

" ESTUDOS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA
ALFA-AMILASE EM FARINHA DE TRIGO ATRAVÉS
DE MÉTODO VISCOSIMÉTRICO "

35189

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

" ESTUDOS SOBRE A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA
ALFA-AMILASE EM FARINHA DE TRIGO ATRAVÉS
DE MÉTODO VISCOSIMÉTRICO "

Parcer
Este exemplar corresponde
à redação final da Tese
defendida por Rosamaria
da Ré e aprovada pela
comissão julgadora em
06/06/89.
Campinas, 20 de Junho de
1989.

ROSAMARIA DA RÉ
Engenheira Química

Prof. DR. CÉSAR FRANCISCO CIACCO
Orientador

Cesar F. Ciacco
Presidente da Banca

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

CAMPINAS

1989

in memoriam.

Profa. Norma Mancilla Diaz

À minha família

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. César Francisco Ciacco, pela orientação e amizade,
à Profa. Celina Rachel de Oliveira Camargo, pelo seu apoio,
amizade e colaboração no desenvolvimento do trabalho,
ao Prof. José Carlos Carvalho, pela amizade e auxílio na
análise estatística,
à Profa. Cecília Figueiredo Toledo, pela ajuda e amizade,
ao pessoal do Laboratório de Cereais, pelo apoio e amizade
durante todo o trabalho,
à UNICAMP, pelo suporte financeiro da pesquisa,
à CIENTEC, pela oportunidade que me concedeu de obter esta
formação,
à UCS e à CAPES, pela bolsa de estudo concedida,
à ABIA, pelas cópias desta tese,
aos amigos, professores e funcionários da FEA pelo carinho
e amizade,
e a todos os amigos, cuja presença foi fundamental para
realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

	PÁGINA
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
1. Amilases	04
1.1. Caracterização das alfa e beta-amilases	04
1.2. Mecanismo de ação das alfa e beta-amilases ...	06
1.2.1. Alfa-amilase	06
1.2.2. Beta-amilase	10
1.3. Alfa e beta-amilases em cereais	12
1.4. Fontes de alfa e beta-amilases	14
1.5. Influência do pH e temperatura na atividade das alfa e beta-amilases	15
2. Amilases em Panificação	18
2.1. Ação na mistura	19
2.2. Ação na fermentação	20

2.3. Ação no cozimento	22
2.4. Ação na conservação do pão	25
2.5. Suplementação de alfa-amilase	25
3. Métodos de Determinação da Atividade da Alfa- Amilase	27
3.1. Métodos de determinação do poder redutor	28
3.2. Métodos dextrinogênicos	29
3.3. Método nefelométrico	31
3.4. Método fluorimétrico	32
3.5. Métodos colorimétricos a partir de substratos cromogênicos	33
3.6. Métodos viscosimétricos	34
III. MATERIAL E MÉTODOS	43
1. Material	43
1.1. Matéria-prima	43
1.2. Reagentes	43
1.3. Equipamentos	44
2. Métodos Analíticos	44
2.1. Composição centesimal	44
2.2. Determinação das propriedades amilográficas da farinha de trigo	45

2.3. Determinação da atividade diastática da farinha de trigo	46
2.4. Determinação do "falling-number" da farinha de trigo	46
2.5. Determinação da atividade da alfa-amilase do malte	46
3. Métodos Experimentais	47
3.1. Preparação da amostra	47
3.2. Determinação da atividade da alfa-amilase no equipamento-teste	49
3.2.1. O equipamento-teste	49
3.2.2. Metodologia experimental	52
3.2.3. Análise estatística	53
3.2.3.1. Determinação da atividade da alfa-amilase	53
3.2.3.2. Determinação das condições ideais de operação	57
3.2.3.3. Avaliação do desempenho do equipamento-teste	59
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
1. Caracterização da Matéria-Prima	60
1.1. Composição centesimal da farinha de trigo padrão	60

1.2. Propriedades amilográficas da farinha de trigo padrão	60
1.3. Atividade da alfa-amilase da farinha de trigo padrão	63
1.4. Atividade da alfa-amilase do malte	63
2. Determinação da Atividade da Alfa-Amilase no Equipamento-teste	64
2.1. Determinação das faixas de variação dos parâmetros de operação do equipamento-teste.....	64
2.2. Determinação da relação entre a atividade da alfa-amilase e o volume de suspensão coletado ...	67
2.3. Determinação da concentração da suspensão e do tempo de escoamento no equipamento-teste	70
2.4. Determinação das relações entre o equipamento- teste e os métodos amilográfico e de "falling number"	74
2.5. Determinação das faixas de atividade da alfa- amilase em farinhas pelo equipamento-teste.....	82
V. CONCLUSÕES	87
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
VII. ANEXOS	99

ÍNDICE DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 1: Faixas de pH e temperatura característicos de diversos tipos de amilases	17
Tabela 2: Perfil de temperatura da suspensão de farinha em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio	48
Tabela 3: Parâmetros independentes e seus níveis de variação	56
Tabela 4: Delineamento estatístico genérico para três variáveis, com cinco níveis de variação	58
Tabela 5: Composição centesimal da farinha de trigo padrão utilizada	61
Tabela 6: Propriedades amilográficas da farinha de trigo padrão utilizada	62
Tabela 7: Valores mínimo e máximo das variáveis do equipamento-teste	65

Tabela 8: Matriz experimental utilizada pelo método estatístico adotado e resultados obtidos	68
Tabela 9: Variação dos valores de viscosidade máxima (U.A.), "falling number" (s) e volume coletado no equipamento-teste (ml) em função da concentração de malte (%) adicionada à farinha de trigo padrão	75
Tabela 10: Relações obtidas com a farinha de trigo padrão com adições de malte	77
Tabela 11: Valores de viscosidade máxima (U.A.), "falling number" (s) e volume coletado no equipamento teste (ml) para farinhas de trigo comerciais ...	79
Tabela 12: Relações obtidas com as farinhas comerciais	81
Tabela 13: Faixas ótimas de volume coletado no equipamento teste com base nos valores recomendados de viscosidade máxima	84
Tabela 14: Faixas ótimas de volume coletado no equipamento teste com base nos valores recomendados de "falling number"	85

Tabela 15: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o volume coletado (ml) versus a concentração de malte (%) na farinha de trigo padrão e o tempo de escoamento (s) da suspensão no equipamento-teste.	
Amostras preparadas no Viscoamilógrafo	101
Tabela 16: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona a viscosidade máxima (U.A.) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para a farinha de trigo padrão com adições de malte.	
Amostras preparadas no Viscoamilógrafo	103
Tabela 17: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o "falling number" (s) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para a farinha de trigo padrão com adições de malte.	
Amostras preparadas no Viscoamilógrafo	106
Tabela 18: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona a viscosidade máxima (U.A.) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais.	
Amostras preparadas no Viscoamilógrafo	109

Tabela 19: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o "falling number" (s) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais.
 Amostras preparadas no Viscoamilógrafo 112

Tabela 20: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona a viscosidade máxima (U.A.) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais.
 Amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio 114

Tabela 21: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o "falling number" (s) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais.
 Amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio 117

Tabela 22: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas comerciais com amostras preparadas no Viscoamílografo versus o volume coletado (ml) para amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio ... 119

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Mecanismo de ação da alfa-amilase	09
Figura 2: Mecanismo de ação da beta-amilase	11
Figura 3: Esquema do dispositivo de preparação de amostras em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio	50
Figura 4: Esquema do equipamento-teste para determinação da atividade da alfa-amilase em farinha de trigo..	51
Figura 5: Curvas de concentração de malte (%) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) em função de diferentes tempos de escoamento (s)	72
Figura 6: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 6 para a relação viscosidade máxima (U.A.) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para a farinha de trigo padrão com adições de malte. Amostras preparadas no Viscoamilógrafo	104

Figura 7: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 7 para a relação "falling number" (s) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para a farinha de trigo padrão com adições de malte.	
Amostras preparadas no Viscoamilógrafo	107
Figura 8: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 8 para a relação viscosidade máxima (U.A.) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais.	
Amostras preparadas no Viscoamilógrafo	110
Figura 9: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 9 para a relação "falling number" (s) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais.	
Amostras preparadas no Viscoamilógrafo	113
Figura 10: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 10 para a relação viscosidade máxima (U.A.) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais.	
Amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio .	115

Figura 11: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 11 para a relação "falling number" (s) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais. Amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio . 118

Figura 12: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 12 para a relação volume coletado (ml) para farinhas comerciais com amostras preparadas no Viscoamilógrafo versus volume coletado (ml) para amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio 120

RESUMO

A alfa-amilase, enzima amilolítica presente no grão de trigo, representa um papel fundamental na qualidade final dos produtos de panificação.

No processo de panificação, a alfa-amilase presente na farinha de trigo deve apresentar uma atividade adequada pois, se presente em excesso, devido principalmente à germinação indesejada dos grãos, deve ser diluída e, se em quantidade insuficiente, requer suplementação com fontes externas.

Dessa forma, para garantir um suprimento adequado de alfa-amilase em farinhas para panificação, é necessário um controle eficiente da atividade da enzima.

Neste trabalho, procurou-se pesquisar um equipamento que possibilitasse o desenvolvimento de um método simples, rápido e econômico para quantificação da atividade da alfa-amilase em farinha de trigo.

O princípio para construção do equipamento está baseado na mudança, devido à ação da alfa-amilase, das características viscosimétricas de suspensões de farinhas aquecidas.

Um protótipo de equipamento, denominado equipamento-teste, foi idealizado, construído e utilizado para realização dos experimentos. Foram estudadas as condições ótimas de operação do equipamento-teste e estabelecidas as relações entre as

determinações do equipamento-teste e a atividade da alfa-amilase naturalmente presente ou adicionada à farinha testada.

Além disso, foram estabelecidas as relações entre os resultados desse método e os de outros dois métodos viscosimétricos, quais sejam o método amilográfico e o de "falling number". A partir destas relações, foram calculados os valores de resposta do equipamento-teste correspondentes às faixas ótimas de atividade enzimática em farinhas para panificação. O método proposto apresentou relações altamente significantes com os métodos amilográfico e de "falling number".

Os resultados do trabalho demonstraram que o equipamento-teste possibilita determinar adequadamente a atividade da alfa-amilase naturalmente presente ou adicionada à farinha de trigo para panificação.

SUMMARY

Alpha-amylase, one of the amylolytic enzymes occurring in wheat, plays a fundamental role in the quality of baking products. This enzyme must show an adequate activity in the breadmaking process because, if present in excess, due to sprouting or germination caused by preharvest weather conditions, it must be diluted and, if present in insufficient quantities, must be supplemented by external sources. Thus, in order to guarantee an adequate supply of alpha-amylase in breadmaking flours, an effective control of the enzyme activity must be maintained.

The objective of this work, was to develop an equipment in which the quantification of the alpha-amylase was fast, economic and simple. The method studied was based on the increasing fluidity of heated wheat flour suspensions under the action of alpha-amylase action. It was assumed that the volume of an incubated wheat flour suspension passing through an orifice was related to the alpha-amylase activity.

A prototype of an equipment, called test-equipment, was idealized, constructed and employed in the experiments. The optimal operating conditions of the test equipment were studied and the relation between the flowed volume of the suspension after a fixed time and the activity of the enzyme naturally occurring in or added to the tested flour was established.

Equations relating the proposed method with the Amylograph and the Falling Number methods were established. From these relations, the response values of the test-equipment corresponding to the optimal ranges of enzymatic activity in breadmaking flours were determined. The proposed method was highly related to the Amylograph and the Falling Number methods.

The results obtained showed that the test-equipment allowed an adequate evaluation of the activity of the alpha-amylase naturally present in or added to breadmaking wheat flour.

I. INTRODUÇÃO

O consumo brasileiro atual de trigo é de cerca de 6,5 milhões de toneladas anuais, equivalentes a aproximadamente 5 milhões de toneladas de farinha. Esta farinha é, principalmente, utilizada na produção de pão francês e produtos de confeitaria em pequenos estabelecimentos comerciais. No entanto, a produção de biscoitos, "crackers", pão de forma e massas alimentícias é realizada, em maior extensão, em indústrias de médio e grande porte, que consomem por volta de 30 a 40% da farinha produzida no Brasil (Alimentos e Tecnologia, 1985).

A inexistência de farinhas com características tecnológicas diferenciadas e apropriadas para cada tipo de produto final implica a necessidade de utilização de aditivos pelas indústrias de panificação. Como exemplo dos aditivos comumente utilizados, temos os emulsificantes, os oxidantes, os redutores, as enzimas amilolíticas, dentre outros.

A alfa-amilase, uma enzima amilolítica muito utilizada em panificação, é capaz de catalisar a hidrólise do amido, produzindo, principalmente, dextrinas e maltose (Whitaker, 1972; Asp & Midness, 1983).

A adição de alfa-amilase à farinha de trigo tem sido uma prática comum em produtos fermentados de panificação, como pães e biscoitos "cracker", pois sua ação sobre o amido danificado mecanicamente ou gelatinizado resulta em aumento do substrato disponível para o desenvolvimento das leveduras, possibilitando,

assim, a diminuição da quantidade de açúcar utilizada nas formulações. Além disso, a presença da enzima em níveis adequados propicia um produto final mais macio e com melhores características de qualidade (Miller & Johnson, 1948).

A presença de um excesso de alfa-amilase nas farinhas para panificação, ocasionada, notadamente, pela germinação inadequada dos grãos de trigo colhidos em condições de alta umidade, provoca um ataque excessivo ao amido, produzindo um alto conteúdo de dextrinas, resultando em produtos de panificação de baixa qualidade (El-Dash, 1977).

A medida da atividade da alfa-amilase da farinha de trigo destinada à panificação é assim um importante parâmetro para o controle de qualidade. O ajuste da atividade da enzima a um nível desejado, para cada tipo de produto, pode ser obtido pela mistura de farinhas de trigo com diferentes teores da enzima ou pela suplementação da farinha deficiente com uma fonte enzimática externa (Osborn et alii, 1981).

Entretanto, os métodos citados na literatura para determinação da atividade da alfa-amilase na farinha de trigo envolvem a utilização de equipamentos caros, de fabricação estrangeira e sem similares no Brasil e/ou a necessidade de laboratórios de análise bem equipados e com técnicos especializados. A soma desses fatores limita sensivelmente a realização da quantificação da enzima na grande maioria das indústrias de panificação brasileiras.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um equipamento simples, denominado equipamento-teste, de baixo custo e boa reprodutibilidade, para determinar a atividade da alfa-amilase em farinhas de trigo utilizadas em panificação.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Amilases

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de polissacarídeos. Essas enzimas agem sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos derivados desses, hidrolisando ligações glicosídicas α -1,4 (Whitaker, 1972).

O principal sistema de hidrólise do amido em produtos à base de cereais é constituído por duas amilases: a alfa-amilase e a beta-amilase (Milner, 1947).

1.1. Caracterização das alfa e beta-amilases

A alfa-amilase (α -1,4 - glicano 4 - glicanoidrolase, E.C. 3.2.1.1.) é uma endo-enzima que hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 no interior da molécula dos polissacarídeos que constituem o amido, produzindo uma mistura de maltodextrinas, onde predominam maltose, maltohexose e dextrinas ramificadas (Whitaker, 1972; Hill & Mac Gregor, 1988).

A ação hidrolítica da alfa-amilase, rompendo ligações no interior das moléculas, provoca uma perda muito rápida da integridade dos polímeros do amido, provocando uma redução na viscosidade de sua pasta e na capacidade de complexação com iodo.

Por esses motivos, a alfa-amilase é conhecida como uma enzima dextrinizante dotada de poder de liquefação (Whitaker, 1972).

A alfa-amilase é encontrada quase que universalmente nos reinos vegetal e animal. O peso molecular das alfa-amilases cristalizadas de diversas fontes está na faixa de 50.000 e todas contêm um átomo-grama de cálcio por molécula. O cálcio encontra-se fortemente ligado à enzima e somente pode ser removido com o uso de agentes quelantes, em pH ácidos, provocando assim a perda da atividade ou redução da estabilidade da enzima (Whitaker, 1972).

Metais pesados, agentes quelantes e agentes bloqueadores de grupos tiol são inibidores potenciais da alfa-amilase, embora não sejam usados tecnologicamente por razões toxicológicas (Fox & Mulvihill, 1982). Segundo os autores, meio ácido e cloreto de sódio são usados para controlar a atividade da alfa-amilase em farinhas de trigo que contêm alto teor da enzima, devido à germinação indesejada dos grãos.

A beta-amilase (α - 1,4 - glicano maltoidrolase, E.C. 3.2.1.2.) é uma exo-enzima que hidrolisa as ligações glicosídicas α - 1,4 a partir do final não-redutor das moléculas do amido, produzindo, principalmente, maltose e dextrinas ramificadas de alto peso molecular, as beta - dextrinas limite.

A importância tecnológica da beta-amilase em panificação, cervejaria, etc, está relacionada com a produção de açúcares fermentáveis, razão pela qual essa enzima é denominada de sacarificante (Whitaker, 1972).

A ação da beta-amilase causa uma redução muito lenta da viscosidade de suspensões de amido. A ação da enzima cessa quando cerca de 60% da produção teórica de maltose são atingidos. As dextrinas residuais formadas mantêm muito das propriedades originais do amido, sendo essencialmente não redutoras e complexando com o iodo (Pyler, 1973).

A beta-amilase, encontrada principalmente em vegetais superiores, tem, em geral, peso molecular superior ao da alfa-amilase. A enzima extraída da batata doce, por exemplo, apresenta um peso molecular de 152.000 (Whitaker, 1972).

A beta-amilase contém grupos sulfidríla essenciais a sua atividade, os quais podem ser bloqueados por determinados agentes. Da mesma forma, os metais pesados inativam a enzima (Fox & Mulvihill, 1982).

1.2. Mecanismo de ação das alfa e beta-amilases

1.2.1. Alfa-amilase

O padrão de ação da alfa-amilase sobre o amido depende, principalmente, do estado em que se encontra o substrato e da fonte de origem da enzima (Hill & Mac Gregor, 1988). Segundo os autores, se o substrato da reação for a amilose, fração linear do amido, e a alfa-amilase for de cereais, a enzima realiza uma hidrólise completamente aleatória das ligações internas da cadeia. No

mecanismo multicadeia de ataque da alfa-amilase de cereais, a enzima hidrolisa uma ligação a cada encontro com a molécula do substrato.

A ação das alfa-amilases de origem microbiana sobre a amilose parece ser do tipo de ataque múltiplo, em que a enzima catalisa a hidrólise de diversas ligações em um substrato antes de ser eliminada ou formar um novo complexo ativo com outro substrato (Robyt & French, 1967).

Segundo Whitaker (1972), o mecanismo de ação da alfa-amilase microbiana gera produtos definidos e reprodutíveis, característicos de uma fonte particular de enzima.

Em um primeiro estágio, os produtos da degradação hidrolítica da amilose pela alfa-amilase são dextrinas com oito unidades de glicose, que são hidrolisadas vagarosamente e, em um segundo estágio, uma mistura de maltodextrinas de glicose a maltohexose, na qual predominam maltose e maltohexose. Esses produtos apresentam, aparentemente, uma alta resistência a hidrólises posteriores (Hill & Mac Gregor, 1988).

A ação da alfa-amilase de cereais sobre a fração ramificada do amido, a amilopectina, produz, inicialmente, grandes dextrinas que, após prolongada hidrólise, dão origem a uma mistura de grandes e pequenas dextrinas ramificadas (Hill & Mac Gregor, 1988).

De acordo com Whistler & Paschall (1967), a ação hidrolítica das alfa e beta-amilases envolve uma interação entre o sítio ativo das enzimas e os grupos funcionais do substrato. Esta

reação, com a participação da água, ocorre na superfície da enzima.

Segundo Whitaker (1972), a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 do amido pela alfa-amilase, envolve a interação do substrato com um grupo carboxila e um grupo contendo nitrogênio, mais provavelmente um grupo imidazol, da enzima. O substrato forma um complexo de adsorção com a enzima, no qual as ligações glicosídicas susceptíveis à hidrólise se justapõem ao sítio ativo da enzima.

No esquema de reação citado por Whitaker (1972), Figura 1, o ânion carboxila faz um ataque nucleofílico ao carbono C(1) do substrato, o que é facilitado pela protonação da ligação pelo grupo imidazol. Como resultado, forma-se um complexo intermediário glicosil-enzima envolvendo ligações covalentes. Na reação de deglicosilação, o grupo imidazol desprotonado remove o próton da molécula de água, liberando a hidroxila para atacar o C(1) do complexo glicosil-enzima. O produto dessa reação de duplo deslocamento apresenta uma configuração alfa.

De acordo com Hill & Mac Gregor (1988), a alfa-amilase pode hidrolisar, embora muito lentamente, grânulos de amido intactos, mas sua importância no processo tecnológico de panificação não é relevante.

A alfa-amilase pode hidrolisar os grânulos de amido danificados durante a moagem do trigo, mas uma reação mais rápida é obtida quando o substrato é amido gelatinizado (Reed & Thorn, 1978). Segundo Whitaker (1972), a velocidade de hidrólise do amido

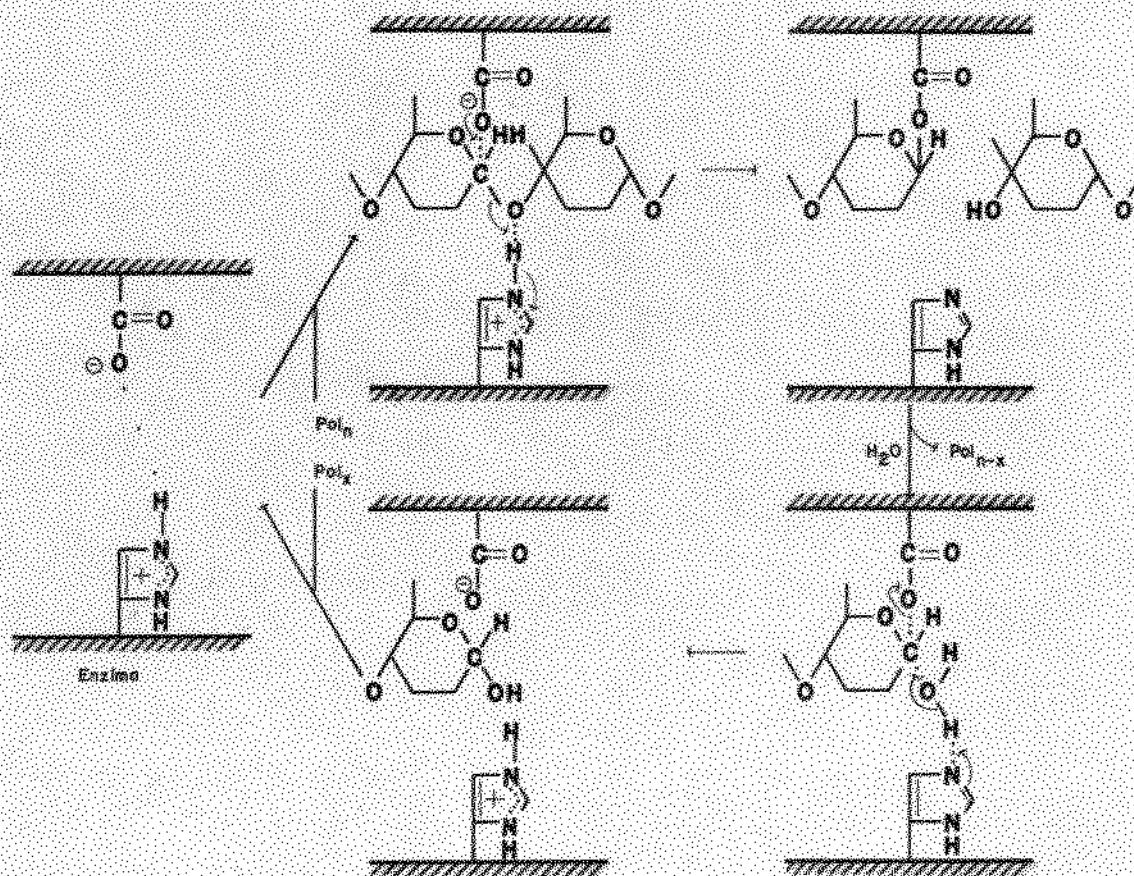


Figura 1- Mecanismo de ação da alfa-amilase
 Fonte: Whitaker, 1972

gelatinizado pela ação da alfa-amilase é de 165 a 7000 vezes maior do que sobre o amido "in natura".

1.2.2. Beta-amilase

A ação da beta-amilase sobre a amilose forma basicamente maltose; contudo, quando a cadeia do polissacarídeo apresenta um número ímpar de unidades de glicose, forma-se também glicose. Por sua vez, a ação desta enzima sobre a amilopectina forma, além da maltose, as beta-dextrinas limite, devido a sua ação cessar quando os pontos de ramificação (ligações glicosídicas α -1,6) se tornam próximos (Whistler & Paschall, 1967).

O mecanismo de ação para a beta-amilase, proposto por Whitaker (1972), envolve a retirada de unidades de maltose e a inversão de configuração do carbono C(1) da molécula da glicose de alfa para beta (Figura 2). Acredita-se que a enzima apresente um sítio ativo com pelo menos três grupos funcionais: um grupo contendo um composto nitrogenado (imidazol, provavelmente), um contendo uma carboxila e um grupo sulfeto, e um terceiro não especificado. Este último grupo liga-se à hidroxila do carbono C(4) do final não-redutor da cadeia do polissacarídeo, deixando a segunda ligação glicosídica do substrato justaposta aos outros dois grupos catalíticos.

No mecanismo de inversão da configuração de alfa para beta da glicona do carbono C(1) proposto pelo autor, após a

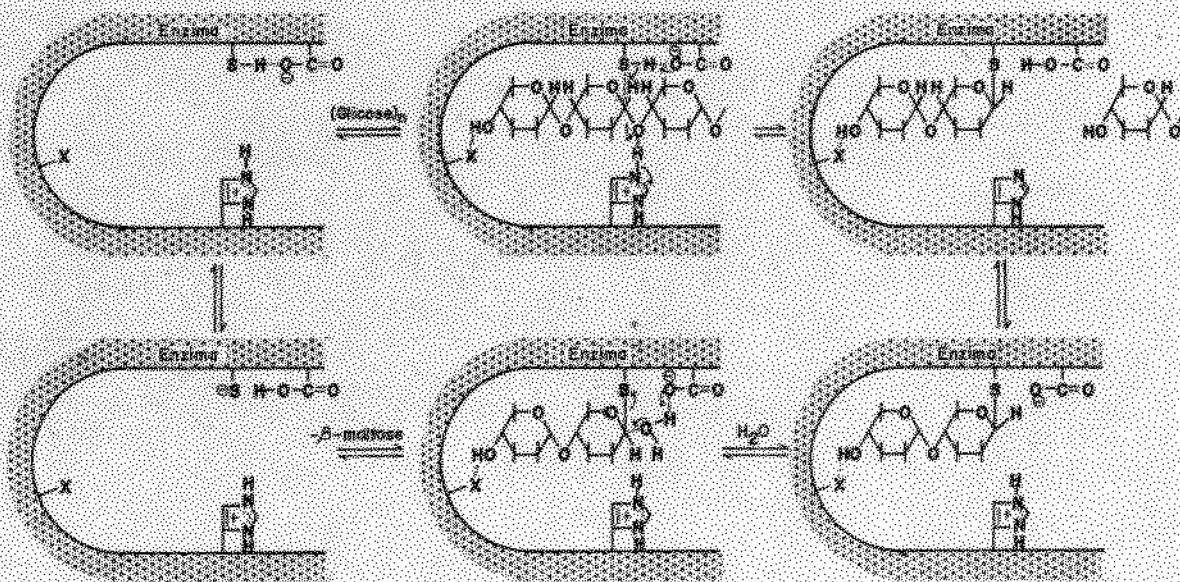


Figura 2 - Mecanismo de ação da beta-amilase
 Fonte: Whitaker, 1972.

formação do complexo enzima-substrato, o ataque nucleofílico do grupo sulfidrila ao carbono C(1) é facilitado pela presença do grupo carboxila, enquanto que o grupo imidazol age doando o hidrogênio para o oxigênio glicosídico. Dessa forma, ocorre a formação de um complexo maltosil-enzima, que a seguir é hidrolisado. Neste mecanismo, o grupo carboxilado age como base e facilita o ataque da água ao carbono C(1), rompendo assim a estrutura formada, liberando a beta-maltose e regenerando a enzima.

A beta-amilase não age sobre o amido "in natura", apresentando limitada ação de liquefação e dextrinização sobre o amido gelatinizado e rápida sacarificação sobre esse substrato (Fox & Mulvihill, 1982).

A ação conjunta das alfa e beta-amilases tem importância básica no ataque enzimático ao amido em produtos à base de cereais. Essas enzimas apresentam uma ação complementar devido à alfa-amilase hidrolisar cadeias de amido danificado e gelatinizado a dextrinas, as quais se constituem em novos pontos de ataque para a beta-amilase (Milner, 1947).

1.3. Alfa e beta-amilases em cereais

As alfa e beta-amilases encontradas naturalmente nos grãos de cereais têm função relacionada com o fornecimento de energia para o processo germinativo das sementes, degradando o

amido, principal suprimento energético dos vegetais, a açúcares fermentáveis (Pyler, 1973).

O trigo imaturo contém um certo nível de alfa-amilase que se mantém praticamente constante durante o período de crescimento e desenvolvimento do grão, mas cai drasticamente com a aproximação da maturidade (Fox & Mulvihill, 1982). Esse tipo de alfa-amilase, mais comumente denominado alfa-amilase "green", se localiza principalmente no pericarpo e está associado com a degradação do amido nesse tecido (Hill & Mac Gregor, 1988). A alfa-amilase "green" não é homogênea e contém um grande número de componentes. Marchylo et alii (1980) demonstraram a presença de vinte e duas isoenzimas.

Na etapa de desenvolvimento dos grãos, sob determinadas condições, pode haver produção de alfa-amilases típicas do período germinativo, sem que este esteja ocorrendo. Este fenômeno é causado pela ativação da camada de aleurona do grão. Assim, o trigo, dentre outros cereais, pode conter significativos níveis de alfa-amilase sem ter sofrido um processo germinativo (Hill & Mac Gregor, 1988).

Diversos trabalhos com cevada germinada levaram à conclusão que no processo germinativo a alfa-amilase é sintetizada "de novo", inicialmente no escutelum, sendo secretada para o endosperma adjacente e, posteriormente, na camada de aleurona (Hill & Mac Gregor, 1988).

No entanto, a alfa-amilase pode ser sintetizada nos grãos maduros de trigo se existirem condições de alta umidade no tempo de

colheita, ocasionando o chamado "sprouting" (Hill & Mac Gregor, 1988).

A beta-amilase, por outro lado, está normalmente presente em quantidades consideráveis no trigo não germinado, sofrendo apenas um moderado aumento durante o processo de germinação (Milner, 1947).

Segundo Fox & Mulvihill (1982), as atividades da beta e alfa-amilases em trigo aumentam 2,6 e 229 vezes, respectivamente, após 5 dias de germinação.

1.4. Fontes de alfa e beta-amilases

Além do trigo, outros cereais, como a cevada, centeio, arroz, triticale e aveia, podem ser fonte de amilases, quando submetidos a processos de germinação ou maltamento (Campbell, 1980). A cevada produz o malte de melhor qualidade devido a seu potencial de rápida síntese de grandes quantidades de alfa-amilase durante o processo de maltamento (Hill & Mac Gregor, 1988).

A alfa-amilase, além de oriunda da germinação de cereais, pode ser obtida a partir de fungos e bactérias.

A alfa-amilase fúngica, preparada comercialmente a partir de tipos especiais de fungos, principalmente o *Aspergillus oryzae*, apresenta um modo de ação semelhante ao da alfa-amilase de origem de cereais. No entanto, possui uma estabilidade térmica menor do

que a de cereais e, quando comparada com essa, em termos de peso, apresenta uma atividade muito maior (Brown, 1983).

A alfa-amilase bacteriana, preparada a partir de certos tipos de *Bacillus*, dentre os quais encontramos o *B. subtilis* e o *B. stearothermophilus*, apresenta uma atividade bem superior às alfa-amilases de cereais e de fungos e, também, apresenta uma maior estabilidade térmica (Fox & Mulvihill, 1982).

A beta-amilase pode ser obtida não só de cereais mas também de alguns tubérculos, como a batata doce, da soja e de fontes microbianas (Pazur, 1965).

1.5. Influência do pH e temperatura na atividade da alfa e beta-amilases

As amilases apresentam uma atividade ótima dentro de uma estreita faixa de pH. A curva da atividade das enzimas versus pH apresenta a forma de um sino. As alfa e beta-amilases possuem valores de pH ótimo diferenciados e uma curva característica. O decréscimo da atividade dessas enzimas na região de pH acima e abaixo do valor ótimo é atribuído a mudanças reversíveis ou irreversíveis na estrutura protéica de sua molécula. Vale mencionar que a forma das curvas de atividade depende bastante das condições do meio (Allen & Spradlin, 1974).

A temperatura exerce efeitos opostos sobre a taxa de hidrólise das enzimas. A taxa de hidrólise é dependente da

temperatura e portanto aumentos de temperatura implicam um aumento de atividade catalítica da enzima. Por outro lado, as alfa e beta-amilases são termicamente lábeis e sua taxa de desnaturação está diretamente relacionada com a temperatura, ou seja, quando a temperatura aumenta, ocorre a desnaturação térmica das enzimas, provocando a perda de sua atividade (Allen & Spradlin, 1974). Segundo os mesmos autores, as amilases são, em geral, estáveis à temperatura ambiente ou abaixo dela. A taxa de hidrólise nessas temperaturas é baixa e constante, elevando-se em temperaturas intermediárias e decrescendo em temperaturas elevadas, que dependem da origem da enzima em questão, em decorrência da desnaturação térmica (Tabela 1).

A atividade da alfa-amilase é muito influenciada pelas condições de temperatura e pH do meio. Foi observado que temperaturas superiores a 70 °C e pHs inferiores a 4 causam a inativação da alfa-amilase de cevada (Allen & Spradlin, 1974; Fox & Mulvihill, 1982). Cabe salientar que a estabilidade térmica da beta-amilase é bem inferior à da alfa-amilase, sendo a primeira desnaturada em temperaturas acima de 55 °C (Allen & Spradlin, 1974).

Diversos autores apresentam faixas de valores de temperatura e pH característicos para cada enzima. Esses valores variam de autor para autor, dependendo principalmente do método empregado para sua determinação. A Tabela 1 apresenta faixas valores de pH e temperatura de alfa e beta-amilases de diversas origens, segundo fontes comumente citadas na literatura.

Tabela 1 - Faixas de pH e temperatura característicos de diversos tipos de amilases.

Origem das amilases	pH		Temperatura (°C)	
	pH de estabilidade	pH ótimo	Temperat. desnaturação	Temperat. ótima
Alfa-amilase				
Trigo	-	5,2 - 5,7	> 55	60 - 66
Cevada	4,9 - 9,1	4,0 - 5,8	> 70	51 - 60
Fúngica				
(<i>A.oryzae</i>)	5,5 - 8,5	4,8 - 6,0	> 60	45 - 55
Bacteriana				
(<i>B.subtilis</i>)	4,8 - 8,5	5,0 - 7,0	> 90	60 - 70
Beta-amilase				
Trigo	-	5,0 - 6,0	> 45	48 - 51
Malte	4,8 - 8,0	5,0 - 5,5	> 55	40 - 51

* Fonte : Whitaker, 1972; Allen & Spradlin, 1974; Reed & Thorn, 1978; Fox & Mulvihill, 1982.

2. Amilases em Panificação

Segundo Beleia (1982), a atividade amilolítica de farinhas de trigo é um dos fatores que determinam a qualidade final dos produtos de panificação.

Na obtenção de produtos fermentados em panificação, tais como pães e biscoitos tipo "cracker", o dióxido de carbono é o agente que provoca o crescimento desses produtos durante as etapas de fermentação e cozimento. Este gás é produzido pelas leveduras a partir de açúcares simples naturalmente presentes na farinha, adicionados na formulação ou provenientes da ação das amilases sobre o amido da farinha (Pratt, 1978).

A farinha de trigo contém níveis de açúcares fermentáveis em torno de 0,5%, insuficientes não apenas para permitir um ótimo crescimento das leveduras durante o processo de panificação, mas também para garantir o suprimento adequado para a ocorrência das reações de caramelização e de Maillard, cujos produtos conferem "flavor" e cor da crosta ideais para o pão (Fox e Mulvihill, 1982). De acordo com os autores, a adição de sacarose ou frutose à massa, para garantir o nível adequado de açúcares metabolizáveis pelas leveduras, implicaria a produção rápida de gás em um único estágio do processo de panificação, com prejuízo para a qualidade do produto final. Dessa forma, a ação das amilases é fundamental para garantir um suprimento adequado de açúcares durante todo o processo de panificação.

Miller & Johnson (1948) realizaram um experimento de panificação pelo método direto e esponja, combinando adições de alfa-amilase fúngica ou de trigo maltado e açúcar. Os autores concluíram que melhores resultados foram obtidos nas mais altas concentrações da enzima, vinte e quatro vezes um valor arbitrário de atividade enzimática, e nas menores de açúcar, 3 e 4% nos métodos direto e na esponja, respectivamente.

A alfa-amilase, além de participar do processo de hidrólise do amido para a produção de açúcares, apresenta outras propriedades relacionadas com as modificações estruturais do amido devido à produção de dextrinas, que têm papel decisivo na qualidade do produto final.

2.1. Ação na mistura

Na fase de mistura, primeira etapa do processo de panificação, os componentes da formulação são homogeneizados e distribuídos por toda a massa.

Segundo Milner (1947), a ação das amilases se inicia quando os ingredientes são misturados ocorrendo a liquefação e a dextrinização do amido danificado mecanicamente na moagem pela alfa-amilase, aumentando assim a capacidade de formação de açúcar pela beta-amilase. Nessa etapa de mistura, a maltose formada é utilizada pelas leveduras para produção de dióxido de carbono.

2.2. Ação na fermentação

A etapa de fermentação tem como objetivo principal desenvolver ou completar o desenvolvimento do glúten, produzir dióxido de carbono, e desenvolver compostos responsáveis pelo aroma e gosto característicos dos produtos de panificação.

Inicialmente, o dióxido de carbono produzido pelo metabolismo das leveduras se dissolve no meio aquoso da massa, causando um aumento de acidez do meio. Essa acidificação acelera a atividade das amilases. Esse aumento de atividade é um fator muito importante na manutenção da produção de gás durante os estágios finais seguintes do processo de panificação (Milner, 1947).

Segundo este autor, uma atividade adequada de amilases é particularmente importante em formulações pobres, que contêm pouco açúcar, bem como no processo de panificação pelo método esponja. Nesse método, uma parte da farinha e água, juntamente com toda a levedura, são misturadas formando uma esponja que, após um longo período de fermentação, cerca de 3 a 5 horas, retorna ao misturador, onde é incorporado o restante dos ingredientes. Dessa forma, as amilases desempenham um papel muito importante na fase esponja, no sentido de fornecer açúcares fermentáveis pelas leveduras. De acordo com Reed & Thorn (1978), estima-se que 2 a 5% de farinha, em peso, sejam hidrolisados e fermentados durante a etapa de fermentação da esponja.

A ação conjunta das amilases representa também um papel importante durante a etapa de fermentação de biscoitos tipo

"cracker", fornecendo os açúcares que serão fermentados pelas leveduras no longo período de duração do processo fermentativo (10 a 15 horas) (Matz, 1968).

Nos biscoitos tipo doce, segundo Gabor et alii (1982), a presença de alfa-amilase microbiana em suplementos proteolíticos facilita a ação destes no enfraquecimento do glúten, uma vez que a alfa-amilase agirá sobre o amido da farinha, degradando-o e expondo a matriz do glúten ao ataque das proteases.

De acordo com Perten (1980), a ação da beta-amilase em panificação praticamente se restringe à formação de maltose na etapa de fermentação, uma vez que sua inativação ocorre em temperaturas inferiores à gelatinização do amido. A ação da beta-amilase é especialmente importante nos últimos estágios da fermentação, devido à manutenção da taxa de açúcares disponíveis para ação das leveduras, depois que todas as outras fontes de açúcar foram esgotadas. Dessa forma, a produção de dióxido de carbono é mantida, levando à obtenção de massa com volume e leveza adequados.

Segundo Brown (1983), a presença de alfa-amilase em excesso pode causar um ataque muito intenso sobre o amido no estágio de massa. Nesse caso, a quantidade de dextrinas formadas, pode ser demasiadamente elevada, não sendo totalmente transformada em maltose pela beta-amilase normalmente presente na farinha de trigo, originando problemas de umidade e pegajosidade no miolo dos pães. A falta de alfa-amilase, por outro lado, implicará a inexistência de uma quantidade adequada de açúcares durante todo

o processo fermentativo, acarretando problemas na qualidade do produto final no que se refere à textura, volume, sabor, aroma, etc.

2.3. Ação no cozimento

Após a fermentação, moldagem e descanso final, a massa é colocada no forno, onde ocorre uma sequência de modificações físicas e químicas.

Com a elevação da temperatura, a atividade das amilases sofre, inicialmente, um grande aumento mas, com o progressivo acréscimo de temperatura, estas enzimas são inativadas.

O gás carbônico produzido pela fermentação acelerada, nas primeiras etapas do cozimento, sofre uma expansão térmica e provoca um aumento grande de volume da massa. Esta expansão continua até que a desnaturação térmica das proteínas impossibilite o aumento de volume.

Com a desnaturação das proteínas por coagulação térmica, sua capacidade de ligar água é grandemente reduzida, provocando sua liberação. Essa água é, então, absorvida pelo amido que intumescce e gelatiniza.

De acordo com McDermott (1974), a ação da alfa-amilase durante o cozimento do pão pode não somente produzir dextrinas e açúcares, mas também modificar os padrões de intumescimento e gelatinização dos grânulos de amido quando aquecidos na massa.

Segundo Fox & Mulvihill (1982), a estabilidade térmica da alfa-amilase de cereais permite que ela aja sobre o amido gelatinizado no cozimento do pão, por um período de 2 a 3 minutos, à temperatura de 60 e 70°C. Nessas condições, o amido está bastante susceptível à hidrólise e o pH da massa, situado entre 5,0 a 5,6, encontra-se na faixa de atividade ótima da enzima.

O efeito benéfico da ação limitada da alfa-amilase sobre o amido gelatinizado deve-se à produção de dextrinas, as quais não somente aumentam a retenção de gás e, conseqüentemente o volume do pão, mas também conferem características de suavidade à massa e aumentam a retenção de umidade e maciez do miolo (Milner, 1947; Fox & Mulvihill, 1982).

Segundo Selman & Sumner (1947), farinhas deficientes em alfa-amilase produzem géis de alta viscosidade no forno, fazendo com que a parte exterior da massa, exposta à ação do calor, geleifique, diminuindo a expansão da massa e produzindo um pão de volume reduzido, com textura grosseira, seco e quebradico.

Já o excesso de alfa-amilase no assamento do pão causa um ataque intenso ao amido gelatinizado, produzindo dextrinas que não são suficientemente degradadas, devido à inativação térmica da beta-amilase na temperatura do forno (Brown, 1983). Brown & Harrel (1944) afirmam que uma excessiva liquefação e dextrinização do amido pela alfa-amilase diminuem sua capacidade de incorporar a água liberada na desnaturação das proteínas do trigo durante o assamento do pão, produzindo dessa forma um miolo demasiado úmido.

Além da diminuição da quantidade de água que o amido pode absorver nos estágios de fermentação e no assamento, a presença de grandes quantidades de produtos da degradação do amido oriundos dessas etapas, tais como dextrinas e açúcares, contribuem para o alto grau de pegajosidade e gomosidade do miolo, que se torna inaceitável ao consumidor, podendo igualmente criar sérios problemas técnicos no estágio de corte dos pães (McDermott, 1974; Chamberlain et alii, 1981).

De acordo com Selman & Sumner (1947), o excesso de alfa-amilase origina um pão com miolo escuro e estrutura muito aberta, devido à coalescência das células estruturais.

Para minimizar este problema, recomendada-se a redução da quantidade de água adicionada à formulação do pão e do nível de amido danificado existente na farinha, devido a influência desse fatores na absorção de água na mistura. Também, é recomendada uma lubrificação especial das facas de corte do pão (Buchanan, 1980; Chamberlain et alii, 1981).

Outros efeitos da presença da alfa-amilase são observados na qualidade da crosta do pão, formada pelo ressecamento da superfície da massa e acompanhada pela caramelização e ocorrência da reação de Maillard a partir dos açúcares presentes. Se esses açúcares estiverem em excesso, ocasionam coloração escura da crosta e "flavor" demasiadamente intenso. Por outro lado, se estiverem em falta, a crosta resulta demasiadamente pálida e o pão com "flavor" pouco acentuado (Fox & Mulvihill, 1982).

2.4. Ação na conservação do pão

De acordo com Fox & Mulvihill (1982), a alfa-amilase de origem bacteriana, oriunda principalmente do *B. subtilis*, pode ser usada como agente "anti-staling", para prevenir o envelhecimento do pão. Esse complexo processo, que inclui a retrogradação da amilopectina, pode ser retardado pela hidrólise limitada do amido através do uso de uma alfa-amilase bacteriana. Esta enzima é estável ao calor, não sendo desativada nas temperaturas atingidas no forneamento do pão. Seu uso, porém, requer muito cuidado, pois o excesso na quantidade de enzima adicionada resulta em sérios danos à estrutura e à cor do miolo do pão.

2.5. Suplementação de alfa-amilase

A exceção da alfa-amilase bacteriana, que pode ser utilizada no retardamento do envelhecimento do pão, as demais fontes utilizadas para a suplementação de alfa-amilase, quando essa se encontra em níveis inadequados para panificação, são de origem fúngica ou produzida pelo maltamento de cereais, principalmente de cevada (Brown, 1983). Segundo este autor, a adição de alfa-amilase de origem fúngica é preferida à de malte, por apresentar estabilidade térmica menor. Neste sentido, as enzimas de origem fúngica agiriam nas etapas de mistura e fermentação da massa e, no assamento, não degradariam excessivamente o amido

gelatinizado, pois já estariam com sua atividade bastante reduzida na faixa de temperatura de gelatinização do amido. Além disso, devido a sua maior atividade, podem ser utilizadas em menores quantidades, em comparação com a alfa-amilase de malte. Cabe salientar que a alfa-amilase de malte apresenta uma ação mais prolongada na degradação do amido gelatinizado, podendo qualquer erro de formulação implicar uma perda na qualidade do produto final.

No entanto, segundo Calvel (1983), nos processos de panificação rápidos, largamente adotados no Brasil na atualidade, é recomendado o uso de alfa-amilase de malte, que contribui para melhoria do sabor e da qualidade tecnológica do produto final.

3. Métodos de Determinação da Atividade de Alfa-amilase

A medida da atividade de alfa-amilase é um importante aspecto do controle de qualidade de farinhas para panificação, permitindo que a atividade da enzima seja ajustada para o nível desejado, seja por mistura de farinhas ou por suplementação com farinha de malte ou alfa-amilase fúngica (Osborn et alii, 1981).

De acordo com D'Appolonia et alii (1982), a quantificação da alfa-amilase pode ser usada como medida do grau de germinação ("sprouting") do trigo, embora também ocorram mudanças em outras enzimas e componentes bioquímicos, notadamente quando as condições climáticas durante a colheita são úmidas, provocando a germinação dos grãos na própria planta. Segundo os autores, a germinação causa uma diminuição da qualidade do trigo que pode ser observada por exame visual das amostras. Porém, como as mudanças conhecidas como "germinação incipiente" podem ocorrer mesmo antes de o dano ser visualmente detectado, é mais indicada a medida da germinação pela determinação do teor de alfa-amilase.

Os ensaios de determinação de alfa-amilase foram subdivididos com base no monitoramento dos diferentes aspectos da reação da enzima, tais como: aumento do poder redutor de uma suspensão de farinha ou amido; decréscimo de cor da beta-dextrina limite corada com iodo; formação de produtos dializáveis fluorescentes pela ação da enzima em um derivado antranilado de beta-dextrina limite; perda da turbidez de uma suspensão de beta-dextrina limite; formação de produtos coloridos filtráveis pela

reação da enzima com um substrato cromogênico; ou, finalmente liquefação do gel de amido pela ação da enzima sobre uma suspensão de farinha ou amido.

3.1. Métodos de determinação do poder redutor

Os métodos A.A.C.C. 22-15 e 22-16, citados na "American Association of Cereal Chemists" - A.A.C.C. (1969), determinam o poder diastático de farinhas e malte, respectivamente, pela medida do poder redutor do substrato. Essas determinações baseiam-se na redução do ferricianato pelos grupamentos redutores formados pela ação conjunta de alfa e beta-amilases sobre o substrato. Os resultados são expressos em função da quantidade de maltose produzida pelas enzimas da farinha ou malte, nas condições de realização dos ensaios.

Robyt & Whelan (1968) propõem um método colorimétrico que mede o aumento do poder redutor de uma suspensão de amido por efeito da redução de sais de cobre pela ação das amilases. O resultado é expresso em termos do número de ligações glicosídicas hidrolisadas pelas enzimas, nas condições de realização dos ensaios.

De acordo com Tippler (1969), há usualmente um grande excesso de atividade de beta-amilase em trigo em condições normais, medida através da determinação do poder redutor de suspensões de amido ou farinhas. Assim, nas determinações baseadas no aumento do

poder redutor, o efeito da beta-amilase é significativo, sendo o resultado expresso em termos de poder diastático da amostra, ou seja, atividade das alfa e beta-amilases conjuntamente.

Kruger & Marchylo (1972) propõem um método de quantificação de alfa-amilase pela medida dos açúcares redutores liberados na redução de uma beta-dextrina limite. No entanto, o método apresenta um tempo de incubação excessivamente longo e resultados insatisfatórios para a determinação de quantidades pequenas de alfa-amilase em farinhas.

3.2. Métodos dextrinogênicos

O método proposto por Sandsted et alii (1939) conhecido como método SKB, correspondente ao método A.A.C.C. 22-01 (A.A.C.C., 1969) avalia a atividade da alfa-amilase através de sua capacidade dextrinogênica, ou seja, da medida do decréscimo da cor do complexo iodo - beta-dextrina limite, decorrente da ação da alfa-amilase. O resultado é expresso em função do número de gramas de amido solúvel, tratado com excesso de beta-amilase, dextrinizados por um grama de malte ou alfa-amilase de origem microbiana, nas condições do método.

O método SKB é considerado demasiadamente demorado e apresenta falhas no que se refere à medida do tempo requerido para a clivagem do amido notadamente superior ao requerido durante o cozimento do pão no forno. Além disso, o método SKB não é

recomendado para a determinação de pequenas quantidades de alfa-amilase em farinhas, devido a sua baixa sensibilidade e longo tempo de análise (Hagberg, 1960).

Para aumentar a sensibilidade na determinação de pequenas quantidades de alfa-amilase, Kneen et alii (1943) propuseram o método micro-SKB, que envolve uma pré-hidrólise do substrato com o extrato de uma amostra com baixa atividade de alfa-amilase, seguida de uma segunda hidrólise após a adição de uma quantidade conhecida de alfa-amilase. O método tem uma duração de cerca de 18 horas.

Hagberg (1961) sugere algumas modificações no método SKB, para determinação de alfa-amilase em trigo e centeio, com o objetivo de tornar o método mais rápido e acurado. Essas modificações baseiam-se no decréscimo do tempo de hidrólise pelo aumento da taxa farinha/beta-dextrina limite, pelo aumento da temperatura de hidrólise ou pela medida dos resultados por colorimetria. O método colorimétrico proposto pelo autor é o método oficial adotado pela "International Association of Cereal Chemistry" - I.C.C., onde a atividade de alfa-amilase é expressa em unidades "H", que podem ser relacionadas diretamente com as unidades "SKB".

Segundo Perten (1966), uma vantagem dos métodos dextrinogênicos é o fato de a determinação da atividade da alfa-amilase ser feita a 30°C. Estes métodos não são influenciados pela termossensibilidade das enzimas de diferentes fontes, podendo ser aplicados para a determinação da atividade da enzima de cereais, fúngica ou bacteriana.

3.3. Método nefelométrico

Em 1978, foi proposto um procedimento nefelométrico de determinação da atividade de alfa-amilase, através do uso do equipamento denominado "Perkin Elmer Grain Amylase Analyser - 191" - G.A.A. (Campbell, 1980).

A nefelometria baseia-se na medida da dispersão da luz pelas partículas em suspensão em um meio. Dessa forma, o método utilizado no G.A.A. mede a dispersão da luz de uma suspensão de substrato no ângulo reto do eixo da luz incidente (Campbell, 1980).

A atividade da alfa-amilase é determinada pela medida da taxa de decréscimo, em unidades nefelométricas, da habilidade de dispersão da luz em uma suspensão diluída de beta-dextrina limite tratada com a enzima extraível (O'Connell et alii, 1980; Diachuck et alii, 1983).

De acordo com Diachuck et alii (1983), a nefelometria é capaz de medir o conteúdo de alfa-amilase de farinhas com pequena quantidade desta enzima e em farinhas elaboradas a partir de trigo germinado ou com suplementação da enzima, quer seja de cereais ou de origem microbiana.

Segundo o autor, o método é sensível, requerendo técnicos bem treinados para garantir um bom grau de precisão e reprodução dos resultados. Além disso, a técnica nefelométrica deve ser restrita a laboratórios, não podendo ser transferida para unidades de produção industrial.

Hsu & Varriano - Marston (1982) realizaram um trabalho de comparação entre os métodos nefelométrico e colorimétrico (apresentado em 3.5), concluindo que, para baixos teores de suplementação de malte (0,05 - 0,20%), o método nefelométrico era mais sensível, embora houvessem grandes variações entre as replicações.

D'Appolonia et alii (1982) realizaram um estudo comparativo do G.A.A. com os métodos amilográfico e de "falling number" (apresentados em 3.6), utilizando trigos de diferentes variedades, provenientes de locais e épocas de plantio diversos, tendo encontrado relações altamente significantes.

3.4. Método fluorimétrico

Marchylo & Kruger (1978) propuseram um método fluorimétrico de determinação da atividade da alfa-amilase de cereais, fúngica e bacteriana. O método baseia-se no ataque da enzima a um substrato formado por uma beta-dextrina limite antranilada, resultando na formação de produtos fluorescentes dializáveis cuja concentração aumenta linearmente com a concentração de enzima. Além da rapidez e fácil execução, esse método apresenta a vantagem de empregar pequenas quantidades de amostra.

De acordo com O'Connell et alii (1980), o método fluorimétrico proposto por Marchylo & Kruger tem como desvantagem a

complexidade da técnica de execução e instrumentação, requerendo assim operadores treinados.

3.5. Métodos colorimétricos a partir de substratos cromogênicos

Barnes & Blakeney (1974) desenvolveram um método clínico de determinação de alfa-amilase que utiliza amido solúvel inter cruzado corado, os tabletes de Phadebas, para a determinação da enzima em cereais, principalmente em trigo.

O método baseia-se na transformação do amido hidrolisado solúvel de batata em uma matriz tridimensional insolúvel, através de ligações cruzadas, que intumescem em água. O grau de intumescimento dessa matriz é regulado pelo número de interligações formadas, o qual também controla o grau de susceptibilidade do substrato ao ataque da enzima. Esse substrato é, a seguir, marcado com o corante "Cibracon-blue" por meio de ligações covalentes. A alfa-amilase age sobre esse substrato, hidrolizando-o e liberando produtos corados solúveis em água, que são filtrados e quantificados colorimetricamente.

Mathewson & Pomeranz (1979) otimizaram o teste com os tabletes de Phadebas, adequando as condições do teste para a determinação de alfa-amilase de cereais, ou seja, pH de 6,2 e temperatura de 60°C. Estes autores testaram igualmente um novo substrato, a amilose "Cibracon-blue" - C.B.A., que demonstrou aumentar a sensibilidade do método.

Segundo Mathewson et alii (1981), o método colorimétrico utilizando C.B.A. como substrato mostrou-se sensível às mudanças do conteúdo de alfa-amilase, aparentando ter um maior poder de padronização que os métodos viscométricos utilizando o viscoamilógrafo e o "falling number".

Mathewson & Pomeranz (1982) desenvolveram um instrumento comercial para a determinação colorimétrica de alfa-amilase, utilizando amido corado. O instrumento incorpora, em uma unidade simples, um controlador eletrônico de tempo e mistura e um espectrofotômetro de precisão. A configuração do equipamento possibilita extração da enzima e reação simultânea com o substrato, com subsequente filtração e leitura da absorbância dos produtos filtráveis da reação.

Barnes (1987) cita uma unidade de avaliação do grau de germinação em grãos de cereais baseada no uso do tablete de Phadebas. O procedimento é rápido e os resultados são expressos em termos de percentagem de grãos germinados na amostra. O pequeno tamanho da unidade e a rapidez de execução da análise tornam essa unidade compatível com a avaliação dos teores de grãos germinados em sistemas de estocagem de cereais.

3.6. Métodos viscosimétricos

Os métodos viscosimétricos são largamente utilizados na quantificação da alfa-amilase de origem de cereais ou microbiana.

Seu princípio baseia-se na medição do poder de liquefação da enzima, a qual é responsável pela redução da viscosidade de géis de amido (Shuey & Tipples, 1980).

Dois tipos de viscosímetros têm sido utilizados para a medição da viscosidade de pastas de amido:

a) viscosímetros capilares - nestes, a viscosidade é calculada com base no fluxo do líquido através de um capilar ou orifício de saída. Normalmente, a viscosidade das pastas é obtida a partir do tempo requerido para escoamento de um certo volume de líquido.

b) viscosímetros rotacionais - nestes, as medidas de viscosidade dependem do torque produzido em um disco ou cilindro pela pasta de amido submetida a aquecimento. Estes equipamentos são projetados para uso em pastas concentradas, estando a viscosidade subordinada à resistência dos grânulos de amido intumescidos ao cisalhamento e às propriedades tixotrópicas das pastas.

Para determinar o poder de liquefação do malte, Józsa & Gore (1930) utilizaram um método que relaciona o tempo de escoamento de uma pasta de amido através de uma pipeta encamisada com a quantidade de amido liquefeito pelo malte, nas condições de operação do método.

Tipples (1969) descreveu um método viscosimétrico para a determinação de alfa-amilase em pequenas amostras de trigo ou farinha que utiliza um viscosímetro em "U" para medir a queda da viscosidade de uma suspensão de amido gelatinizado de batata, incubada com um extrato de trigo ou farinha. A base do cálculo para

a determinação das unidades de alfa-amilase presentes na amostra é o inverso do tempo requerido para a queda da viscosidade a metade do valor original.

Sproessler (1984) cita um trabalho que utiliza um viscosímetro capilar, no qual se pode analisar as características de viscosidade e elasticidade de massas de farinha, ressaltando a influência das enzimas sobre a reologia de massas de panificação.

Dentre os métodos que utilizam viscosímetros rotacionais, o método amilográfico, que emprega o Viscoamilógrafo Brabender, é o mais largamente utilizado (D'Appolonia et alii, 1982; Dubois, 1983).

O Viscoamilógrafo Brabender consiste de um viscosímetro rotacional que registra, contínua e automaticamente, a resistência ao cisalhamento oferecida por uma suspensão de amido ou farinha, enquanto a temperatura da suspensão é aumentada a uma taxa constante de $1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Anker & Geddes, 1944; Shuey & Tipples, 1980).

O princípio de medição da atividade de alfa-amilase através do Viscoamilógrafo tem como base as alterações sofridas pela suspensão de amido ou farinha durante o aquecimento. Os grânulos de amido em suspensão sofrem um progressivo intumescimento com o aumento da temperatura da suspensão, devido ao conjunto de modificações na estrutura dos grânulos, que caracteriza o processo de gelatinização do amido. A gelatinização transforma a suspensão de amido em um gel, aumentando a viscosidade do meio.

A alfa-amilase, que já agia sobre o amido danificado mecanicamente presente na amostra, aumenta sua atividade sobre o amido gelatinizado, hidrolisando as ligações glicosídicas, causando rompimento dos grânulos intumescidos e conseqüente abaixamento da viscosidade. Assim, o aumento de viscosidade das suspensões de amido se opõe à ação de liquefação da alfa-amilase presente, sendo a viscosidade registrada no aparelho o resultado desses efeitos contrários.

No método amilográfico, a altura da curva no máximo de viscosidade é considerada como índice de atividade de alfa-amilase. Dessa forma, amostras com valores baixos de viscosidade máxima apresentam alta atividade de alfa-amilase, enquanto que altos valores de viscosidade máxima são característicos de amostras com baixa atividade de alfa-amilase (Anker & Geddes, 1944; Shuey & Tipples, 1980).

Tipples (1969) afirma que, embora a viscosidade amilográfica decresça com o aumento da atividade de alfa-amilase, a relação entre a viscosidade máxima e a atividade da enzima não é diretamente proporcional.

O método A.A.C.C. 22-10 (A.A.C.C., 1969) fornece as condições de obtenção das curvas amilográficas, utilizando o Viscoamilógrafo Brabender, sendo a atividade de alfa-amilase dada pela viscosidade máxima, em unidades amilográficas (U.A.), lida no pico da curva de viscosidade.

Esse método, segundo Shuey & Tipples (1980), é mais apropriado para a medição da atividade diastática de uma farinha,

a qual envolve a ação combinada da alfa e beta-amilases, bem como a susceptibilidade do amido ao ataque enzimático. Como a quantidade de beta-amilase é, em geral, suficientemente alta e a susceptibilidade do amido considerada razoavelmente constante, a atividade diastática medida no aparelho torna-se dependente, principalmente, da atividade da alfa-amilase.

Farinhas derivadas de trigos colhidos em condições adequadas de temperatura e umidade normalmente apresentam altos picos de viscosidade, geralmente, na ordem de 2000 U.A., enquanto que aquelas provenientes de trigos que sofreram algum processo germinativo, apresentam viscosidades máximas em torno de 100 U.A. (Shuey & Tippler, 1980).

Segundo os autores, valores de viscosidade máxima de farinhas em torno de 475 a 625 U.A. são adequados para uso em processos de panificação convencionais; entre 252 e 600 U.A., para processos de panificação contínuos; e, entre 700 a 800 U.A., para uso na produção de biscoitos tipo "cracker".

Devido às temperaturas empregadas no método amilográfico, a atividade da alfa-amilase de origem fúngica não pode ser determinada, em face da quase total inativação da enzima que ocorre antes que a faixa de gelatinização do amido de trigo seja atingida (Pomeranz & Shellenberger, 1962; Dubois, 1983). Os autores mostraram, entretanto, que a alfa-amilase fúngica apresenta uma ação de liquefação sobre o amido pré-gelatinizado no Viscoamilógrafo e sugerem este princípio como base de estimativa da alfa-amilase de várias preparações da enzima fúngica.

Ranum et alii (1978), com base no trabalho de Pomeranz & Shelleberger (1962), sugeriram um método amilográfico modificado para determinação da alfa-amilase fúngica, utilizando como substrato uma pasta de farinha de trigo (30%) e amido de trigo pré-gelatinizado (70%). O amilograma modificado apresentou um mínimo de viscosidade, valor este inversamente proporcional à quantidade de enzima adicionada.

Além do método amilográfico, foi desenvolvido outro método viscosimétrico para determinação da atividade de alfa-amilase, com base no mesmo princípio de medida. O método utiliza o equipamento denominado "Ottawa Starch Viscometer" - O.S.V. (Paton & Voisey, 1977). O O.S.V. foi desenvolvido para eliminar algumas das dificuldades encontradas no Viscoamilógrafo, tais como a quantidade de amostra requerida, o tempo de análise, a taxa de transferência de calor para a pasta, e a configuração do sistema de agitação e do recipiente em que se encontra a pasta.

Da mesma forma, a necessidade de um método rápido e simples de determinação da atividade de alfa-amilase, em termos de equipamento e operação, levou ao desenvolvimento de outro método viscosimétrico, o método de "falling number" (número de queda) que, juntamente com o método amilográfico, constituem os dois métodos mais comumente utilizados atualmente para a determinação da atividade de alfa-amilase (Hagber, 1960; Doty, 1981; Dubois, 1983).

O método apresenta entre outras vantagens a de possibilitar a avaliação da atividade de alfa-amilase em trigo, utilizando trigo integral ou farinha de trigo como substrato, além

de poder avaliar a atividade de alfa-amilase presente em extratos de malte (Hagberg, 1960; Perten, 1964; Medcalf et alii, 1966).

O método de "falling number" baseia-se na rápida gelatinização de uma suspensão de farinha e subsequente medida da degradação de géis de amido pela ação da alfa-amilase. A atividade da enzima é medida pelo "número de queda", definido como o tempo requerido para agitar e permitir que o agitador caia, por uma distância determinada, através do gel de amido aquecido que está sofrendo a ação de liquefação da enzima (Perten, 1964; Mailhot, 1980).

De acordo com Perten (1964), o método de "falling number" determina a atividade de alfa-amilase em condições similares às encontradas durante o cozimento do pão, pois o amido supera o ponto crítico de temperatura para atividade da alfa-amilase de cereais quase no mesmo tempo registrado durante o cozimento.

Os valores de "falling number" são inversamente proporcionais à atividade de alfa-amilase. Assim, valores elevados de "falling number" são característicos de amostras com baixo teor de alfa-amilase enquanto valores baixos representam amostras com alto teor de enzima, resultando uma relação curvilínea entre os valores de quantificação e o teor de enzima na amostra (Medcalf et alii, 1968).

O método A.A.C.C. 56-81B (A.A.C.C., 1972) fornece as condições de determinação do "falling number", utilizando o equipamento de mesmo nome, sendo a atividade de alfa-amilase dada

pelo tempo de queda, em segundos, do agitador através do gel de amido.

Valores de "falling number" em torno de 250 segundos são típicos de farinhas para pão com níveis adequados de alfa-amilase. Em farinhas com pouca ou nenhuma atividade de alfa-amilase, o amido não é atacado pela enzima, resultando altos valores, excedendo 450 ou 500 segundos. Ao contrário, a excessiva atividade da enzima resulta em valores muito baixos, inferiores a 150 segundos.

Nos Estados Unidos, a legislação especifica valores de "falling number" entre 200 e 300 segundos para farinhas para panificação e entre 175 e 350 segundos para farinhas para uso doméstico (Greenaway & Neustadt, 1967; Patterson & Crandall, 1967).

Da mesma forma que o método amilográfico, o método de "falling number" não pode detectar a presença de alfa-amilase de origem fúngica, devido à baixa termoestabilidade dessa enzima. Foi então desenvolvido um método denominado "falling number" modificado, realizado a 30°C, que substitui metade da amostra por amido pré-gelatinizado (Pertin, 1984).

Ross et alii (1987) desenvolveram um novo método para determinação do dano causado pela germinação ("sprouting") do trigo com base no mesmo princípio de "falling number". O equipamento utilizado nesse método é denominado de "Rapid Visco-Analyser" e foi desenvolvido visando acelerar e simplificar os ensaios de quantificação.

Cabe salientar que os métodos amilográfico e de "falling number" são os mais comumente utilizados em moinhos e indústrias de

transformação de farinha de trigo (D'Appolonia et alii, 1982; Dubois, 1983) e, segundo Marchylo & Kruger (1978), consistem nos mais sensíveis dentre os métodos disponíveis para a determinação da atividade de alfa-amilase.

Segundo Paton & Voisey (1977), o método de "falling number" é um tanto impreciso, só permitindo a discriminação entre valores altos e baixos de atividade de alfa-amilase.

Corn & Spillane (1969), estudando farinhas de trigo irlandês, encontraram uma relação de pequeno grau de significância entre os valores de "falling number" e os de viscosidade máxima amilográfica, demonstrando que esses métodos não podem ser considerados alternativas equivalentes para a predição do comportamento amilolítico, mesmo em baixos teores de atividade de alfa-amilase.

Entretanto, o trabalho de D'Appolonia et alii (1982), em que foram realizadas experimentos com trigos americanos, evidenciou a existência de uma relação significativa entre os dois métodos.

De acordo com Dubois (1983), os dois métodos são mais complementares do que concorrentes. O método de "falling number" é, evidentemente, mais rápido e melhor adaptado às determinações em série, apresentando ainda a vantagem de poder ser aplicado diretamente na amostra de trigo moído. Isto permite calcular as misturas de farinhas necessárias à correção de farinhas hipodiatáticas. Entretanto, o método amilográfico é usado preferencialmente em moinhos por ser melhor adaptado ao controle das farinhas por ocasião da moagem.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1. Matéria-prima

Farinha de trigo comum produzida pela Rações Anhanguera, Duratex S/A, foi utilizada como padrão. As demais farinhas de trigo utilizadas, escolhidas dentre as existentes no Laboratório de Cereais do Departamento de Tecnologia de Alimentos, eram de diversas procedências: Moinho São Jorge, Moinho Santista, Marca Dona Benta.

O malte empregado foi obtido pela moagem de grãos de cevada maltada, produzindo uma farinha de granulometria inferior a 100 mesh. A cevada maltada, de procedência européia, e utilizada em cervejaria, foi adquirida do Sr. Flávio Lorena, Rua Piragibe 362, Campinas.

1.2. Reagentes

Foram utilizados reagentes com o grau de pureza requerido pelo método de análise química.

1.3. Equipamentos

Além dos aparelhos e equipamentos comuns de laboratório, foram também utilizados os seguintes:

- Moinho Brabender, modelo Quadrumat Senior.
- Centrífuga Fanem, modelo 204 - NR.
- Estufa Fanem, modelo 320 - 1, com circulação forçada de ar.
- Banho-maria Biomatic, modelo 1050, com controle de temperatura.
- Manta-térmica Fisatom, modelo 102.
- Agitador Fisatom, modelo 713, com controle de velocidade.
- Viscoamilógrafo Brabender, modelo 801300.
- Sistema de "Falling Number", Falling Number, modelo RT.
- Equipamento-teste.

2. Métodos Analíticos

2.1. Composição centesimal

As análises de composição centesimal foram determinadas segundo os métodos da A.A.C.C. (1969), sendo a umidade, determinada pelo método 44-15A; a proteína, determinada pelo método 46-12, utilizando-se o valor 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína bruta; a gordura, determinada, após extração em Soxhlet, pelo

método 30-25 modificado e as cinzas, determinadas pelo método 08-01. As fibras foram determinadas pelo método proposto por Van de Kamer & Van Ginkel (1952) e os carboidratos, determinados por diferença.

2.2. Determinação das propriedades amilográficas da farinha de trigo

As propriedades de pasta foram determinadas através do Viscoamilógrafo Brabender, com cabeçote regulado para sensibilidade de 700cm.g. Uma quantidade equivalente a 80g (14% b.u.) de farinha de trigo foi misturada a 450ml de solução tampão de fosfato de sódio e ácido cítrico. A seguir, a suspensão foi aquecida a uma taxa de 1,5°C por minuto, a partir de 25°C até a temperatura de 95°C, sendo, posteriormente mantida nesta temperatura durante 20 minutos. Em seguida, a pasta foi resfriada gradativamente (1,5°C por minuto) até a temperatura de 50°C. Durante todo o procedimento, a pasta foi agitada a 75rpm. Do amilograma obtido foram determinados os seguintes parâmetros:

- Temperatura de pasta: temperatura na etapa de aquecimento, em °C, na qual ocorre o primeiro aumento de 10 unidades amilográficas (U.A.) na viscosidade de pasta.

- Viscosidade máxima: valor máximo da viscosidade da pasta, em U.A., na etapa de aquecimento.

- Temperatura de viscosidade máxima: temperatura, em °C, correspondente ao ponto de viscosidade máxima.

- Viscosidade mínima a 95°C: valor mínimo da viscosidade da pasta, em U.A., na etapa de temperatura constante.

- Viscosidade a 50°C: valor da viscosidade da pasta, em U.A., no final do período de resfriamento.

2.3. Determinação da atividade diastática da farinha de trigo com o viscoamilógrafo

A atividade diastática da farinha de trigo foi avaliada segundo o método 22-10 da A.A.C.C. (1969). Cabe salientar que essa medida reflete, principalmente, a atividade da alfa-amilase da farinha, tendo em vista que a quantidade de beta-amilase presente e a susceptibilidade do amido de trigo são razoavelmente constantes (Shuey & Tipples, 1980).

2.4. Determinação do "falling number" da farinha de trigo

A determinação do "falling number" foi realizada segundo o método 56-18B da A.A.C.C. (1969).

2.5. Determinação da alfa-amilase do malte

A atividade da alfa-amilase presente no malte foi determinada, através da avaliação do poder dextrinogênico da enzima, segundo o método 22-01 da A.A.C.C. (1969).

3. Métodos Experimentais

3.1. Preparação da amostra

As amostras de farinha, nas quais foi determinada a atividade da alfa-amilase, foram dispersas em água destilada, numa concentração de 10% (14% b.u.). O processo de gelatinização dessas amostras, antes de sua introdução no equipamento-teste desenvolvido para a quantificação de alfa-amilase, foi realizado de duas maneiras:

- Gelatinização da amostra utilizando o dispositivo de aquecimento/ agitação do Viscoamilógrafo: uma quantidade de farinha equivalente a 51,11g (14% b.u.) foi adicionada a 460 ml de água destilada. A suspensão foi aquecida a uma taxa de 1,5°C por minuto, de 25°C a 95°C, sob agitação de 75rpm.

- Gelatinização da amostra utilizando o banho-maria: uma quantidade de farinha equivalente a 22,22g (14% b.u.) foi adicionada a 200 ml de água destilada, em bequer de 250ml. O recipiente com a suspensão foi imerso em um banho-maria com uma solução aquosa saturada com 17% de cloreto de sódio em ebulição. A suspensão foi aquecida de 25°C a 95°C, em 27 minutos, conforme o perfil de temperatura mostrado na Tabela 2. A agitação da amostra foi realizada com um agitador com velocidade variável, adaptado para as condições de operação, sendo igual a 300 rpm nos primeiros 30 segundos e de cerca de 180 rpm no restante do tempo de

Tabela 2 - Perfil de temperatura da suspensão de farinha em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada de cloreto de sódio.

Tempo (min)	Temperatura (°C)
0	25
5	30
10	43
15	59
20	75
25	89
27	95

preparação da amostra. A Figura 3 mostra um esquema do dispositivo de banho-maria empregado.

A adição de malte às amostras de farinha-padrão foi realizada calculando-se as percentagens sobre a massa seca da amostra de farinha.

3.2. Determinação da atividade de alfa-amilase no equipamento-teste.

Para determinar a atividade da alfa-amilase em farinhas de trigo, foi desenvolvido um equipamento, denominado equipamento-teste. A descrição detalhada desse equipamento e a metodologia experimental empregada no seu estudo são apresentadas a seguir.

3.2.1. O equipamento-teste

O equipamento-teste para quantificação da atividade da alfa-amilase consta, basicamente, de um recipiente encamisado com água em ebulição e provido de um sistema de descarga, constituído de um tubo de vidro onde se encontra uma torneira, que torna possível escoar uma suspensão de amido gelatinizado por um determinado tempo (Figura 4).

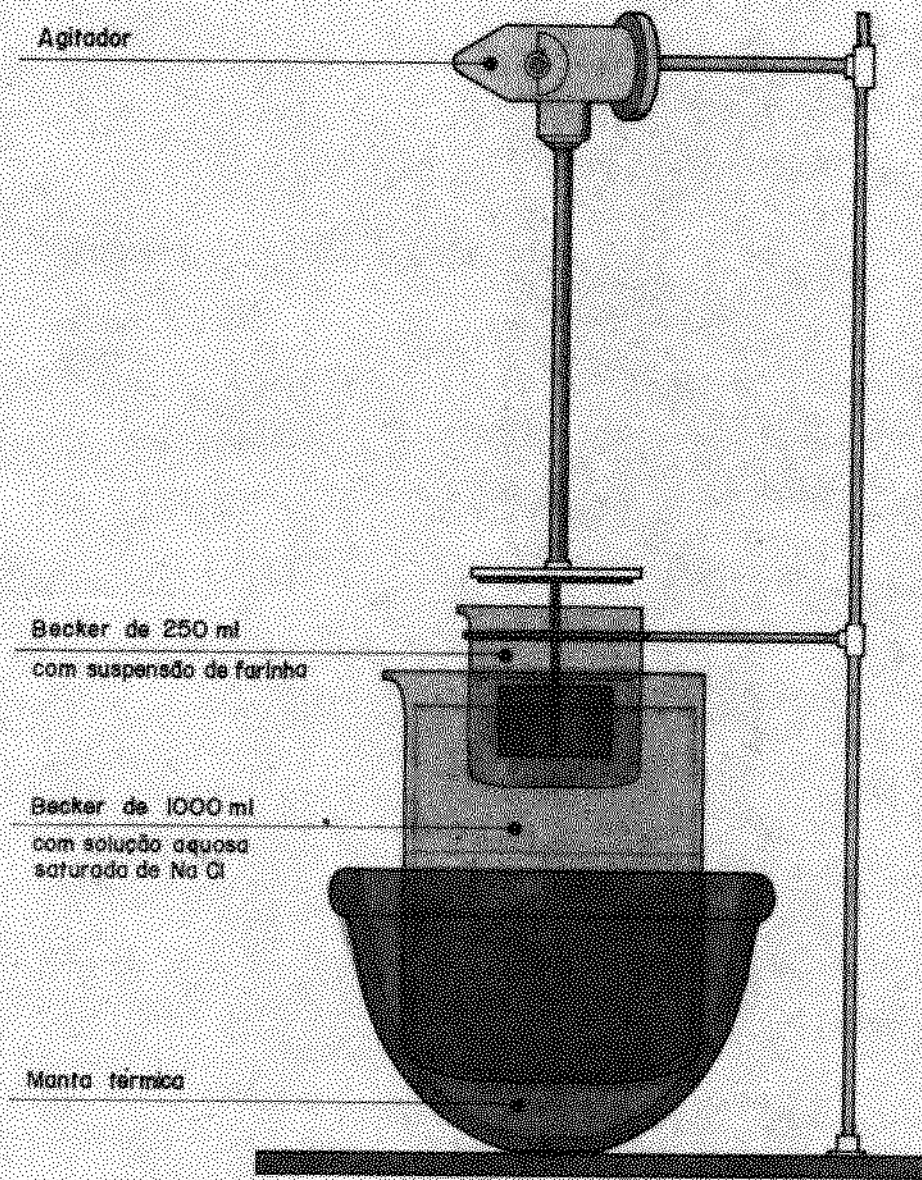


Figura 3 - Esquema do dispositivo de preparação de amostras em banho-maria com solução aquosa saturada de cloreto de sódio.

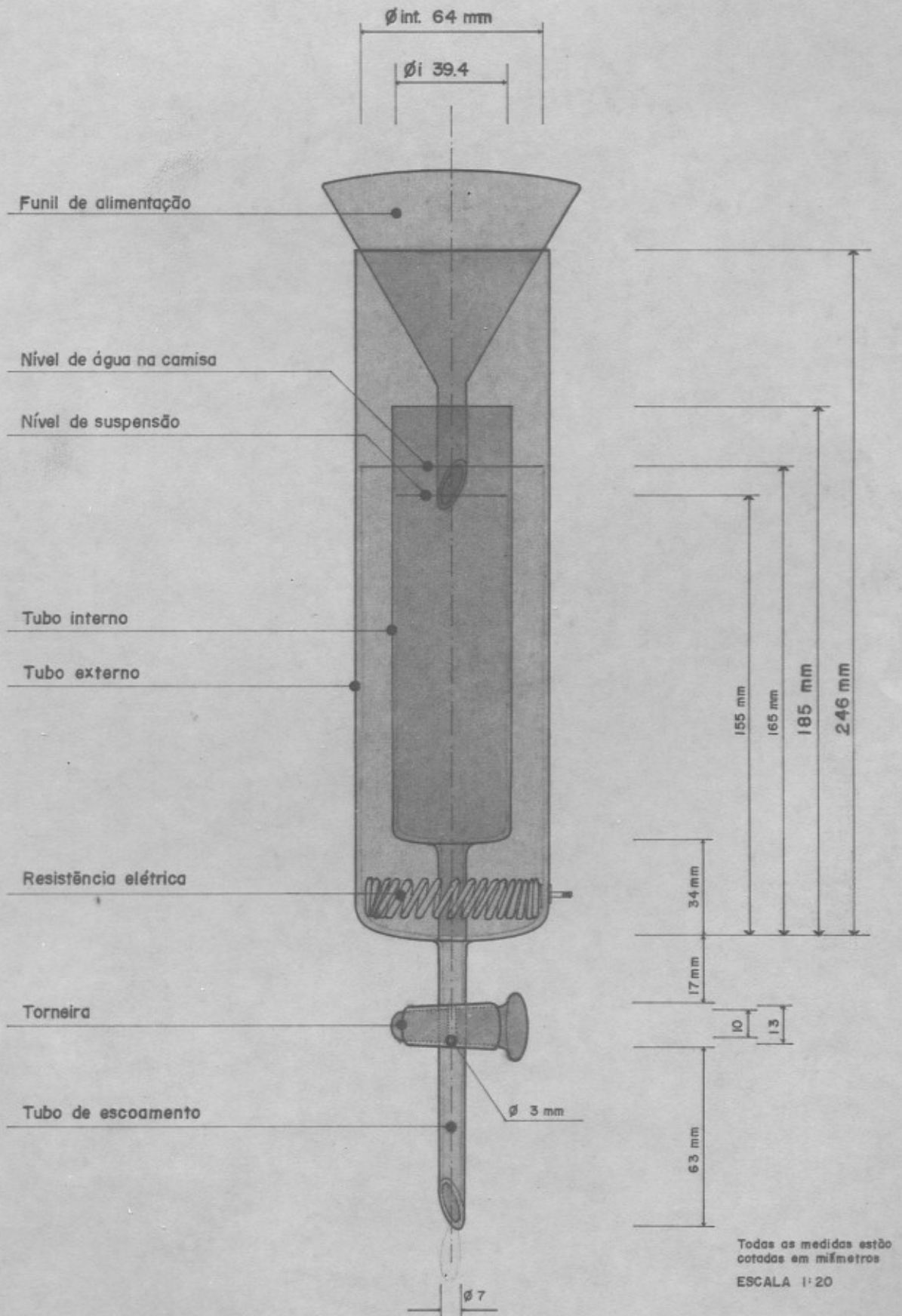


Figura 4- Esquema do equipamento-teste para determinação da atividade de alfa-amilase em farinha de trigo.

O dispositivo é constituído de dois tubos de vidro concêntricos. O tubo exterior constitui a camisa, onde um volume de 325 ml de água é levado à temperatura de ebulição, através de uma resistência elétrica. O tubo interior constitui o recipiente onde são introduzidas as suspensões de farinha previamente gelatinizadas, a uma temperatura de 95°C, preparadas conforme descrito no item 3.1. Foi utilizado um funil de vidro para facilitar a transferência de um volume de 158ml de amostra. Esta suspensão permanece no tubo interior do equipamento por 1 minuto em contato com a camisa de água em ebulição, para permitir a estabilização da temperatura. A suspensão é então liberada pela abertura da torneira por um determinado período de tempo, e coletada em uma proveta graduada, colocada junto à saída do tubo de escoamento.

O volume de suspensão coletado na proveta é usado como índice de determinação da atividade da alfa-amilase em farinha de trigo.

3.2.2. Metodologia experimental

A metodologia experimental desenvolvida para a determinação da atividade da alfa-amilase, através do equipamento-teste, baseou-se nas seguintes etapas:

- Determinação das variáveis de operação do equipamento-teste, ou seja, a concentração de malte adicionado à farinha de

trigo padrão, a concentração de farinha de trigo na suspensão e o tempo de escoamento da suspensão de farinha de trigo.

- Determinação da equação que relaciona a concentração de alfa-amilase na farinha com o volume de escoamento obtido no equipamento-teste, nas condições ideais de operação.

- Avaliação do desempenho do equipamento-teste na determinação da atividade da alfa-amilase em farinha de trigo, comparando-o com outros dois tipos de métodos viscosimétricos, o método amilográfico e o método de "falling number".

3.2.3. Análise estatística

A análise estatística desenvolvida no trabalho foi utilizada com o objetivo determinar os parâmetros experimentais e avaliar o desempenho do equipamento-teste em estudo.

3.2.3.1. Determinação da atividade da alfa-amilase

A atividade da alfa-amilase na farinha de trigo foi determinada com emprego da técnica de superfície de respostas. Esta técnica pode ser definida como um método estatístico que usa dados quantitativos e planos experimentais apropriados para determinar e resolver equações polinomiais (Giovani, 1983).

A técnica de superfície de respostas descreve o comportamento de um sistema no qual estão sendo combinados k fatores (ou variáveis independentes) em um experimento. A resposta (ou variável dependente) poderá ser uma função dos níveis nos quais estes fatores são combinados. Em notação matemática pode-se escrever:

$$Y = (X_1, X_2 \dots\dots\dots X_k),$$

onde : Y = função resposta
 $X_1 \dots\dots X_k$ = fatores.

O polinômio quadrático completo para o caso de três variáveis pode ser escrito como segue:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3$$

Plano experimental

O experimento foi projetado para verificar a relação entre a atividade da alfa-amilase presente na farinha e o tempo de escoamento obtido no equipamento-teste, operado em condições ideais.

O plano experimental empregado é um tipo padrão em superfície de respostas denominado central composto e é constituído por um fatorial 2^k , onde k é igual ao número de variáveis do

experimento, com adição de pontos axiais e de um ponto central, no qual são realizadas replicações (Myers, 1971).

As variáveis utilizadas no modelo, definidas após trabalhos preliminares, são: a concentração de malte adicionada à farinha-padrão, a concentração da farinha-padrão na suspensão e o tempo de escoamento da suspensão contida no equipamento-teste. A função resposta é representada pelo volume de suspensão coletado no equipamento-teste.

Os planos experimentais são tabelados. Por conveniência, as tabelas listam os níveis da parte fatorial em níveis codificados 1 ou -1. O ponto central é, portanto, zero; a parte externa é codificada u e $-u$, onde u é dado na Tabela 3. Escolhidos os pontos mínimo e máximo de cada variável no experimento, atribuem-se a esses pontos correspondência com $-u$ e u , respectivamente. A partir daí, uma simples transformação linear fornece as correspondências experimentais aos pontos fatoriais e ao ponto central.

A resposta é expressa como uma função dos fatores, em geral um polinômio completo do segundo grau. Planos experimentais determinam as combinações de níveis dos fatores para as provas. Os planos são calculados para proporcionar alguma propriedade estatística (em nosso caso, variância uniforme e distância constante do centro do experimento).

Tabela 3 - Valores dos fatores experimentais.

Variáveis	Níveis				
	-u	-1	0	1	u
Concentração de malte (%)	0,16	0,29	0,48	0,67	0,80
Concentração de farinha- padrão (%; 14% b.u.)	9,0	9,6	10,5	11,4	12,0
Tempo de escoamento da suspensão (s)	10,0	11,0	12,0	13,0	14,0

As variáveis independentes (fatoriais) foram combinadas como mostra a Tabela 4. As 20 provas experimentais foram aleatorizadas, sendo 8 fatoriais, 6 axiais e 6 centrais. As repetições no ponto central permitiram a estimativa da variabilidade.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do sistema SAS (SAS Institute, Cary, NC, EUA), em microcomputador compatível com IBM PC-XT.

3.2.3.2. Determinação das condições ideais de operação

As condições de operação estudadas com o objetivo de otimizar o desempenho do equipamento-teste de quantificação da alfa-amilase foram: a concentração da suspensão de farinha e o tempo de escoamento dessa suspensão. As demais condições foram estabelecidas experimentalmente a partir das características de construção do aparelho.

Ambas as condições de operação estudadas foram determinadas durante o desenvolvimento da análise estatística empregada para obtenção da atividade da alfa-amilase em função do volume coletado no equipamento-teste.

Tabela 4 - Delineamento estatístico genérico para 3 variáveis (Plano Central Composto Rotacionável).

Número de experimentos	Variáveis		
	Concentração de malte	Concentração de farinha-padrão	Tempo de escoamento
01	-1	-1	-1
02	-1	-1	1
03	-1	1	-1
04	-1	1	1
05	1	-1	-1
06	1	-1	1
07	1	1	-1
08	1	1	1
09	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	-u	0	0
16	u	0	0
17	0	-u	0
18	0	u	0
19	0	0	-u
20	0	0	u

3.2.3.3. Avaliação do desempenho do equipamento-teste

A avaliação do desempenho do equipamento-teste na quantificação da atividade da alfa-amilase foi realizada frente a dois outros métodos viscosimétricos, o método amilográfico e o método de "falling number".

Foram realizados dois tipos de provas para calibração do equipamento-teste. No primeiro teste, foram utilizadas amostras de farinha de trigo padrão com diferentes teores de alfa-amilase, obtidos pela adição de quantidades variáveis de malte. As concentrações de malte usadas variaram de 0,04% a 0,94%, com intervalos de 0,07%, com base no peso de farinha (b.s.). Cada amostra assim obtida era submetida aos três métodos de quantificação. Esses testes foram considerados testes-padrão, uma vez que a quantidade de alfa-amilase presente nas amostras era bem definida, permitindo a comparação dos resultados de quantificação encontrados e a quantidade real da enzima contida nas amostras.

No segundo teste, farinhas comerciais com diferentes teores de alfa-amilase foram analisadas por meio dos três métodos de quantificação.

Nos dois testes, a avaliação aproximada das relações entre as respostas dos três métodos de quantificação de alfa-amilase foram realizadas através de ajustes dos modelos quadráticos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização da Matéria-Prima

1.1. Composição centesimal da farinha de trigo padrão

A composição centesimal da farinha de trigo padrão utilizada para realização do presente trabalho está apresentada na Tabela 5. Os dados obtidos indicam que esta farinha pode ser considerada, quanto à composição química, como representante da média encontrada para as farinhas de trigo utilizadas no Brasil.

1.2. Propriedades amilográficas da farinha de trigo padrão

As propriedades amilográficas da farinha de trigo padrão utilizada estão apresentadas na Tabela 6. Os valores encontrados estão situados dentro das faixas consideradas normais para uma farinha de trigo com baixo teor de alfa-amilase, como pode ser observado nos resultados encontrados por Diaz et alii (1980). Os valores de viscosidade máxima (620 U.A.) e de viscosidade mínima a 95°C (260 U.A.), principalmente, são próximos dos encontrados para a farinha de trigo argentino, que foram de 650 e de 380 U.A., respectivamente.

Tabela 5 - Composição centesimal da farinha de trigo padrão*.

Componente	%
Umidade	12,54
Proteína	11,39
Gordura	1,71
Cinzas	0,65
Fibras	0,52
Carboidratos	73,19

* Resultados expressos em base úmida.

Tabela 6 - Propriedades amilográficas da farinha
de trigo padrão.

Temperatura de pasta	61,0 °C
Viscosidade máxima	620 U.A.
Temperatura de viscosidade máxima	86,5 °C
Viscosidade mínima a 95 °C	260 U.A.
Viscosidade a 50 °C (etapa de resfriamento)	650 U.A.

1.3. Atividade da alfa-amilase da farinha de trigo padrão

A atividade da alfa-amilase da farinha de trigo padrão foi avaliada através do método amilográfico e do método de "falling number". Os valores encontrados para a viscosidade máxima amilográfica e o "falling number" foram superiores a 1000 U.A. e igual a 385 segundos, respectivamente. Os valores obtidos estão acima das faixas ideais de viscosidade máxima e de "falling number" recomendadas pela literatura para uma farinha de trigo adequada para panificação por métodos convencionais, que são de 475 a 625 U.A. e de 200 a 300 segundos, respectivamente (Shuey & Tipples, 1980; Patterson & Crandall, 1967).

Assim, constatou-se a baixa atividade da alfa-amilase na farinha-padrão e a necessidade de suplementação com uma fonte externa como forma de adequação dessa farinha para obtenção da maior parte dos produtos de panificação.

1.4. Atividade da alfa-amilase do malte

A alfa-amilase utilizada no presente trabalho apresentou uma atividade de 73 SKB, determinada através da avaliação do poder dextrinogênico da enzima, valor este característico de malte utilizado em cervejaria.

2. Determinação da Atividade da Alfa-Amilase no Equipamento Teste

Para determinação da relação existente entre a atividade da alfa-amilase na farinha e os resultados obtidos no equipamento-teste, foi desenvolvida uma equação que relaciona o volume de suspensão coletado com a concentração de alfa-amilase adicionada à farinha. Para tal, determinaram-se primeiramente as faixas de variação dos parâmetros de operação do equipamento-teste.

Após, foram determinadas as relações entre os resultados de quantificação da alfa-amilase no equipamento-teste e nos métodos amilográfico e de "falling number".

2.1. Determinação das faixas de variação dos parâmetros de operação do equipamento-teste

Os parâmetros de operação do equipamento-teste estudados foram a concentração de malte adicionada à farinha, a concentração de farinha na suspensão e o tempo de escoamento da suspensão. As faixas de variação dessas variáveis foram determinadas experimentalmente a partir do equipamento-teste projetado. Esses valores estão apresentados na Tabela 7.

O intervalo de variação da concentração de malte adicionado à farinha de trigo padrão estudada foi determinada através dos resultados obtidos nos testes preliminares usando o Viscoamilógrafo Brabender. Foram determinados as quantidades

Tabela 7 - Valores mínimo e máximo das variáveis do equipamento-teste.

Variáveis do equipamento-teste	Valor mínimo	Valor máximo
Concentração de malte adicionado à farinha (%)	0,16	0,80
Concentração de farinha na suspensão (%; 14% bu)	9,0	12,0
Tempo de escoamento da suspensão (s)	10,0	14,0

máxima e mínima de alfa-amilase que, quando adicionados à farinha-padrão, originaram curvas de viscosidade com picos entre 200 e 1000 U.A., respectivamente. Assim, em uma primeira etapa, os níveis mínimo e máximo de concentração de malte foram fixados em 0,04 e 0,94 %. Valores de concentração abaixo de 0,04 % produziram curvas amilográficas com picos que ultrapassaram a escala do registrador do aparelho (1000 U.A.), não podendo dessa forma serem determinados. Valores de concentração de malte de 0,65 a 0,94% apresentaram resultados bastante próximos, demonstrando a falta de sensibilidade do aparelho nessa faixa de viscosidade.

Com o desenvolvimento da análise estatística, observaram-se melhores resultados quando os níveis mínimo e máximo foram fixados entre 0,16 e 0,80 %, respectivamente, passando-se então a adotar essas faixas de valores para a concentração de malte nos experimentos.

Os níveis mínimo (9,0 %) e máximo (12,0 %) para a concentração de farinha na suspensão testada no equipamento-teste foram determinados após testes preliminares. Esses níveis permitiram a obtenção de suspensões com fluidez adequada ao escoamento, em todos os níveis de concentração de alfa-amilase utilizados nos experimentos.

Foram fixados como limites mínimo e máximo para o tempo de escoamento os valores de 10 e 14 segundos, respectivamente. Esses valores de tempo garantiram volumes coletados dentro da faixa de variação da concentração de malte utilizada no experimento.

2.2. Determinação da relação entre a atividade da alfa-amilase e o volume de suspensão coletado

Tendo como base os intervalos de variação dos parâmetros do equipamento-teste, estabelecidos em 3.1., foi realizado o estudo estatístico utilizando o plano central composto rotacionável à precisão uniforme (Tabela 4). Os resultados experimentais, que determinaram o volume de suspensão coletado no equipamento-teste em função dessas variáveis, estão apresentados na Tabela 8.

A partir desses resultados, procedeu-se à análise estatística, através dos ajustes de modelos quadráticos. A função quadrática foi escolhida por ser a mais simples que permitia estimativas de máximos e mínimos. Os modelos foram avaliados através de extensa análise de resíduos.

Com o desenvolvimento da análise concluiu-se, através de um teste F, que o efeito da variação dos valores da concentração da farinha na suspensão, na faixa utilizada, era negligível, sendo, então essa variável retirada do modelo.

A equação encontrada para relacionar o volume de escoamento obtido no equipamento-teste com a concentração de malte adicionado à farinha é apresentada a seguir:

Tabela 8 - Matriz experimental utilizada pelo modelo estatístico adotado e resultados obtidos.

Concentração de malte (%)	Concentração de farinha-padrão (%)	Tempo de escoamento (s)	Volume de suspensão coletado (ml)
0,29	9,6	11,0	70
0,29	9,6	13,0	83
0,29	11,4	11,0	67
0,29	11,4	13,0	82
0,67	9,6	11,0	87
0,67	9,6	13,0	96
0,67	11,4	11,0	82
0,67	11,4	13,0	95
0,48	10,5	12,0	88
0,48	10,5	12,0	83
0,48	10,5	12,0	83
0,48	10,5	12,0	84
0,48	10,5	12,0	85
0,48	10,5	12,0	83
0,16	10,5	12,0	59
0,80	10,5	12,0	92
0,48	9,0	12,0	90
0,48	12,0	12,0	88
0,48	10,5	10,0	76
0,48	10,5	14,0	106

$$VOLET = B_0 + B_1 T + B_2 CONC + B_{11} T^2 + B_{22} CONC^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

VOLET = volume de suspensão coletado, em ml

T = tempo de escoamento da suspensão, em segundos

CONC = concentração de malte adicionada à farinha, em %

$$e: B_0 = 149,85$$

$$B_1 = - 24,99$$

$$B_2 = 140,46$$

$$B_{11} = 1,33$$

$$B_{22} = - 100,77.$$

A equação ajustada (Eq. 1) apresentou coeficiente de correlação múltiplo de 0,95 (proporção de variação explicada pelo modelo).

A análise estatística utilizada para determinação da equação encontra-se detalhada no Anexo 1.

Como o objetivo do trabalho era determinar a concentração de malte na farinha a partir dos resultados de quantificação obtidos no equipamento-teste, procedeu-se à inversão da Equação 1, obtendo-se a concentração de malte na farinha (CONC) em função do volume de escoamento (VOLET) e do tempo de escoamento (T), como mostra a equação a seguir:

$$B_{22} CONC^2 + B_2 CONC + B_0 + B_1 T + B_{11} T^2 - VOLET = 0 \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:

$$\text{CONC} = \frac{-B_2 + [B_2^2 - 4B_{22} (B_0 + B_1T + B_{11}T^2 - \text{VOLET})]^{1/2}}{2B_{22}}$$

(Eq. 3)

2.3. Determinação da concentração da suspensão e do tempo de escoamento no equipamento-teste.

As seguintes variáveis de operação do equipamento-teste foram fixadas através de testes preliminares e utilizadas durante os experimentos (apresentadas em 3.2.1.):

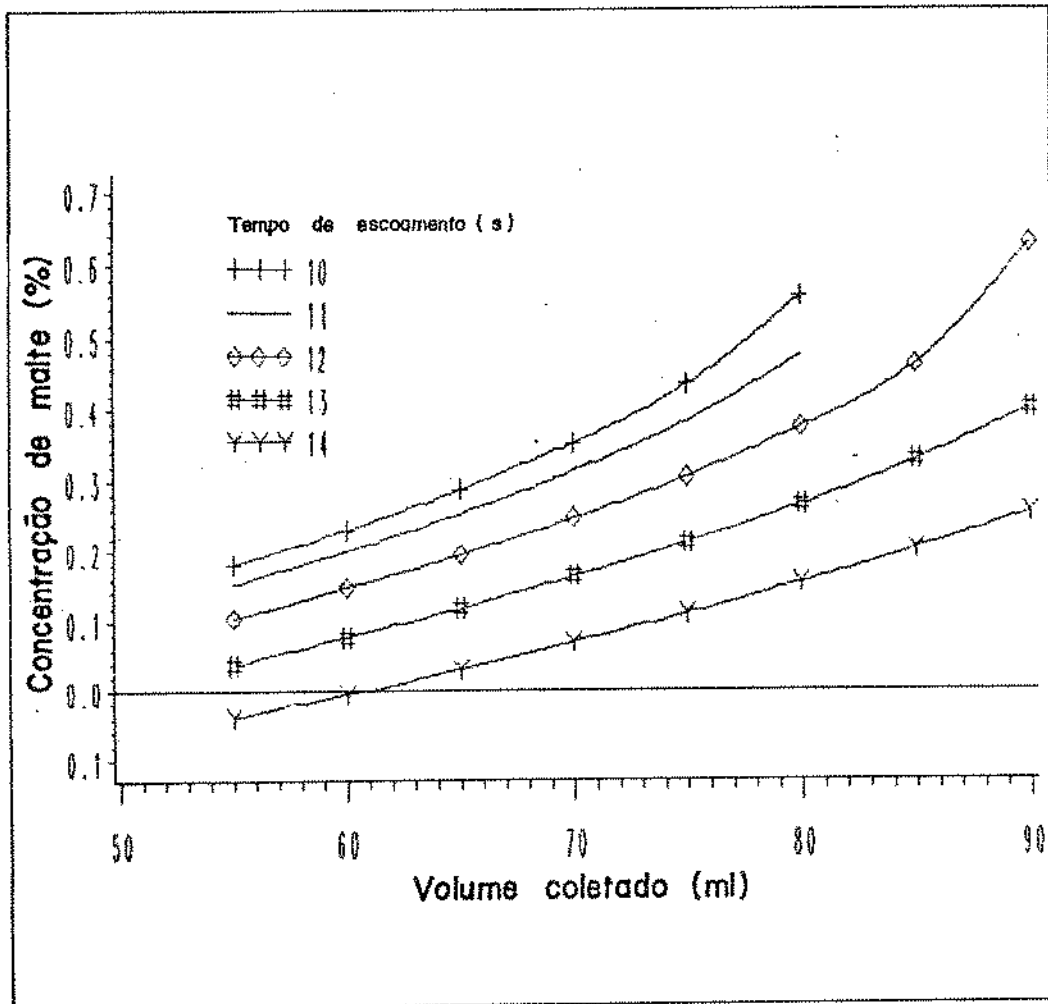
- volume de água na camisa do equipamento-teste (325 ml),
- volume da suspensão de farinha (158 ml),
- temperatura da água na camisa do equipamento-teste (em ebulição),
- temperatura da suspensão de farinha (95°C).

As variáveis operacionais relativas à concentração e ao tempo de escoamento da suspensão de farinha foram estabelecidas pela equação que relaciona estas variáveis com a concentração de malte adicionado à farinha-padrão (Eq. 3).

Observou-se que a concentração da farinha de trigo padrão não mostrou influência estatisticamente significativa na resposta do aparelho. Adotou-se, então, um único valor para essa variável para ser utilizado no experimento. Esse valor foi escolhido em 10% (14% bu), arbitrariamente, por ser um ponto intermediário dentro da faixa de variação desse parâmetro nos experimentos preliminares.

A Figura 5 representa curvas de concentração de malte adicionado em função dos volumes de suspensão coletados para valores de tempo de escoamento de 10, 11, 12, 13 e 14 segundos, obtidas a partir da Equação 3. Para valores de tempo de escoamento iguais a 10 e 11 segundos, não foi possível a obtenção de valores de concentração de malte para volumes coletados maiores que 79ml. Para tempo de escoamento igual a 14 segundos, foram encontradas estimativas negativas de concentração de malte em valores de volume coletado inferiores a 61ml. Quando substituídos na Equação 3, observou-se que valores de 12 e 13 segundos apresentaram resultados dentro da faixa de concentração de malte em estudo (0,04 a 0,80%) e no intervalo de volumes coletados obtidos através dessa equação. O valor médio de 12 segundos foi escolhido como condição ótima de operação do equipamento-teste.

Figura 5: Curvas de concentração de malte (%) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) em função de diferentes tempos de escoamento (s).



Assim, para um tempo de escoamento de 12 segundos, obtém-se para a Equação 3:

$$\text{CONC} = \frac{-B_2 + [B_2^2 - 4B_{22}(B_0 + 12B_1 + 144B_{11} - \text{VOLET})]^{1/2}}{2B_{22}}$$

(Eq. 4)

e substituindo os valores de B:

$$\text{CONC} = \frac{-140,46 + (36452,80 - 403,08\text{VOLET})^{1/2}}{-201,54}$$

(Eq. 5)

onde:

CONC = concentração de malte adicionado à farinha, em %

VOLET = volume de suspensão coletado, em ml.

A Equação 5 possibilita conhecer a concentração de alfa-amilase presente na farinha de trigo com base apenas nas medidas de volume de suspensão coletado através do uso do equipamento-teste desenvolvido.

2.4. Determinação das relações entre o equipamento-teste e os métodos amilográfico e de "falling number"

Para determinação das relações existentes entre as medidas de volume de suspensão coletado no equipamento-teste, de viscosidade máxima pelo método amilográfico e de tempo de queda pelo método de "falling number", foram realizados dois ensaios.

Os resultados dos testes realizados com a farinha de trigo padrão com adições crescentes de malte entre 0,04 e 0,94%, estão apresentados na Tabela 9.

Desses resultados, foi observado que o aumento da concentração de malte adicionado à farinha acarretou uma diminuição dos valores de viscosidade máxima, de 910 a 290 U.A., e de "falling number", de 317 a 183 segundos, o que está de acordo com trabalhos realizados por Tipples (1969), Shuey & Tipples (1980) e Medcalf et ali (1968).

No caso do equipamento-teste, foi observado que o volume de suspensão coletado aumentou com a adição de concentrações crescentes de malte, no intervalo estudado, apresentando valores de 26 a 100 ml. Esse comportamento se justifica pelo fato de maiores quantidades da enzima provocarem uma diminuição da viscosidade da suspensão aquecida de farinha (Shuey & Tipples, 1980), e, portanto, originando maiores volumes de suspensão coletados no tempo de 12 segundos previamente fixado para o teste.

Tabela 9 - Variação dos valores de viscosidade máxima (U.A.), "falling number" (s) e volume coletado no equipamento-teste (ml) em função da concentração de malte adicionada à farinha de trigo padrão.

Concentração de malte (CONC) %	Viscosidade máxima (VMÁX) U.A.	"Falling number" (FN) s	Volume coletado (VOLET) ml
0,04	910	317	26
0,11	680	299	54
0,16	550	286	63
0,23	460	268	68
0,30	390	245	73
0,37	360	230	75
0,44	350	222	85
0,51	330	206	83
0,58	300	194	90
0,65	290	191	89
0,72	280	183	98
0,80	270	183	95
0,87	280	182	101
0,94	290	183	100

As relações obtidas a partir dos resultados de quantificação de alfa-amilase presente na farinha de trigo padrão estão apresentadas na Tabela 10.

Através dessas relações, pode-se observar que os resultados obtidos da relação entre o equipamento-teste e o método amilográfico (Eq. 6) e entre o equipamento-teste e o método de "falling number" (Eq. 7) apresentaram altos coeficientes de correlação múltiplos, iguais a 0,99 e 0,98, respectivamente.

A análise de variância, a estimativa dos parâmetros, e os pontos experimentais e curvas ajustadas para o ensaio com a farinha de trigo padrão estão apresentadas no Anexo 2.

Os resultados encontrados nas Tabelas 9 e 10 são referentes à adição de quantidades definidas de alfa-amilase numa mesma farinha de trigo (farinha-padrão). Neste ensaio também foi utilizado como sistema de gelatinização das amostras para uso no equipamento-teste, o dispositivo de aquecimento/agitação do Viscoamilógrafo, que opera a velocidades de aquecimento e agitação constantes e padronizadas.

Para o estudo do comportamento de farinhas de trigo comerciais que apresentam diferentes níveis de alfa-amilase endógena foi realizado um segundo ensaio. Neste ensaio, além de gelatinização das amostras no sistema de aquecimento/agitação do Viscoamilógrafo, foi usado um outro sistema de gelatinização, o sistema denominado de banho-maria.

A introdução desse sistema de preparação das amostras teve como finalidade alcançar o objetivo desse trabalho, que é o de

Tabela 10 - Relações obtidas com a farinha de trigo padrão com adições de malte.

Equações	Coeficiente de correlação múltiplo	
$VMÁX = 692,10 + 21,76VOLET - 5,98 \times 10^{-1} VOLET^2 + 3,40 \times 10^{-3} VOLET^3$	(Eq. 6)	0,99
$FN = 131,04 + 12,25VOLET - 2,25 \times 10^{-1} VOLET^2 + 1,07 \times 10^{-3} VOLET^3$	(Eq. 7)	0,98

onde:

VMÁX = viscosidade máxima, em U.A.

FN = "falling number", em segundos.

VOLET = volume de suspensão coletado, em ml.

Amostras gelatinizadas no Viscoamilógrafo.

desenvolver um método simples e de baixo custo para quantificação de alfa-amilase. Então, passou-se a testar um dispositivo simples e barato de aquecimento/agitação (Fig. 3), que reproduzisse o grau de gelatinização da amostra obtido no Viscoamilógrafo. Para tal, estabeleceram-se condições de operação relativas à velocidade de agitação e de aquecimento da suspensão de farinha. Esse procedimento objetivou a obtenção de uma suspensão de farinha gelatinizada perfeitamente homogênea e com uma temperatura final constante de 95°C. Uma vez obtida essa padronização, o sistema foi empregado para testar as farinhas de trigo comerciais em estudo no equipamento-teste.

Para realização desse segundo ensaio, foram utilizadas várias farinhas de trigo comerciais, dentre as quais foram escolhidas 12 farinhas que apresentaram valores de viscosidade máxima dentro da escala do registrador do aparelho (0 a 1000 U.A.). Esse critério foi adotado para obterem-se farinhas com diferentes níveis de alfa-amilase.

A Tabela 11 mostra os valores de viscosidade máxima, "falling number" e de volume de suspensão coletado para as 12 farinhas de trigo selecionadas, ordenadas em níveis crescentes de atividade de alfa-amilase.

Pode-se observar que as farinhas apresentam uma faixa de viscosidade máxima de 970 a 100 U.A. e uma variação de "falling number" de 374 a 127 segundos, comprovando o aumento da atividade da alfa-amilase.

Tabela 11 - Valores de viscosidade máxima (U.A.), "falling number" (s) e volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais.

Farinha de trigo comercial	Viscosidade máxima (VMAX) U.A.	"Falling number" (FN) s	Volume ^a coletado (VOLET) ml	Volume ^b coletado ₁ (VOLET ₁) ml
1	970	374	21	26
2	960	352	22	29
3	880	346	26	34
4	810	342	28	36
5	810	339	29	37
6	800	328	30	39
7	740	290	38	46
8	520	262	63	75
9	350	235	74	80
10	210	179	90	96
11	110	132	97	104
12	100	127	105	109

^a volume coletado utilizando amostras gelatinizadas no sistema de aquecimento/agitação do Viscoamilógrafo.

^b volume coletado utilizando amostras gelatinizadas em sistema de banho-maria.

Foi também observado que os valores de volume de suspensão coletado aumentaram nas farinhas de trigo comerciais com maiores teores de alfa-amilase: o volume de suspensão coletado variou de 21 a 105 ml, para os testes realizados com amostras gelatinizadas no Viscoamilógrafo, e de 26 a 109 ml, para os testes realizados com amostras gelatinizadas no sistema de banho-maria. Esses resultados mostraram também que os volumes de suspensão coletados obtidos a partir de amostras gelatinizadas no Viscoamilógrafo foram sempre inferiores aos obtidos no sistema de banho-maria.

Na Tabela 12 estão apresentadas as equações que relacionam os valores de viscosidade máxima e de "falling number" com os valores de volume de suspensão coletado no equipamento-teste, para os dois sistemas de gelatinização das amostras. Todas as equações apresentaram um coeficiente de correlação múltiplo igual ou superior a 0,95.

A Equação 12 correlaciona os volumes coletados no equipamento-teste para as duas formas de gelatinização das amostras, apresentando um coeficiente de correlação múltiplo de 0,99. Com base nesse resultado pode-se adotar o sistema de banho-maria para gelatinização das amostras, em substituição ao sistema de aquecimento/agitação do Viscoamilógrafo.

A análise de variância, a estimativa dos parâmetros, e os pontos experimentais e curvas ajustadas para o ensaio com as farinhas de trigo comerciais, estão apresentadas no Anexo 3.

Tabela 12 - Relações obtidas com as farinhas comerciais.

Equações		Coefficiente de correlação múltiplo
$VMAX = 1140,27 - 10,31VOLET$	(Eq. 8)	0,95
$FN = 417,42 - 2,73VOLET$	(Eq. 9)	0,98
$VMAX = 1227,40 - 10,51VOLET_1$	(Eq. 10)	0,99
$FN = 440,25 - 2,78VOLET_1$	(Eq. 11)	0,97
$VOLET = 3,98 \times 10^{-1} + 6,83 \times 10^{-1} VOLET_1 + 2,51 \times 10^{-3} VOLET_1^2$	(Eq. 12)	0,99

onde:

$VMAX$ = viscosidade máxima, em U.A..

FN = "falling number", em segundos.

$VOLET$ = volume de suspensão coletado, em ml.

Amostras gelatinizadas no Viscoamilógrafo.

$VOLET_1$ = volume de suspensão coletado, em ml.

Amostras gelatinizadas em sistema de banho-maria.

2.5. Determinação das faixas de atividade da alfa-amilase em farinhas pelo equipamento-teste

Os resultados de quantificação da atividade da alfa-amilase, obtidos pelos métodos amilográfico e de "falling number", são comumente utilizados como parâmetros para avaliar a qualidade de farinhas de trigo para panificação (D'Appolonia et alii, 1982; Dubois, 1983).

Os valores de viscosidade máxima no Viscoamilógrafo usualmente empregados na avaliação de farinhas utilizadas como matéria-prima para produtos de panificação (métodos convencional e contínuo) e para biscoitos "cracker" (esponja), são dados por Shuey & Tipples (1980) como:

Tipo de processo/produto	Visc. Máxima (U.A.)
Métodos convencionais de panificação	475 - 625
Métodos contínuos de panificação	265 - 600
Biscoitos tipo "cracker" (esponja)	700 - 800

Assim, de acordo com os dados encontrados na literatura, foram estabelecidas, para os diversos produtos e processos de panificação, as faixas de atividade ótima da alfa-amilase presente em farinhas medidas pelo equipamento-teste.

A Tabela 13 apresenta as faixas de variação dos valores de volume de suspensão coletado no equipamento-teste, em função dos valores de viscosidade máxima recomendados, para farinha de trigo padrão com adições de malte (Eq. 6), e para farinhas de trigo comerciais com amostras preparadas no Viscoamilógrafo (Eq. 8) e com amostras preparadas em sistema de banho-maria (Eq. 10).

O mesmo procedimento foi aplicado para as faixas de valores de "falling number" empregados para avaliar farinhas utilizadas na fabricação de produtos de panificação e em farinhas para uso doméstico (Greenaway & Neustadt, 1967; Patterson & Crandall, 1967), conforme mostrado abaixo:

Tipo de farinha	"Falling number" (s)
Farinha para panificação	200 - 300
Farinha para uso doméstico	175 - 350

A Tabela 14 apresenta as faixas de variação dos valores de volume de suspensão coletado, em função dos valores de "falling number" recomendados, para farinha de trigo padrão com adições de malte (Eq. 7), e para farinhas de trigo comerciais com amostras preparadas no Viscoamilógrafo (Eq. 9) e com amostras preparadas no sistema de banho-maria (Eq. 11).

**Tabela 13 - Faixas ótimas de volume coletado no equipamento-
teste com base nos valores recomendados^a de
viscosidade máxima.**

Tipo de processo/produto	Volume coletado (ml)		
	Far. padrão	Far. comerc. ^b	Far. comerc. ^c
Métodos convenc. panificação	57-68	50-65	57-72
Métodos contín. panificação	58- ^d	52-85	60-92
Biscoitos "cracker" (esponja)	42-51	33-43	41-50

^a Shuey & Tipples, 1980.

^b Amostras gelatinizadas no Viscoamilógrafo.

^c Amostras gelatinizadas em sistema de banho-maria.

^d A curva empregada não apresenta valores reais para a relação viscosidade máxima versus volume coletado no equipamento-teste para valores inferiores a 270 U.A..

Tabela 14 - Faixas ótimas de volume coletado no equipamento-
teste com base nos valores recomendados^a de
"falling number".

Tipo de farinha	Volume coletado (ml)		
	Far. padrão	Far. comerc. ^b	Far. comerc. ^c
Farinha para panificação	56-89	43-80	50-86
Farinha para uso doméstico	-- ^d	25-89	32-95

^a Greenaway & Neustadt, 1967; Patterson & Crandall, 1967.

^b Amostras gelatinizadas no Viscoamilógrafo.

^c Amostras gelatinizadas em sistema de banho-maria.

^d A curva empregada não apresenta valores reais para a relação "falling number" versus volume coletado no equipamento-teste para valores superiores a 320s e inferiores a 181s.

Dessa forma, foram estabelecidos os valores de volumes de suspensão coletados correspondentes aos valores de viscosidade máxima e de "falling number" recomendados para produção de diferentes produtos e métodos de panificação, tornando possível avaliar, pelo uso do equipamento-teste, a qualidade de uma farinha de trigo quanto a sua atividade da alfa-amilase.

Assim, foram atingidos os objetivos do trabalho, que visaram desenvolver um método de quantificação da atividade da alfa-amilase que utilizasse um equipamento de fabricação nacional, mais simples e de menor custo, quando comparado ao Viscoamilógrafo Brabender e ao "Falling Number". O método desenvolvido torna-se acessível à grande maioria das indústrias de panificação, que poderão realizar um controle efetivo da atividade da enzima na farinha de trigo.

O tempo de análise, que inclui a preparação da amostra (gelatinização) e a análise propriamente dita, ainda representa um fator limitante para o uso do equipamento-teste no controle de qualidade de farinhas em larga escala. Recomenda-se portanto a continuidade dos estudos sobre a configuração do equipamento, visando principalmente possibilitar a gelatinização das amostras no próprio recipiente interno do equipamento.

V. CONCLUSÕES

- é possível avaliar a atividade da alfa-amilase presente na farinha de trigo através de medidas da variação do volume de suspensão aquosa gelatinizada desta farinha, nas condições experimentais utilizadas no presente estudo.

- Existe uma relação entre as medidas de atividade de alfa amilase obtidas através do método desenvolvido e as obtidas pelos métodos amilográfico e de "falling number". Esta relação foi determinada com aproximação no estudo.

- A gelatinização da suspensão de farinha de trigo por meio do sistema de banho-maria pode ser utilizada na preparação da amostra a ser analisada no equipamento de determinação da atividade da alfa-amilase desenvolvido no estudo.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A industria de alimentos no Brasil. *Alimentos e Tecnologia*. 2: 34-36, 1985.
- ALLEN, W. G. & SPRADLIN, J. E. Amylases and their properties. *The Bakers Digest* 48 (3): 14-16, 20-22 e 57, 1974.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. *Approved Methods of AACC*. The Association, St. Paul, Minn., 1969.
- ASP, E. H. & MIDNESS, L.T. Measuring alpha-amylase activity in yeast dough and bread. *Cereal Foods World* 28 (12): 725-28, 1983.
- ANKER, C. A. & GEDDES, W. F. Gelatinization studies upon wheat and other starches with the amylograph. *Cereal Chemistry* 21 (5): 335-60, 1944.
- BARNES, W. C. Rain damage wheat tester: an instrument for the rapid assessment of sprouted grain at silos. *Journal of Science and Food Technology* 38 (1): 23-30, 1987.

BARNES, W. C. & BLAKENEY, A. B. Determination of cereal alpha-amylase using a commercially available dye-labelled substrate. *Die Stärke* 26 (6): 193-97, 1974.

BELEIA, A. Níveis de alfa-amilase de farinhas de algumas cultivares de trigos brasileiros. *Boletim de Pesquisa* 005. Centro de tecnologia agrícola e alimentar - EMBRAPA, 1982.

BROWN, J. Alpha-amylase. *Baking Today* 38 (3): 27-29, 1983.

BROWN, R.O. & HARREL, C.G. The use of amilograph in the cereal laboratory. *Cereal Chemistry* 21 (5): 360-69, 1944.

BUCHANAN, A. M. & NICHOLAS, E. M. Sprouting, alpha-amylase and breadmaking quality. *Cereal Research Communication* 1 (8): 23-28, 1980.

CARVEL, R. Les possibilités du pain au Brésil. *Industries des Cereales* 24 : 24-26, 1983.

CAMPBELL, J. A. Measurement of alpha-amylase in grains. *Cereal Foods World* 24 (2): 46-49, 1980.

CHAMBERLAIN, N.; COLLINS, T. H. & McDERMOTT, E. E. Alpha-amylase and bread properties. *Journal of Food Technology* 16 (2): 127-52, 1981.

CORR, J. G. & SPILLANE, P. A. Some factors affecting amylolytic behavior in irish flour. *Journal of Science and Food Agriculture* 20 (5): 638-41, 1969.

D'APPOLONIA, B. L.; Mac ARTHUR, L. A.; PISESOOKBUNTERNG, W. & CIACCO, C. F. Comparison of the grain amylase analyser with the amylograph and falling number methods. *Cereal Chemistry* 59 (4): 254-57, 1982.

DIACHUCK, V. R.; HAMILTON, E.; SAVCHUK, N. & JACKEL, S. S. Measurement of alpha-amylase in flour with the grain alpha-amylase analyzer. *Milling and Baking News* 61 (48): 8-10, 1983.

DIAZ, N.M.; BLOCH, M.; CHANG, Y.K.; VILELA, E.R.; RUIZ, F.S. & AMELUNGE, O.A. Controle de qualidade de uma variedade de trigo e farinha argentino, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1980.

DOTY, J. W. The falling number method - a rapid technique for malt control. *Bakers Digest* 55 (2): 23-25, 1981.

DUBDIS, M. Measurement of α -amylase activity of flours by the brabender amylograph and the falling number method. Comparison of results. Measurement activity of fungal α -amylase. *Industries des Cereales* 25 : 13-16, 19-20, 1983.

- EL-DASH, A. A. Qualidade tecnológica do trigo nacional brasileiro: I. O problema da presença de α -1,4-glucan-4-glucanohidrolase (alfa-amilase). *Ciência e Cultura* 29 (6): 684-88, 1977.
- FOX, P. F. & MULVIHILL, D. M. Enzymes in wheat, flour and bread. *Advances in Cereal Science and Technology* 5: 107-56, 1982.
- GIOVANI, M. Response surface methodology and product optimization. *Food Technology* 37 (11): 41-45, 83, 1983.
- GABOR, R. ; TAUFEL, A. & RUTTLOFF, H. Zur Wirkungsweise verschiedener mikrobieller Proteasepraeparate auf Weizengluten und -mehl. *Die Naehrung* 26 (1): 37-46, 1982.
- GREENAWAY, W. T. & NEUSTADT, M. H. Estimation and control of experimental error in the falling number test. *Cereal Science Today* 12 (5): 182-84, 1967.
- HAGBERG, S. A rapid method for determining alpha-amylase activity. *Cereal Chemistry* 37 (2): 218-22, 1960.
- HAGBERG, S. Modified wohlgemuth method for alpha-amylase activity of wheat and rye. *Cereal Chemistry* 38 (3): 241-50, 1961.

HILL, R. D. & MacGREGOR, A. W. Cereal α -amylases in grain research and technology. *Advances in Cereal Science and Technology* 9 : 217-61, 1988.

HSU, E. & VARRIAND-MARSTON, E. Comparison of nephelometric and phadebas methods of determining alpha-amylase activity in wheat flour supplement with barley malt. *Cereal Chemistry* 60 (1): 46-50, 1982.

JOZSA, S. & GORE, H. C. Determination of liquefying power of malt diastase. *Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition* 2 (1): 26-28, 1930.

KNEEN, E.; SANDSTEDT, R. M. & HOLLENBECK, C. M. The differential stability of the malt amylases - separation of the alpha and beta components. *Cereal Chemistry* 20 (4): 399-423, 1943.

KRUGER, J. E. & MARCHYLO, B. The use of reduced β -limit dextrin as substrate in an automated amylase assay. *Cereal Chemistry* 49 (4): 453-58, 1972.

MAILHOT, W. C. The falling number method. *Cereal Foods World* 24 (2): 50-51, 1980.

MARCHYLO, B. & KRUGER, J. E. A sensitive automated method for the determination of α -amylase in wheat flour. *Cereal Chemistry* 55 (2): 1188-96, 1978.

MARCHYLO, B; LaCROIX, L.J. & KRUGER, J. α -Amylase isoenzymes in Canadian wheat cultivars during kernel growth and maturation. *Canadian Journal Plant Science* 60 : 433-43, 1980.

MATHEWSON, P. R.; FAHRENHOLZ, C. H.; BOOTH, G. D.; MILLER, B. S. & POMERANZ, Y. Colorimetric alpha-amylase, falling number and amylograph assays of sprouted wheat. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 64 (5): 1243-51, 1981.

MATHEWSON, P. R. & POMERANZ, Y. Modified chromogenic α -amylase assay for sprouted wheat. *Journal Association Analytical Chemistry* 62 (1): 198-200, 1979.

MATHEWSON, P. R. & POMERANZ, Y. A new commercial instrument for colorimetric assay of cereal alpha-amylase. 7th World Cereal and Bread Congress, Praga, 1982.

MATZ, S. A. *Cookie and cracker technology*. The AVI Publishing Company, Westport, Conn., 1968.

- McDERMOTT, E. E. Measurement of the stickiness and other physical properties of bread crumb. *Journal of Food Technology* 9 (2): 185-93, 1974.
- MEDCALF, P. R.; TOMBETTA, E. E.; BANASIK, D. J. & GILLES, K. A. A rapid procedure for alpha-amylase determination in malt. *Cereal Chemistry* 43 (6): 675-82, 1966.
- MILLER, B. S. & JOHNSON, J. A. High levels of alpha-amylase in baking II. Proteolysis in straight and sponge doughs. *Cereal Chemistry* 25 (3): 178-90, 1948.
- MILNER, M. Amylase activity in flours and diastatic supplements. *Bakers Digest* 21 (4): 19-21, 1947.
- MYERS, R. H. *Response surface methodology*, Allyn and Bacon Inc., Boston, 1971.
- O'CONNELL, B. T.; RUBENTHALER, G. L. & MURBACH, N. L. Evaluation of a nephelometric method for determining cereal alpha-amylase. *Cereal Chemistry* 57 (6): 411-15, 1980.
- OSBORN, B.G.; DOUGLAS, S.; MOORHOUSE, C. & HECKLEY, M.J. Collaborative evaluation of a rapid nephelometric method for the measurement of alpha-amylase in flour. *Cereal Chemistry* 58 (5): 474-76, 1981.

- PATON, D. & VOISEY, P. W. Rapid method for the determination of diastatic activity of cereal flours using the ottawa starch viscometer. *Cereal Chemistry* 54 (5): 1007-17, 1977.
- PATTERSON, B. E. & CRANDALL, L. G. Amylograph vs. falling number values compared. *Cereal Science Today* 12 (8): 332-35, 1967.
- PAZUR, J. H. Enzymes in synthesis and hydrolysis of starch. In: "Starch : chemistry and technology", ed. by Whistler, R. L. & Paschall, E. F., v. I, p. 133-75, Academic Press, N. Y., 1965.
- PERTEN, H. Application of the falling number method for evaluating alpha-amylase activity. *Cereal Chemistry* 41 (3): 127-140, 1964.
- PERTEN, H. A colorimetric method for the determination of alpha-amylase activity (ICC method). *Cereal Chemistry* 43 (3): 336-42, 1966.
- PERTEN, H. Metodo de numero di caduta per la valutazione dell'attività alfa amilasica. *Tecnica Molitoria* 31 (5): 379-84, 1980.
- PERTEN H. A modified falling-number method suitable for measuring both cereal and fungal alpha-amylase activity. *Cereal Chemistry* 61 (2): 108-11, 1984.

- POMERANZ, Y. & SHELLENBERGER, J. A. Starch-liquefying activity of alpha-amylase I. Use of pregelatinizing wheat starch as substrate. *Cereal Chemistry* 39 (4): 327-35, 1962.
- PRATT, JR., D. B. Criteria of flour quality. In: "Wheat chemistry and technology", ed. by Pomeranz, Y., p. 201-26, The Association, St. Paul, Minn., 1978.
- PYLER, E. J. Baking science and technology, v. 1, Siebel Publishing Company, Chicago, Ill., 1973.
- RANUM, P. M.; KULP, K. & AGASIE, F. R. Modified amylograph test for determining diastatic activity in flour supplemented with fungal α -amylase. *Cereal Chemistry* 55 (3): 321-31, 1978.
- REED, G. & THORN, J. A. Enzymes. In : "Wheat chemistry and technology", ed. by Pomeranz, Y., p. 453-91, AACC, St. Paul, Minn., 1978.
- ROBYT, J. F. & WHELAN, W. J. The alpha-amylase. In : "Starch and its components", ed. by Radley, J. A., p. 430-76, Chapman and Hall, London, 1968.

ROBYT, J.F. & FRENCH, D. Multiple attack hypothesis of α -amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary and *Aspergillus oryzae* α -amylases. Archives of Biochemistry and Biophysics 122 : 8-16, 1967.

ROSS, A. S.; WALKER, C. E.; BOOTH, R. I.; ORTH, R.A. & WRIGLEY, C. W. The rapid visco-analyses : a new technique for the estimation of sprout damage. Cereal Foods World 32 (11): 327-29, 1987.

SANDSTED, R. M.; KEEN, E. & BLISH, M. J. A standardized wohlgemuth procedure for alpha-amylase activity. Cereal Chemistry 16 (6): 712-23, 1939.

SELMAN, R. W. & SUMNER, R. J. The use of the amylograph for flour malt control. Cereal Chemistry 24 (4): 291-99, 1947.

SHUEY, W. C. & TIPPLES, K. H. The amylograph handbook. The Association, St. Paul, Minn., 1980.

SPROESSLER, B. New analytical methods for determination of enzymes in flours. Industries des Cereales 30 : 35-39, 1984.

TIPPLES, K. H. A viscometric method for measuring alpha-amylase activity in small samples of wheat and flour. Cereal Chemistry 46 (6): 589-98, 1969.

VAN DE KAMER, J. H. & VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. *Cereal Chemistry* 29 (4): 239-51, 1952.

WHISTLER, R. L. & PASCHALL, E. F. *Starch chemistry and technology*, v. 1, Academic Press, N. Y., 1967.

WHITAKER, J. R. *Principles of enzymology for the food science*, Marcell Dekker, N. Y., 1972.

VII. ANEXOS

ANEXO 1

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O VOLUME DE SUSPENSÃO COLETADO NO EQUIPAMENTO-TESTE COM A CONCENTRAÇÃO DA ALFA-AMILASE E O TEMPO DE ESCOAMENTO DA SUSPENSÃO

Para determinação da relação entre a atividade de alfa-amilase e o volume de suspensão coletado no equipamento-teste, empregou-se uma análise estatística, através dos agentes dos modelos quadráticos, que envolveu os seguintes termos:

- concentração de malte
- (concentração de malte)²
- concentração de farinha
- (concentração de farinha)²
- tempo de escoamento
- (tempo de escoamento)²
- concentração de malte x concentração de farinha
- concentração de malte x tempo de escoamento
- concentração de farinha x tempo de escoamento.

Como a concentração de farinha na suspensão apresentou uma influência não significativa, os termos que envolvem essa variável foram retirados do modelo.

Da mesma forma, o termo concentração de malte x tempo de escoamento não apresentou influência significativa no modelo, sendo também retirado.

Os termos empregados na análise foram:

- tempo de escoamento
- (tempo de escoamento)²
- concentração de malte
- (concentração de malte)²

A equação obtida foi a seguinte:

$$VOLET = B_0 + B_1 T + B_2 CONC + B_{11} T^2 + B_{22} CONC^2 \quad (\text{Eq. 1}),$$

onde:

VOLET = volume de suspensão coletado, em ml

T = tempo de escoamento da suspensão, em segundos

CONC = concentração de malte adicionada à suspensão, em %

$$e: B_0 = 149,85$$

$$B_1 = - 24,99$$

$$B_2 = 140,46$$

$$B_{11} = 1,33$$

$$B_{22} = - 100,77.$$

A análise de variância e a estimativa de parâmetros da equação estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o volume coletado (ml) versus a concentração de malte (%) na farinha de trigo padrão e o tempo de escoamento (s) da suspensão no equipamento-teste. Amostras preparadas no Viscoamilógrafo.

Análise de Variância

Fonte de Variância	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível de Significância
Modelo	4	1971,159	472,790	69,872	0,0001
Erro	15	105,791	7,053		
Total	19	2076,950			

Estimativa de Parâmetros

Variável	Grau de Liberdade	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H ₀ : Parâmetro=0	Nível de Significância
Interseção	1	149,845	74,855	2,002	0,0637
T	1	- 24,987	12,372	-2,020	0,0617
CONC	1	140,458	18,934	7,403	0,0001
T ²	1	1,328	0,515	2,579	0,0210
CONC ²	1	-100,769	19,368	-5,203	0,0001

ANEXO 2

DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES ENTRE O EQUIPAMENTO-TESTE E OS MÉTODOS AMILOGRÁFICO E DE "FALLING NUMBER" PARA A FARINHA DE TRIGO PADRÃO

Através dos resultados mostrados na Tabela 9, foram determinadas as relações entre os equipamentos normalmente utilizados para quantificação da atividade de alfa-amilase e o equipamento-teste, em termos de volume coletado.

Para o método viscoamilográfico, a equação que melhor relaciona a viscosidade máxima com o volume coletado foi:

$$VMAX = 692,10 + 21,76 VOLET - 5,98 \times 10^{-1} VOLET^2 + 3,40 \times 10^{-3} VOLET^3$$

(Eq. 6)

onde:

VMAX = viscosidade máxima, em U.A.

VOLET = volume de suspensão coletado com amostra preparada no Viscoamilógrafo, em ml.

A análise de variância e a estimativa dos parâmetros da Equação 6 estão apresentadas na Tabela 16. Os pontos experimentais e a curva ajustada pela equação estão mostrados na Figura 6.

Tabela 16: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona a viscosidade máxima (U.A.) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para a farinha de trigo padrão com adições de malte.

Amostras preparadas no Viscoamilógrafo.

Análise de Variância

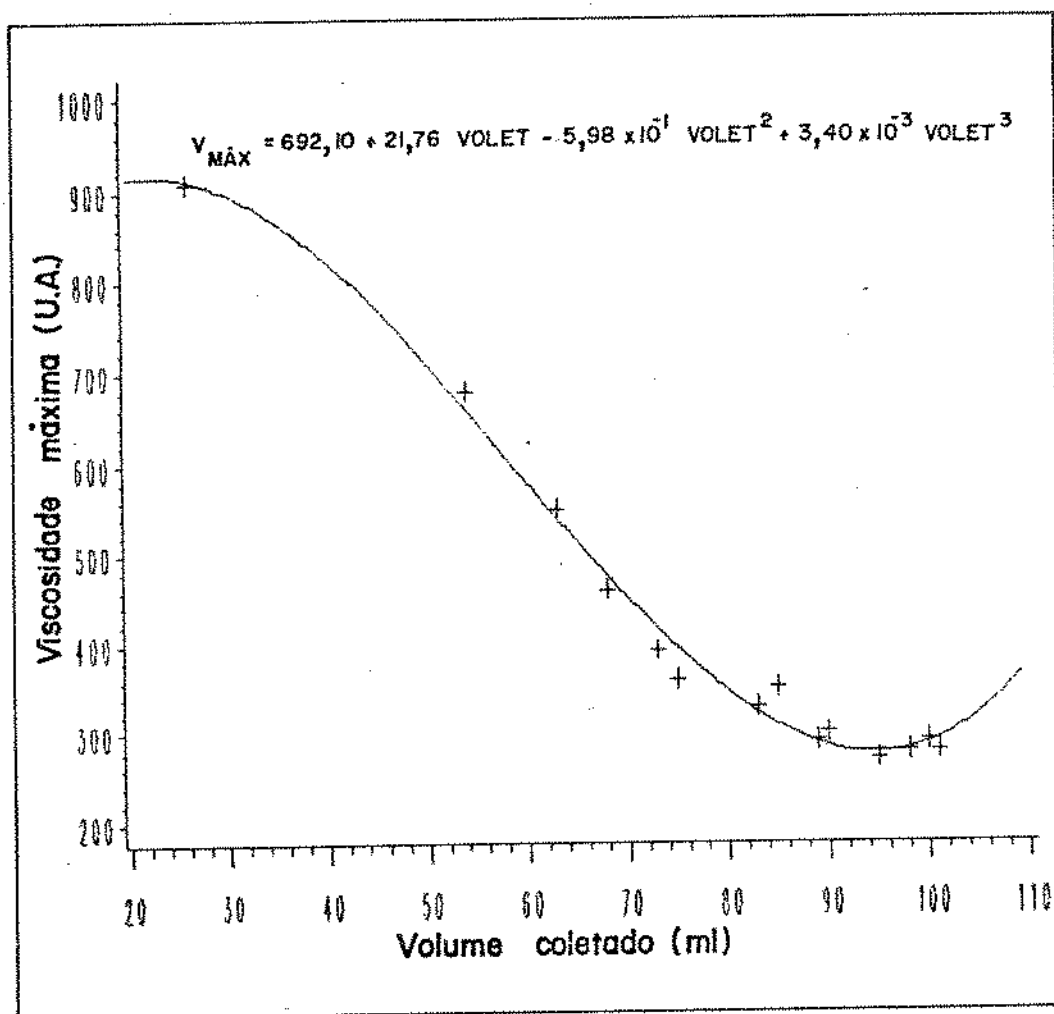
Fonte de Variância	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível de Significância
Modelo	3	447317,845	149105,948	305,410	0,0001
Erro	10	4882,155	488,215		
Total	13	452200,000			

Estimativa de Parâmetros

Variável	Grau de Liberdade	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H ₀ : Parâmetro=0	Nível de Significância
Intersecção	1	692,104	146,414	4,727	0,0008
VOLET	1	21,758	8,342	2,608	0,0261
VOLET ²	1	-0,598	0,139	-4,293	0,0016
VOLET ³	1	0,003	0,001	4,775	0,0008

Figura 6: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 6 para a relação viscosidade máxima (U.A.) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para a farinha de trigo padrão com adições de malte.

Amostras preparadas no Viscoamilógrafo.



Para o método de "falling number", a equação que melhor relaciona o tempo de queda com o volume coletado foi:

$$FN = 131,04 + 12,25 \text{ VOLET} - 2,25 \times 10^{-1} \text{ VOLET}^2 + 1,07 \times 10^{-3} \text{ VOLET}^3$$

(Eq. 7)

onde:

FN = "falling number", em segundos.

A análise de variância e a estimativa dos parâmetros da Equação 7 estão apresentadas na Tabela 17. Os pontos experimentais e a curva ajustada pela equação estão mostrados na Figura 7.

Tabela 17: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o "falling number" (s) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para a farinha de trigo padrão com adições de malte.

Amostras preparadas no Viscoamilógrafo.

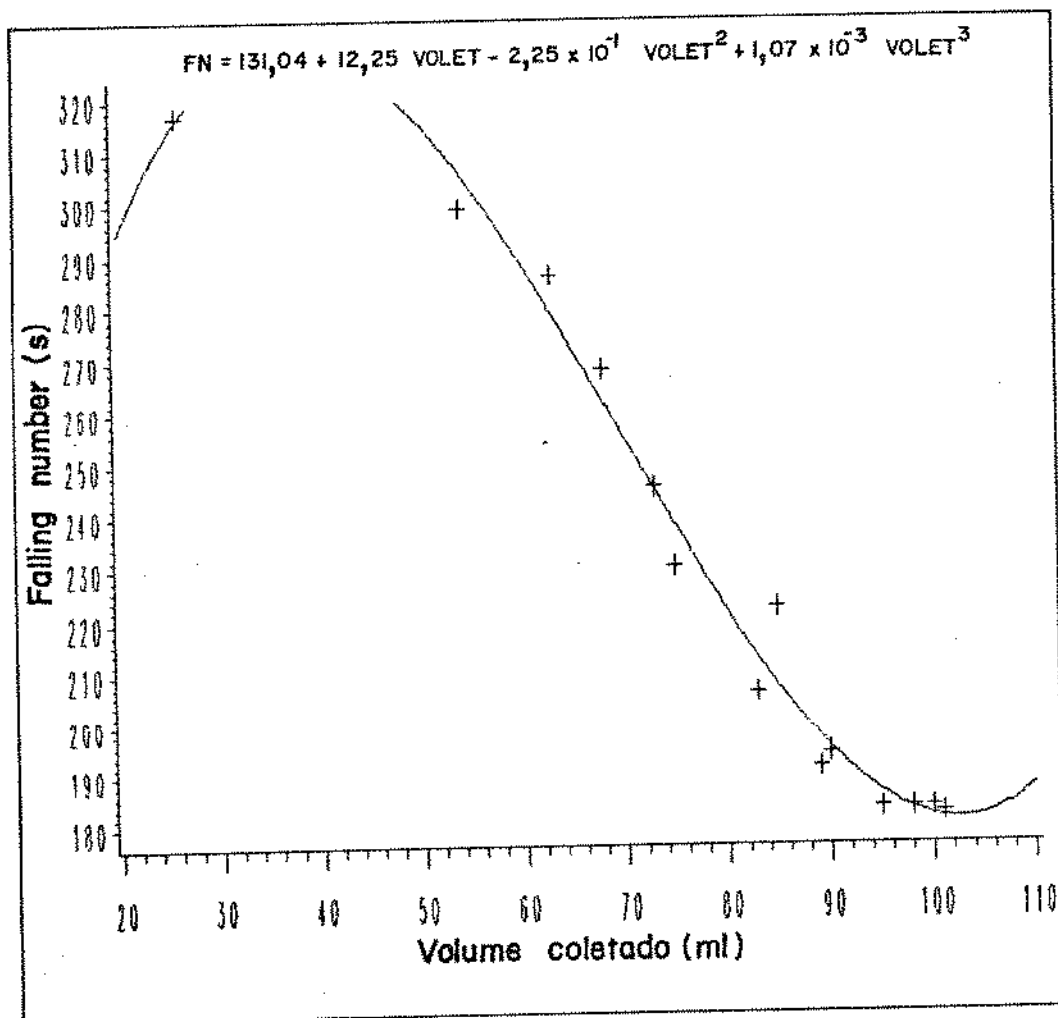
Análise de Variância

Fonte de Variância	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível de Significância
Modelo	3	28934,580	9644,860	185,558	0,0001
Erro	10	519,777	51,978		
Total	13	29454,357			

Estimativa de Parâmetros

Variável	Grau de Liberdade	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H0: Parâmetro=0	Nível de Significância
Intersecção	1	131,044	47,7733	2,743	0,0207
VOLET	1	12,251	2,7217	4,501	0,0011
VOLET ²	1	-0,225	0,0454	-4,945	0,0006
VOLET ³	1	0,001	0,0002	4,775	0,0008

Figura 7: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 7 para a relação "falling number" (s) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para a farinha de trigo padrão com adições de malte. Amostras preparadas no Viscoamilógrafo.



ANEXO 3

DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES ENTRE O EQUIPAMENTO-TESTE E OS MÉTODOS AMILOGRÁFICO E DE "FALLING NUMBER" PARA FARINHAS DE TRIGO COMERCIAIS

Na segunda parte do experimento, utilizando farinhas comerciais como matéria-prima, as relações entre os métodos de quantificação de alfa-amilase, obtidas através dos resultados apresentados na Tabela 10, foram os seguintes:

- Equação que melhor relaciona a viscosidade máxima com o volume coletado:

$$VMAX = 1140,27 - 10,31 VOLET \quad (Eq. 8)$$

onde:

VMAX = viscosidade máxima, em U.A.

VOLET = volume de suspensão coletado com amostra preparada no Viscoamilógrafo, em ml.

A análise da função está apresentada na Tabela 10. Os pontos experimentais e a curva ajustada pela equação estão mostrados na Figura 8.

Tabela 18: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona a viscosidade máxima (U.A.) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais. Amostras preparadas no Viscoamilógrafo.

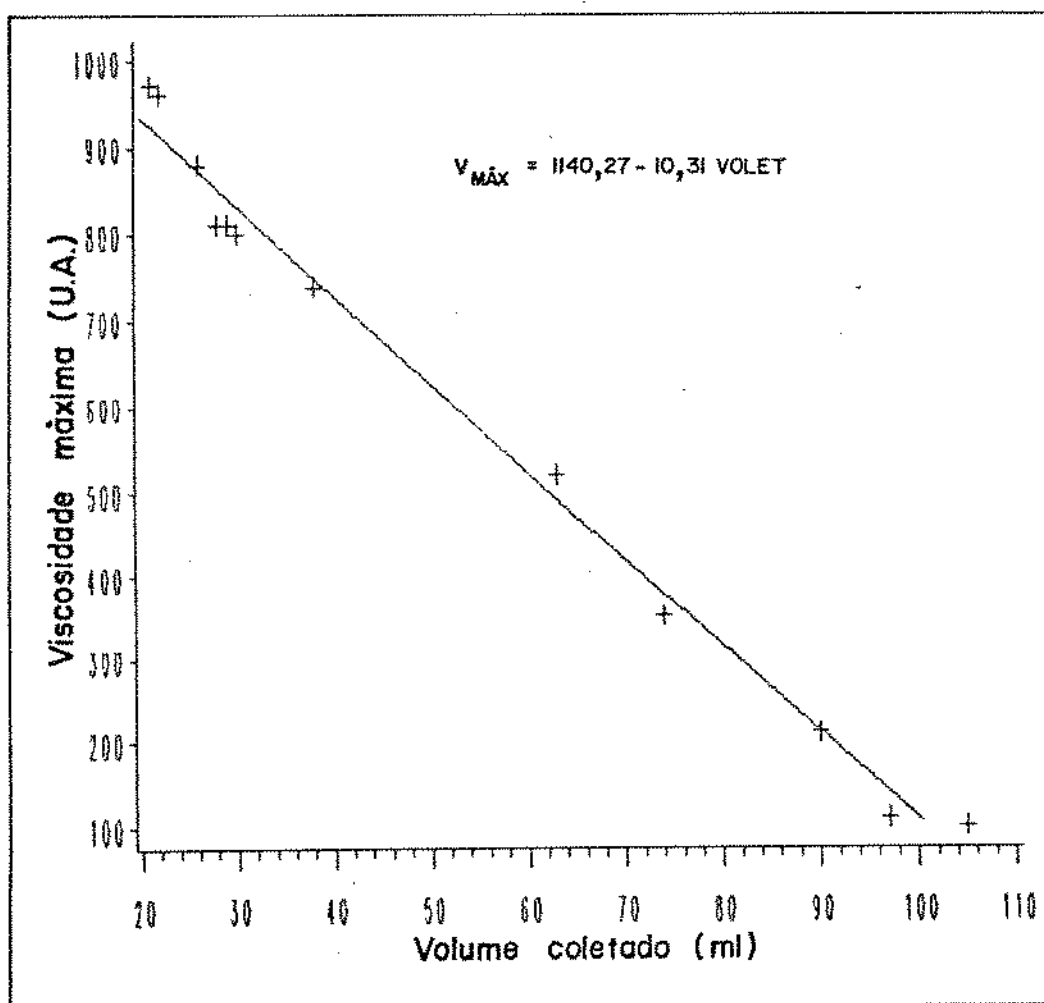
Análise de Variância

Fonte de Variância	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível de Significância
Modelo	1	1191086,558	1191086,514	959,514	0,0001
Erro	10	12413,442	1241,344		
Total	11	1203500,000			

Estimativa de Parâmetros

Variável	Grau de Liberdade	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H0: Parâmetro=0	Nível de Significância
Intersecção	1	1140,272	20,051	56,868	0,0001
VOLET	1	-10,310	0,333	-30,976	0,0001

Figura 8: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 8 para a relação viscosidade máxima (U.A.) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais. Amostras preparadas no Viscoamilógrafo.



- Equação que melhor relaciona o "falling number" com o volume coletado:

$$FN = 417,42 - 2,73 \text{ VOLET} \quad (\text{Eq. 9})$$

onde:

FN = "falling number", em segundos.

A análise da função está apresentada na Tabela 19. Os pontos experimentais e a curva ajustada pela equação estão mostrados na Figura 9.

- Equação que melhor relaciona a viscosidade máxima com o volume coletado de uma amostra preparada em sistema de banho-maria:

$$V_{MAX} = 1227,40 - 10,51 \text{ VOLET}_1 \quad (\text{Eq. 10})$$

onde:

VOLET_1 = volume de suspensão coletado com amostra preparada em sistema de banho-maria, em ml.

A análise da função está apresentada na Tabela 20. Os pontos experimentais e a curva ajustada pela equação estão mostrados na Figura 10.

Tabela 19: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o "falling number" (s) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais. Amostras preparadas no Viscoamilógrafo.

Análise de Variância

Fonte de Variância	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível de Significância
Modelo	1	83733,557	83733,557	420,467	0,0001
Erro	10	1991,443	199,144		
Total	11	85725,000			

Estimativa de Parâmetros

Variável	Grau de Liberdade	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H ₀ : Parâmetro=0	Nível de Significância
Intersecção	1	417,423	8,031	51,975	0,0001
VOLET	1	-2,734	0,133	-20,505	0,0001

Figura 9: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 9 para a relação "falling number" (s) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais. Amostras preparadas no Viscoamilógrafo.

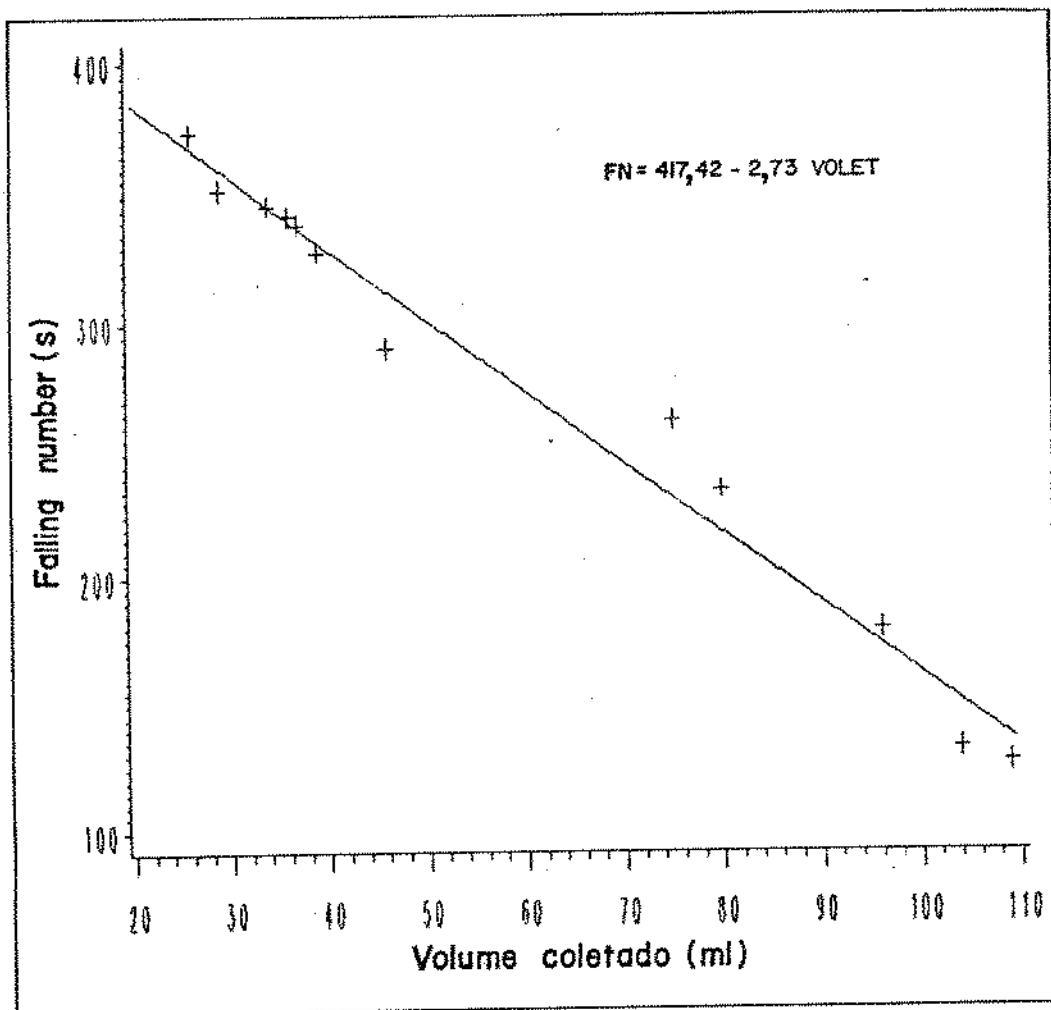


Tabela 20: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona a viscosidade máxima (U.A.) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais. Amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio.

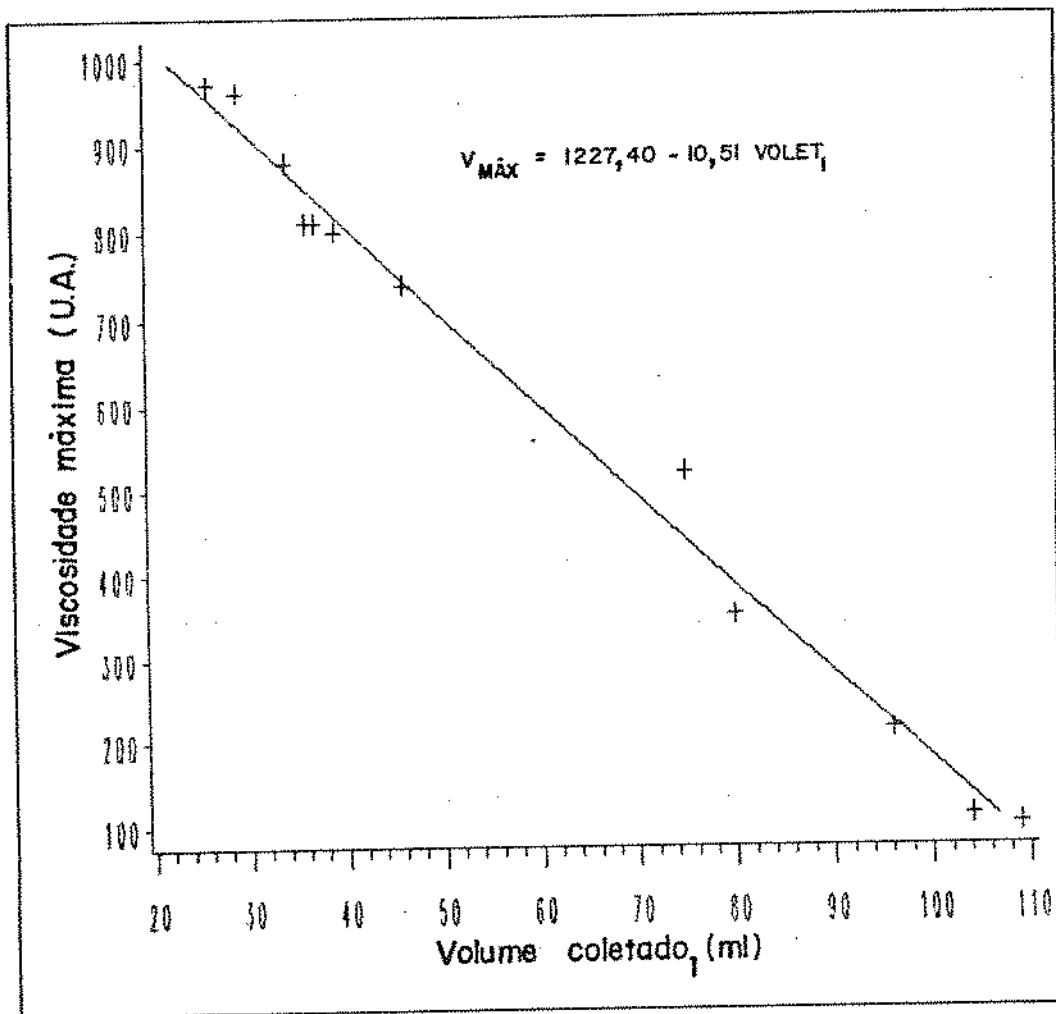
Análise de Variância

Fonte de Variância	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível de Significância
Modelo	1	1190821,164	1190821,164	896,329	0,0001
Erro	10	13278,836	1327,884		
Total	11	1203500,000			

Estimativa de Parâmetros

Variável	Grau de Liberdade	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para $H_0: \text{Parâmetro}=0$	Nível de Significância
Intersecção	1	1227,396	23,299	52,680	0,0001
VOLET ₁	1	-10,505	0,351	-29,939	0,0001

Figura 10: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 10 para a relação viscosidade máxima (U.A.) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais. Amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio.



- Equação que melhor relaciona o "falling number" com o volume coletado de uma amostra preparada em sistema de banho-maria:

$$FN = 440,25 - 2,78 \text{ VOLET}_1 \quad (\text{Eq. 11})$$

A análise de função está apresentada na Tabela 21. Os pontos experimentais e a curva ajustada pela equação estão mostrados na Figura 11.

- Equação que melhor relaciona o volume coletado obtido no equipamento-teste a partir de dois métodos diferentes de preparação da amostra, o que utiliza o viscoamilógrafo e o que utiliza o sistema de banho-maria:

$$\text{VOLET} = 3,98 \times 10^{-1} + 6,83 \times 10^{-1} \text{VOLET}_1 + 2,51 \times 10^{-3} \text{VOLET}_1^2 \quad (\text{Eq. 12})$$

A análise da função está apresentada na Tabela 22. Os pontos experimentais e a curva ajustada pela equação estão mostrados na Figura 12.

Tabela 21: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o "falling number" (s) versus o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais. Amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio.

Análise de Variância

Fonte de Variância	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível de Significância
Modelo	1	83397,850	83397,850	358,369	0,0001
Erro	10	2327,150	232,715		
Total	11	85725,000			

Estimativa de Parâmetros

Variável	Grau de Liberdade	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H0: Parâmetro=0	Nível de Significância
Intersecção	1	440,252	9,754	45,137	0,0001
VOLET ₁	1	-2,781	0,147	-18,931	0,0001

Figura 11: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 11 para a relação "falling number" (s) versus volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas de trigo comerciais. Amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio.

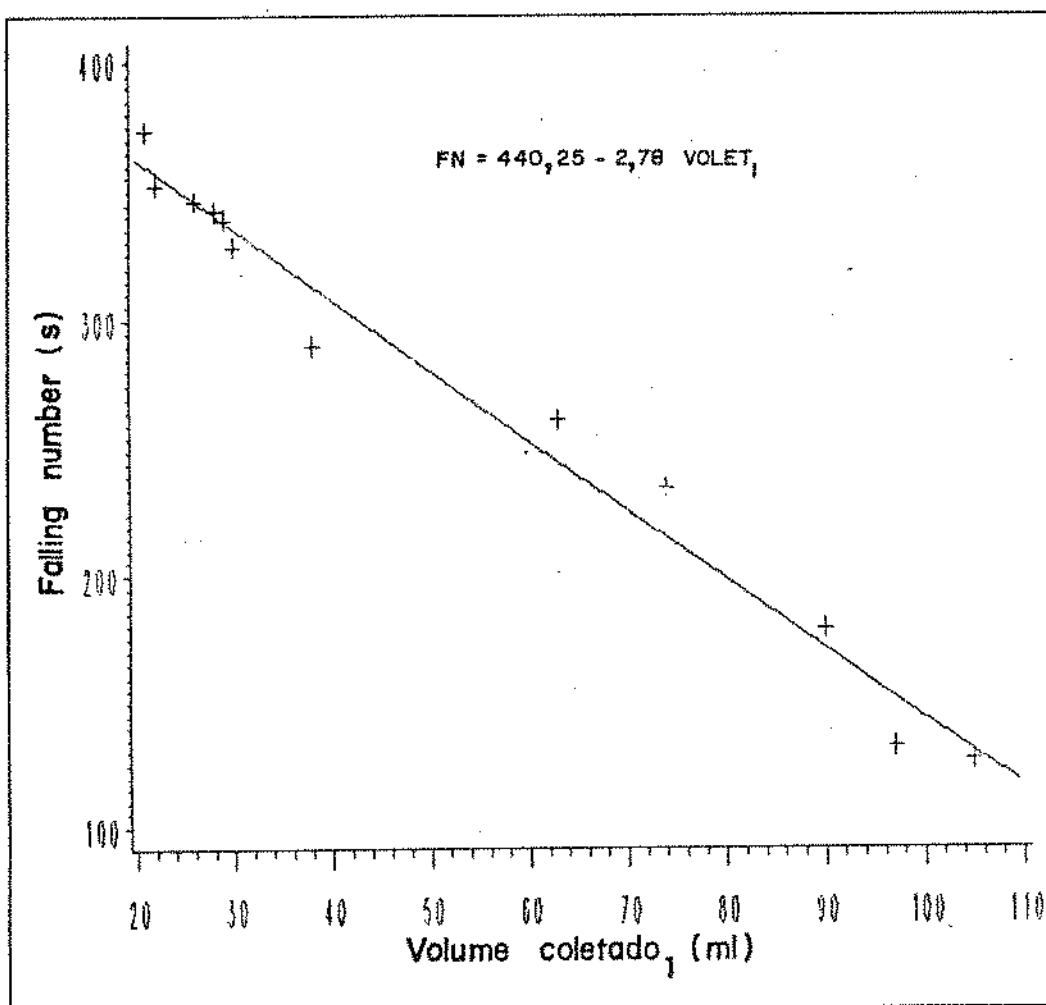


Tabela 22: Análise de variância e estimativa de parâmetros da equação que relaciona o volume coletado no equipamento-teste (ml) para farinhas comerciais com amostras preparadas no Viscoamilógrafo versus o volume coletado (ml) para amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio.

Análise de Variância

Fonte de Variância	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível de Significância
Modelo	1	11161,457	11161,457	2568.258	0,0001
Erro	10	43,459	4,346		
Total	11	11204,917			

Estimativa de Parâmetros

Variável	Grau de Liberdade	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H0: Parâmetro=0	Nível de Significância
Intersecção	1	-8,355	1,333	-6,268	0,0001
VOLET ₁	1	1,017	0,020	50,678	0,0001

Figura 12: Pontos experimentais e curva ajustada pela Equação 12 para a relação volume coletado (ml) para farinhas comerciais com amostras preparadas no Viscoamilógrafo versus volume coletado (ml) para amostras preparadas em sistema de banho-maria com solução aquosa saturada com cloreto de sódio.

