Comissão Juizadora em 16 de fevereiro de 1998.

Campinas, 16 de fevereiro de 1998.


Prof. Dr. CESAR F. CIACCO
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas – SP
1998

BANCA EXAMINADORA

César F. Ciacco

Prof. Dr. César F. Ciacco
(orientador)

Prof.^a Dr.^a Celina R. O. Camargo
(membro)

Célia Maria Landi Franco

Prof.^a Dr.^a Célia M. L. Franco
(membro)

Gláucia M. Pastore

Prof.^a Dr.^a Gláucia M. Pastore
(membro)

Campinas, de fevereiro de 1998

Dedico
Aos meus pais, Juraci e Terezinha
Às minhas irmãs, Paula e Patrícia

AGRADECIMENTOS

À Deus e à minha família.

Aos Professores César F. Ciacco e Débora Q. Tavares, pela orientação, incentivo, confiança e amizade.

Às Professoras Celina Camargo, Célia Franco e Gláucia Pastore, pelo apoio e rapidez na correção da tese.

Aos Professores Nelson Horácio Pezoa-Garcia, Hillary Menezes e Ramón Hinojosa, pela amizade e colaboração.

Ao Professor Renato Cruz, pela amizade e apoio.

Ao Candy, Susi, Vi e Cris, pelo companheirismo, amizade, apoio e por acreditarem em mim.

Ao Teen, Bibi, Paulo, Mieko, Karina, Rose, Conci, André e a todos os meus amigos, pelo carinho.

À Francy, Manuel e Martha, pelo incentivo, amizade e colaboração.

À Kelly, Sr. José, Helena e a todos os amigos do laboratório de cereais, pelo carinho e colaboração.

À Ana Loudes, Yara, Eliete, Marçal, Aninha, Mara, Alice, Ana Maria, Waldeci, Adalto e Homero, pela amizade e colaboração.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), nas pessoas do Professor Gil Serra e Alexandre Bonezzi, pela colaboração na realização das análises cromatográficas dos amidos.

À Professora Isabel Rodrigues e a Henelyta, pela ajuda no delineamento experimental.

À Refinações de Milho Brasil, pelo fornecimento da matéria prima.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Pag
Índice de Tabelas.....	iv
Índice de Figuras.....	v
Resumo.....	vii
Summary.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. AMIDO RESISTENTE.....	3
2.1.1. DEFINIÇÃO	3
2.1.2. TIPOS	4
2.2. FATORES QUE AFETAM A FORMAÇÃO DO AMIDO RESISTENTE	4
2.2.1. Teor de Amilose-Tipo de Amido.....	6
2.2.2. Umidade	6
2.2.3. Tempo e temperatura de armazenamento.....	6
2.2.4. Ciclos de autoclavagem/resfriamento	7
2.2.5. Presença de lipídeos	8
2.2.6. Proteínas	8
2.3. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO AMIDO RESISTENTE	8
2.4. ESTRUTURA DO AMIDO RESISTENTE	10
2.5. ANÁLISE DA ESTRUTURA DO AMIDO RESISTENTE	15
2.5.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	15
2.5.2. Difração de Raio-X.....	16
2.5.3. Cromatografia por Exclusão	17
2.5.4. Ressonância Magnética Nuclear (NMR).....	17
2.5.5. Cromatografia de Troca Iônica de Alta Performance (HPAEC)	17
2.5.6. Microscopia.....	18
2.6. CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS: IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL	18

III. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. MATERIAL.....	22
3.1.1. Matérias Primas.....	22
3.1.2. Reagentes Químicos.....	22
3.1.3. Aparelhos e Equipamentos.....	22
3.2. MÉTODOS.....	23
3.2.1. Extração do Amido da Banana (Musa AAB 'TERRA').....	23
3.2.2. Composição Química dos Amidos.....	25
3.2.2.1. Umidade.....	25
3.2.2.2. Proteína.....	27
3.2.2.3. Gordura.....	27
3.2.2.4. Fibras.....	27
3.2.2.5. Cinzas.....	27
3.2.2.6. Amilose.....	27
3.2.3. Tratamento Hidrotérmico do Amido de Milho.....	27
3.3.4. Quantificação do Amido Resistente (AR).....	28
3.3.5. Caracterização dos Amidos.....	31
3.3.5.1. Propriedades de pasta.....	32
3.3.5.2. Análises microscópicas.....	33
3.3.5.3. Difractogramas de Raio-x.....	33
3.3.5.4. Estrutura Fina dos Amidos.....	34
3.3.5.5. Ensaio Biológicos.....	37
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS AMIDOS.....	39
4.2. EFEITO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NA FORMAÇÃO DO AMIDO RESISTENTE.....	41
4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS.....	47
4.3.1. Propriedades de Pasta.....	47
4.3.2. Análises Microscópicas.....	51
4.3.3. Difractogramas de Raio-x.....	55
4.3.5. Análises Cromatográficas em Gel Sephadex G-50.....	57
4.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	64
4.4.1. Resultados Fisiológicos.....	64
4.4.2. Resultados Histológicos.....	77

V. CONCLUSÕES	81
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ÍNDICE DE TABELAS

	Pag
1. Classificação nutricional do amido <i>in Vitro</i>	5
2. Delineamento experimental.....	29
3. Composição centesimal e teores de amilose e Amido Resistente do amido normal de milho e de banana.....	40
4. Variação do teor de AR em amido de milho normal em função das das variáveis: umidade, tempo e temperatura de armazenamento dos géis.....	42
5. Análise de variância para produção de Amido Resistente: modelos linear e quadrático.....	43
6. Parâmetros das propriedades de pasta dos amidos de milho nativo, AR de milho e amido de banana.....	48
7. Perfil de eluição do amido de banana, amido de milho nativo e do amido resistente de milho.....	58
8. Ingesta (g).....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
1. (a e b). Proposta de EERLINGER & DELCOUR (1995) para a formação de AR em soluções aquosas de amilose.....	11
2. Fluxograma da extração do amido de banana.....	24
3. Modelo de funcionamento de um hidrociclone.....	26
4. Fluxograma do método utilizado para determinação do AR.....	30
5. Método enzimático utilizado para o estudo da estrutura do amido.....	35
6. Variação na percentagem de Amido Resistente obtido em função da Umidade e dos tempo e temperatura de armazenamento dos géis.....	45
7. Propriedades de pasta dos amidos de milho nativo, AR de milho e amido de banana.....	49
8. Micrografia ao SEM (microscópio eletrónico de varredura) de amido normal de milho (aumento 500 X).....	52
9. Micrografia aumentada (1000X) da figura anterior.....	52
10. Micrografia ao SEM do amido de milho após tratamento hidrotérmico, secagem, trituração e peneiramento (AR de milho), aumento 350X.....	53
11. Micrografia do AR de milho (aumento 1000X).....	53
12. Micrografia ao SEM do amido de banana (aumento de 1000X).....	54
13. Difractograma de raio-x do amido de milho.....	56
14. Difractograma de raio-x do AR Milho.....	56
15. Difractograma de raio-x do amido de banana.....	56
16. Padrão de eluição das frações de carboidratos da amostra de amido de banana após ação da pululanase e/ou β -amilase em gel Sephadex G-50.....	59
17. Padrão de eluição das frações de carboidratos da amostra de Amido Resistente de milho após ação da Pululanase e/ou β -amilase em gel Sephadex G-50.....	60
18. Padrão de eluição das frações de carboidratos da amostra de amido de milho após ação da Pululanase e/ou β -amilase em gel Sephadex G-50.....	61
19. Curva ponderal dos Grupos 1, 2 e 3.....	66
20. Peso corporal e a respectiva ingesta.....	68

21. Comparação entre o AR determinado <i>in vitro</i> e o AR determinado <i>in vivo</i> proveniente do conteúdo do caecum de ratos.....	69
22. Porcentagem de AR e de ALD presentes no caecum.....	70
23. AR e ALD presentes nas fezes excretadas pelos ratos.....	72
24. Porcentagem de AR e ALD nas fezes colhidas no caecum e também nas excretadas pelo reto.....	73
25. Massa (g) de fezes excretada.....	74
26. Peso (g) médio do ceco e o pH dos grupos 1, 2 e 3.....	75
27. Íleo de rato do Grupo 2.....	77
28. Caecum normal de rato do grupo 3.....	78
29. Vilosidades do íleo rato do Grupo 2 e 3.....	79
30. Detalhe da massa de microorganismos sob tratamento Gram.....	80

RESUMO

No presente trabalho foi estudada a ocorrência de Amido Resistente (AR) em amido de milho e em amido de banana (naturalmente resistente) e investigado o efeito das variáveis: umidade de condicionamento, tempo e temperatura de armazenamento dos géis, na formação do AR em amido normal de milho; além das características físico-químicas do AR de milho e de banana, e sua estrutura fina. Paralelamente foi realizado um ensaio biológico visando verificar como os ARs medidos *in vitro* se comportariam diante da situação fisiológica oferecida pelo trato intestinal dos ratos.

Após a determinação da composição química dos amidos, o amido de milho foi submetido a um processamento hidrotérmico, visando a sua retrogradação. Posteriormente os amidos de milho e de banana foram caracterizados quanto às suas propriedades de pasta e analisados cristalográfica, microscópica e cromatograficamente, além de terem sido submetidos a um ensaio com ratos.

A análise da composição centesimal sugere que o teor de AR (2,5% de AR em amido normal de milho e 49,61% de AR em amido de banana) não se relaciona com a composição química do grânulo.

Os grânulos do amido de banana demonstraram poliformismo, superfícies lisas, tamanhos entre 10 a 50 μm e padrão de difração de raio-x tipo B. Quando cromatografados em coluna de permeação em gel e submetidos à hidrólises com pululanase e/ou β -amilase foi observado o aparecimento de uma fração linear com DP 34 resistente à β -amilólise. Essa resistência poderia ser decorrente de alterações químicas ao longo da molécula ou de interações entre cadeias que impediriam a ação da enzima e que, provavelmente, são provenientes da amilose. Os resultados obtidos no estudo das propriedades de pasta indicam que a estrutura cristalina que mantém o grânulo do amido de banana coeso, por si só, não explica o alto teor de AR encontrado. Desta forma, a resistência do amido de banana parece ser ocasionada por outros fatores que impedem o ataque enzimático.

Nos cromatogramas do amido de milho normal não foi observada a fração com DP 34 resistente à β -amilólise, apesar dos resultados obtidos no estudo das

propriedades de pasta indicar maior coesividade para o amido de milho normal (padrão de difração A) em relação ao amido de banana (padrão de difração B).

O tratamento hidrotérmico do amido normal de milho quase triplicou o teor de AR (7,15% de AR). Através das análises no RVA ("Rapid visco Analyser") pode-se observar que a retrogradação do amido de milho gelatinizado torna o amido menos susceptível ao inchamento durante o aquecimento, indicando a formação de estruturas cristalinas coesas.

O AR de milho (7,15% de AR), constituído por fragmentos porosos que evidenciam vitrificação, apresentou padrão de difração tipo C, possivelmente porque as condições de processamento em que foi produzido não permitiram a completa gelatinização dos cristais. A não significância do tempo de armazenamento dos géis na produção do AR e a fração linear com DP 34 resistente à β -amilólise presente nos cromatogramas, sugerem a participação da amilose na formação da estrutura resistente.

Durante o período do ensaio biológico, que apresentava ratos divididos em 3 grupos com dietas contendo: amido normal de milho (G1); amido resistente de milho (G2) e amido de banana (G3). Ocorreu maior ingestão inicial nos grupos G2 e G3, mas o ganho ponderal foi semelhante para todos os 3 grupos. Com relação a quantidade de fezes excretadas, o Grupo G3 excretou desde o início o triplo de fezes em relação aos outros dois grupos. A histologia do intestino delgado e do intestino grosso não foi alterada; embora o caecum do grupo 2 e do grupo 3 estivesse muito dilatado não ocorreu alteração de estrutura de tecido do caecum. A dilatação do caecum evidenciou a ocorrência de fermentação do conteúdo luminal e sensível diminuição do pH.

Foi observado que o AR *in vivo* era composto por 2 frações: uma que resiste à hidrólise por α -amilase/16 horas/37°C e recebe o nome de AR e outra que é hidrolisada, recebendo o nome de ALD (Amido Lentamente Digerível).

O ensaio demonstrou que a hidrólise *in vivo* é superior em relação à *in vitro*. Nos grupos G2 e G3 a superioridade de hidrólise *in vivo* é cerca de 50% em relação à hidrólise *in vitro*.

SUMMARY

In this work the occurrence of resistant starch (RS) in normal corn and banana (naturally resistant) starches was studied and also the effects of conditioning moisture, storage temperature and time on the formation of RS in normal corn starch. The physico-chemical characteristics of the RS from corn and banana were also studied, including the molecular structure and behavior in the gastrointestinal tract of rats.

The corn starch was submitted to a hydrothermal process in order to obtain retrograded starch. The normal corn and banana starches were characterized according to their pasting properties, x-ray diffraction patterns, microscopy and gel exclusion chromatography after sequential amyolysis with β -amylase and pulullonase. These starches were also submitted to a biological assay with rats.

The proximate composition data showed that the percentage of RS is not related to the chemical composition of the granule.

Banana starch showed granules with a certain polyformism, smooth surface, sizes from 10 to 50 μm and a B x-ray diffraction pattern. The dextrans from this starch, obtained by the sequential action of β -amylase and/or pulullonase and separated by gel permeation chromatography, showed a linear fraction with DP 34 resistant to these enzymes. This resistance could be due to chemical alterations in the molecular chain, preventing hydrolysis by these enzymes. The pasting characteristics indicated that the high RS content observed in this starch, could not be explained by the physical structure which maintains the granule. Thus the observed resistance of the banana starch would be due to other factors which impede the enzymatic hydrolysis.

Exclusion gel chromatography of the residues obtained after β -amylase and/or pulullonase hydrolysis, did not show a fraction with DP 34, although the pasting properties indicated a higher granule cohesivity than that of the banana starch.

The hydrothermal treatment almost triplicated the RS content (7.15%) of the corn starch. The pasting properties, obtained from the RVA (Rapid Visco Analyser) analyses, showed that the retrogradation of the corn starch made the granule less

susceptible to swelling during the gelatinization process, which indicated the formation of more cohesive structures inside the granule.

The retrograded corn starch, with 7.15% RS, was constituted of porous fragments and a C type diffraction pattern, possibly because the hydrothermal process was unable to gelatinize all granules. On the other hand, the non significance of storage time on the formation of RS in conjunction with the absence of a fraction with DP 34, suggested the participation of amylose in this resistant structure.

No physiological adaptation was detected in the biological assays with diets containing normal corn (G1), retrograded corn (G2) and banana (G3) starches. The appearance of the intestinal tract varied according to the diet, especially the caecum. All three diets caused an expansion of the caecum and decrease in the pH, indicating some fermentation. The G3 diet resulted in three times more faeces than the other diets.

The *in vivo* hydrolysis showed that the RS was composed of two fractions: one resistant to α - amylase hydrolysis/16 hours/37°C called RS, and the other which is hydrolyzed, called slow digestible starch (SDS).

The *in vivo* hydrolysis was 50% more efficient than that observed *in vitro* for G2 and G3.

I. INTRODUÇÃO

O amido é o componente mais abundante da maioria dos alimentos sendo responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados (GALLANT et al., 1992).

A definição do amido como um carboidrato nutricionalmente disponível é baseada na suposição de que suas macromoléculas formadoras, amilose e amilopectina, seriam facilmente hidrolisadas no trato intestinal, produzindo carboidratos de baixo peso molecular. Entretanto, a origem e as características do amido, bem como as condições de processamento a que são submetidos os produtos amiláceos, são de grande importância na alteração das taxas de hidrólise *in vivo* e *in vitro* (COLONNA et al., 1992).

EERLINGER & DELCOUR (1995) definiram o amido com base na sua resistência à hidrólise enzimática. De acordo com estes pesquisadores, Amido Resistente (AR) pode ser definido como a parcela do grânulo, ou de seus produtos de degradação, que não são absorvidos/digeridos no intestino delgado de indivíduos saudáveis, podendo entretanto ser fermentado no intestino grosso.

Segundo COLONNA et al. (1992) a extensão do efeito do processamento nos alimentos pode ser explicada em termos de modificações estruturais. Estas modificações devem ser levadas em consideração para um melhor entendimento da taxa de hidrólise do amido.

A observação de que alguns amidos resistem à hidrólise por enzimas pancreáticas, podendo alcançar o intestino grosso, tem importante implicação na saúde humana. As atividades fisiológicas no intestino, especialmente o hábito intestinal, a produção de ácidos graxos de cadeia curta (scfa), o metabolismo do nitrogênio, a atividade bacteriológica e a proliferação celular, são amplamente controladas pelos carboidratos que entram no colon, dos quais os mais conhecidos são os polissacarídeos-não-amiláceos (NSP). A possibilidade de que os amidos também possam afetar estes aspectos de funcionamento do intestino é, desta forma, de grande importância (CUMMING et al., 1996).

O presente trabalho objetivou investigar tanto o efeito de variáveis, normalmente encontradas no processamento de alimentos, na formação do Amido Resistente, quanto as características físico - químicas do AR, sua digestão e propriedades fisiológicas *in vivo*. Paralelamente, foi investigada a estrutura fina do AR.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AMIDO RESISTENTE

Diversos fatores podem alterar a hidrólise do amido no trato intestinal: a origem do amido e suas características, bem como os tratamentos industriais sofridos pelos produtos amiláceos, a presença de outros componentes na refeição, além de fatores extrínsecos – como a extensão de mastigação, a qual determinará a acessibilidade física do amido contido dentro de estruturas rígidas, o tempo de trânsito do alimento da boca até o fim do íleo, a concentração de amilase no intestino e a presença de outros componentes no alimento - são de grande importância na alteração das taxas de hidrólise *in vivo* e *in vitro* (COLONNA et al., 1992; ENGLYST et al., 1992).

Apesar de se saber desde há muito tempo que algumas frações do amido não são digeridas no intestino delgado, pouca atenção foi dada a isto até que se descobriu que carboidratos, assim como os polissacarídeos-não-amiláceos (NSP), que alcançam o cólon e são fermentados pelas bactérias do trato intestinal, podem proporcionar benefícios para o funcionamento do intestino delgado (CUMMINGS et al., 1996).

2.1.1. Definição

O amido resistente (AR) à hidrólise enzimática pode ser fisiologicamente definido como a soma do amido e produtos da degradação do amido não digeridos/absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis, podendo entretanto, ser fermentado no intestino grosso (EERLINGER & DELCOUR, 1995; CHAMP, 1992).

2.1.2. Tipos

Segundo ENGLYST et al. (1992) o AR pode ser classificado em 4 tipos: a) tipo I - representa o amido fisicamente inacessível, o qual é protegido pela parede celular; tipo II - é o grânulo nativo do amido encontrado em alimentos não cozidos, pois a alta densidade e a parcial cristalinidade dos grânulos reduzem a susceptibilidade às enzimas; tipo III - é a fração de amido não digerida, que é formada a partir de certos tratamentos hidrotérmicos que causam a retrogradação no amido e o tipo IV que representa o amido que sofreu alterações químicas na sua estrutura. A formação de ligações glicosídicas, outras que as ligações alfa-(1-4) ou alfa-(1-6), por tratamentos que envolvam calor (como em produtos das reações de caramelização e de Maillard), a presença de ligações cruzadas e/ou a presença de alguns constituintes (como o. hidroxipropil, grupos fosfatos, etc.) podem reduzir a digestibilidade do amido.

Além dos fatores intrínsecos ao amido que reduzem a sua digestibilidade, outros fatores podem ser limitantes à hidrólise. Estes fatores incluem a viscosidade do meio (alimento), que pode limitar a difusão das enzimas, o tamanho das partículas do alimento (influenciada pela mastigação) e o tempo de trânsito pelo cólon (EERLINGER & DELCOUR, 1995).

ENGLYST et al. (1992) propuseram uma nova classificação nutricional do amido em: a) amido rapidamente digerível (ARD); b) amido lentamente digerível (ALD) e c) amido resistente (AR). Esta classificação está baseada nos fatores intrínsecos que afetam a digestibilidade do amido. A Tabela 1 apresenta esta classificação com alguns exemplos de ocorrência e sua provável digestão no intestino delgado.

2.2. FATORES QUE AFETAM A FORMAÇÃO DO AMIDO RESISTENTE

Vários fatores podem afetar a formação do AR: o teor de amilose, o tipo de amido, a umidade, o tempo e a temperatura de armazenamento dos géis de amido, os ciclos de autoclavagem/resfriamento, além da presença de lipídeos e proteínas.

Tabela 1. Classificação nutricional do amido *in Vitro*.

Tipo de Amido	Exemplo de Ocorrência	Provável Digestão no Intestino Delgado
Amido rapidamente digerível	Alimentos amiláceos recentemente cozidos	Rápida
Amido lentamente digerível	Principalmente cereais crus	Lenta, mas completa
Amido Resistente		
• Tipo I:		
Amido Fisicamente Inacessível	Grãos e sementes parcialmente moídas	Resistente
• Tipo II:		
Grânulos Amido Resistentes	Batata e banana cruas.	Resistente
• Tipo III:		
Amido Retrogradado	Batata cozida resfriada, pão e "Corn Flakes".	Resistente

Fonte: ENGLYST et al. (1992).

2.2.1. Teor de Amilose e Tipo de Amido

POMERANZ et al. (1992) estudando a formação do AR durante autoclavagem e resfriamento em amidos de trigo, milho, batata, ervilhas, amido ceroso e amilomaize, concluíram que o conteúdo de amilose e a produção de AR são positivamente correlacionados. A correlação positiva entre teor de amilose e produção de AR também foi verificada em vários outros estudos (SIEVERT & POMERANZ, 1989 e 1990; GRUCHALA & POMERANZ, 1993; SILJESTROM et al., 1989).

EERLINGEN et al. (1993) investigaram a formação do amido resistente em função do tamanho das cadeias de amilose. Segundo esses autores, cadeias de diferentes tamanhos de amilose induziram a produção de amido resistente com grau de polimerização (DP) entre 19 e 26 e com padrão de cristalinidade tipo B determinado por raio-x.

2.2.2. Umidade

A formação do AR também é afetada pelo conteúdo de água presente durante o tratamento térmico. A máxima produção de AR é obtida quando uma proporção 1:3,5 (p/p) de amido:água é aplicada. Por outro lado, uma quantidade mínima de água é necessária para conferir plasticidade ao meio e ser incorporada nas estruturas cristalinas. As estruturas cristalinas tipo B, por exemplo, contêm aproximadamente 27% de água (EERLINGER & DELCOUR, 1995).

2.2.3. Tempo e Temperatura de Armazenamento

Segundo EERLINGEN & DELCOUR (1995), a produção do AR em amidos gelatinizados dependeu fortemente do tempo e da temperatura de estocagem do gel. Estudos mostraram que a formação de frações de amido altamente resistentes, como é o caso da amilose retrogradada que resiste à hidrólises a 100°C, obedecem à cinética da formação de cristais, na qual a nucleação é favorecida em temperaturas muito abaixo da temperatura de fusão dos cristais (150°C), mas acima da temperatura de transição vítrea (- 5°C). A propagação ou crescimento dos cristais é favorecida em condições muito acima da temperatura de transição

vítrea, mas abaixo da temperatura de fusão. Ainda, segundo estes autores, altas temperaturas de estocagem (100°C) induzem a formação de uma estrutura resistente cristalina tipo A, formada quando o amido for incubado por muitas horas, enquanto que à temperaturas mais baixas (0°C e 68°C), pode ocorrer a formação de cristais resistentes tipo B. Além disto, verificou-se que a cristalinidade das frações resistentes aumentaram com o tempo de estocagem dos géis de amido, conforme já havia sido observado por GALLANT (1992).

Porém, BERRY (1986) e SILJESTRÖN et al. (1988) não observaram dependência entre o tempo de armazenamento e a formação do AR em géis concentrados de vários amidos que sofreram autoclavagem. De acordo com VAN SOEST et al. (1994) e COLONNA et al. (1992) a retrogradação da amilose é um processo rápido que ocorre em apenas algumas horas, ao contrário da retrogradação da amilopectina que é um processo lento, podendo demorar muitos dias.

2.2.4. Ciclos de Autoclavagem/Resfriamento

A autoclavagem induz a fragmentação das moléculas do amido produzindo cadeias de DP de aproximadamente 65 favoráveis à formação de amido resistente (SILJESTRÖM et al., 1989).

Em estudo usando diversos tipos de amido, POMERANZ (1992) verificou que o número de ciclos de autoclavagem – resfriamento exerceu um grande efeito na produção de AR. Aumentando-se o número de ciclos de 1 a 20, o rendimento na produção do AR aumentou acima de 40%. Foi observado também que o aumento no rendimento do AR não foi acompanhado pelo aumento de entalpia, indicando modificações na estrutura deste amido resistente formado.

SIEVERT & POMERANZ (1989) estudaram as alterações na estrutura do grânulo em função do número de ciclos de autoclavagem através de microscópio eletrônico de varredura. Após o primeiro ciclo, a estrutura granular desapareceu e transformou-se em partículas expandidas e irregulares e/ou conglomerados porosos. Depois de quatro ciclos, estas estruturas porosas ainda ocorreram, mas prevaleceram como formações mais compactadas.

2.2.5. Presença de Lipídeos

Vários estudos (CZUCHAJOWSKA et al., 1991; SIEVERT & WURSCH, 1993 *apud* EERLINGER & DELCOUR, 1995; POMERANZ, 1992) sobre o efeito de lipídeos na formação de AR mostraram que a adição de lipídeos em excesso (1g de lipídeo por 10g de amilomaize) reduziu o nível de AR. Isto foi atribuído à formação de complexos amilose-lipídeos. Segundo POMERANZ (1992) tanto os lipídeos adicionados quanto os endógenos, embora presentes em baixas quantidades (até 1,2%), reduzem a quantidade de AR produzida nos géis de amido, através da formação de complexos com a amilose, resultando em menor quantidade de amilose disponível para formar as dupla-hélices resistentes à hidrólise enzimática.

2.2.6. Proteínas

De acordo com EERLINGER & DELCOUR (1995) alguns autores observaram um decréscimo nos níveis de AR em farinhas de legumes após incubação com proteases, antes ou após o cozimento da farinha. Isto poderia ser atribuído à alterações da parede celular e/ou à liberação das associações proteína-amido, implicando que as proteínas afetam a formação de AR tipo I (amido fisicamente inacessível).

Uma vez que a cristalização da amilose ocorre acima da temperatura de transição vítrea, todos os componentes, inclusive as proteínas que têm efeito sobre a temperatura da transição vítrea, podem teoricamente influenciar na formação do AR tipo III. Entretanto é necessário maior número de pesquisas para que se possa entender a influência das proteínas na formação do AR.

2.3. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO AMIDO RESISTENTE

De acordo com CHAMP (1992) os métodos para quantificar o AR *in vitro* estão baseados na remoção das partes não-resistentes, pelo uso de diferentes

enzimas, e na quantificação da fração residual, referida como "amido resistente" (ENGLYST et al., 1982; BERRY, 1986). Outros métodos (TOVAR et al., 1992) são baseados na determinação paralela do amido total e do amido rapidamente digerível nas amostras, sendo o AR determinado pela diferença entre os dois tipos de amido.

SILJESTRÖM & ASP (1985) apud BERRY (1986) e BJÖRCK et al. (1986), desenvolveram um método para quantificar AR através da combinação desses dois princípios. O método proposto por estes autores envolve a preparação de um resíduo de fibra alimentar e a quantificação do AR e do "amido total" nestes resíduos de fibra alimentar (AR = "amido total" – amido residual).

As diferenças no tipo e quantidade de enzimas usadas e as condições de tempo-temperatura de incubação entre os diversos métodos dificultam a comparação da quantidade de AR determinada *in vitro*; por exemplo, quando se aplica α -amilase termoresistente a 100°C, o amido gelatiniza-se e não é possível a quantificação do AR presente em alimentos crus. Também a amilopectina retrogradada, a qual exhibe temperaturas de fusão na faixa entre 55-70°C, e os complexos amilose-lipídeos, com temperaturas de fusão na faixa entre 90-110°C, são facilmente hidrolisados quando incubados com α -amilase termoresistente à 100°C de temperatura (EERLINGEN & DELCOUR, 1995).

A digestibilidade dos alimentos amiláceos *in vivo* permite a avaliação da resistência do amido no trato intestinal e pode ser estudada por várias técnicas: recolhimento do conteúdo intestinal que aporta ao ponto de ileostomia, teste de respiração (liberação de hidrogênio/metano) e ensaios biológicos com animais (ANDERSSON, 1992; RUMESSEN, 1992; TOVAR et al., 1992; ASP, 1992).

O AR, quando presente no cólon, induz a fermentação e a conseqüente produção de gases. A resistência do amido à digestão no intestino grosso poderá ser avaliada pela produção de H₂, CH₄ e ácidos graxos voláteis ocorridas neste local. O aumento na produção destes gases indica o aumento da fermentação dos carboidratos tornando possível avaliar o tempo de trânsito boca – ceco, bem como estimar a capacidade de absorção de muitos tipos de carboidratos resistentes através de testes de H₂ / metano (RUMESSEN, 1992; ENGLYST, 1996; CUMMINGS, 1996).

Através de ensaios biológicos com ratos pode-se simular o que ocorre com o amido resistente no trato gastrointestinal de humanos, apesar do metabolismo destes diferir do dos homens (ASP et al., 1992; DECKERE et al., 1992; FAULKS et al., 1992).

2.4. ESTRUTURA DO AMIDO RESISTENTE

GIDLEY et al. (1995) sugere que hélices não perfeitamente agregadas podem conferir resistência à hidrólise enzimática.

Baseado na semelhança dos comprimentos das cadeia de polissacarídeos presentes nos amidos resistentes, EERLINGEN & DELCOUR (1995) propuseram dois mecanismos para sua formação em solução de amilose: a agregação de cadeias curtas ocorreria em determinadas regiões que estariam intercaladas com regiões amorfas, formando micelas interligadas entre si; o segundo mecanismo poderia ser a formação de estruturas planas devido ao dobramento das cadeias, intercaladas também por regiões amorfas (Figura 1a e 1b).

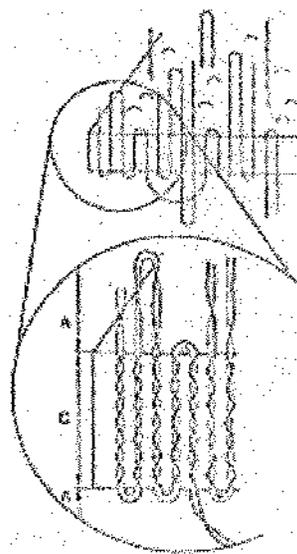
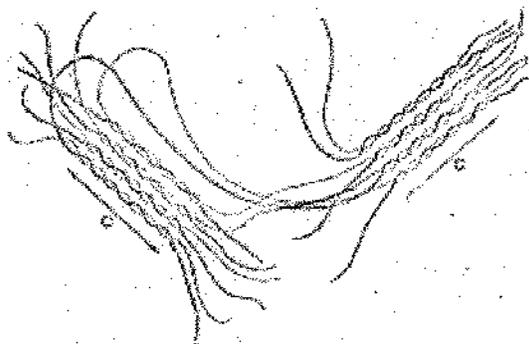
Entretanto é difícil conciliar a hipótese de que a resistência à hidrólise seja conferida por estados cristalinos de duplas-hélices, devido ao fato de que AR retrogradados têm baixa cristalinidade (BERRY et al., 1988; SIEVERT et al., 1991; EERLINGEN et al., 1993).

De acordo com LII et al. (1982) o modo de inchamento, o viscograma e a alta temperatura de pasta do amido de banana (AR tipo II), sugerem intensa interação entre as moléculas no grânulo. Essa interação poderia ser o resultado da existência de ligações cruzadas, através dos grupos fosfatos presentes na molécula ou da formação de pontes de hidrogênio entre grande número de moléculas de amilose. Esta hipótese, porém, é incompatível com a baixa afinidade do amido de banana por iodo.

Segundo ENGLYST et al. (1996) amidos resistentes tipo II, como o de banana e batata, tomam-se rapidamente digeríveis se suas estruturas forem rompidas pelo calor úmido.

Figura 1 (a e b): Proposta de EERLINGER & DELCOUR (1995) para a formação de AR em soluções aquosas de amilose.

(a)



(b)

1a: Proposta micelar da amilose: hélices duplas estão agrupadas na região C cristalina e seriam intercaladas por porções amorfas da cadeia as quais seriam sensíveis a ação enzimática.

1b: Proposta de formação lamelar da amilose na porção superior da figura apresentam as regiões cristalinas formadas por planos ou lamelas de hélices paralelas. Na parte inferior desta figura os autores mostram que as hélices se dobram sobre o mesmo plano (c); após o plano de polímeros cristalinos situam-se as áreas amorfas.

Nos grânulos nativos, um grande número de cadeias moleculares estão organizadas em estruturas cristalinas que se apresentam em três formas ou arranjos: os padrões A, B e C. Geralmente os amidos de cereais apresentam um padrão tipo A. Amidos de batata, banana, alguns tubérculos, amidos retrogradados, bem como alguns amidos ricos em amilose (amilomaize, cevada) apresentam padrão tipo B. Amidos de legumes e sementes apresentam padrão tipo C (GALLANT et al., 1992; LII et al., 1982).

Os padrões A e B diferem entre si quanto à forma dos cristais e quanto ao conteúdo de água. Os amidos tipo B são formados em órgãos de plantas oriundas de ambientes com alta umidade e baixa temperatura. Em baixas condições de umidade e altas temperaturas, os amidos tipo B podem ser convertidos irreversivelmente para amidos tipo A, devido à falta de água e à reorganização das duplas hélices. A passagem do padrão A para o B só é possível se os grânulos de amido forem inteiramente destruídos e então recristalizados em um novo sistema que possuirá nível diferente de organização (COLONNA et al., 1992; GALLANT et al., 1992).

Uma vez que a estrutura do padrão A, termodinamicamente mais estável, parece ser mais densa do que o padrão B, seria esperado que o padrão A demonstrasse maior resistência ao ataque enzimático. Entretanto observa-se que os grânulos de amido que apresentam padrão de difração tipo B e C tendem a ser mais resistentes a amilases pancreáticas (GALLANT et al., 1992; ENGLYST et al., 1992).

Segundo GALLANT et al. (1992) o padrão de difração tipo C pode ser formado pela mistura de grânulos com padrão cristalográfico A e com padrão cristalográfico B; ou ainda, existiria a possibilidade de que coexistissem, internamente nos grânulos, os dois padrões citados.

Após a gelatinização dos grânulos de amido, um padrão tipo V pode aparecer. Este padrão é devido às frações de amilose que se complexam com ácidos graxos, fosfolípidos ou outras moléculas polares (ENGLYST et al., 1992).

GIDLEY et al. (1995) determinaram os endotermas de fusão dos cristais dos AR retrogradados na presença de excesso de água e encontraram um amplo endoterma de transição iniciando em 90°C e com o pico entre 150 e 160°C. Os

valores de entalpia encontrados, entre 15 a 30 J/g, situaram-se na faixa relatada por outros pesquisadores (SIEVERT & POMERANZ, 1990; SIEVERT & WÜRSCH, 1993, apud EERLINGEN & DELCOUR, 1995).

Estudando a taxa e extensão da retrogradação do amido, EERLINGEN et al. (1994) encontraram um pico endotérmico de fusão dos cristais isolados de amido resistente em torno de 150°C, com entalpia variando de 8 a 30J/g. De acordo com este autor, a largura dos endotermas é consistente com a ampla faixa de comprimento de cadeias presentes nas hélices.

SIEVERT et al. (1991) verificaram que as entalpias de fusão dos cristais dependem do método usado para isolar a fração resistente do amido. Foi observado um decréscimo na entalpia de fusão de 21 para 8J/g quando as frações resistentes foram isoladas à partir da hidrólise com α -amilase pancreática a 37°C em relação à fração isolada após incubação com α -amilase termoresistente (termamyl - 100°C) e amiloglicosidase (60°C). Estes resultados indicam que a hidrólise com α -amilase pancreática a 37°C, foi menos efetiva, deixando intactas maior quantidade de amilose que não estava na forma de dupla hélice (ex: complexos amilose-lipídeo ou amilose livre).

Segundo COLONNA et al. (1992) a fusão da amilopectina inicia-se a 45°C com pico em 55 – 60 °C, enquanto que o pico da amilose situa-se entre 125 – 145 °C. Essas diferenças nas temperaturas de fusão são principalmente atribuídas as diferenças no grau de polimerização dos cristais.

Segundo COLONNA et al. (1992) a combinação de um padrão de difração tipo B e um pico endotérmico na faixa de 130–170 °C é característico de amilose retrogradada.

De acordo com RUSSEL et al. (1989) e SILJESTRÖM et al. (1989), a análise molecular de AR retrogradado mostrou que ele é composto essencialmente de cadeias lineares (1-4)- α -D-glucano.

Segundo SILJESTRÖM et al. (1989), o grau de polimerização (DP) das cadeias formadoras do AR tipo III varia de 22 a 65 resíduos de glicose. Para RUSSEL et al.(1989) e FAISANT et al. (1993) apud EERLINGEN & DELCOUR

(1995), estes segmentos são lineares e estão arranjados em uma estrutura cristalina, com peso molecular relativamente baixo.

De acordo com COLONNA et al. (1992), durante a retrogradação, os géis de amilose, que são formados por algumas estruturas cristalinas e uma grande fração amorfa, tendem a formar longos cristais nos quais o grau de polimerização fica entre 40 e 60. As menores cadeias de amilose capazes de formar dupla hélice possuem DP10, com a formação dos cristais sendo favorecida em cadeias com DP igual ou maior que 13 (GIDLEY et al., 1995).

EERLINGEN & DELCOUR (1995) e LELOUP et al.(1992) propuseram um modelo para a organização da estrutura do gel de amilose. Segundo estes autores, os géis de amilose exibem estrutura macroporosa com tamanho de abertura dos poros de 100 –1000 nm, contendo filamentos de 10 a 30 nm de largura. Estes filamentos resultam da associação de segmentos das cadeias de amilose com DP entre 26 e 76, as quais são parcialmente organizadas em uma estrutura cristalina tipo B. A fração amorfa do gel possui DP entre 6 e 30 e está localizada na estrutura macroporosa.

Os géis de amilopectina podem ser obtidos com concentração de amilopectina acima de 10%. Estes géis também são parcialmente cristalinos e são formados por associações das ramificações externas da amilopectina. A amilopectina é uma molécula ramificada sendo que 5% do total das ligações consiste de ligações α -1-6 glicosídicas. Usando-se enzimas desramificantes como pululanase ou isoamilase, GALLANT et al. (1992) observaram que três ou mais tipos de cadeias são obtidos à partir da amilopectina. Após cada uma destas ramificações terem sido hidrolisadas com β - amilase para determinar seu comprimento, a amilopectina demonstrou ser composta de cadeias curtas S (DP médio 12 – 20), cadeias longas L (DP médio 40 – 45) e cadeias com DP médio acima de 60.

LELOUP et al. (1992) observaram que géis de amilopectina, obtidos após o armazenamento por 21 dias a 1°C, são totalmente degradados com α - amilase pancreática a 37°C em uma hora. Esses resultados, entretanto, não condizem com os encontrados por EERLINGEN & DELCOUR (1995) que observaram altos níveis de AR quando amido de milho, tipo ceroso, foi armazenado sob condições

específicas (hidrólise com pancreatina e amiloglicosidase a 37 °C e 2 horas de incubação) e a retrogradação foi mais extensiva.

Segundo EERLINGER & DELCOUR (1995) o decréscimo na susceptibilidade enzimática nos amidos cerosos pode ser atribuído ao aumento do emaranhado das moléculas na rede do gel e/ou ao aumento da ordem molecular através da associação das pequenas cadeias externas da amilopectina em duplas hélices e da organização destas hélices em estruturas cristalinas tridimensionais. Uma vez que tais cadeias externas são curtas (DP entre 14 e 20 resíduos de glicose), o comprimento das cadeias das frações de amido resistente deve ser limitado. Como resultado, a temperatura de fusão da amilopectina retrogradada é mais baixa com pico de temperatura na faixa de 55 –70 °C, dependendo das condições de armazenamento e do comprimento das moléculas de amilopectina. Assim, frações altamente resistentes (resistentes à hidrólise a 100°C) parecem não estar presentes na amilopectina retrogradada.

2.5. ANÁLISE DA ESTRUTURA DO AMIDO RESISTENTE

Para a obtenção de informações sobre a estrutura do AR podem ser utilizados os seguintes métodos: análise calorimétrica diferencial de varredura (SIEVERT & POMERANZ, 1989 e 1990), microscopia eletrônica de varredura (GALLANT et al., 1992) difração de raio-x (SILJESTRÓM et al., 1989; EERLINGEN et al., 1993; SIEVERT et al., 1991), cromatografia de permeação em gel (RUSSEL et al., 1989, LELOUP et al., 1992, EERLINGEN et al., 1993), ressonância magnética nuclear (GIDLEY et al., 1995), etc.

2.5.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é útil na medida da taxa e extensão da retrogradação do amido e, portanto, em estudos sobre a formação do amido resistente formado em tratamentos hidrotérmicos. Através do monitoramento da recristalização, o aumento do conteúdo de cristais retrogradados pode ser

avaliado à partir da magnitude de seu endoterma de fusão. Cristais de amilose e amilopectina possuem temperaturas de fusão distintas, sendo menor que 100°C para amilopectina e por volta de 150°C para amilose (ELIASSON, 1985; BILIADERES, 1991).

As mudanças de entalpia observadas através da calorimetria diferencial geralmente são relacionadas a transições do tipo ordem/desordem dos cristais, presentes em extensos arranjos ordenados internos e em regiões de menor ordem cristalina do grânulo (SIEVERT et. al., 1991).

BILIADERIS (1991), sugeriu que as respostas térmicas do DSC estão diretamente relacionadas com o número de hélices presentes no grânulo de amido, sem considerar sua organização terciária. De acordo com este conceito, hélices com nenhum registro cristalográfico também requerem energia para fusão e, por esta razão, são detectáveis termicamente. Transições endotérmicas de fusão em complexos amorfos amilose-lipídeos e amilose-álcool, por exemplo, já foram observadas em termogramas feitos por DSC.

O registro da dissociação das estruturas pode ser detectado somente após a remoção das partes degradáveis da estrutura do amido e do isolamento e concentração dos cristais. Amido de milho autoclavado, resfriado e liofilizado e analisado através do DSC apresentou pico em torno de 55°C, enquanto a fração resistente isolada deste amido apresentou pico em torno de 150°C, além de um pequeno endoterma de transição entre 41 e 67 °C. Estudos sobre o efeito de proteínas e lipídeos na formação do AR sugeriram que estes componentes induzem a formação de um pico de transição a 54 °C em alguns resíduos de AR (POMERANZ, 1992)

2.5.2. Difração de Raio-X

A técnica de difração do raio-x detecta as repetições ordenadas regulares das hélices, refletindo a ordem tridimensional dos cristais do amido; através desta classificação pode-se agrupar a maioria dos amidos de acordo com suas propriedades físicas (GALLANT et al., 1992). Esta técnica é o melhor método para estimar a cristalinidade; entretanto é um procedimento lento porque todas as

amostras precisam conter a mesma quantidade de água para efeito de comparação (COLONNA et al., 1992).

A difração de raio-x, entretanto, somente detecta cristais agregados em dupla hélice, e, uma vez que hélices não perfeitamente agregadas podem conferir resistência à hidrólise enzimática, a utilização do raio-x para avaliar o AR é limitada (COLONNA et al., 1992).

2.5.3. Cromatografia por Exclusão

Outra técnica que permite a obtenção de dados sobre as características das cadeias que compõem as regiões retrogradadas é a cromatografia por exclusão ou permeação em gel; quando aplicada a uma série homóloga de polímeros com densidade e formas semelhantes, fornecerá dados que permitem determinar a massa molecular e a forma das macromoléculas presentes (COLLINS et al., 1995).

2.5.4. Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Segundo GIDLEY et al. (1995) a ressonância magnética nuclear (NMR) pode ser usada para avaliar as características de hélices ordenadas e cadeias não ordenadas, podendo ser usada para estimar o conteúdo de dupla hélice nas amostras de amidos sólidos. Esta mesma técnica pode ser usada para testar se outros compostos, como por exemplo lipídeos estão presentes dentro da hélice simples de amilose.

2.5.5. Cromatografia de Troca Iônica de Alta Performance (HPAEC)

De acordo com GIDLEY et al. (1995) as medidas de distribuição de tamanho das cadeias de AR retrogradadas feitas através de cromatografia de permeação em gel mostram limitada resolução. Segundo este autor, maiores resoluções podem ser obtidas usando cromatografia de troca iônica de alta performance (HPAEC).

Estudando a distribuição do tamanho das cadeias de AR retrogradadas através da cromatografia de troca iônica (HPAEC), GIDLEY et al. (1995) obteve

uma ampla faixa de comprimento de cadeia com um máximo entre DP 20 e 30. De acordo com GIDLEY et al. (1995), a ampla faixa de valores de DP de cadeia linear e o máximo em DP 20 – 30 está de acordo com estudos realizados anteriormente usando a cromatografia de exclusão (RUSSEL, 1989; BERRY, 1988; LELOUP et al., 1992; EERLINGEN et al., 1993).

2.5.6. Microscopia

A microscopia eletrônica tem sido usada para detectar diferenças estruturais em amido, visualizando a heterogeneidade de amidos de fontes distintas. Dependendo do tipo de informação requerida, deve-se usar o microscópio de varredura (SEM) ou o de transmissão (TEM).

Muitos autores, dos quais GALLANT et al. (1992 e 1997), têm apresentado as características estruturais de amidos submetidos a amilólises, através do SEM e do TEM, mostrando que a parte cristalina do grânulo é menos digerida que a parte amorfa, assim como sugerindo que a organização interna do cristal apresenta blocos que resistem diferenciadamente ao ataque enzimático.

2.6. CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS: IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL

ENGLYST et al. (1996) observaram que existe grande variação da capacidade hidrolítica de amidos entre os humanos e no mesmo estudo concluíram que é possível obter *in vitro* uma previsão da quantidade de AR que pode escapar à digestão e absorção no intestino delgado de humanos.

ENGLYST & MACFARLANE (1986) realizaram estudos com o objetivo de descobrir o que de fato ocorre com o AR no trato digestivo. De acordo com estes autores, as α -amilases do intestino delgado hidrolizam totalmente o amido prontamente digerível, não tendo ação sobre o AR, que passa direto para o cólon ou intestino grosso, onde é fermentado por complexa população bacteriana.

Com base nestes resultados foi proposta a hipótese de que o AR se comportaria como fibra alimentar no trato intestinal de monogástricos (ENGLYST et al., 1992).

De acordo com EERLINGER & DELCOUR (1995) a caracterização do AR obtido na luz do íleo de humanos revelou que o AR consiste de três populações de alfa-glucanos: a) uma pequena quantidade de oligossacarídeos; b) a fração principal, que consiste em alfa-glucanos cristalizados com DP de 35 resíduos de glicose, temperatura de fusão de 150°C e difração de Raio-x tipo B e, finalmente, c) alfa-glucanos de alto peso molecular. Deste modo, o amido resistente determinado *in vivo* é apenas similar ao determinado *in vitro*.

Segundo COLONNA et al. (1992) materiais lentamente degradáveis podem parecer resistentes *in vivo* porque o tempo de hidrólise está limitado ao tempo de trânsito pelo íleo. Entretanto, de acordo com TRUSWELL (1992) se o trânsito for suficientemente lento, alguns amidos que aparentemente são resistentes *in vitro* podem ser completamente digeridos no intestino delgado.

Em estudo visando determinar quantitativamente a extensão da utilização do AR nas várias regiões ao longo do trato gastrointestinal FAULKS et al. (1992) observaram que, com o tempo, tanto na altura do intestino delgado quanto na região colônica, houve uma adaptação parcial de forma a melhorar a taxa de digestão, aumentando, assim, a proporção do AR a ser digerido.

Como já foi dito anteriormente, na maioria das pessoas o modo de ação do AR no cólon compreende a fermentação (com produção de gases H₂ e CO₂) e portanto o crescimento bacteriano com a produção de ácidos graxos de cadeia curta. Dependendo da origem do AR, ocorrerá maior quantidade de acetato (AR tipo II) ou de propionato (AR tipo III) nas fezes destes humanos (CUMMINGS et al., 1996; ENGLYST et al., 1996).

Experimentos com ratos, segundo GEE et al. (1992), demonstraram que o AR é parcialmente degradado no trato alimentar, podendo contribuir significativamente para o aumento do volume fecal. Porém, foi observado que após maior tempo de administração da dieta e, em concordância com FAULKS et al. (1992), ocorreu um aumento da fermentabilidade do AR e conseqüente redução da quantidade excretada. Nestes animais, o bolo fecal e o conteúdo do ceco estavam

aumentados e o pH reduzido, quando comparados com ratos que não ingeriram AR.

De acordo com GEE et al. (1992), a proliferação celular também foi aumentada no íleo devido à presença do AR na dieta, porém, não houve mudança no nível de colesterol.

Do mesmo modo, CUMMINGS et al. (1996), estudaram a digestão de quatro fontes de AR oriundas de batata, banana, trigo e milho em indivíduos saudáveis. Os indivíduos controle deste experimento receberam ou dietas amiláceas sem AR ou dietas contendo polissacarídeos não amiláceos (NSP). Os autores observaram aumento da massa fecal para os indivíduos onde o AR compunha a dieta, porém em quantidade significativamente menor do que na dieta contendo NSP. Foi observado também o aumento do nitrogênio fecal, o aumento da quantidade de energia excretada, além de certo efeito laxativo.

A passagem do amido resistente para o colon poderia estar limitando a quantidade de glicose absorvida no intestino delgado. Alimentos contendo grande quantidade de AR deveriam abaixar os valores glicêmicos sangüíneos, porém os dados são contraditórios. A glicemia é afetada pela forma física do alimento, pelas condições nas quais o alimento é processado e por outras substâncias, por exemplo, proteínas, lipídeos, presentes nos alimentos (TRUSWELL, 1992). Para este autor parece não haver correlação da glicemia sangüínea dos humanos com a porcentagem de AR controle em suas dietas.

Segundo ENGLYST et al. (1992 e 1996), quando a taxa de digestão do amido é diminuída, a elevação glicêmica pós-prandial é reduzida ou retardada.

Estudos de fermentação *in vitro* mostraram que a presença de AR na dieta leva à produção de uma taxa relativamente elevada de butirato/acetato/propionato. Segundo ENGLYST et al. (1996) a produção dos ácidos graxos de cadeia curta (scfa) pela microflora do intestino delgado pode ser benéfica à saúde: além de serem absorvidos e metabolizados para fornecimento de energia, podem estar implicados na redução do colesterol plasmático e no aumento de tolerância à glicose.

Entretanto, de acordo com ANNISON & TOPPING (1994), o AR parece não exercer impacto substancial no colesterol plasmático. Seus maiores benefícios, assim como os das fibras, parecem se situar no intestino grosso.

Segundo ANNISON & TOPPING (1994) o butirato possui efeitos sobre a renovação celular dos colonócitos. A carência desta substância no intestino grosso tem sido associada ao favorecimento de processos cancerosos. Por outro lado, o propionato parece inibir a síntese de ácidos graxos no fígado (provavelmente através da competição com o lactato), abaixando a taxa de secreção do triacilglicerol.

CUMMINGS et al. (1992) observaram aumento na excreção dos ácidos graxos de cadeia curta, quando se ingere uma dieta rica em AR. Segundo CUMMINGS et al. (1996) é possível que as mudanças na estrutura física entre os diversos tipos de amido possam explicar as diferenças da capacidade de fermentação intestinal entre os indivíduos.

DECKERE et al. (1992), estudando em ratos o efeito de dietas, contendo grande e pequena quantidades de AR, no crescimento, na ingestão, no colesterol total e no triacilglicerol concluíram que o AR exerce efeitos comparáveis aos induzidos pelas fibras: após 10 semanas de experimento foi encontrado uma taxa de crescimento ligeiramente maior no grupo alimentado com alta concentração de AR, apesar da quantidade de alimento ingerido ter sido praticamente a mesma nos dois grupos. Além disto, foi observado um pH relativamente mais baixo e maior conteúdo de dieta no ceco do grupo alimentado com maior quantidade de AR.

O AR oferece uma grande vantagem em relação aos polissacarídeos-não-amiláceos uma vez que o AR pode ser manipulado tecnologicamente para alterar o conteúdo de "fibra aparente" nos alimentos sem, contudo, causar grandes mudanças nas suas propriedades organolépticas e tecnológicas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Matérias Primas

Foram usados para o desenvolvimento do trabalho amido de milho normal, fornecido pela Refinações de Milho Brasil LTDA, e amido de banana, obtido da extração da banana (*Musa paradisiaca* AAB 'TERRA') segundo metodologia descrita em 3.2.1.

3.1.2. Reagentes Químicos

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade p.a., conforme especificado nos métodos, e de diferentes procedências: Nuclear, Merck, Sigma e outros.

3.1.3. Aparelhos e Equipamentos

Além dos equipamentos, utensílios e materiais comumente utilizados em laboratório (balanças, estufas, mufla, geladeira, vidrarias e outros), os seguintes equipamentos foram usados:

- Autoclave Universal Fabbe Primar mod. 146.
- Centrífuga Fanem não refrigerada - mod. 204.NR.
- Coluna de vidro para cromatografia xk 16/100 com Programador GP250 Plus, Coletor de fração Super-Frac; Integrador mod.746; Detector de índice de refração R403, Watters.

- Conjunto para determinação de proteínas tipo Kjeldahl: digestor mod.4025 e destilador mod. TE036E, Tecnal.
- Despoldadeira tipo WBEF, Sterling Speed-trol.
- Difratorômetro de Raio-x URD 6, Carl Zeiss.
- Espectrofotômetro mod.DU-70, Beckman.
- Estufa para determinação de umidade Brabender.
- Hidrociclone de nylon Dorr-Oliver, 100mm de comprimento, 10 mm de diâmetro interno. Bomba de deslocamento positivo tipo moyno, modelo SJ 310/V, MONO-CLEAN
- Multiprocessador tipo UMM SK12 de 2 velocidades (1750 e 350 rpm), Geiger.
- Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL
- Microscópio Ótico Jenaval/ Zeiss com luz polarizada.
- Rapid Visco Analyser (RVA), Newport Science.
- Agitador com controle de temperatura, Tecnal.

3.2. MÉTODOS

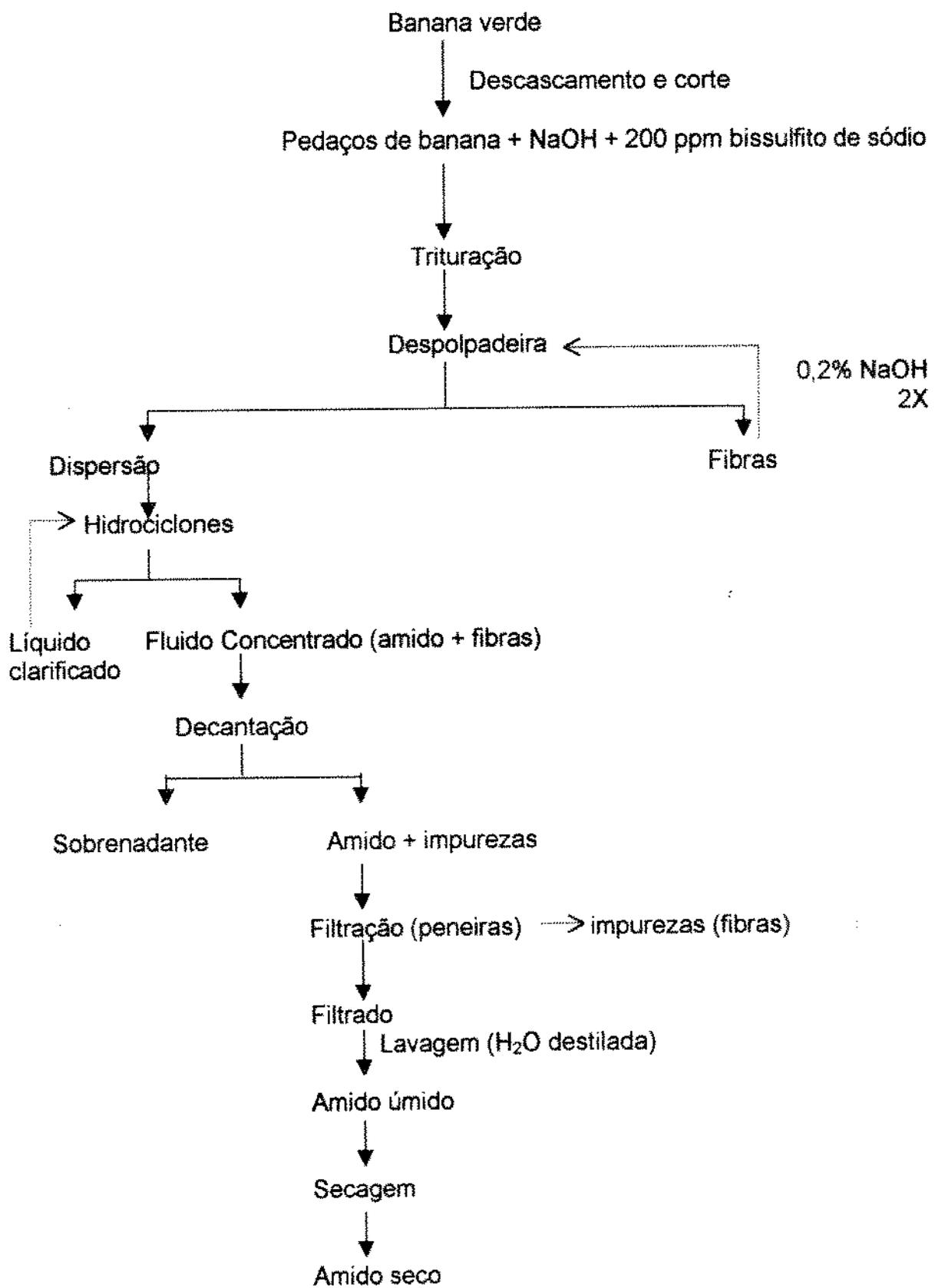
3.2.1. Extração do Amido da Banana (Musa AAB 'TERRA')

A extração do amido da banana seguiu a metodologia descrita por CHIANG et al. (1987), com pequenas modificações.

O processo geral de extração do amido está descrito no fluxograma apresentado na Figura 2.

A banana descascada foi imersa em solução de NaOH 0,2% (p/v) e de metabissulfito de sódio 200 ppm e triturada em Multiprocessador tipo UMM SK12, Geiger, operando a 1750 rpm, por 4 min.

Figura 2: Fluxograma da extração do amido de banana.



Após a trituração, a massa formada foi passada em despulpadeira tipo WBEF da Sterling Speed-trol operando a velocidade de 3600 rpm, de modo a separar a polpa das fibras mais grossas.

Às fibras separadas juntou-se uma solução com 0,2% (p/v) de NaOH e por mais duas vezes a dispersão formada foi passada pela despulpadeira, para aumentar o rendimento da extração.

A dispersão obtida com a polpa foi bombeada através de um sistema contendo dois hidrociclones de nylon de 100 mm de comprimento e 10 mm de diâmetro, marca Dorr-Oliver, alimentados em paralelo. Uma bomba de deslocamento positivo foi utilizada para bombeamento da dispersão, mantendo fluxo sob $2,8 \text{ Kg/cm}^2$, de modo a submeter a dispersão a uma força centrífuga de 10000 g.

O esquema do funcionamento de um hidrociclone está ilustrado na Figura 3.

A dispersão resultante do fluxo da parte superior do hidrociclone, contendo as fibras mais finas e um pouco de amido, foi novamente bombeada nos hidrociclones para completar a separação do amido.

A dispersão resultante do fluxo da parte inferior dos hidrociclones, contendo amido e as fibras mais grossas, foi deixada decantar e o líquido sobrenadante foi descartado.

O sedimento castanho foi, a seguir, filtrado através de peneiras de 24 a 100 mesh. As impurezas retidas nas peneiras foram descartadas e o filtrado lavado com água destilada até se obter um sedimento branco.

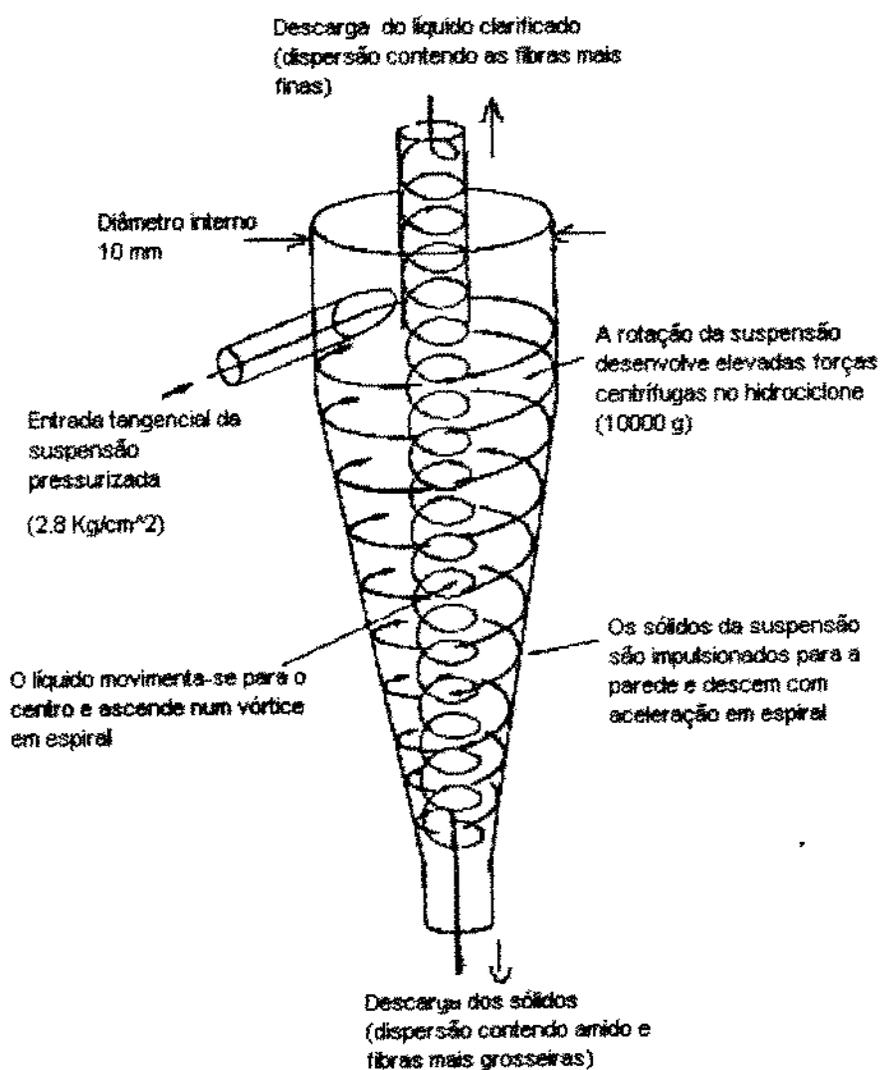
O amido, assim obtido, foi seco em estufa com circulação forçada de ar a cerca de 40°C .

3.2.2. Composição Química dos Amidos

3.2.2.1. Umidade

A determinação da umidade das amostras dos amidos de milho e de banana foi realizada segundo o método N° 44-15A – Approved Methods of the American

Figura 3: Modelo de funcionamento de um hidrociclone.



Fonte - PEZOA -GARCÍA (1985).

Association of Cereal Chemists – AACC - (1976).

3.2.2.2. Proteína

O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl N° 46-20 – Approved Methods of the AACC (1976), utilizando o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25.

3.2.2.3. Gordura

O teor de gordura foi determinado pelo método de BLIGH & DYER (1959).

3.2.2.4. Fibras

O teor de fibras foi determinado pelo método ácido - detergente, segundo GOERING & VAN SOEST (1970).

3.2.2.5. Cinzas

O conteúdo de cinzas foi determinado segundo o método N° 8-17 – Approved Methods of the AACC (1976).

3.2.2.6. Amilose

O teor de amilose foi determinado pelo método de WILLIAMS et al. (1970).

3.2.3. Tratamento Hidrotérmico do Amido de Milho

O tratamento hidrotérmico consistiu em acondicionar, em latas de folha de flandres, verniz tipo C, de 73 mm de diâmetro e 111 mm de altura, cerca de 200 g de amido de milho com diferentes níveis de umidade (30 a 70 %) e recravá-las para evitar perda de umidade durante o tratamento térmico. As amostras foram então autoclavadas à 121°C por um período de uma hora.

Após o tratamento hidrotérmico, as latas seladas contendo as amostras foram armazenadas a temperaturas e tempos pré-estabelecidos. As condições foram estabelecidas (tempo e temperatura) com base em testes preliminares.

O efeito combinado das variáveis independentes de processamento (umidade, tempo e temperatura de armazenamento dos géis) na formação do AR foi verificado através de um delineamento experimental do tipo composto rotacional central, com dois níveis e dois pontos centrais (Tabela 2). Foram testados os modelos linear e quadrático (NETO et al., 1995).

3.3.4 Quantificação do Amido Resistente (AR)

A quantificação do AR foi feita de acordo com a metodologia descrita por FAISANT et al. (1995) com algumas modificações.

O fluxograma do método de quantificação do amido resistente está ilustrado na Figura 4.

Uma amostra de amido (~100 mg) foi dispersa em 10 ml de tampão tris-maleato 0,1 M (contendo 4 mM de CaCl_2 e 0,02% de NaN_3), pH 6,9, com 500 unidades de α -amilase pancreática (EC 3.2.1.1 Typo VI.B, da Sigma) e incubada em banho-maria a 37°C, sob agitação constante por 16 horas.

Após a hidrólise com α -amilase pancreática foram adicionados 20 ml de etanol absoluto. A dispersão foi, a seguir, deixada por uma hora à temperatura ambiente e, então, centrifugada à 4300 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi lavado, duas vezes, com 10 ml de etanol 80% (v/v) e, uma vez, com acetona (CHAMP, 1992). O resíduo foi deixado secar em estufa com ventilação forçada a cerca de 60°C.

Ao resíduo seco foram adicionados 10 ml de água destilada. A dispersão formada foi aquecida a 100°C e deixada nesta temperatura por 30 minutos.

Após esse tempo a dispersão foi resfriada em gelo e deixada a 0°C por 30 minutos, sob agitação constante, após adição de 10 ml de KOH 4M.

Tabela 2: Delineamento experimental.

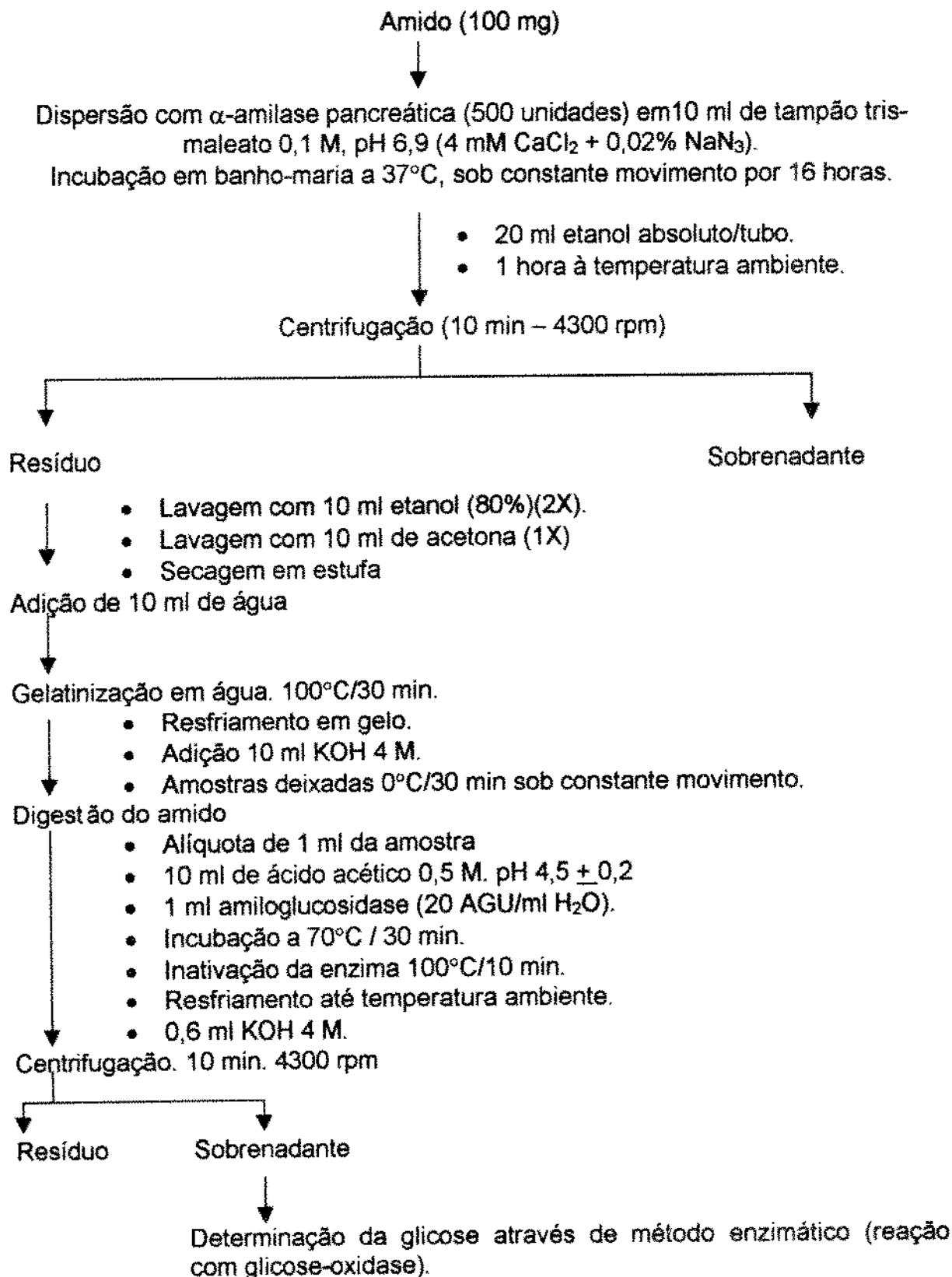
ENSAIOS	U (%)	t (h)	T (°C)	
1	30	17.76	15	Modelo linear
2	70	17.76	15	
3	30	58.24	15	
4	70	58.24	15	
5	30	17.76	35	
6	70	17.76	35	
7	30	58.24	35	
8	70	58.24	35	
9	16.4	38	25	Modelo Quadrático
10	83.6	38	25	
11	50	4	25	
12	50	72	25	
13	50	38	5	
14	50	38	45	
15	50	38	25	Pontos centrais
16	50	38	25	

U = Umidade;

t = Tempo de armazenamento;

T= Temperatura de armazenamento.

Figura 4: Fluxograma do método utilizado para determinação do AR.



Uma alíquota de 1 ml solução de amido gelatinizado foi colocada em tubo contendo ácido acético 0,5 M e 1 ml de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3 de *Aspergillus niger*, 20 AGU/ml H₂O), corrigindo-se o pH para 4,5 ± 0,2.

A hidrólise com amiloglicosidase foi conduzida a 70°C, sob agitação constante por 30 minutos. Após hidrólise, a enzima foi inativada pelo aquecimento a 100°C por 10 minutos.

Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 0,6 ml de KOH 4 M e a dispersão resultante foi centrifugada por 10 minutos a 4300 rpm.

O resíduo sólido foi descartado e o sobrenadante recolhido para quantificação da glicose produzida.

A quantidade de glicose produzida foi determinada através de leitura em espectrofotômetro a 505nm, após a oxidação enzimática desta pela glicose-oxidase (GOD - βD – Glicose: oxigênio 1 – oxidorreductase; EC 1.1.3.4), contida no kit glicose E da CELM, segundo a metodologia sugerida pelo fabricante.

A quantidade de amido resistente presente foi determinada através da fórmula:

$$AR = \frac{G \times 0,9 \times D \times 100}{P}, \text{ onde:}$$

AR = % de amido resistente em base seca;

G = concentração final de glicose (mg/ml), determinada através de curva padrão obtida com glicose P.A.;

0,9 = fator de conversão da glicose em amido;

D = fator de diluição da amostra;

P = peso (g) da amostra em base seca.

3.3.5. Caracterização dos Amidos

As análises físico-químicas utilizadas para caracterização dos amidos e os ensaios *in vivo* e *in vitro* foram feitos com o amido de milho, com o amido de milho

tratado hidrotérmicamente contendo o maior teor de amido resistente (AR de milho) e com o amido de banana.

3.3.5.1 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta foram determinadas através do Rapid Visco Analyser (RVA), com auxílio do programa "Thermocline for windows", segundo método descrito no manual do fabricante. As medidas no RVA foram feitas utilizando-se 2,8 g de amido suspensos em 25,0 ml de água. A mistura foi agitada a 960 rpm por 10 segundos, e a 160 rpm durante o restante do teste. A curva de temperatura seguiu o seguinte perfil:

Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
00:00	50
01:00	50
08:30	95
13:30	95
21:00	50

Tempo total: 23:00 minutos.

Os parâmetros medidos foram:

- Temperatura de pasta: temperatura na qual a viscosidade aumenta em pelo menos 2 RVU (Unidades do RVA) durante 20 segundos, em °C;
- Viscosidade máxima: valor máximo de viscosidade atingida durante ou logo após a etapa de aquecimento, em RVU;
- Temperatura da viscosidade máxima;

- Viscosidade a 95 °C;
- Viscosidade à 50 °C: viscosidade no final do período de resfriamento, em RVU;
- Quebra: viscosidade máxima menos a viscosidade final a 95 °C, em RVU;
- Retrogradação: viscosidade final à 50 °C menos a viscosidade final a 95°C.

3.3.5.2. Análises microscópicas

As técnicas empregadas para microscopia ótica e eletrônica de varredura foram técnicas de rotina, não exigindo preparações especiais. Amostras de amido foram observadas in natura ao fotomicroscópio ótico, sob luz transmitida ou polarizada: pequena quantidade foi colocada dispersa sobre lâmina histológica e adicionada uma mistura de glicerol e água (1:1) ou apenas glicerol com a finalidade de diminuir a refração da luz em torno dos grânulos; o glicerol tinha também a função de imobilizar gradualmente os grânulos. Lâminas histológicas contendo amido e preparadas com várias horas de antecedência permitem o assentamento dos grânulos e proporcionam micrografias com maior número de grânulos em foco.

Para detalhamento da superfície do grânulo, as amostras foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura. As amostras de amido, após desidratação à vácuo, foram montadas sob suporte metálico. Para conferir condutividade ao amido, as amostras foram recobertas com ouro em metalizador à vácuo.

Para a obtenção de imagem com maior aumento (acima de 2000X) procedeu-se também uma secagem em secador de ponto crítico de CO₂

3.3.5.3. Difractogramas de Raio-x

O padrão de difração de Raio-x foi obtido utilizando-se um difratômetro de Raio-x URD 6 Carl Zeiss, Radiação de Cu linha K, 40 Kv e 30mA, sendo a velocidade de varredura de 0,1° a cada 5s, sob ângulos (2 θ) variando de 0-40°.

3.3.5.4. Estrutura Fina

O estudo da estrutura fina dos amidos foi feito através da cromatografia de permeação em gel Sephadex G-50 dos resíduos obtidos após hidrólise do amido com pululanase e/ou β -amilase (Figura 5), segundo metodologia relatada por ROBIN et al. (1974) apud FRANCO (1993).

Foram feitas diluições adequadas das enzimas em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,2, de modo que cada ml da solução de pululanase correspondeu a 1 unidade da enzima, e, cada ml da solução de β -amilase correspondeu a 110 unidades da enzima. Para a diluição da β -amilase utilizou-se soroalbumina bovina e cloridrato de cisteína para a estabilização desta.

- Desramificação com pululanase (P_1).

Uma dispersão contendo 0,2 g de amido e aproximadamente 8 ml de tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 5,2 foi preparada e aquecida por 3 minutos a 100°C. Após resfriamento, seu volume foi completado para 10 ml. Aos 10 ml da solução contendo 2% (p/v) de amido, foram adicionadas 4 unidades de pululanase e 6 ml de tampão. A mistura foi então incubada à 30°C. A digestão encerrou-se quando o teor de açúcares redutores, determinado através do método de SOMOGY-NELSON (1945), tendo glicose como padrão, tornou-se constante. A mistura foi aquecida à ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.

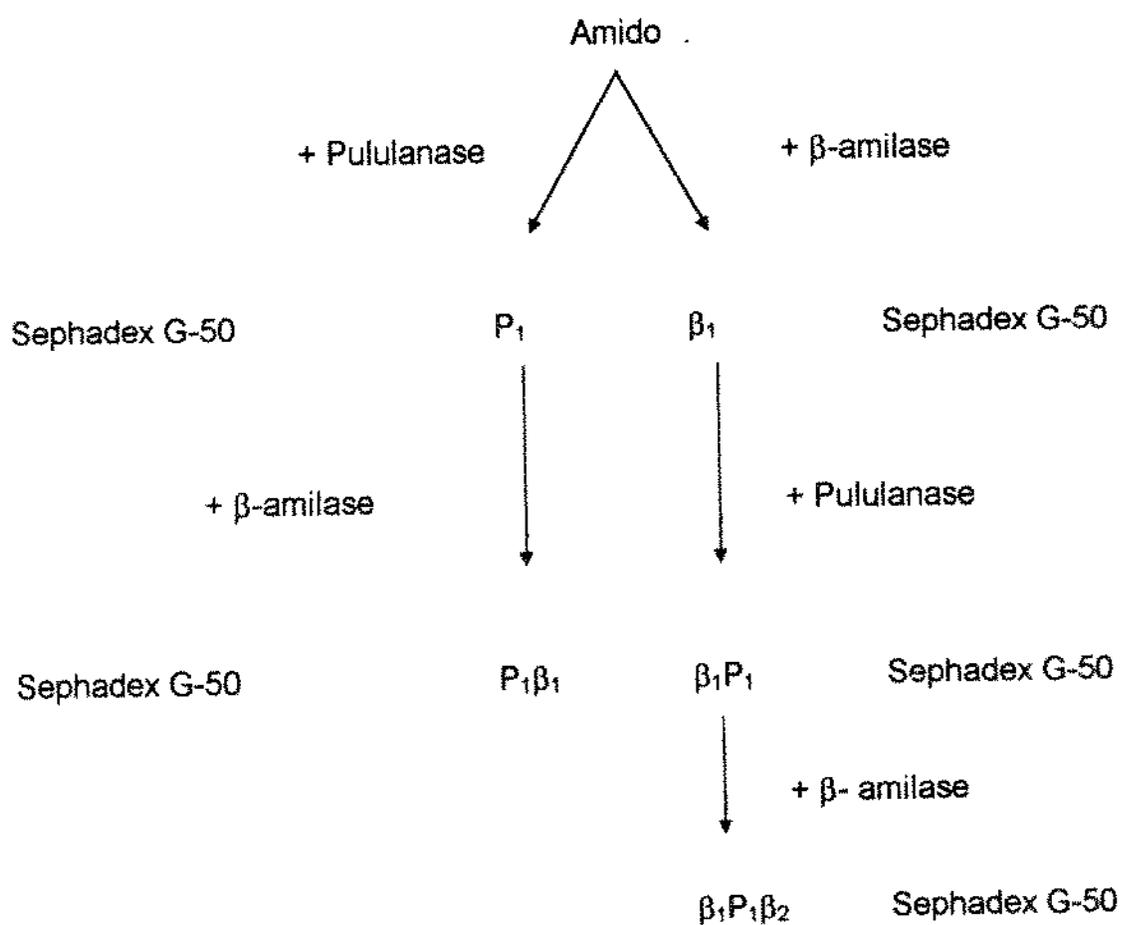
- Ação da β -amilase sobre a amostra de amido desramificada (P_1B_1).

A 10 ml de amostra de amido desramificada (P_1), adicionou-se 110 unidades de β -amilase. A mistura foi, então, incubada à 30°C. A digestão encerrou-se quando o teor de açúcares redutores tornou-se constante. A mistura foi aquecida à ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.

- Preparo das β -limite dextrinas (B_1).

Uma dispersão contendo 0,5 g de amido e aproximadamente 15 ml de tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 5,2 foi preparada e aquecida por 3 minutos a 100°C. Após resfriamento, seu volume foi completado para 25 ml. Tomou-se 20 ml da solução contendo 2% (p/v) de amido e adicionou-se 440 unidades de β -amilase e 16 ml de tampão. A mistura foi então incubada à 30°C. A digestão

Figura 5: Método enzimático utilizado para o estudo da estrutura do amido.



Fonte - ROBIN et al. (1974), apud FRANCO (1993).

encerrou-se quando o teor de açúcares redutores tornou-se constante. A mistura foi aquecida à ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.

- Desramificação da β -limite dextrina (B_1P_1)

A 20 ml da solução de β -limite dextrina (B_1) adicionou-se 4 unidades de pululanase e 1 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH5,2. A mistura foi então incubada à 30°C. A digestão encerrou-se quando o teor de açúcares redutores tornou-se constante. A mistura foi aquecida à ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.

- Ação da β -amilase sobre a β -limite dextrina desramificada ($B_1P_1B_2$).

A 10 ml da solução de β -limite dextrina desramificada(B_1P_1), adicionou-se 110 unidades de β -amilase. A mistura foi então incubada à 30°C. A digestão encerrou-se quando o teor de açúcares redutores, determinado através do método de SOMOGY-NELSON (1945), tendo glucose como padrão, tornou-se constante. A mistura foi aquecida à ebulição por 15 minutos para inativação da enzima.

- Análises Cromatográficas

As soluções de amido hidrolisadas com pululanase e/ou β -amilase foram cromatografadas em coluna (xk 16/100) de gel Sephadex G-50. A eluição foi realizada em fluxo ascendente, usando tampão fosfato 10 mM, pH 7,0, contendo 0,02% de azida de sódio para prevenir crescimento microbiano.

Alíquotas de 3 ml de amostras, após a ação enzimática, foram injetadas na coluna com a utilização de uma bomba que permitiu um fluxo constante de 1 ml/min. Foram coletados 5 ml de amostra por tubo.

Em todas as frações coletadas, determinou-se o teor de açúcar total, através do método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e o teor de açúcar redutor, através do método de SOMOGY-NELSON (1945), de modo a se obter o grau de polimerização (DP), que foi calculado como sendo a razão entre carboidratos totais/carboidratos redutores das frações à vários volumes de eluição.

Os padrões de eluição obtidos foram expressos como mg de glicose por 100 mg de polissacarídeo recuperado versus o volume de eluição. Assim, esses padrões puderam ser comparados, uma vez que cada um correspondeu à 100 mg de polissacarídeo.

3.3.5.5. Ensaio Biológicos

Dezoito ratos machos da linhagem Wistar, recém - desmamados (21 dias), foram divididos aleatoriamente em três grupos; durante os três primeiros dias (fase de adaptação) todos os ratos ingeriram ração comercial. À partir do 4º dia, os ratos foram divididos em três grupos e foram alimentados *ad libitum* por 12 dias.

- A Grupo 1 (grupo controle): animais receberam dieta AIN93 contendo amido normal de milho com 2,50% de AR
- Grupo 2: grupo de animais recebendo dieta AIN93 onde todo o amido foi substituído por amido resistente de milho - teor de AR igual a 7,15% (determinado *in vitro* segundo metodologia descrita em 3.3.4).
- Grupo 3: animais recebendo dieta AIN93 onde todo o amido normal foi substituído por amido de banana - teor de AR igual 49,61% (determinado *in vitro* segundo metodologia descrita em 3.3.4.).

A dieta (1 Kg) consistiu em:

- amido de milho: 397,486 g;
- amido dextrinizado: 120,24 g;
- açúcar: 100 g;
- caseína: 211,76 g,
- óleo de soja: 70 g;
- fibra: 50 g
- mix-vitamínico (AIN-93G): 10 g;
- mix-mineral (AIN-93G): 35 g;
- L-cystina: 3,0 g;
- bitartarato de colina: 2,5 g;
- tert-butylhidroquinona: 0,014 g.

Esta dieta é referida como AIN-93G e se encontra detalhadamente descrita no trabalho de REEVES et al. (1993).

A quantidade de ração ingerida foi medida a cada 3 dias durante o experimento, quando os ratos eram pesados e suas fezes eram coletadas, secas e guardadas em freezer. As fezes coletadas foram divididas em dois lotes: lote 1, do 1º ao 7º dia e lote 2, do 8º ao 12º dia.

Posteriormente, as fezes foram trituradas, e seus conteúdos de AR foram determinados de acordo com a metodologia descrita em 3.3.4, com pequena modificação: O sobrenadante obtido após a primeira centrifugação não foi descartado. A quantidade de oligossacarídeos solúveis nele presente - correspondente à fração lentamente digerível do amido *in vivo* - foi determinada através de curva padrão obtida com glicose P.A. (leitura em espectrofotômetro, a 505nm), após oxidação enzimática pela glicose-oxidase (GOD - β D - Glicose:oxigênio 1 - oxidoredutase; EC 1.1.3.4), contida no kit Glicose E da CELM, segundo a metodologia sugerida pelo fabricante.

Ao décimo segundo dia, após anestesiados, os ratos foram sacrificados, os intestinos delgado e grosso, apêndices cecais e fígados foram coletados e fixados em solução tamponada (tampão fosfato) contendo 4% de paraformaldeído.

Cada ceco, após ser pesado, teve o conteúdo extraído e o pH determinado, sendo a seguir acondicionado em recipiente contendo álcool e guardado em congelador. Posteriormente, foram descongelados e centrifugados (10 minutos a 4300 rpm). O sobrenadante foi descartado e a parte residual, após ser lavada por duas vezes com etanol a 80%, foi seca em estufa com circulação forçada de ar a 40°C e triturada. A determinação do AR foi feita de maneira semelhante à usada na quantificação dos amidos resistentes presentes nas fezes.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COMPOSIÇÃO DOS AMIDOS

A composição química dos amidos de milho e de banana está de acordo com valores encontrados na literatura (LII et al., 1982; PATIL & NAGER, 1974; KAYISU & HOOD, 1981) e apresentaram grau de pureza compatível com o objetivo do trabalho, em particular em relação ao baixo teor de fibras (Tabela 3).

LII et al. (1982) encontraram em amidos de banana teores de 0,15% de gordura, 0,042% de cinzas e 0,09% de proteína. FUJIMOTO et al. (1977) e KAYISU et al. (1981) encontraram em amidos de banana 0,17% e 0,2% de proteína, respectivamente. KAYISU & HOOD (1981) encontraram 16% de amilose em amidos de banana, valor que, segundo estes autores, se assemelha ao determinados por GREENWOOD & THONSON (1962), mas inferiores aos apresentados por PATIL & NAGER (1974), que encontraram de 19,8% a 21,2% de amilose em diferentes variedades de banana.

Segundo SWINKELS (1985) apud FRANCO (1993) amidos de cereais comuns (milho, trigo, arroz, sorgo) possuem alta porcentagem de substâncias graxas (0,6 - 0,1%) – sendo que no amido de milho normal estas substâncias são predominantemente ácidos graxos livres – além de considerável quantidade de proteínas (0,25 - 0,5%), e teor de cinzas (cálcio, potássio, magnésio e sódio) variando de 0,05 a 0,1%. De acordo com MITCHELL (1990) apud FRANCO (1993), o amido de milho normal contém 0,35% de proteína, 0,55% de gordura e 0,10% de cinzas.

Os teores de AR encontrados para amidos de milho e de banana foram de 2,50 % e 49,61 %, respectivamente (Tabela 3).

As diferenças no tipo e quantidade de enzimas usadas e nas condições de tempo e temperatura de incubação entre os diversos métodos de determinação do AR dificulta a comparação da quantidade de AR determinada *in vitro*, uma vez que

Tabela 3: Composição centesimal e teores de amilose e Amido Resistente (AR) do amido de milho e de banana

	AMIDO MILHO	AMIDO BANANA
	(%)*	(%)*
PROTEÍNA	0,33	0,10
LIPÍDEOS	0,44	0,58
FIBRAS	0,05	0,06
CINZAS	0,03	0,04
AMILOSE	25,50	19,20
AR	2,50	49,61

* valores expressos em base seca.

o conteúdo e as características do mesmo podem ser afetadas pelos procedimentos utilizados.

A grande diferença nos teores de AR entre os dois amidos estudados, entretanto, parece não estar relacionada com a composição química do grânulo. Mesmo a diferença entre os teores de amilose, por si só, não fornece subsídios para uma explicação sobre os teores de AR.

É possível que a diferença no teor de AR entre amido de milho normal e amido de banana seja decorrente de diferenças nas estruturas das regiões não susceptíveis ao ataque enzimático presentes nesses amidos. Por outro lado, a existência de modificações químicas nas cadeias dos componentes do amido de banana, formando barreiras à hidrólises, não pode ser descartado (KAYISU & HOOD, 1981; LIL et al., 1982). Também a existência de associações do tipo proteína-amido, diminuindo a digestibilidade do AR, proposta por EERLINGER & DELCOUR (1995), pode ser um fator responsável pelo alto teor de AR em amido de banana.

4.2. EFEITO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO AMIDO DE MILHO NA FORMAÇÃO DO AMIDO RESISTENTE

O efeito das variáveis de processamento (umidade, tempo e temperatura de armazenamento) na produção do AR pode ser observado na Tabela 4.

A Tabela 5 mostra os parâmetros estatísticos obtidos através da análise de variância para os modelos linear e quadrático.

A análise de variância (ANOVA) do efeito das variáveis – umidade, tempo e temperatura de armazenamento do gel – na formação do AR mostrou que o modelo linear é o que melhor descreve o efeito dessas variáveis na formação do AR, pois apresentou maior R^2 , além de maior $F_{\text{calculado}}$ em relação ao F_{tabelado} . O modelo linear foi significativo ao nível de 90%, não apresentou falta de ajuste e explicou 92% das variações das respostas.

Tabela 4: Variação do teor de AR em amido de milho normal em função das variáveis: umidade, tempo e temperatura de armazenamento dos géis.

Ensaio	Umidade (%)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	AR (%)
1	30	17,76	15	2,88
2	70	17,76	15	5,54
3	30	58,24	15	3,98
4	70	58,24	15	5,28
5	30	17,76	35	4,04
6	70	17,76	35	5,67
7	30	58,24	35	4,56
8	70	58,24	35	7,15
9	16,4	38	25	3,9
10	83	38	25	7,15
11	50	4	25	5,32
12	50	72	25	4,76
13	50	38	5	4,74
14	50	38	45	5,32
15 (C)	50	38	25	5,22
16 (C)	50	38	25	4,66

AR- Amido Resistente

Tabela 5: Análise de variância para produção de Amido Resistente: modelos linear e quadrático.

Modelo	R ²	F _{calculado}	F _{tabelado}
Linear	0,92	regr. 21,58	regr. 3,29
		f.a. 1,11	f.a. 4,06
Quadrático	0,86	regr. 9,26	regr. 2,55
		f.a. 1,92	f.a. 3,46

Onde: regr. = Regressão;

f.a. = Falta de Ajuste,

$\alpha = 0,1$

A comparação entre o $F_{\text{calculado}}$ (21,58) e o F_{tabelado} (3,29) mostra que a regressão foi estatisticamente significativa e que o modelo se ajustou aos dados experimentais.

Pela análise da estimativa dos efeitos das variáveis, observa-se que a umidade do amido no tratamento hidrotérmico foi a única variável significativa, dentro da faixa de variação estudada, na formação do AR.

A equação da regressão para a produção do AR, obtida de acordo com os coeficientes de regressão foi:

$$\%AR = 0,506 + 0,051U^* + 0,018t + 0,046T, \text{ onde:}$$

U =umidade (30 a 70%);

t = Tempo (4 a 72 horas);

T = Temperatura (15 a 35°C);

* = Estatisticamente significativa, a 90% de confiança.

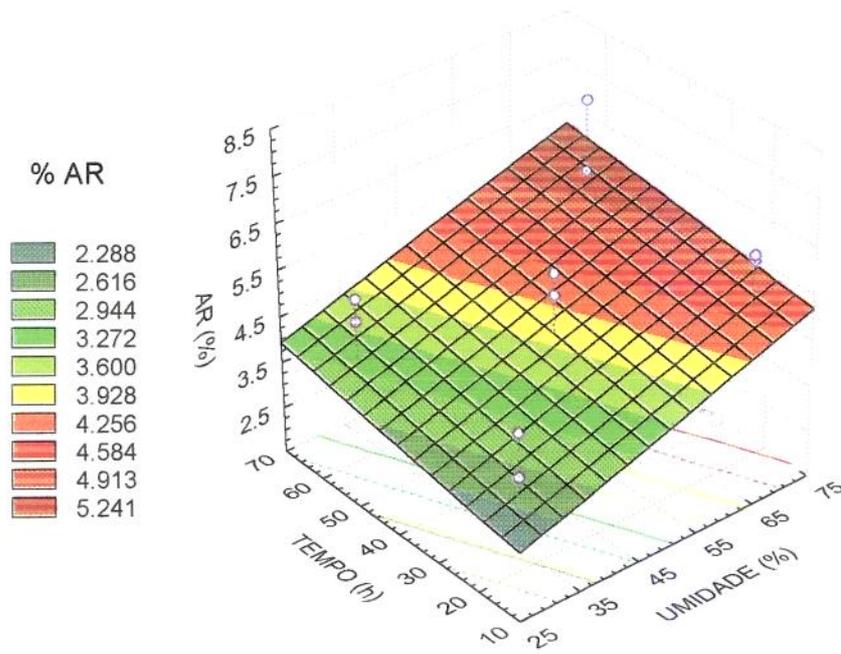
Uma representação melhor dessa equação pode ser vista na Figura 6, que mostra a tendência no aumento da produção do AR em função do aumento da umidade.

Nas condições do experimento, a quantidade máxima de AR (7,15%) foi obtida com 70% de umidade, 35°C e no tempo de 58,24 h de armazenamento.

A formação do AR é afetada pelo conteúdo de água presente durante o tratamento térmico. Uma máxima produção de AR é obtida quando uma proporção 1:3,5 (p/p) de amido:água é aplicada. Por outro lado, uma quantidade mínima de água é necessária para conferir plasticidade ao meio e ser incorporada nas estruturas cristalinas (EERLINGER & DELCOUR, 1995).

A análise dos resultados mostrou que não houve diferença significativa, na faixa de valores estudados, nas variáveis tempo ($4h < t < 72h$) e temperatura ($15^\circ\text{C} < T < 35^\circ\text{C}$) de armazenamento do gel quanto à produção de AR. No entanto segundo EERLINGEN & DELCOUR (1995) a produção do AR em amidos gelatinizados depende fortemente do tempo e da temperatura de estocagem do gel. Estudos

Figura 6: Variação na porcentagem de Amido Resistente obtido em função da umidade e dos tempo e temperatura de armazenamento dos géis.



mostram que a formação de frações de amido altamente resistentes, como é o caso da amilose retrogradada, que resiste a hidrólises a 100°C, obedecem à cinética da formação de cristais, na qual a nucleação é favorecida à temperaturas muito abaixo da temperatura de fusão dos cristais (150°C), mas acima da temperatura de transição vítrea (- 5°C). A propagação ou crescimento dos cristais é favorecida em condições muito acima da temperatura de transição vítrea mas, abaixo da de fusão (EERLINGEN & DELCOUR, 1995).

Uma explicação para a influência não-significativa da temperatura de armazenamento do gel na formação do AR pode estar na pequena faixa de variação dos valores estudados (15 a 35°C), que não causaram variações significativas na produção de AR.

De acordo com VAN SOEST et al. (1994) e COLONNA et al. (1992) a retrogradação da amilose é um processo rápido que ocorre em apenas algumas horas após a gelatinização do amido, ao contrário da retrogradação da amilopectina que é um processo lento, podendo demorar muitos dias. BERRY (1986) e SILJESTRÖN et al. (1988) não observaram dependência entre o tempo de armazenamento e a formação do AR em géis concentrados de amidos que sofreram autoclavagem. Estas observações, em conjunção com as de VAN SOEST et al. (1994) e COLONNA et al. (1992), indicam que a formação do AR está relacionada principalmente à mudanças envolvendo amilose, ao invés da amilopectina. No presente experimento, a não significância do tempo de armazenamento, poderia ser o resultado da retrogradação extensiva da amilose nas primeiras 4 horas de armazenamento do gel que foi o menor tempo de estabelecido experimento.

A despeito de não ter constatado influências significativas do efeito do tempo e temperatura de armazenamento dos géis, nas condições do experimento, foi possível, com o tratamento hidrotérmico, triplicar a produção do AR quando comparado com o amido de milho nativo (não tratado)(2,15% de AR).

A adição de água de modo a se obter uma dispersão com 70% de umidade e a posterior autoclavagem, que induz a fragmentação e produção de cadeias de comprimento favorável à formação do AR, juntamente com o armazenamento

adequado (58,24h e 35°C) dos géis, provocou aumento do teor de AR devido à indução da retrogradação das moléculas do amido.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS AMIDOS

As análises *in vivo* e *in vitro* foram realizadas com os amidos de milho nativo (2,50% de AR) e tratado hidrotérmicamente (7,15% de AR) e com o amido de banana (49,61% de AR).

O amido tendo 7,15% de AR obtido nas condições de 70% de umidade, 58,24h e 35°C será denominado simplesmente de AR de milho.

4.3.1. Propriedades de Pasta

Os parâmetros das propriedades de pasta dos amidos medidos pelo RVA, estão listados na Tabela 6. A Figura 7 ilustra o comportamento de suspensões dos amidos em água durante o aquecimento, resistência à ação mecânica e resfriamento.

A viscosidade de pasta à quente depende do grau de inchamento dos grânulos e da resistência que os mesmos apresentam à fragmentação pelo atrito mecânico ou pelo calor. Quando os grânulos tornam-se bastante inchados com o aquecimento, ocorre enfraquecimento das forças associativas, tornando-os frágeis ao atrito mecânico (SCHOCH & MAYWALD, 1968 apud FRANCO, 1993).

A suspensão de amido de banana apresentou aumento mais abrupto da viscosidade em função do aumento da temperatura, comparativamente aos outros amidos, indicando que as forças que mantêm seus grânulos são mais homogêneas e a estrutura cristalina que mantém o grânulo não é tão coesa como seria esperado para um amido com alto teor de estruturas resistentes à hidrólise.

O inchamento rápido da suspensão de amido de banana aquecida é semelhante ao da batata crua, que também possui alto teor de AR *in natura* e é

Tabela 6: Parâmetros das propriedades de pasta do amido de milho nativo, AR de milho e amido de banana.

Parâmetros	Amido milho	AR milho	Amido banana
VM	187,75	27,00	288,75
Vmin	73,42	26,75	86,17
Q	114,33	0,25	202,58
Vf	186,67	40,25	179
Rtg	113,25	13,50	93,33
TP	68,65	-	72,00
tVM	8,13	12,67	6,67

Onde:

VM = Viscosidade máxima; em unidades RVU.

Vmin = Viscosidade mínima; à 95°C em RVU.

Vf = Viscosidade; à temperatura de 50°C em RVU.

tVM = Tempo para atingir a viscosidade máxima; em minutos.

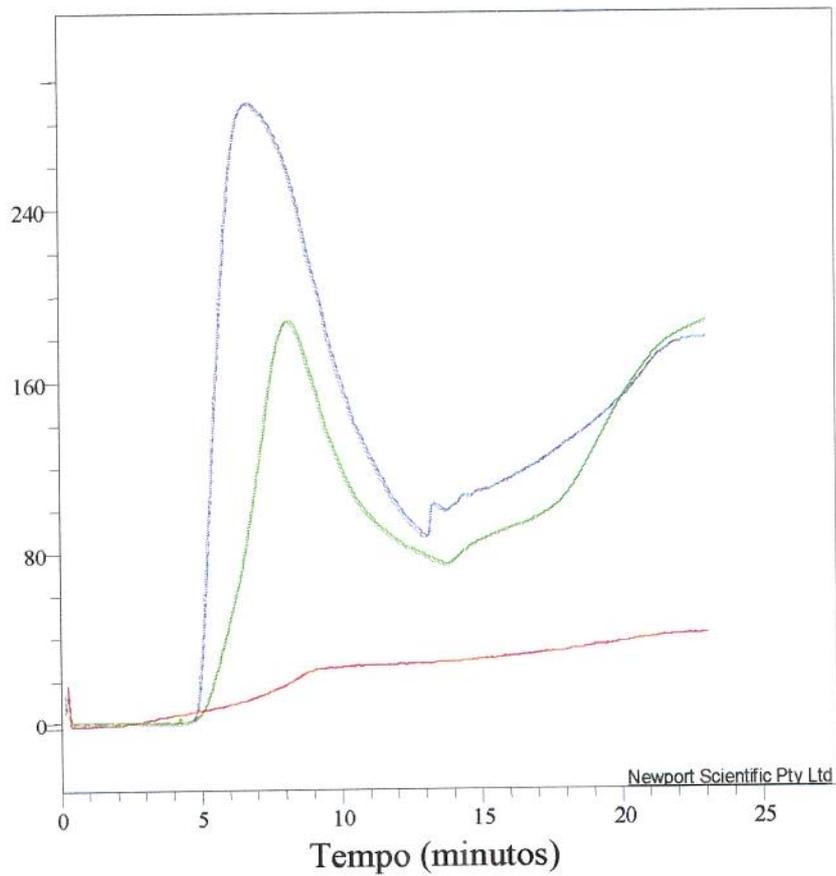
Rtg = Retrogradação; viscosidade final em RVU, à 50°C menos a viscosidade final à 95°C.

TP = Temperatura de pasta.

Q = Quebra, em RVU.

RVU = Unidades do RVA.

Figura 7: Propriedades de pasta dos amidos de milho nativo, AR de milho e amido de banana.



Onde:

- amido de banana
- amido de milho in natura
- AR de milho

caracterizado pelo relativo alto teor de grupos fosfatos na molécula de amilopectina (0,1 – 0,2%), que segundo ZOBEL (1984) estão esterificados no carbono 6.

Também foi observada uma abrupta redução na viscosidade da pasta de amido de banana gelatinizado indicando alta susceptibilidade à ação mecânica.

Para LII et al. (1982) o modo de inchamento, o viscograma e a alta temperatura de pasta do amido de banana (AR tipo II), sugerem intensa interação entre as moléculas no grânulo. Essa interação poderia ser resultado da formação de pontes de hidrogênio entre grande número de moléculas de amilose. Essa hipótese é entretanto incompatível com a baixa afinidade do amido de banana por iodo. Segundo esses autores, outra explicação para a alta temperatura de pasta verificada em amido de banana pode ser a existência de ligações cruzadas através dos grupos fosfatos presentes na molécula.

Os resultados obtidos no presente trabalho entretanto não indicam, como observado anteriormente, a existência de ligações cruzadas que tornam o amido gelatinizado resistente à ação mecânica. Por outro lado, o abrupto aumento da viscosidade durante o aquecimento, não sugere forte coesão nas estruturas cristalinas que mantêm o grânulo.

O amido de milho apresentou propriedades de pasta semelhantes às encontradas na literatura (FRANCO, 1993).

O aumento da viscosidade em função da temperatura do amido de milho, menos abrupto que o do amido de banana, mostra que as forças que mantêm a estrutura dos grânulos não são homogêneas. Por outro lado, este amido mostrou menor susceptibilidade à ação mecânica e maior tendência à retrogradação em relação ao amido de banana.

Segundo ZOBEL (1984) a formação do complexo entre parte da amilose e os lipídeos presentes no amido de milho normal é responsável pelo menor inchamento dos grânulos e pelo fortalecimento das forças de associação, o que se reflete na estabilidade de pasta desses amidos durante o cozimento.

SWINKELS (1995) e LEELAVATHI & INDRANI (1987) segundo FRANCO (1993) relataram que a maior retrogradação dos amidos de cereais pode ser primeiramente causada pelo alto teor de amilose, acrescido do fato de que nos cereais este polímero possui tamanho molecular relativamente baixo, favorecendo

a afinidade de grupos hidroxil entre as suas moléculas; finalmente as moléculas de amilose podem orientar-se de modo paralelo facilitando essa afinidade dos grupos hidroxil e formando agregados de baixa solubilidade que aumentam a viscosidade da pasta à frio.

A curva de viscosidade (RVA) do amido de milho tratado termicamente (AR de milho) apresentou viscosidade máxima muito baixa e similar à viscosidade mínima, indicando que ou as temperaturas aplicadas não foram capazes de romper as interações entre as moléculas formadoras da rede cristalina ou o tratamento hidrotérmico destruiu a estrutura granular, cujo inchamento resulta no aumento da viscosidade.

Os resultados obtidos no RVA indicam que a estrutura cristalina que mantém o grânulo do amido de banana coeso, por si só, não explica o alto teor de AR encontrado. A retrogradação do amido de milho gelatinizado, por outro lado, torna o amido menos susceptível ao inchamento durante o aquecimento, indicando a formação de estruturas cristalinas mais coesas.

4.3.2. Análises Microscópicas

As análises microscópicas do amido de milho mostra a aparência esperada que consiste em formas poliédricas e variabilidade de diâmetros (Figuras 8 e 9). No entanto as micrografias do AR de milho apresentam fragmentos porosos evidenciando vitrificação (Figuras 10 e 11).

Os grânulos dos amidos de banana demonstraram superfícies lisas, poliformismo e tamanho entre 10 a 50 μm (Figuras 12).

Segundo LII et al. (1982) a forma dos grânulos dos amidos de banana variam do oval ao irregular, com tamanho de 6 a 80 μ , sendo que a maioria situa-se entre 20 - 60 μ . De acordo com estes autores, estas formas diferem das encontradas por FUJIMOTO et al. (1977) que encontrou formas de discos finos e planos em amidos de banana.

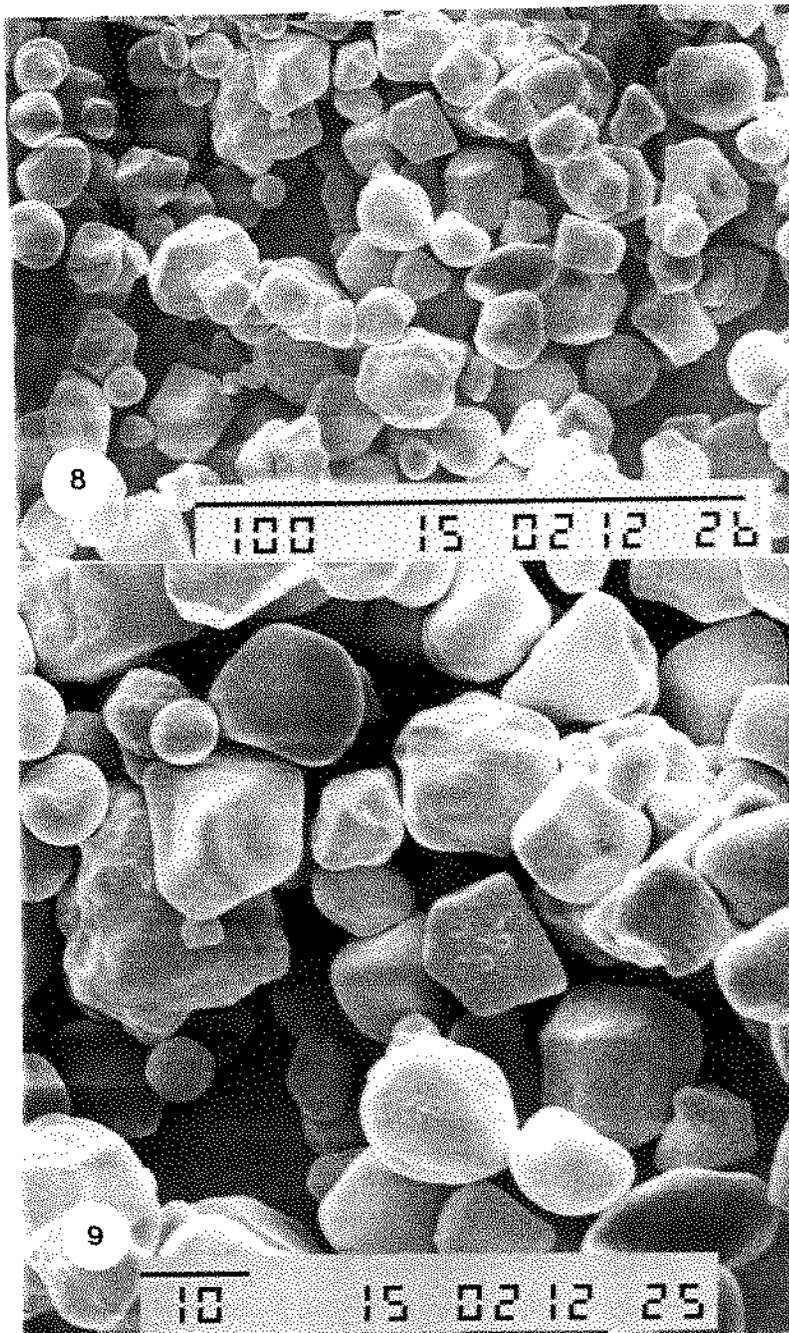


Figura 8: Micrografia ao SEM (microscópio eletrônico de varredura) de amido normal de milho. A escala representa 100µm. Os grânulos são poliédricos polimorfos e com diâmetros variados (aumento 500 X).

Figura 9: Micrografia aumentada (1000X) da figura anterior. A escala representa 10µm. Os amidos têm diâmetros distribuídos entre 6µm a 20 µm.

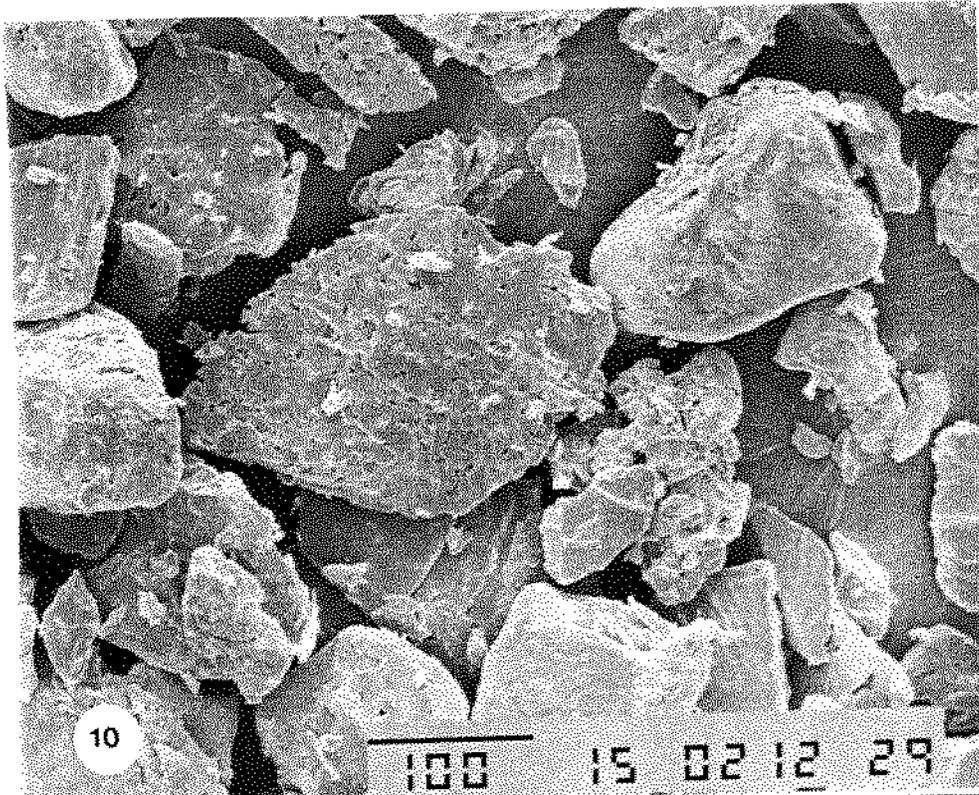


Figura 10: Micrografia ao SEM do amido de milho após tratamento hidrotérmico, secagem, trituração e peneiramento (AR de milho). A escala representa 100 μ m (aumento 350X).

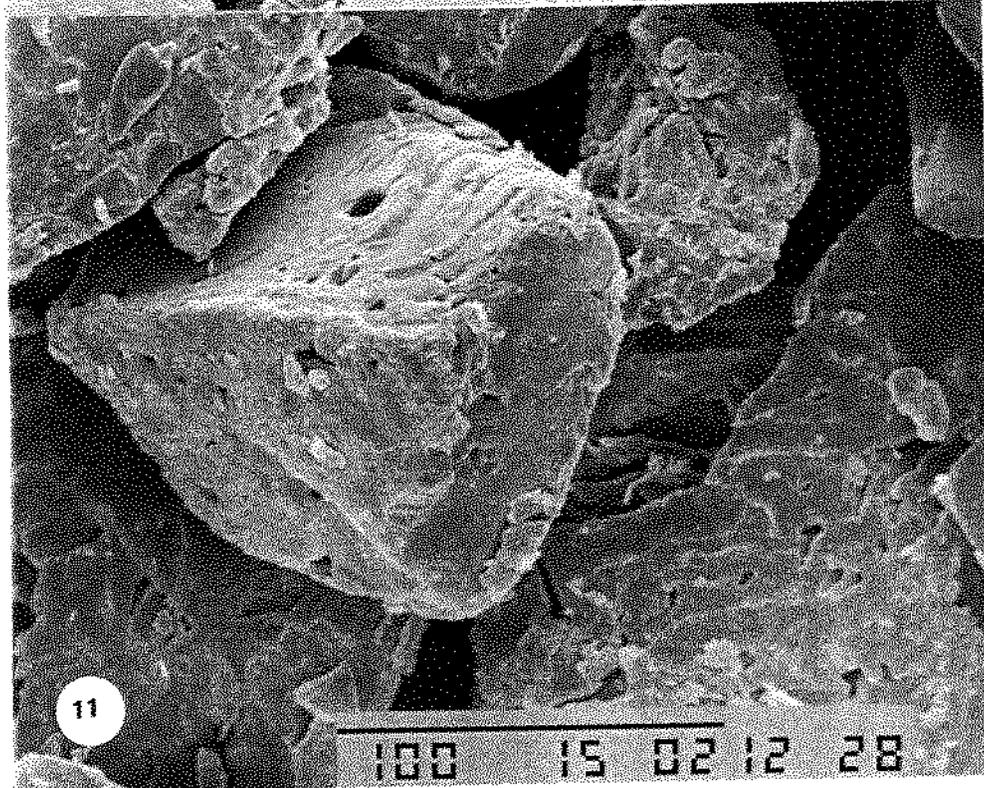


Figura 11: Micrografia do AR de milho: as fraturas dos blocos demonstram vitrificação e frequente porosidade dos mesmos (aumento 1000X).

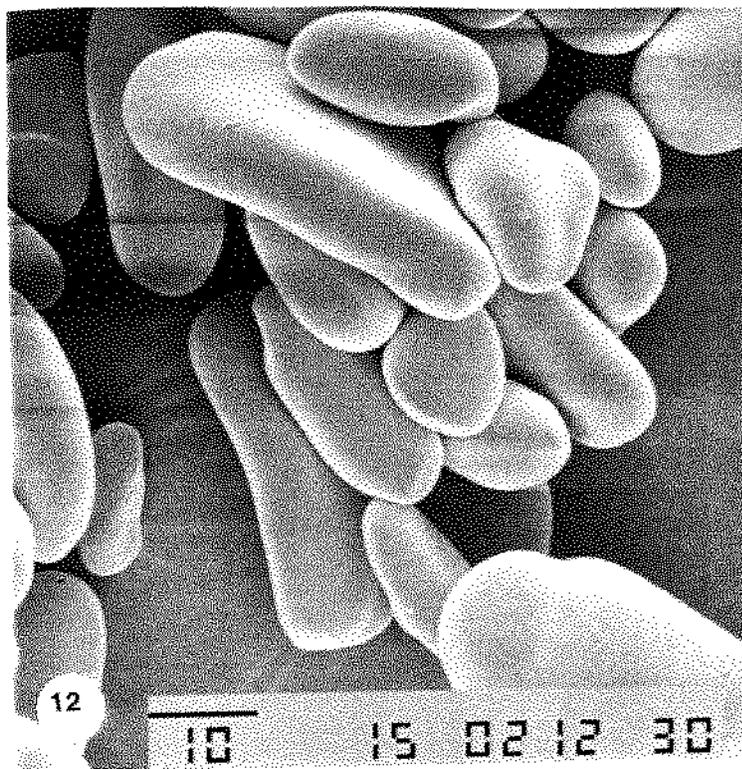


Figura 12: Micrografia ao SEM do amido de banana demonstrando superfícies polidas. A escala representa 10 μm (aumento de 1000X).

4.3.3. Difractogramas de Raio-x

Através dos difractogramas de raio-x foi encontrado para o amido de milho padrão de difração tipo A (picos em 2θ igual a 15, 17, 18 e 23), para o AR de milho, tipo C (picos em 2θ igual a 5.6, 15, 17, 18, 22 e 24) e para o amido de banana, tipo B (picos em 2θ igual a 5.6, 17, 22, e 24), como pode ser observado pelas Figuras 13, 14 e 15.

Segundo GALLANT et al. (1992); LII et al. (1982) e EERLINGEN et al. (1993), geralmente, os amidos de cereais apresentam um padrão tipo A. Amidos de batata, banana, alguns tubérculos, amidos retrogradados, bem como alguns amidos ricos em amilose (amilomaize, cevada) apresentam padrão tipo B. Amidos de legumes e sementes apresentam padrão tipo C.

De acordo com GALLANT et al. (1992) o padrão de difração C pode ser formado pela mistura de grânulos com padrão cristalográfico A e com padrão cristalográfico B; ou ainda, existiria a possibilidade de que coexista, internamente nos grânulos, os dois padrões citados.

De acordo com COLONNA et al. (1992) e GALLANT et al. (1992) a passagem do padrão A para o B só é possível se os grânulos de amido forem inteiramente destruídos e então recristalizados em sistema novo com nível diferente de água e organização.

Os padrões A e B diferem-se quanto à forma dos cristais e ao conteúdo de água (ENGLYST et al., 1992).

No AR de milho foi encontrado padrão tipo C devido possivelmente as condições em que foi gerado, que não permitiram a completa gelatinização dos cristais. Provavelmente alguns cristais tipo A permaneceram intactos e os outros que foram gelatinizados se reorganizaram sob forma distinta por exemplo, cristais do tipo B.

Uma vez que a estrutura do padrão A, termodinamicamente mais estável, parece ser mais densa que o padrão B, seria esperada resistência maior ao ataque enzimático dos grânulos de amido tipo A. Observa-se entretanto que os grânulos de amido apresentando padrão de tipo B e C tendem a ser mais resistentes a amilases pancreáticas, conforme se verifica nas micrografias obtidas em

Figura 13: Difractograma de raio-x do amido de milho: tipo A

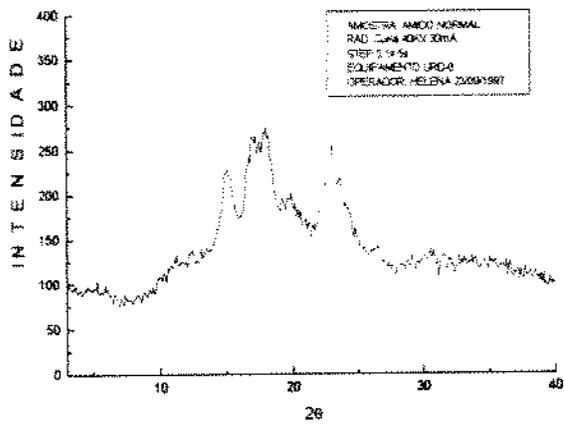


Figura 14: Difractograma de raio-x do AR Milho: tipo C

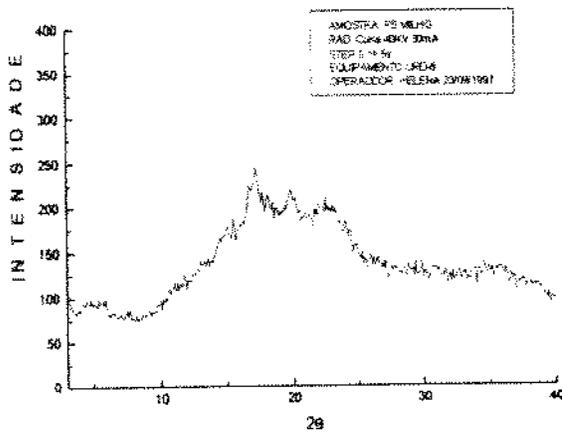
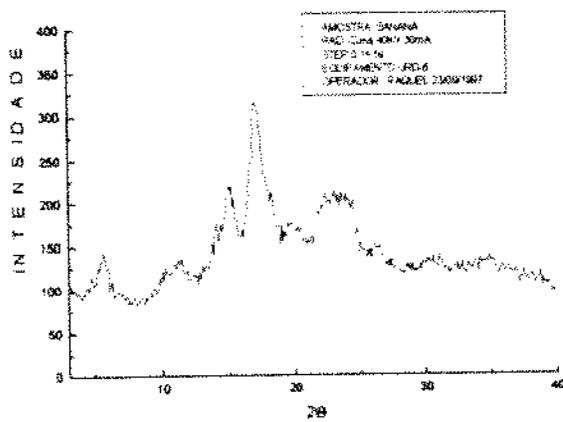


Figura 15: Difractograma de raio-x do amido de banana: tipo B



microscopia eletrônica de transmissão e de varredura (GALLANT et al., 1992; ENGLYST et al., 1992).

Os resultados obtidos no estudo das propriedades de pasta com o RVA são coerentes e indicam maior coesão para o amido de milho normal (padrão A) em relação ao amido de banana (padrão B). Desta forma, a maior resistência do amido de banana seria ocasionada também por outros fatores que impedem o ataque enzimático e não apenas pela coesividade da estrutura cristalina.

4.3.5. Análises Cromatográficas em Gel Sephadex G-50

A Tabela 7 apresenta a porcentagem de carboidratos presentes em cada pico, em relação ao total recuperado, resultantes da soma dos açúcares totais contidos nas frações e o seu respectivo DP, obtidos do padrão de eluição em gel Sephadex G-50 após os amidos de banana, de milho e AR de milho terem sido desramificados com pululanase (P_1), pululanase + β -amilase (P_1B_1) ou β -amilase (B_1), β -amilase + pululanase (B_1P_1), β -amilase + pululanase + β -amilase ($B_1P_1B_2$). Os padrões de eluição das frações de amido podem ser observados nas Figuras 16, 17 e 18. Os cromatogramas da eluição dos amidos apresentaram em geral 2 picos, denominados A e B.

Segundo catálogo da PHARMACIA (1982) o peso molecular máximo que permeia a partícula do gel Sephadex G-50 é de aproximadamente 10000 (DP = 60). Portanto, todo polissacarídeo com grau de polimerização maior que 60 é excluído pela matriz do gel em determinado v_0 . As frações com DP > 60 não foram registradas provavelmente devido ao rápido fluxo da coluna (1 ml/min).

Com relação ao amido de banana a ação da pululanase (Figura 16a) resultou em uma fração com DP igual a 28 e outra com DP 2 - 3. A baixa recuperação, que pôde ser medida fazendo - se a diferença entre a quantidade de açúcar total injetado e a quantidade de açúcar coletado nos tubos, indicou que grande parte das cadeias lineares, resultantes da ação da pululanase, tinha DP maior que 60. Entre essas cadeias podem estar incluídos as amiloses e cadeias

Tabela 7: Perfil de eluição do amido de banana, amido de milho nativo e do amido resistente de milho

	Banana		AR milho		Milho	
	A	B	A	B	A	B
P ₁	DP 28 (39,60%)	DP 2-3 (60,40%)	DP 34 (46,66%)	DP 2-3 (53,34%)	DP 2-10 (100,00%)	-
P ₁ B ₁	DP 34 (13,56%)	DP 2-3 (86,44%)	DP 34 (11,37%)	DP 2-3 (88,63%)	DP 34 (13,38%)	DP 2-3 (86,62%)
B ₁	DP 34 (11,20%)	DP 2-3 (88,80%)	DP 34 (21,28%)	DP 2-3 (78,72%)	DP 34 (26,26%)	DP 2-3 (73,74%)
B ₁ P ₁	DP 34 (3,59%)	DP 2-3 (96,41%)	DP 34 (3,34%)	DP 2-3 (96,56%)	DP 2-6 (100,00%)	-
B ₁ P ₁ B ₂	DP 34 (5,34%)	DP 2-3 (96,41%)	DP 34 (3,58%)	DP 2-3 (96,42%)	DP 2-3 (100,00%)	-

Onde: Número entre parêntesis refere-se à porcentagem em relação ao total dos carboidratos recuperados presentes em cada pico (A e/ou B).

Figura 16: Padrão de eluição das frações de carboidratos da amostra de amido de banana após ação da Pululanase e/ou β -amilase em gel Sephadex G-50

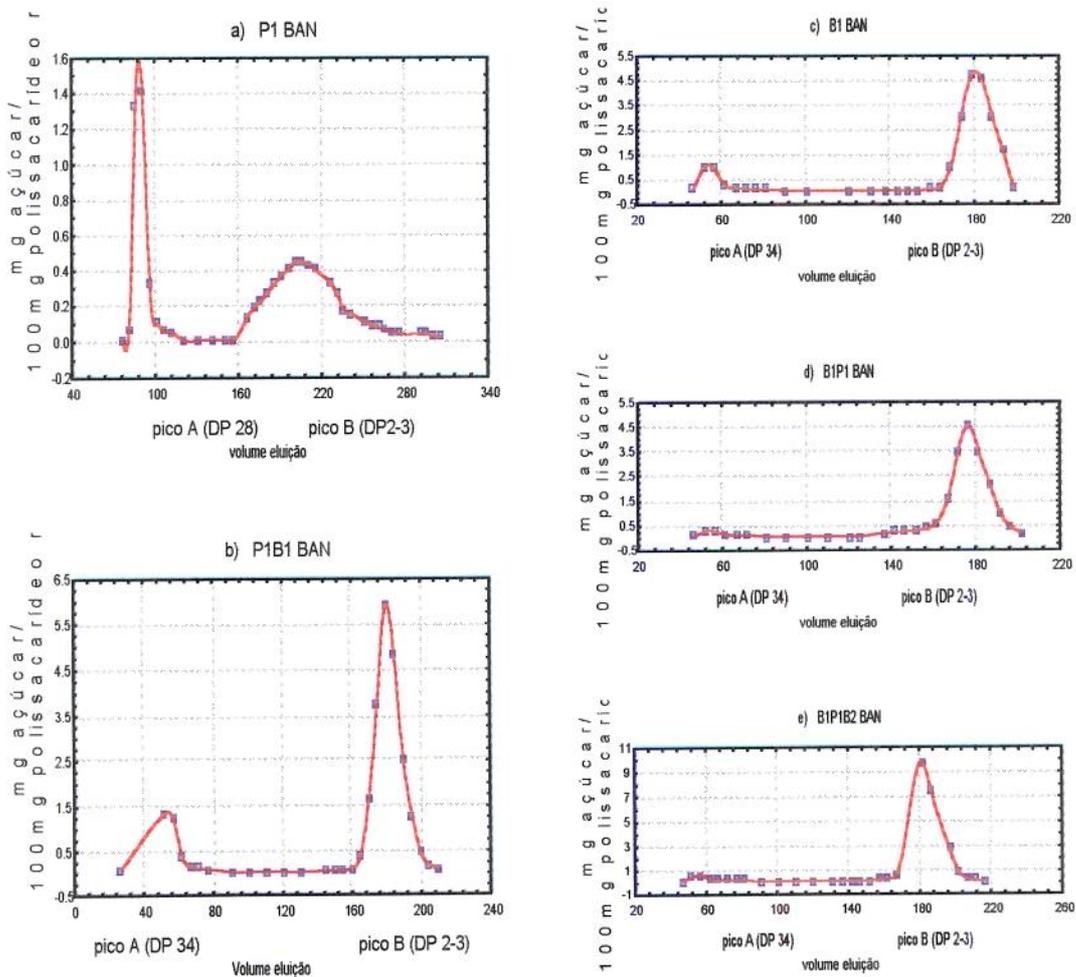


Figura 17: Padrão de eluição das frações de carboidratos da amostra de Amido Resistente de milho após ação da Pululanase e/ou β -amilase em gel Sephadex G-50

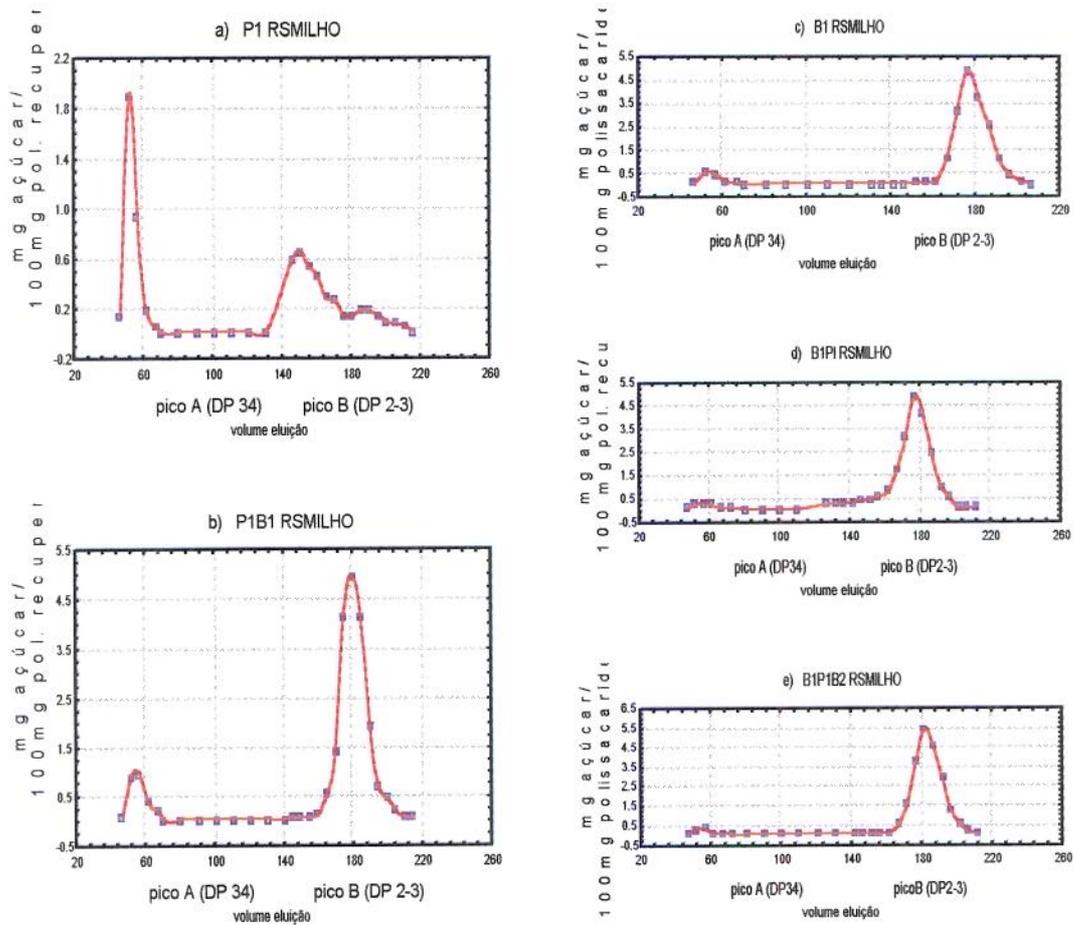
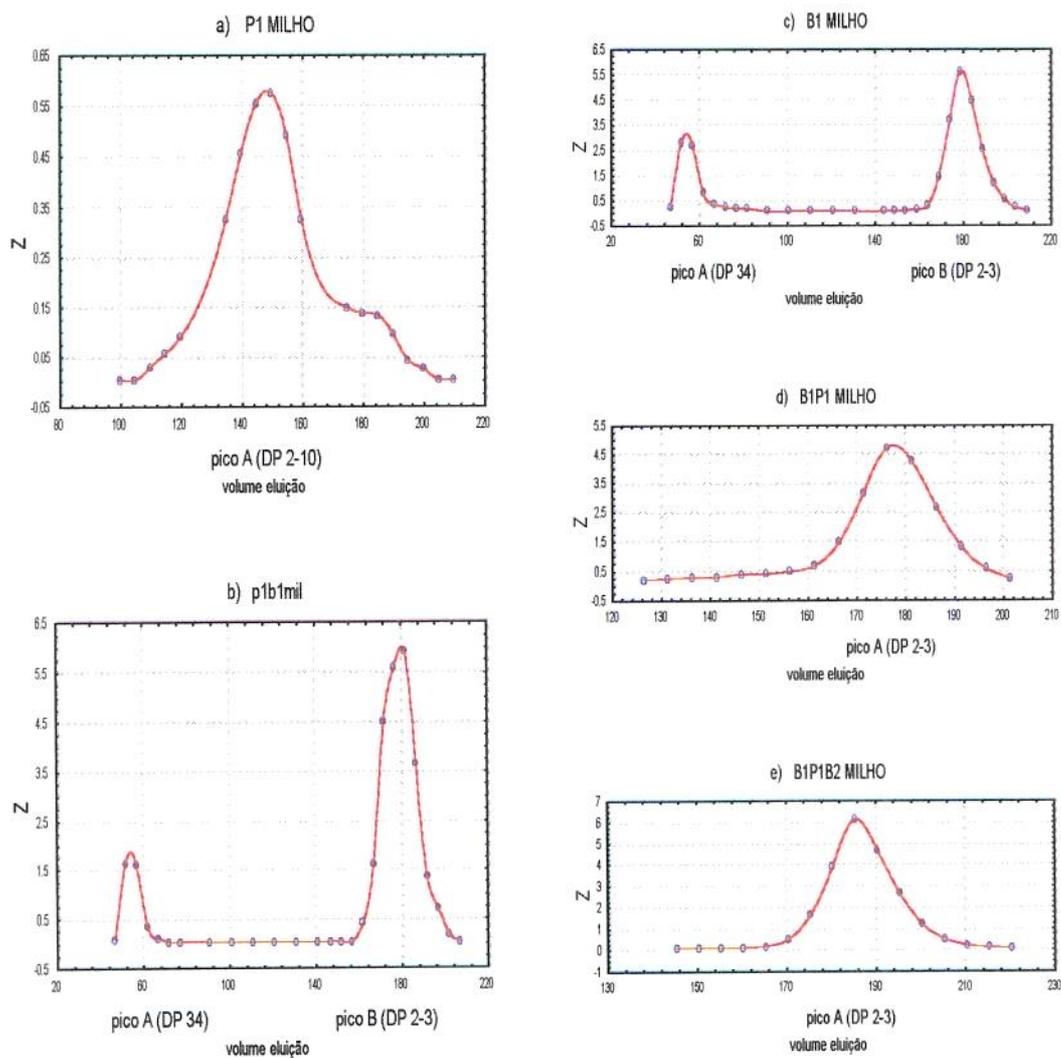


Figura 18: Padrão de eluição das frações de carboidratos da amostra de amido de milho nativo após ação da pululanase e/ou β -amilase em gel Sephadex G-50



laterais da amilopectina. A ação da β -amilase nos produtos da pululanase (Figura 16b) resultaram em uma fração com DP 34 e outra com DP 2 - 3, mostrando que parte das cadeias de amilose e/ou amilopectina têm impedimento à ação da β -amilase. Por outro lado, o aumento de DP 28 para 34, devido a ação da β -amilase indica que as frações lineares com DP 34, resistentes à β -amilase, devem ser provenientes da amilose, com DP > 60, pois não se espera cadeias laterais de amilopectina com DP > 60. Esse bloqueio à ação da β -amilase pode ser decorrente de alterações químicas dessas cadeias ou de interação entre cadeias e também a uma pequena quantidade de ramificações (ligações α -1,6 glicosídicas) da amilose (GALLANT et al., 1992).

Segundo KAYISU & HOOD (1981) outros fatores podem fazer com que a estrutura se torne resistente à ação da pululanase, como a presença de ligações α -1,2 e α -1,3 nos pontos de ramificação

Dextrinas resistentes à pululanase foram encontradas em batatas que sofreram hidrólise ácida (lintnerizadas) e em amidos de cereais (ROBIN et al., 1974 apud FRANCO, 1993).

A ação da β -amilase no amido de banana (Figura 16c) produziu uma fração menor (11,20%) com DP 34 e outra maior (88,80%) composta provavelmente de maltose e maltotriose, com DP 2 - 3. Essa fração com DP 34 pode representar tanto amilose, com alterações na cadeia que bloqueiam a ação da enzima, quanto dextrinas ramificadas provenientes da amilopectina.

Quando submetidas à ação da pululanase (Figura 16d) a quantidade da fração com DP 34 decresceu sensivelmente, o que pode ser atribuído à desramificação da amilopectina. A fração com DP 34, que não foi hidrolisada, poderia ser atribuída à amilose e/ou à resíduos da amilopectina. Porém, uma vez que o amido foi gelatinizado, anteriormente à ação das enzimas, muito provavelmente, esta fração que exerce bloqueio à ação da β -amilase seja proveniente da amilose pois, segundo EERLINGER & DELCOUR (1995), os cristais de amilopectina são formados pela associação de pequenas cadeias externas da amilopectina com temperatura de fusão baixa (55 - 70 °C). Essa fração com DP 34 mostrou-se resistente à β -amilase (Figura 16e).

Os resultados das duas sequências de enzima mostram que o amido de banana existe em uma fração linear dos componentes de amido – amilose ou amilopectina – resistente a ação de β -amilase, decorrente de alterações químicas na cadeia e/ou formação de agregados não susceptíveis à ação da enzima. A comparação dos resultados obtidos com dados da literatura sugere que esta fração é, provavelmente, parte da amilose.

Resultados qualitativamente semelhantes a estes foram obtidos com as amostras de amido de milho tratado hidrotérmicamente (AR de milho). As diferenças observadas foram em relação às quantidades relativas das frações, particularmente nos produtos obtidos das ações da pululanase (P_1) ou da β -amilase (B_1).

O amido de milho sob a ação da pululanase (P_1) (Figura 18a) produziu uma só fração com DP de 2-10. É provável que essa fração com DP 10 seja proveniente das ramificações da amilopectina, pois segundo EERLINGER & DELCOUR (1995) essas cadeias laterais têm DP em torno de 14 – 20. A fração que representaria as moléculas de amilose, provavelmente com DP > 60, não foram detectadas.

As frações resultantes da ação da β -amilase (Figura 18b) resultaram em uma fração com DP =34 e outra com DP = 2-3. À semelhança dos amidos de banana e AR de milho.

O aparecimento de cadeias com DP 34 resultante da ação da β -amilase sugere que existiam frações com DP maior que 60, que tiveram suas cadeias diminuídas.

Submetido à β -amilólise (B_1) (Figura 18c) o amido de milho produziu uma fração com DP 34 e outra com DP 2 - 3. Porém, após ação da pululanase (B_1P_1) (Figura 18d), obteve-se apenas uma fração com DP 2 - 6, indicando que a fração com DP 34 era constituída por junções α -1-6, que constituem ramificações da amilopectina. Nesta sequência não foi observada fração resistente à β -amilólise (Figura 18e).

Os resultados da análise sequencial das duas enzimas mostram que nos amidos com alto teor de AR existe uma fração linear com DP 34 resistente à β -amilólise. Essa resistência poderia ser decorrente de alterações químicas ao longo

da molécula ou de interações entre cadeias que impediriam a ação da enzima, sendo provavelmente provenientes da amilose. Em amido de milho essa fração não foi observada de forma conclusiva.

Segundo EERLINGEN & DELCOUR (1995) a resistência das soluções de amilose à ação enzimática poderia ser devido à agregação das cadeias ou à formação de estruturas bidimensionais pelo dobramento destas. GIDLEY et al. (1995) observou que as menores cadeias de amilose capazes de formar dupla hélice possuem DP10, com a formação dos cristais sendo favorecida em cadeias com DP igual ou maior que 13.

Segundo SILJESTRÖM et al. (1989) o AR tipo III é formado por segmentos lineares arranjados em estruturas cristalinas com PM relativamente baixo variando de 22 a 65 resíduos de glucose.

EERLINGEN & DELCOUR (1995) e LELOUP et al.(1992) propuseram um modelo para a organização da estrutura do gel de amilose. Segundo estes autores, os géis de amilose exibem uma estrutura macroporosa (tamanho abertura 100 – 1000 nm), contendo filamentos de 10 a 30 nm de largura. Estes filamentos resultam da associação de segmentos das cadeias de amilose com DP entre 26 e 76, as quais são parcialmente organizadas em uma estrutura cristalina tipo B. A fração amorfa do gel possui DP entre 6 e 30 e está localizada na estrutura macroporosa.

4.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1. Resultados Fisiológicos

O ensaio biológico foi realizado para verificar como os ARs medidos *in vitro* se comportariam diante da situação fisiológica oferecida pelo trato intestinal dos ratos, os quais estavam recebendo dietas nutricionalmente adequadas e diferindo apenas quanto à origem e quantidade de ARs.

Todos os animais foram sacrificados no 12º de ensaio. Verificou-se, após a abertura da parede abdominal que a aparência do trato digestivo era distinta entre

os 3 grupos de ensaio, sobretudo quanto ao caecum. O grupo 1, controle, demonstrava, pela coloração cinza do íleo e do caecum, que o conteúdo luminal havia sido digerido e transformado durante o trajeto pelo intestino delgado. O grupo 2, AR de milho, apresentou uma situação intermediária acrescido de intensa dilatação do caecum. O grupo 3, amido de banana, demonstrou no íleo e caecum conteúdo luminal esbranquiçado, análogo ao encontrado no duodeno e a dilatação do caecum era ainda maior e expandia a parede abdominal.

A Figura 19 apresenta a curva ponderal dos Grupos 1, 2 e 3 durante os 12 dias de ensaio e demonstra que as dietas apresentaram desempenho semelhante durante o ensaio.

A ingesta da dieta G3 foi maior no início (Tabela 8) mas estava decrescendo ao término do ensaio; de fato, ao analisar na Figura 20 o peso corporal e a respectiva ingesta verifica-se que o incremento de peso iniciava a queda assim como a ingesta.

A Figura 21 demonstra a eficiência da hidrólise *in vivo*: para conteúdos de 2,5% de AR a eficiência não foi evidente, mas à partir de 7,15% de AR a diferença entre *in vitro* e *in vivo* foi significativa ($p < 0,05$) e se manteve significativa para 49,61% de AR de banana, ou seja nos grupos G2 e G3 a superioridade de hidrólise *in vivo* é cerca de 50% em relação à hidrólise *in vitro*. Hidrólise maior *in vivo* foi encontrada também por TRUSWELL (1992); o autor ponderou que se o trânsito fosse suficientemente lento, alguns amidos que pareciam resistentes *in vitro* poderiam ser ainda digeridos no intestino delgado.

Estudos estruturais *in vivo* têm sido conduzidos paralelamente para a determinação da hierarquia de outros fatores limitantes à hidrólise *in vivo*. A combinação destas informações poderá permitir o desenvolvimento de um sistema *in vitro* que simule melhor a hidrólise das macromoléculas *in vivo* (COLLONA et al., 1992).

O conteúdo do caecum dos ratos, submetido à mesma hidrólise *in vitro* descrita no item 3.3.4., mostrou que o amido presente no caecum era constituído por duas frações: uma que, resistente à hidrólise por α -amilase/16 horas/37°C, recebeu o nome de AR e outra que, hidrolisada, recebeu o nome de ALD (Amido Lentamente Digerível) (Figura 22). Estes resultados foram encontrados também em

Figura 19: Curva ponderal dos Grupos 1, 2 e 3: demonstra que durante o período de estudo todas as dietas apresentaram desempenho semelhante.

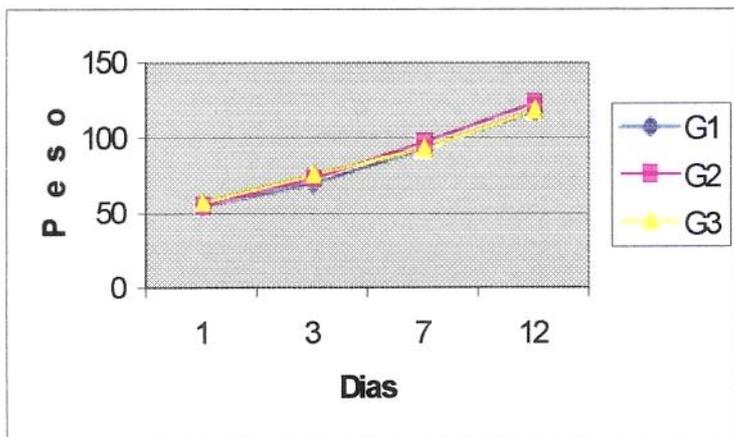


Tabela 8: Ingesta (g)

Período ensaio	G1	G2	G3
1º ao 3º dia	29,66 (F)	29,96 (EF)	35,46 (E)
4º ao 7º dia	50,66 (D)	51,85 (D)	57,60 (C)
8º ao 12º dia	77,12 (AB)	79,23 (A)	72,10 (B)

Análise de variância (teste de tukey): Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes.

Figura 20: Peso corporal e a respectiva ingesta

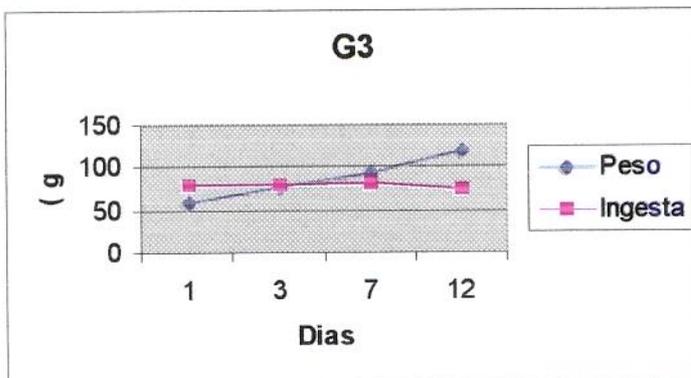
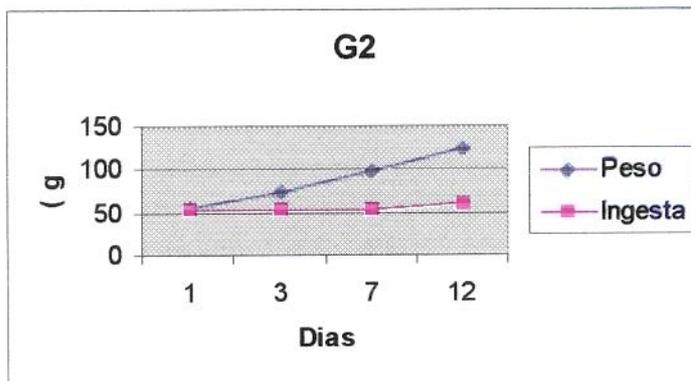
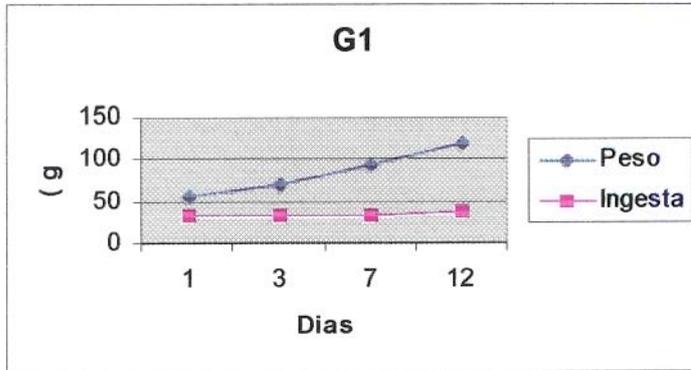


Figura 21: Comparação entre o AR determinado *in vitro* e o AR determinado *in vivo* proveniente do conteúdo do caecum de ratos: as diferenças encontradas são significativas ($p < 0,05$) para G2 e G3.

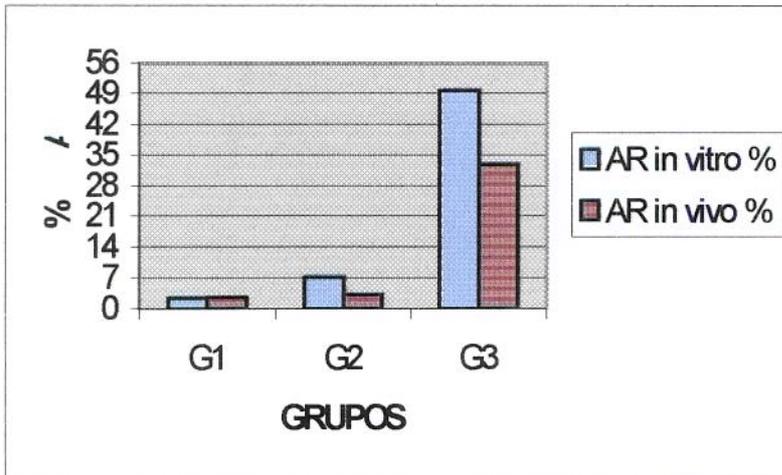
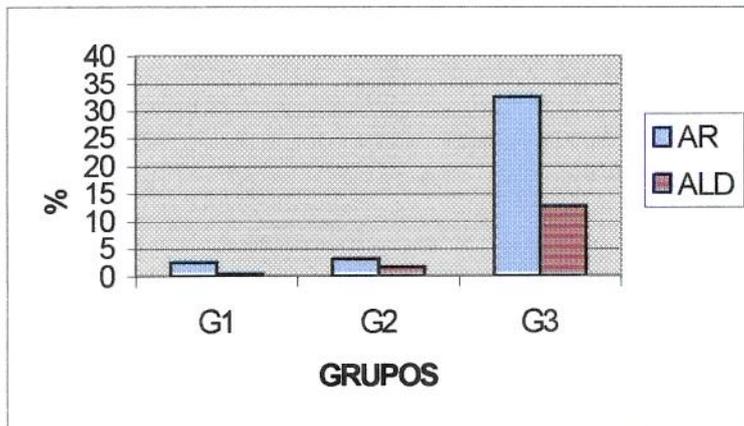


Figura 22: Porcentagem de AR e de ALD presentes no caecum. Não ocorre diferença significativa entre G1, G2; G3 difere significativamente de G1 e G2.



AR = amido resistente à hidrólise por α -amilase pancreática, por 16 horas a 37°C.

ALD= amido lentamente digerível: amido hidrolisado pela α -amilase pancreática, por 16 horas a 37°C.

humanos, segundo EERLINGER & DELCOUR (1995). Para estes autores a fração resistente apresentava DP 35 e no presente trabalho o valor da fração resistente foi DP34, valor este obtido através da cromatografia de permeação em gel.

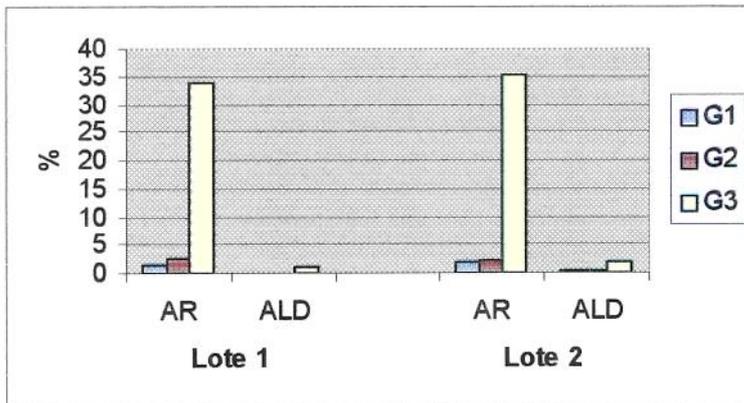
A Figura 23 apresenta os lotes de AR e de ALD das fezes, entre o primeiro e o nono dia e entre o décimo e décimo quarto dia. A análise de variância dos valores de AR e ALD mostrou que a quantidade de AR e ALD não diferiram significativamente ($p < 0,05$) no primeiro e no segundo período de experimento. Este resultado demonstra que não ocorreu adaptação fisiológica durante o tempo de ensaio.

A ANOVA para os valores de AR e ALD encontrados no caecae dos ratos foi feita para verificar as diferenças entre as dietas. A análise de variância mostrou que o grupo 3, amido de banana, foi o único significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os grupos estudados em relação à quantidade de AR e de ALD presentes no caecum. A fração ALD foi praticamente uma fração de amido de banana.

Para verificar, por outro lado, qual o destino que o AR e ALD teriam após deixar o caecum, foram comparados os amidos do caecum e das fezes excretadas. Foi verificado que todos os AR não foram transformados ao nível colônico. Estes resultados demonstram que, fosse com 3,15% de AR presentes no caecum do grupo G1 e com 2,8% de AR presentes no caecum do grupo G2, fosse com 33,18% de AR de banana do caecum do grupo 3, a fermentação a seguir, colônica, não atingiu valores significativos. Esta fermentação foi intensiva para o ALD (amido lentamente digerível) de banana porque 13,19% de ALD estavam no caecum e apenas 2,32% estavam nas fezes excretadas (Figura 24).

Com relação a quantidade de fezes excretadas, a Figura 25 demonstra que o Grupo G3 excretou desde o início o triplo de fezes em relação aos outros dois grupos. A ingesta do G3 foi apenas inicialmente maior que a de G1 ($p < 0,05$), porém a excreção manteve-se sempre muito acima em relação tanto à G1 quanto G2. GEE et al. (1992) e CUMMINGS et al. (1996) demonstraram também que a presença de AR aumentava em muito o peso fecal. Para GEE et al. (1992) o tempo de ensaio teria induzido maior eficiência nos processos de fermentação e redução na quantidade de fezes. Neste trabalho se verá que a fermentação pode ter aumentado (Figura 26) mas não houve redução de massa fecal.

Figura 23: AR e ALD presentes nas fezes excretadas pelos ratos. A separação entre 1º ao 9º e 10º ao 14º dias foi efetuada para verificar ocorrência da adaptação fisiológica, a qual não ocorreu.



AR = amido resistente à hidrólise por α -amilase pancreática, por 16 horas a 37°C.

ALD= amido hidrolisado pela α -amilase pancreática, por 16 horas a 37°C.

Lote 1 = Fezes coletadas do 1º ao 7º dia.

Lote 2 = Fezes coletadas do 8º ao 12º dia.

Figura 24: Porcentagem de AR e ALD nas fezes colhidas no caecum e também nas excretadas pelo reto.

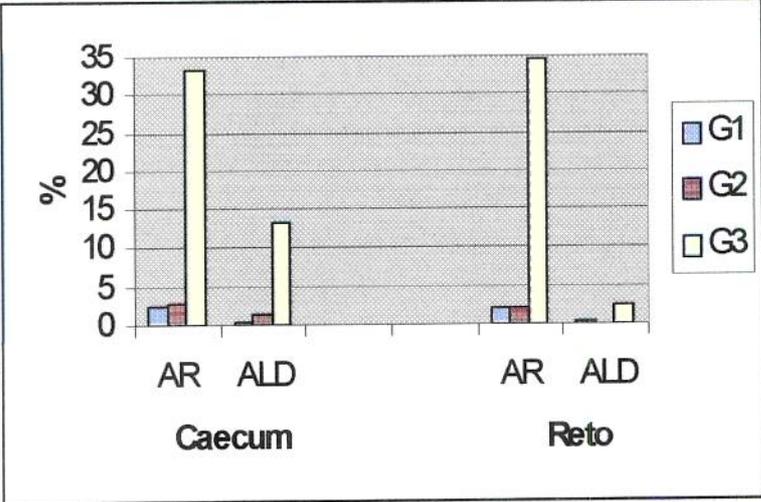
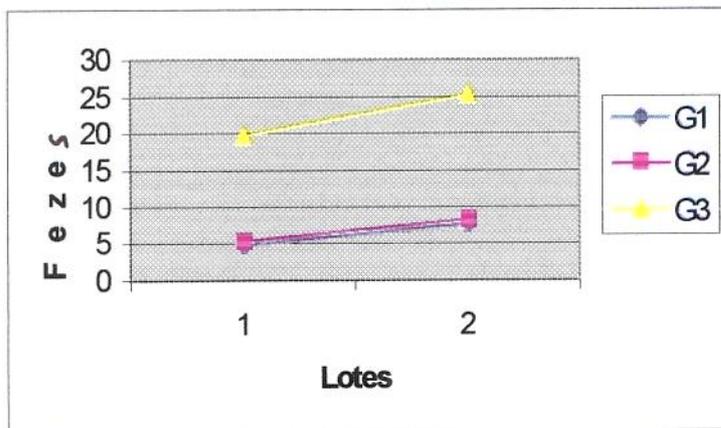


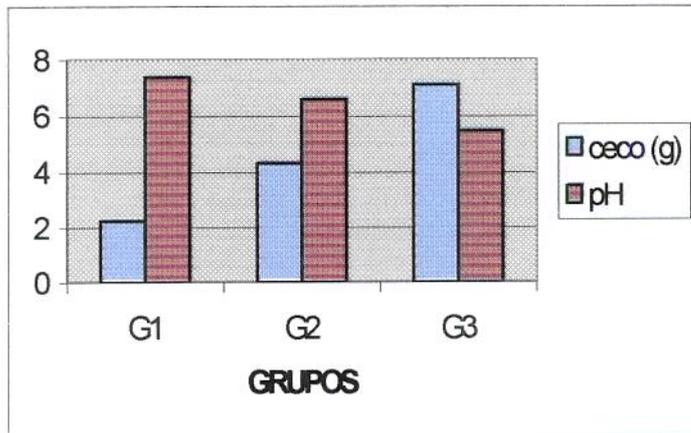
Figura 25: Massa (g) de fezes excretada: G3 excretou cerca de 4X acima de G1 e G2.



Lote 1 = Fezes coletadas do 1º ao 7º dia.

Lote 2 = Fezes coletadas do 8º ao 12º dia.

Figura 26: Peso (g) médio do caecum e o pH dos grupos 1, 2 e 3: demonstra-se que a fermentação evidenciada pela queda do pH provoca aumento considerável do volume do caecum



Conforme se demonstra na Figura 26 cresce entre os grupos o peso do caecum e cai respectivamente o pH do conteúdo. De fato, foi visto que a dilatação do caecum foi grande no G2 e muito grande no G3. A Figura 26 corrobora com esta informação anatômica porque a fermentação cresceu com a presença de AR conforme indica a diminuição do pH.

É interessante observar que a fermentação avaliada pela quantidade de AR ainda presente no caecum e no reto não seria significativa (Figura 22 e 26), mas é inegável que ocorria pelos dados acima: vigorosa expansão do caecum e diminuição expressiva do pH do caecum.

2.4.2. Resultados Histológicos

As dietas eram potencialmente equilibradas, mas sendo distintas permitiram que os animais demonstrassem diferenças fisiológicas (Figuras 27 e 28) relacionadas à ingesta, excreção; fermentação luminal à nível de caecum e cólon.

Do ponto de vista do tecido do trato digestivo e do fígado não ocorreram diferenças histológicas. O fato notável entretanto, ocorreu a nível luminal: a população bacteriana proliferou acentuadamente na presença da dieta G2 e G3 (Figuras 29 e 30).

Figura 27: Íleo de rato do Grupo 2. Todos os 3 grupos apresentaram íleos com vilosidades bem estruturadas (420X)

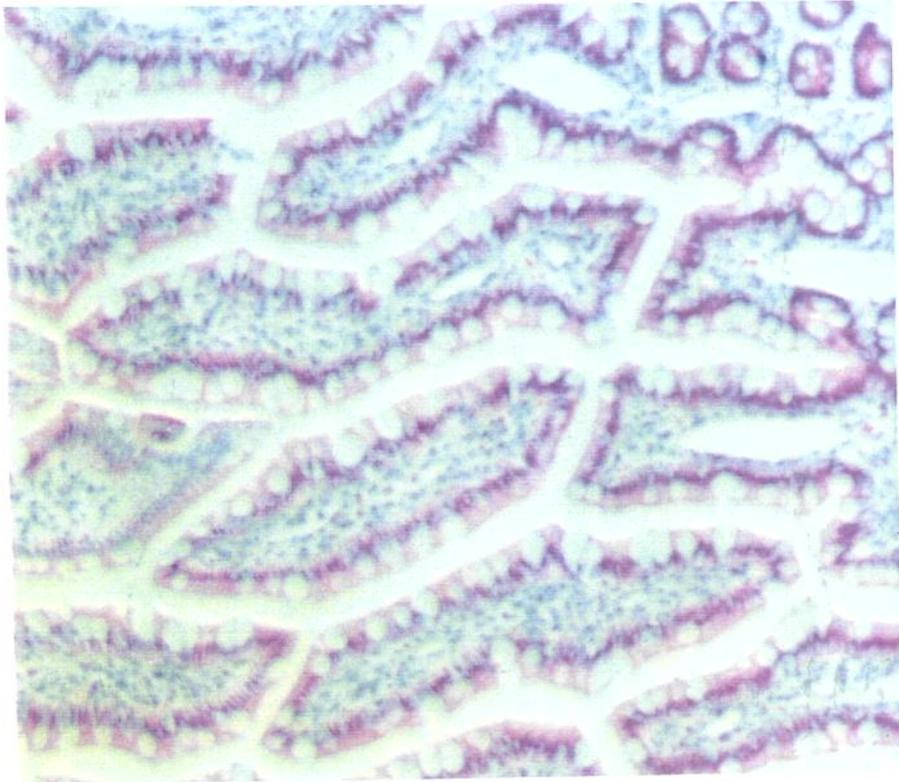


Figura 28. Caecum normal de rato do grupo 3. A acentuada dilatação não induziu alterações durante os 12 dias de ensaio (420X).

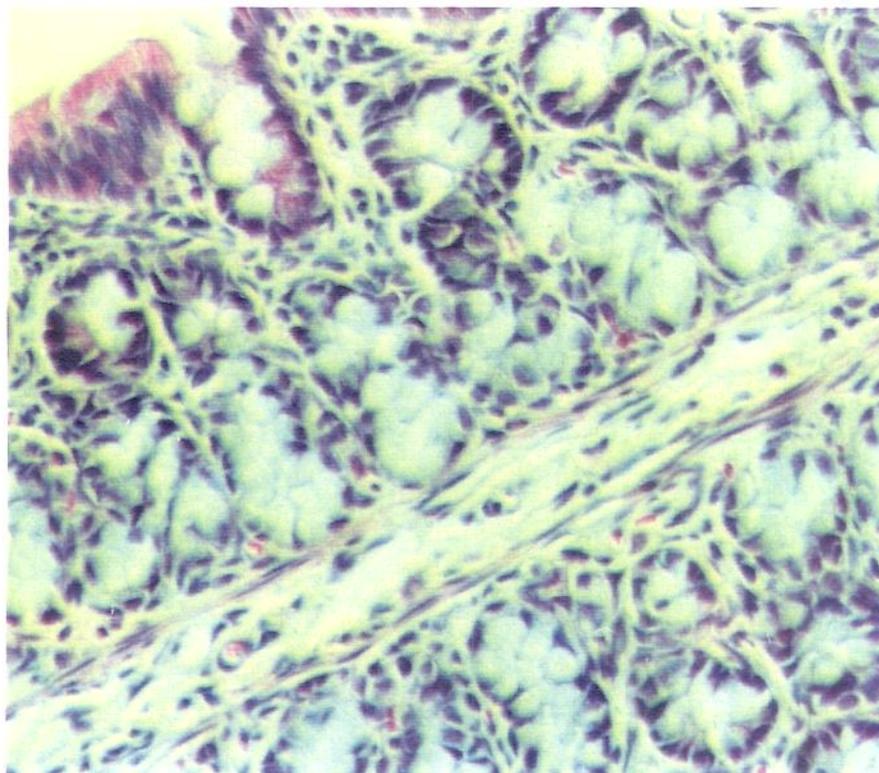


Figura 29: Vilosidades do íleo de rato dos Grupos 2 e 3. As setas apontam as massas de microorganismos que rodeiam os enterócitos (E) e células caliciformes (C) íntegros (420X).

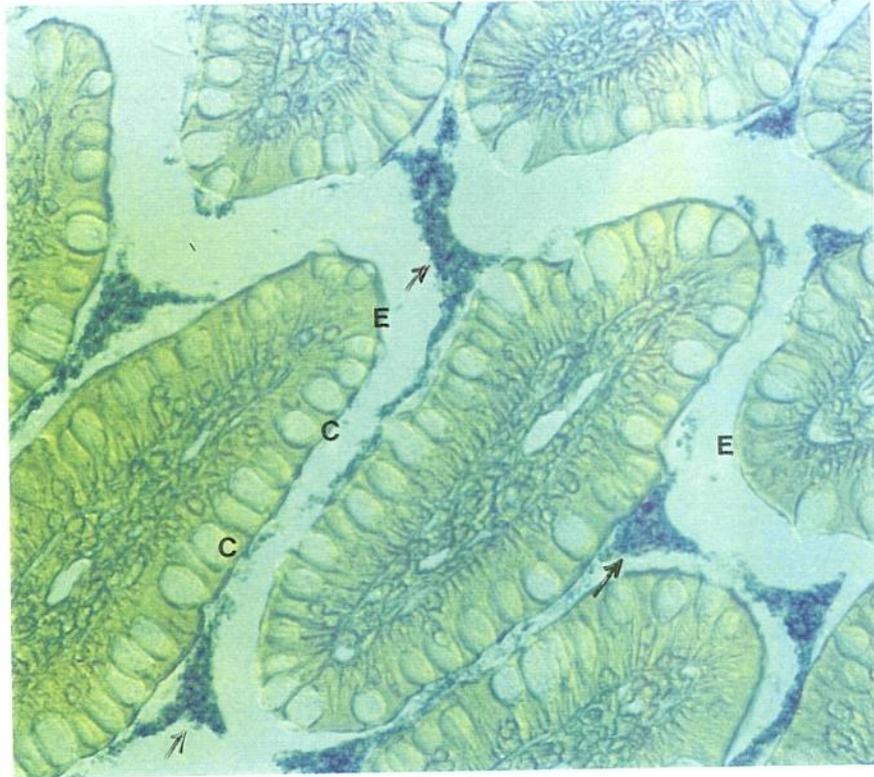
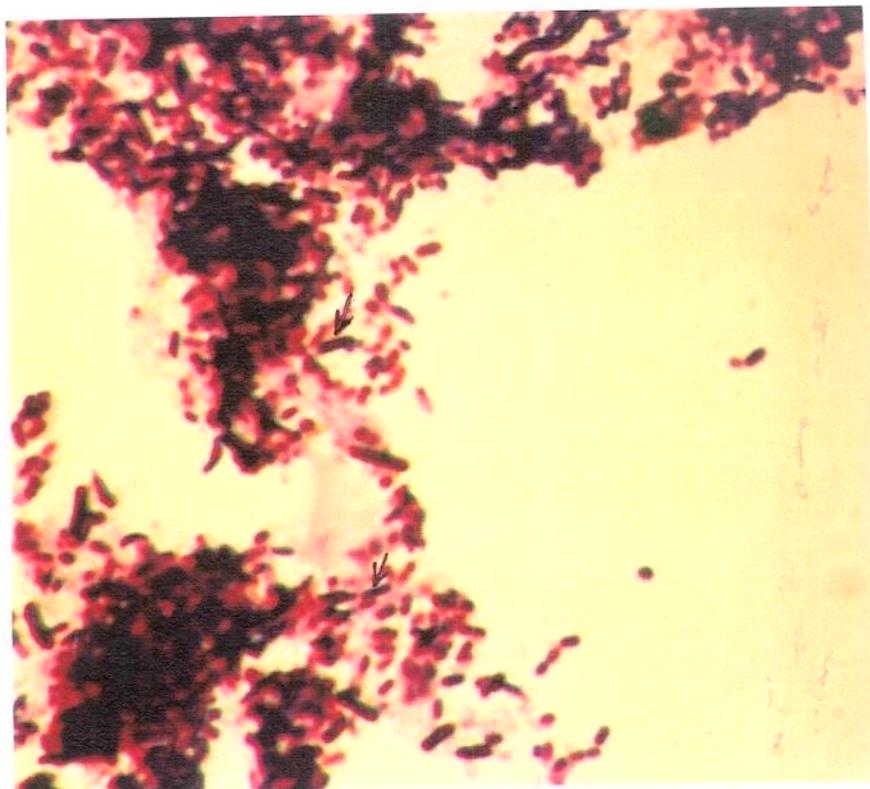


Figura 30: Detalhe da massa de microorganismos sob tratamento Gram. Predominaram as células Gram positivas. As setas indicam prováveis lactobacilos (1680X).



V. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos neste trabalho concluiu-se que:

Composição Centesimal

- A grande diferença nos teores de AR entre os amidos de milho e de banana estudados parece não estar relacionada com a composição química do grânulo. É possível que a diferença no teor de AR entre esses amidos seja decorrente de diferenças nas estruturas das regiões não susceptíveis ao ataque enzimático ou da existência de modificações químicas nas cadeias dos componentes do amido de banana, formando barreiras à hidrólises. Também a existência de associações do tipo proteína-amido, diminuindo a digestibilidade do AR pode ser uma das causas do alto teor de AR em amido de banana.

Efeito do Tratamento Hidrotérmico na Formação do Amido Resistente

- O tratamento hidrotérmico do amido milho quase triplicou o teor de AR obtido. A adição de água e a posterior autoclavagem, que induz a fragmentação e produção de cadeias de comprimento favorável à formação do AR, juntamente com o armazenamento adequado (58,24 h à 35°C) dos géis, provocou um aumento do teor de AR devido à indução da retrogradação das moléculas do amido. A umidade, única variável significativa, dentro da faixa de variação estudada, na formação do AR é necessária para conferir plasticidade ao meio e ser incorporada nas estruturas cristalinas. A não significância do tempo de armazenamento, poderia ser resultado da rápida retrogradação da amilose que durante as primeiras 4 horas, menor tempo de armazenamento usado no experimento, teria sido extensiva.

Propriedades de Pasta

- Os resultados obtidos no RVA indicam que a estrutura cristalina que mantém o grânulo do amido de banana coeso, por si só, não explicam o alto teor de AR encontrado. A retrogradação do amido de milho gelatinizado (AR de milho), por outro lado, torna o amido menos susceptível ao inchamento durante o aquecimento, indicando a formação de estruturas cristalinas mais coesas.

Análises Microscópicas

- Através de análises microscópicas, foi observado que o amido de milho normal possui as formas poliédricas e variabilidade de diâmetros, o AR de milho é constituído por fragmentos porosos evidenciando vitrificação. Os grânulos dos amidos de banana demonstraram poliformismo, superfícies lisas dos grânulos e tamanho entre 10 a 50 μm .

Raio-X

- Os resultados obtidos no estudo das propriedades de pasta com o RVA são coerentes e indicam maior coesividade para o amido de milho normal (padrão A) em relação ao amido de banana (padrão B). Desta forma, a maior resistência do amido de banana seria ocasionada por outros fatores que impedem o ataque enzimático e não devido apenas à coesividade da estrutura cristalina.

Cromatografia

- Os resultados da análise sequencial das hidrólises com pululanase e/ou β -amilase mostram que nos amidos com alto teor de AR (amido de banana e AR de milho) existe uma fração linear com DP 34 resistente à β -amilólise. Essa resistência poderia ser decorrente de alterações químicas ao longo da molécula e/ou de interações entre cadeias que impediriam a ação da enzima e são, provavelmente, provenientes da amilose. Em amido de milho normal essa fração não foi observada de forma conclusiva.

Ensaio Biológicos

- Após a abertura da parede abdominal verificou-se que a aparência do trato digestivo era distinta entre os 3 grupos de ensaio, sobretudo quanto ao caecum. O grupo 1, controle, demonstrava, pela coloração cinza do íleo e do caecum, que o conteúdo luminal havia sido transformado durante o trajeto pelo intestino delgado. O grupo 2, AR de milho, apresentou uma situação intermediária acrescido de intensa dilatação do caecum. O grupo 3, amido de banana, demonstrou no íleo e caecum um conteúdo luminal menos digerido e de cor esbranquiçada análogo ao encontrado no duodeno; neste grupo a dilatação do caecum era ainda maior do que no grupo 2 e até mesmo expandia a parede abdominal.
- Observou-se a relativa eficiência da hidrólise *in vivo* em relação à *in vitro*. Nos grupos G2 e G3 a superioridade de hidrólise *in vivo* foi cerca de 50% em relação à hidrólise *in vitro*.
- O conteúdo do caecum dos ratos, submetido à hidrólise *in vitro* mostrou que o amido presente no caecum era constituído por duas frações: uma que resiste à hidrólise por α -amilase/16 horas/37°C e recebe o nome de AR e outra que é hidrolisada, recebendo o nome de ALD (Amido Lentamente Digerível). Observou-se que a fração ALD estava presente praticamente apenas na fração de amido de banana. O amido normal de milho e o amido resistente de milho já tinham demonstrado alta resistência *in vivo* e *in vitro*, como pode ser observado pelas suas propriedades de pasta, e demonstraram também quase ausência da fração ALD.
- A análise dos lotes de AR e de ALD das fezes, entre o primeiro e o nono dia e entre o décimo e décimo quarto dia mostrou que a quantidade de AR e ALD não diferiram demonstrando que não ocorreu adaptação fisiológica durante o tempo de ensaio.
- Com relação a quantidade de fezes excretadas, o Grupo G3 excretou desde o início o triplo de fezes em relação aos outros dois grupos.
- Observou-se que o peso do caecum foi inversamente proporcional ao pH em todos os grupos estudados.

- A fermentação colônica não foi significativa quando se verificou o destino que o AR e ALD tiveram após deixar o caecum. Foi inegável que a fermentação ocorreu sobretudo no caecum devido à vigorosa expansão demonstrada e à diminuição expressiva do pH do conteúdo luminal do mesmo. Do ponto de vista do tecido do trato digestivo e do fígado não ocorreram diferenças histológicas entre os grupos. Todos os 3 grupos apresentaram íleos com vilosidades bem estruturadas e ceco e cólon com epitélio íntegro. A nível luminal de íleo e caecum a população bacteriana proliferou acentuadamente na presença da dieta G2 e G3, com predominância das células Gram positivas e prováveis lactobacilos

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AACC- American Association of Cereal Chemists. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 7^a ed. St. Paul, Minnesota, V. 1 e 2, 1976.
- ANDERSSON, H. The ileostomy model for the study of carbohydrate digestion and carbohydrate effects on sterol excretion in man. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p. 69-76, fev., 1992.
- ANNISON, G.; TOPPING, D. L. Nutricional role of resistant starch: chemical structure vs physiological function. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.14, p.297-320, 1994.
- ASP, N. -G; TOVAR, J.; BAIROLIUA. Determination of resistant starch *in vitro* with different methods and *in vivo* with a rat model. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.117-119, fev., 1992.
- BERRY, C. S. Resistant-starch: formation and measurement of starch that survives exhaustive with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. **Journal of Cereal Science**, London, v. 4, p.301-314, abr.,1986.
- BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food constituents. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v.69, p.60-78, 1991.
- BJÖRCK, I.; NYMAN, M.; PEDERSEN, B.; SILJESTRÖM, M.; ASP, N.-G. AND EGGREM, B. O. On the digestibility of starch in wheat bread - studies *in vitro* e *in vivo*. **Journal of. Cereal Science**, London, v.4, p.1-11, 1986.

- BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.
- CHAMP, M. Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.51-62, fev. 1992.
- CHIANG, B. H.; CHU, W. C.; CHU, C. L. A pilot scale study for banana starch. **STARCH/STÄRKE**, Stuttgart, v.39, n.1, p.5-8, jan., 1987.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Cromatografia por exclusão. In: **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 6ª Edição. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. Capítulo 4.
- COLONNA, P.; LELOUP, V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hidrolisis. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.17-32, 1992.
- CUMMINGS, J. H.; BEATTY, E. R.; KINGMAN, S. M.; BINGHAM, S.A.; ENGLYST, H. N. Digestion and physiological properties of resistant starch in human large bowel. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.75, n.5, p.733-747, 1996.
- CZUCHAJOWSKA, Z., SIEVERT, D. AND POMERANZ, Y. Enzyme-resistant starch IV. Effects of complexing lipids. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v.68, p.537, 1991.
- DECKERE, E. A. M.; KLOOTS, W. J.; VAN AMELSVOORT, J. M. M. Effects of a diet with resistant starch in the rat. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.121-122, 1992.

- DUBOIS, M.; GILLES, K. A ; HAMILTON, J. R.; ROBERS, P. A & SMITH, F.
Calorimetric method for determination of sugar and related substances.
Analytical Chemistry, Washington, v.28, p.350-354, 1956.
- EERLINGEN, R.C., CROMBEZ, M. AND DELCOUR, J. A. Enzyme-resistant starch
I. Quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of
autoclaved starch on resistant starch formation. **Cereal Chemistry**, St. Paul,
v.70, n.3, p.339-344, 1993.
- EERLINGEN, R. C., M.; DELCOUR, J. A. Enzyme-resistant starch II. Influence of
amilose chain lenth on resistant-starch formation. **Cereal Chemistry**, St. Paul,
v.70, n.3, p.345-350, 1993.
- EERLINGEN, R. C.; DELCOUR. Formation, analysis, structure and properties of
type III enzyme resistant starch. **Journaul of Cereal Science**, London, v. 22,
p.129-138, 1995.
- EERLINGEN, R. C.; JACOBS, H.; DELCOUR, J. A. Enzyme-resistant starch V.
Effect of retrogradation of waxy Maize starch on enzyme susceptibility. **Cereal
Chemistry**, St. Paul, v.71, n.4, p.351-355, 1994.
- ELIASSON, A. C. Retrogradation of starch as measured by differential scanning.
In: HILL, R. D.; MUNCK, C. **New Approaches to Research on Cereal
Carbohydrates**: 1985.
- ENGLYST, H. N; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and
measurement of nutricionally important starch fractions. **European Journal of
Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.33-50, 1992.

- ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; HUDSON, G. J.; CUMMINGS, J. H. Measurement of resistant starch *in vitro* and *in vivo*. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.75, n.5, p.749-755, 1996.
- ENGLYST, H.N. AND MACFARLANE, G.T. Breakdown of resistant and readily digestible starch by human gut bacteria. **Journal Science Food Agriculture**, v.37, p.699-706, 1986.
- FAISANT, N.; CHAMP, M.; COLONNA, P. BULEON, A.; MOLIS, C.; LANGKILDE, N-M.; SCHWEIZER, T.; FLOURIE, B.; GALMICHE, J-P. Structural features of resistant starch at the end of the human small intestine. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.47, p. 285-296, 1993. *Apud* : **Journaul of Cereal Science**, London, v. 22, p.129-138, 1995.
- FAISANT, N.; PLANCHOT, V.; KOZLOWSKI, F.; PACOURET, M. P.; COLONNA, P.; CHAMP, M. Resistant starch determination adapted to products containing high level of resistant starch. **Sciences des Aliments: Journal International of de Science et de Technologie des Aliments**, Paris, v.15, n.1, p.83-89, 1995.
- FAULKS, R. M.; ROE, M. A.; LIVESEY, G. Sites of digestion and absorption of α -amilase-resistant starches in the rat. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.123-124, fev.,1992.
- FRANCO, C. M. L. **Contribuição ao estudo da estrutura do grânulo de amido de milho**. Campinas, 1993. 137p.Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FUJIMOTO, S.; SAISHOJI, K.; NAGAHAMA, T., & KANIE, M. Studies on banana starch 1. Isolation of starch from green bananas. **Chemical Abstracts**, v.91, p.15671w, 1977.

- GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BULÉON, A. & PÉREZ, S. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.3-16, 1992.
- GALLANT, D. J.; BOUCHET, B. AND BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.32, p.177-191, 1997.
- GEE, J. M.; JOHNSON, J. T.; LUND, E. K. Physiological properties of resistant starch. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.125, fev., 1992.
- GIDLEY, M. J.; COOKE, D.; DARKE, A. H.; HOFFMANN, R. A., RUSSEL, A. L.; GREENWELL, P. Molecular order and structure in enzyme-resistant retrograded starch. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.28, n.1, p.23-31, jan., 1995.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fibre analysis. **Agri-handbook** : Agriculture Research Service, U.S. Dept. Agriculture, p.375, 1970.
- GREENWOOD, C. T. & THOMSON, J. Physicochemical studies on starches, Part 24. The fragmentation and characterization of starches of various plant origins. **Journal Chemical Soc.**, p.222, 1962.
- GRUCHALA, L.; POMERANZ, Y. Enzyme-resistant starch: studies using differential scanning calorimetry. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v.70, n.2, p.163-170, fev., 1993.
- KAYISU, K.; HOOD, L. F. Molecular structure of banana starch. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, n.6, p.1894-1897, jun., 1981.

- LEELAVATHI, K. & INDRANI, D. Amylograph pasting behaviour of cereal and tuber starches. **Starch/Stärke**, Weinheim, v.39, n.11, p.378-381, 1987. *Apud: Contribuição ao estudo da estrutura do grânulo de amido de milho*. Campinas, 1993. 137p.Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- LELOUP, V. M., COLONNA, P.; RING, S. G. Physico-chemical aspects of resistant starch. **Journal of Cereal Science**, London, v.16, n.3, p.253-266, mar., 1992.
- LII, C-Y; CHANG, S-M; YOUNG, Y-L. Investigation of the physical and chemical properties of banana starches. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n.5, p.1493-1497, mai., 1982.
- MITCHELL, G.A. Methods of starch analysis. **Starch/Stärke**, Weinheim, v.42, n.2, p.131-134, fev., 1990. *Apud: Contribuição ao estudo da estrutura do grânulo de amido de milho*. Campinas, 1993. 137p.Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP (Série Manuais), 1995.
- PATIL, D., L. & MAGAR, N. G. Physicochemical properties of banana fruit starch and starch components. **J. Indian Chem. Soc.**, v.51, p. 1004, 1974.
- PEZOA-GARCÍA, N. H. **Estudo sobre utilização de hidrociclones para a separação de partículas no processamento de concentrado e isolado proteico de soja**. Campinas, 1985. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

- POMERANZ, Y. Research and development regarding enzyme-resistant starch (RS) in the USA: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.63-68, fev., 1992.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H. AND FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Urbana, v.123, p.1939-1951, 1993.
- ROBIN, J. P.; MERCIER, C.; CHARBONNIERE, R. & GUILBOAT, A. Lintnerized starches gel. Filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v.51, n.3, p.189-406, mar, 1974. *Apud* : **Contribuição ao estudo da estrutura do grânulo de amido de milho**. Campinas, 1993. 137p.Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RUMESSEN, J. J. Hydrogen and methane breath tests for evaluation of resistant carbohydrates. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.77-90, fev., 1992.
- RUSSEL, P.L.; BERRY, C.S. AND GREENWELL, P. Characterization of resistant starch from wheat and maize. **Journal of Cereal Science**, London, v.9, n.1, 1989.
- SCHOCH, T. J. & MAYWALD, E. C. Microscopic examination of modified starches. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, n.3, p.382-387, 1968. *Apud* : **Contribuição ao estudo da estrutura do grânulo de amido de milho**. Campinas, 1993. 137p.Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- SIEVERT, D. CZUCHAJOUSKA, Z. AND POMERANZ, Y. Enzyme-resistant starch III. X-ray diffraction of autoclaved amylo maize VI starch and enzyme-resistance starch residues. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v.68, p.86, 1991.
- SIEVERT, D. AND POMERANZ, Y. Enzyme-resistant starch I. Characterization and evaluation by enzymatic, thermoanalytical and microscopic methods. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v.66, p.342, 1989.
- SIEVERT, D. AND POMERANZ, Y. Enzyme-resistant starch II. Differential scanning calorimetry studies on heat treated starches and enzyme-resistant starch residues. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v.67, p.217, 1990.
- SIEVERT, C. AND WÜRCH, P. Thermal behavior of potato amylose and enzyme-resistant starch. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v.70, p.333-338, 1993 *Apud: Journal of Cereal Science*, London, v. 22, p.129-138, 1995.
- SILJESTRÖM, M., AND ASP, N. G. Z. **Lebensmittelunters u. Forsch**, v.181, p. 4-8, 1985 *apud: Journal of Cereal Science*, London, v. 4, p.301-314, abr.,1986.
- SILJESTRÖM, M.; BJÖRCK, I.; ELIASSON, A. C.; LÖNNER, C.; NYMAN, M.; ASP, N. G. Effects on polysaccharides during baking and storage of bread - *In Vitro* and *in Vivo* studies. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v. 65, n.1, jan, 1988.
- SILJESTRÖM, M.; ELIASSON, A.C. AND BJÖRCK, I. Characterization of resistant-starch from autoclaved wheat starch. **Starch/Starke**, Weinheim, v.41, n.4, p.147-151, abr., 1989.
- SOMOGY, M. A. New reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**; v.160, n.1, p.601-68, 1945.

- SWINKELS, J. J. M. Composition and properties of commercial native starches. **Starch/Stärke**, Weinheim, v.37, n.1, p.1-5, 1985. *Apud* : **Contribuição ao estudo da estrutura do grânulo de amido de milho**. Campinas, 1993. 137p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- TOVAR, J., BJORCK, I. & ASP, N.-G. Digestibility of starch in legumes using the rat **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.141-142, fev., 1992.
- TRUSWELL, A.S. Glycaemic index of food. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.46, n.2, p.92-102, fev., 1992.
- VAN SOEST, J. J. G.; WIT, D.; TOURNOIS WAGENINGEN, H. ; VLIEGENTHART, J. F. G. Retrogradation of potato starch as studied by fourier transform infrared spectroscopy. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 46, n.12, p.453-457, dez., 1994.
- WILLIAMS, P. C.; KUZINA, F. D.; HLYNKA, J. A Rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flours. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v.47, n.4, p.411-420, abr., 1970.
- ZOBEL, H. F. Gelatinization of starch and mechanical properties of starch pastes. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. **Starch: Chemistry and Technology**. London, Academic Press, 1984.