

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

**DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMIDO EM CANA-DE-
AÇÚCAR E ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
 α -AMILASE EM AÇÚCAR BRUTO**

JOELISE DE ALENCAR FIGUEIRA
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos

CAMPINAS - SP
2009

JOELISE DE ALENCAR FIGUEIRA

**DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMIDO EM CANA-DE-AÇÚCAR E
ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE α -AMILASE EM
AÇÚCAR BRUTO**

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F469d Figueira, Joelise de Alencar
Determinação e caracterização de amido em cana-de-
açúcar e adequação de metodologia para determinação de
alfa-amilase em açúcar bruto / Joelise de Alencar Figueira.
– Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Hélia Harumi Sato
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de ampinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cana-de-açúcar. 2. Amido. 3. Amilase. 4. Açúcar.
I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.. III. Título.

(mrs/fea)

Titulo em inglês: Determination and characterization of sugarcane starch and adequacy
of the methodology for the residual a-amylase determination in raw
sugar

Palavras-chave em inglês (Keywords): Sugarcane, Starch, Amylase, Sugar

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Hélia Harumi Sato

Gabriela Alves Macedo

Luciana Francisco Fleuri

Data de defesa: 18/2/2009

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
UNIMEP

Prof. Dr. Márcio Caliar
UFG

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
CPQBA

À minha família: meu marido Ricardo
Angelotti, meu pai Ivalney Figueira,
minha mãe Rosária, meus irmãos
Rodrigo e Thiago Figueira.
Aos amigos do laboratório de Bioquímica.
À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter me conduzido para a realização dessa conquista, não permitindo que desanimasse diante dos obstáculos e colocando em meu caminho pessoas generosas e competentes

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato pela generosidade, sabedoria, e carinho que me foram oferecidos durante essa jornada

Aos amigos e colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos Giselle Arruda, Patrícia Schons, Daniele Branta, Eloísa Serrano, Edi Francielle, Márcio de Barros, Janai, Juliana Macedo, Daniela Orsi, Fabiano Jares, Paula Speranza, Viviane Toret, Ana Luiza Fanchini, Priscila Becker, Priscila Hoffmann, Beatriz Melo, Valdeci, Tatiana Pio, Maria das Dores (Dora), Gaby, Luciana Fleuri, Carolina Bedani pelo apoio e em especial à Haroldo Kawaguti, e Marcela Bagagli por além do companheirismo terem contribuído também com seus conhecimentos enriquecendo o meu trabalho
À Flávio Satomi por ter me ajudado com o tratamento estatístico

Ao meu marido Ricardo Crepani Angelotti por sempre estar ao meu lado, transmitindo perseverança, sensatez, e muitas outras qualidades que o tornam o companheiro mais especial do mundo e indispensável para a minha vida

Aos meus pais, Ivalney e Rosária, por me apoiarem sempre e expressarem o orgulho que sentem por minhas conquistas, aquecendo o meu coração e fazendo com que eu me sinta mais feliz por alegrá-los

Aos meus irmãos, Thiago e Rodrigo, por existirem e estarem sempre por perto mesmo quando estão longe

À família Angelotti, especialmente Osvaldo e Édina, pela acolhida tão carinhosa

Aos amigos de longa data Magna, Cinthia Vitorino, Bel, Anne, Gu, Débora, Bruno, Henrique, Rogéria, Flávia, Bernardo, Cris, Thaís, Gabi por sempre torcerem pelo meu sucesso pessoal e profissional

À todos os funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho

À banca examinadora pela contribuição dada para o aprimoramento do meu trabalho

À empresa Copersucar, especialmente Sra. Madalena Esquiaveto e Sr. Danilo, pelo suporte técnico.

À Usina Furlan, especialmente ao Sr. Régis e Sr Gilmar, pela doação de caldo de cana-de-açúcar

À Fapesp pela bolsa de estudo concedida

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL	1
INTRODUÇÃO GERAL	4
CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMIDO EM CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR	5
RESUMO	5
SUMMARY	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Síntese de amido na cana-de-açúcar	11
2.2. Extração de amido	17
2.3. Enzimas amilolíticas desramificantes.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar	21
3.2. Extração e purificação do amido de caldo de cana-de-açúcar.....	23
3.3. Estudo da estrutura dos grânulos de amido de cana-de-açúcar	23
3.4. Espectro de absorção do complexo amido e iodo	24
3.5. Determinação da temperatura de gelificação do amido de cana-de-açúcar.....	24
3.6. Determinação da filtrabilidade da solução de amido de cana-de-açúcar.....	25
3.7. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à diferentes enzimas amilolíticas .	25
3.7.1. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima glicoamilase	25
3.7.2. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima pululanase	26
3.7.3. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima isoamilase.....	27
3.7.4. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar às α -amilases bacterianas e fúngica comerciais	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
4.1. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar	30
4.2. Estudo da estrutura dos grânulos de amido de cana-de-açúcar	34
4.3. Espectro de absorção do complexo amido e iodo	35
4.4. Determinação da temperatura de gelificação do amido de cana-de-açúcar.....	36
4.5. Estudo da filtrabilidade da suspensão de amido de cana-de-açúcar.....	37
4.6. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à diferentes enzimas amilolíticas .	38

4.6.1.	Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima glicoamilase	38
4.6.2.	Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima amilolítica desramificante pululanase	40
4.6.3.	Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima amilolítica desramificante isoamilase	42
4.6.4.	Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar às α -amilases bacterianas e fúngica comerciais	43
5.	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	CAPÍTULO II – DETERMINAÇÃO DE α-AMILASE RESIDUAL EM AÇÚCAR	
	BRUTO	56
	RESUMO	56
	SUMMARY	57
1.	INTRODUÇÃO	58
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	60
2.1.	Aplicação de enzimas no processamento do açúcar	60
2.2.	Determinação da atividade de α -amilase	66
3.	MATERIAL E MÉTODOS	75
3.1.	Determinação de α -amilase residual em açúcar bruto	75
3.2.	Extração e concentração de α -amilase de açúcar bruto.....	75
3.3.	Determinação de α -amilase pelo Método Iodométrico	75
3.4.	Determinação de α -amilase pelo Método de Phadebas.....	76
3.5.	Determinação de α -amilase utilizando-se substrato ρ -nitrofenil-maltoheptaosídeo BPNPG7	77
3.6.	Determinação de α -amilase pelo Método de Bernfeld modificado.....	78
3.7.	Teste de repetibilidade do Método de Bernfeld modificado para determinação de α -amilase	79
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	80
4.1.	Determinação de α -amilase utilizando-se o Método Iodométrico	80
4.2.	Determinação de α -amilase utilizando-se Método de Phadebas	81
4.3.	Determinação de α -amilase utilizando-se o substrato ρ -nitrofenil-maltoheptaosídeo BPNPG7	82
4.4.	Determinação de α -amilase pelo Método de Bernfeld modificado.....	83
4.5.	Teste de repetibilidade da determinação de α -amilase pelo Método de Bernfeld modificado	85

5. CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
ANEXO 1	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - 1: Teores de amido nas variedades de cana-de-açúcar, utilizando-se curva padrão de amido de batata	32
Figura 1 - 2: Temperatura e Índice Pluviométrico na região de Santa Bárbara D'Oeste no período de Maio a Novembro de 2007	32
Figura 1 - 3: Grânulos de amido de cana-de-açúcar (a), amido de batata (b), amido de mandioca (c) e amido de milho (d) (aumento 1000x).....	34
Figura 1 - 4: Grânulos de amido de cana-de-açúcar (aumento de 10.000x).	35
Figura 1 - 5: Perfis de absorção dos complexos de amido iodo.....	36
Figura 1 - 6: Grânulos de amido de cana em suspensão à temperatura ambiente (a), gelificado à 70°C (b) e gelificado à 75°C (c) (aumento 1000x em microscópio óptico).....	37
Figura 1 - 7: Hidrólise de diferentes amidos <i>in natura</i> pela enzima glicoamilase, 50°C durante 1h.	39
Figura 1 - 8: Hidrólise de diferentes amidos gelificados pela enzima glicoamilase.	40
Figura 1 - 9: Hidrólise de diferentes tipos de amido pela enzima amilolítica desramificante pululanase, determinada pelo teste de coloração com reagente de iodo.	41
Figura 1 - 10: Hidrólise de diferentes tipos de amido pela enzima amilolítica desramificante pululanase, determinada pela formação de açúcares redutores.	41
Figura 1 - 11: Hidrólise de amido de cana-de-açúcar (a), milho (b), mandioca (c), arroz ceroso (d), milho ceroso (e), pela enzima amilolítica desramificante isoamilase de <i>Flavobacterium sp.</i>	43
Figura 1 - 12: Açúcares redutores formados após hidrólise de amido de arroz ceroso, batata , mandioca, milho ceroso e cana-de-açúcar com α -amilase de <i>Bacillus licheniformis</i>	44

Figura I - 13: Açúcares redutores formados após hidrólise de amido de arroz ceroso, batata , mandioca, milho ceroso e cana-de-açúcar com α -amilase de <i>B. subtilis</i>	45
Figura I - 14: Açúcares redutores formados após hidrólise de amido de arroz ceroso, batata , mandioca, milho ceroso e cana-de-açúcar com α -amilase de <i>Aspergillus oryzae</i>	47
Figura II - 1: Hidrólise do amido com α -amilase.....	60
Figura II - 2: Amido complexado com corante Cibacron Blue.....	70
Figura II - 3: Reação de determinação de α -amilase utilizando-se o substrato <i>p</i> -nitrofenil-maltoheptaosídeo BPNPG7 e α -glicosidase.	74
Figura II - 4: Curva padrão de α -amilase por Método Iodométrico.	80
Figura II - 5: Curva padrão de α -amilase utilizando-se o Método de Phadebas...	81
Figura II - 6: Determinação de α -amilase pelo Método <i>p</i> -nitrofenil-maltoheptaosídeo BPNPG7	83
Figura II - 7: Curva padrão de α -amilase - Método de Bernfeld modificado - Determinação de α -amilase em açúcar bruto 1.....	84
Figura II - 8: Curva padrão de α -amilase - Método de Bernfeld modificado - Determinação de α -amilase em açúcar bruto 2.....	84
Figura II - 9: Concentração média de α -amilase em 10 amostras de açúcar bruto determinadas pelo Método de Bernfeld modificado.....	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - 1: Teores de amido * (mg / Kg. %°Brix) em variedades de cana-de-açúcar, determinados utilizando-se curva padrão de amido de batata (AB) e de cana-de-açúcar (AC)	30
Tabela II - 1: Características bioquímicas das α -amilases produzidas por diferentes espécies de <i>Bacillus</i>	64
Tabela II - 2: Resultados da análise de Repetibilidade (R&R) da determinação de α -amilase (ppm) em 10 amostras de açúcar bruto pelo Método de Bernfeld modificado.....	86
Tabela II - 3: Análise de repetibilidade do Método Bernfeld modificado para determinação de α -amilase residual em açúcar bruto	87

RESUMO GERAL

O presente trabalho visou à determinação da quantidade de amido em caldo de algumas variedades de cana-de-açúcar (RB86-7515, SO83-2847, RB72-454, SP80-3280 e RB85-5536) durante uma safra (período de Abril a Novembro de 2007), estudo de algumas características do amido de cana-de-açúcar e a adequação de metodologia para a determinação de atividade de α -amilase residual em açúcar bruto. A variedade de cana-de-açúcar RB86-7515 apresentou maior teor de amido durante toda safra entre as variedades analisadas. Não foi observado correlação entre o índice pluviométrico e as temperaturas da região e o teor de amido encontrado nas variedades de cana-de-açúcar. Na análise dos grânulos de amido por microscopia eletrônica de varredura (MEV) o amido de cana-de-açúcar apresentou forma esférica e diâmetro na faixa de 1-3 μm , tamanho muito inferior quando comparado ao amido de batata, mandioca e milho. Os amidos de cana-de-açúcar, milho, batata e amido solúvel complexados com iodo apresentaram maior absorção na faixa de 540 a 620 nm. O amido de cana-de-açúcar *in natura* mostrou maior susceptibilidade à enzima glicoamilase em relação aos amidos de milho ceroso, mandioca e batata. O amido de cana-de-açúcar mostrou susceptibilidade à enzima amilolítica desramificante pululanase que hidrolisa as ligações α -1,6 glicosídicas de modo similar ao amido de arroz ceroso, que apresenta alto teor de amilopectina. O amido de cana-de-açúcar mostrou susceptibilidade às α -amilases de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Aspergillus oryzae* de modo similar aos outros amidos testados produzindo glicose; maltose; maltotriose; maltotetraose, maltopentaose e α -dextrinas limite. Para a adequação da metodologia para a determinação de α -amilase em açúcar bruto foram testados os métodos de Bernfeld baseado na determinação de açúcares redutores, método Iodométrico baseado na descoloração do complexo amido-iodo, método de Phadebas baseado na hidrólise do amido complexado com corante Cibacron Blue F3GA e o método usando-se o substrato BPNPG7 (benzylidene blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside, Megazyme, Ireland) baseado na hidrólise do substrato e liberação do p-

nitrofenol. O método de Bernfeld se mostrou mais adequado para a quantificação de α -amilase residual em açúcar bruto.

GENERAL SUMMARY

The aim of this work was to quantitatively determine sugarcane starch in five varieties of sugarcane (RB86-7515, SP83-2847, RB72-454, SP80-3280 and RB85-5536) during one harvest (May to November 2007), and study some of the characteristics of sugarcane starch. The variety RB86-7515 showed a higher starch content than the other varieties analyzed throughout the entire harvest. No correlation between the temperature, pluviometric index and starch level was found in any of the samples of sugarcane juice. The sugarcane starch granules examined under the scanning electron microscope showed a spherical shape with a diameter between 1-3 μm , smaller than the starch granules of maize and cassava. The sugarcane, corn, potato and soluble starches formed complexes with iodine, which showed greater absorption in the range from 540 to 620 nm. The crude sugarcane starch showed greater susceptibility to the enzyme glucoamylase than the waxy corn, cassava and potato starches. The sugarcane starch showed a susceptibility to debranching by the amylolytic enzyme pululanase, which hydrolyzed the α -1,6 glucosidic linkages in a way similar to waxy corn starch, which contains a high amount of amylopectin. The sugarcane starch showed susceptibility to the α -amylases from *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus oryzae*, similar to the other starches tested, producing glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose and α -limit dextrins. This work aimed to adequate the methodologies used to determine residual α -amylase in raw sugar. The Bernfeld method is based on the determination of the reducing sugars by an iodometric method based on discoloration of the starch-iodine complex. The Phadebas method is based on the hydrolysis of the starch polymer dyed with Cibachron Blue F3GA, and the method using BPNPG7 p – nitrophenyl maltoheptaoside (benzylidene blocked maltoheptaoside, Megazyme, Ireland) is based on the hydrolysis of the substrate, releasing p-nitrophenol. These three methods were tested for the determination of residual α -amylase in raw sugar, and the Bernfeld method was shown to be more adequate.

INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo cultivada desde a época da colonização. Do seu processo de industrialização obtém-se como produtos o açúcar nas suas mais variadas formas e tipos, o álcool (anidro e hidratado), o vinhoto e o bagaço. Devido à grandeza dos números do setor sucroalcooleiro no Brasil, a cana-de-açúcar é tratada como a principal biomassa energética, base para todo o agronegócio sucroalcooleiro (BANCO DE DADOS DE BIOMASSA, 2009).

A α -amilase bacteriana termoestável é utilizada durante toda a safra, na usina de açúcar, para hidrolisar o amido e facilitar a filtração e cristalização da sacarose. O amido é um polissacarídeo endógeno da cana-de-açúcar, porém altas concentrações interferem no processamento, aumentando a viscosidade, diminuindo a taxa de filtração e reduzindo o rendimento de açúcar bruto. No entanto não existe metodologia padronizada para a determinação de α -amilase residual em açúcar bruto.

Tendo em vista a importância do Brasil como maior produtor de açúcar bruto o trabalho visou à determinação do conteúdo de amido em diferentes variedades de cana-de-açúcar durante o período de Maio a Novembro de 2007; e determinação de algumas características do amido de cana-de-açúcar como: estrutura e tamanho dos grânulos de amido; determinação da temperatura de gelificação; determinação da filtrabilidade da solução de amido de cana-de-açúcar; susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar às enzimas glicoamilase, pululanase, isoamilase, α -amilases bacterianas e fúngica comerciais.

Com o objetivo de adequar a metodologia para determinação de α -amilase residual em açúcar bruto foram testados os métodos de Bernfeld (determinação de açúcares redutores formados a partir do amido), Iodométrico (descoloração do complexo amido-iodo), Phadebas (hidrólise do amido complexado com corante Cibachron Blue) e BPNPG7 (hidrólise do substrato benzylidene blocked p -nitrophenyl maltoheptaoside).

CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMIDO EM CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

O amido é encontrado na cana-de-açúcar como um polissacarídeo de reserva. A quantidade depende da variedade, estágio de desenvolvimento e condições de crescimento da planta. Concentrações de amido acima de 400 ppm no caldo de cana pode resultar na produção de açúcar bruto com conteúdo de amido superior a 150 ppm (baseado em Brix) que causam problemas de filtração, baixa cristalização e menor rendimento de açúcar. Açúcar com alto teor de amido pode resultar em soluções aquosas turvas o qual é inaceitável para muitas aplicações, especialmente em indústrias de bebidas não alcoólicas. O fornecimento de açúcar bruto contendo mais que 150 ppm de amido (baseado em Brix) sofre penalidade em muitos países como a África do Sul e em geral tem menor preço. A produção anual de açúcar no Brasil é estimada em 26 milhões de toneladas, sendo, 10 milhões para o consumo interno e 16 milhões para exportação. Estima-se que a produção de cana-de-açúcar no Brasil, no ano de 2008/2009, será a maior da história atingindo 498,1 milhões de toneladas um crescimento de 16% em relação à safra 2007/2008, quando foram moídas 431,2 milhões de toneladas de cana-de-açúcar.

Este trabalho visou a determinação da quantidade de amido em caldo de algumas variedades de cana-de-açúcar (RB86-7515, SO83-2847, RB72-454, SP80-3280 e RB85-5536) durante uma safra (período de Maio a Novembro de 2007) e estudo de algumas características do amido de cana-de-açúcar. A variedade de cana-de-açúcar RB86-7515 apresentou maior teor de amido durante toda safra entre as variedades analisadas. Não foi observada correlação entre o índice pluviométrico e as temperaturas da região e o teor de amido encontrado nas variedades de cana-de-açúcar. Na análise dos grânulos de amido por microscopia eletrônica de varredura (MEV) o amido de cana-de-açúcar apresentou forma esférica e diâmetro na faixa de 1-3 μm , tamanho muito inferior quando comparado ao amido de batata, mandioca e milho. Os amidos de cana-de-açúcar, milho, batata e amido solúvel complexados com

iodo apresentaram maior absorção na faixa de 540 a 620 nm. O amido de cana-de-açúcar *in natura* mostrou maior susceptibilidade à enzima glicoamilase em relação aos amidos de milho ceroso, mandioca e batata. O amido de cana-de-açúcar mostrou susceptibilidade à enzima amilolítica desramificante pululanase que hidrolisa as ligações α -1,6 glicosídicas de modo similar ao amido de arroz ceroso, que apresenta alto teor de amilopectina. O amido de cana-de-açúcar mostrou susceptibilidade às α -amilases de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Aspergillus oryzae* de modo similar aos outros amidos testados produzindo glicose; maltose; maltotriose; maltotetraose, maltopentaose e α - dextrinas limite.

SUMMARY

Starch is found in sugarcane in the form of a storage polysaccharide. The starch concentration in sugarcane depends on many factors such as cane variety, growth conditions, stage of maturity and transport conditions. High starch contents in sugarcane juice may cause delays in processing due to increasing viscosities leading to slow filtration and poor crystallization. Raw sugar containing high starch levels could result in turbid aqueous solutions and is unacceptable for several applications, especially in the soft drink industry. A penalty is imposed on local raw sugar arriving at the South African Sugar Terminal with a starch content above 150 ppm. The annual production of raw sugar in Brazil is estimated as 26 million tons, 10 million for internal consumption and 16 million for exportation. It is estimated that the Brazilian sugar cane production for the year 2008/2009 will be the greatest in history, reaching 498.1 million tons, a growth of 16% as compared to the 2007/08 harvest, which produced 431.2 million tons.

The aim of this work was to quantitatively determine sugarcane starch in five varieties of sugarcane (RB86-7515, SP83-2847, RB72-454, SP80-3280 and RB85-5536) during one harvest (May to November 2007), and study some of the characteristics of the sugarcane starch. The variety RB86-7515 showed a higher starch content than the other varieties analyzed throughout the entire harvest. No correlation was found between the temperature, pluviometric index and starch level in the samples of sugarcane juice. The sugarcane starch granules examined under the scanning electron microscope showed a spherical shape with a diameter between 1-3 μm , smaller than the starch granules of maize and cassava. The sugarcane, corn, potato and soluble starches formed complexes with iodine, which showed greater absorption in the range from 540 to 620 nm. The crude sugarcane starch showed greater susceptibility to the enzyme glucoamylase than the waxy corn, cassava and potato starches. The sugarcane starch showed susceptibility to debranching by the amylolytic enzyme pululanase, which hydrolyzed the α -1,6 glucosidic

linkages in a way similar to waxy corn starch, which contains a high amount of amylopectin.

The sugarcane starch showed susceptibility to the α -amylases of *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus oryzae*, similar to the other starches tested, producing glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose and α -limit dextrins.

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio é hoje a principal locomotiva da economia brasileira e responde por um em cada três reais gerados no país. O sucesso desse setor é devido ao clima diversificado, chuvas regulares, energia solar abundante e grande disponibilidade de água doce. O Brasil possui 388 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade, dos quais 90 milhões ainda não foram explorados. Esses fatores fazem do país um lugar de vocação natural para a agropecuária e todos os negócios relacionados à suas cadeias produtivas. O agronegócio é responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB), 42% das exportações totais e 37% dos empregos brasileiros. Entre 1998 e 2003, a taxa de crescimento do PIB agropecuário foi de 4,67% ao ano (PORTAL DO AGRONEGÓCIO).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área plantada de 7 milhões de hectares e uma safra anual de cerca de 420 milhões de toneladas. Em consequência disso, também é, naturalmente, o mais importante produtor de açúcar e de álcool. Em 2007 o setor de cana-de-açúcar movimentou cerca de 41 bilhões no Brasil. Foram produzidas 30 milhões de toneladas de açúcar e 17,5 bilhões de litros de bioetanol. Foram exportados 19 milhões de toneladas de açúcar (R\$ 7 bilhões) e 3 bilhões de litros de etanol (US\$ 1,5 bilhões em divisas) representando 2,65% da economia nacional. Para a safra de 2009/2010, foi previsto que 25 novas usinas deverão entrar em operação. Os principais destinos do açúcar brasileiro são Rússia, Nigéria, Emirados Árabes Unidos, Canadá e Egito (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2008).

Na obtenção de açúcar cristal bruto a qualidade da cana-de-açúcar tem um papel muito importante no custo da produção. Nos últimos 30 anos várias pesquisas foram realizadas com o objetivo de determinar quais são os polissacarídeos presentes no caldo de cana que causam problemas durante o processamento para obtenção do açúcar na usina (CUDDIHY et al. 2006).

O teor de polissacarídeos encontrados durante o processamento da cana-de-açúcar incluindo os endógenos, diferem de acordo com a variedade, condições climáticas, processos de deterioração durante armazenamento e manipulação. Há diversos polissacarídeos, como dextrana e amido, que contribuem para o processamento ineficiente e perdas durante a produção de açúcar (CUDDIHY et al., 2006).

A dextrana é produzida em grande quantidade por microrganismos como *Leuconostoc mesenteroides* que contaminam a cana-de-açúcar principalmente nas estações chuvosas.

O amido é encontrado em alta concentração no topo do colmo e nas folhas da cana-de-açúcar. A presença excessiva de amido durante o processamento do caldo de cana-de-açúcar causa problemas de viscosidade, aquecimento e filtrabilidade (MEADE e CHEN, 1977).

A α -amilase bacteriana tem sido utilizada, em diversas usinas de açúcar, para hidrolisar o amido e facilitar a filtração e a cristalização da sacarose.

O trabalho visou a determinação do conteúdo de amido em diferentes variedades de cana-de-açúcar durante o período de Maio a Novembro de 2007; e determinação de algumas características do amido de cana-de-açúcar como: estrutura e tamanho dos grânulos de amido; determinação da temperatura de gelificação; determinação da filtrabilidade da solução de amido de cana-de-açúcar; susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar às enzimas glicoamilase, pululanase, isoamilase, α -amilases bacterianas e fúngica comerciais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Síntese de amido na cana-de-açúcar

A sacarose é sintetizada nas folhas da cana-de-açúcar e é translocada para o colmo onde é hidrolisada pela invertase da parede celular antes que parte da hexose seja estocada nas células. Quando a cana-de-açúcar atinge a maturidade, o acúmulo de sacarose no colmo aumenta gradualmente com a concomitante queda do conteúdo de hexose. Em cana-de-açúcar em estágio de maturação avançado a sacarose é alojada em espaços intercelulares (BATTA e SINGH, 1986).

QUDSIEH et al. (2001) estudaram as mudanças físico químicas na cana-de-açúcar e no caldo de cana-de-açúcar amarela cultivada na Malásia em diferentes porções do caule durante o desenvolvimento e maturação. Os autores constataram que o teor de sacarose aumentou durante os seis meses de maturação sofrendo uma pequena queda no sétimo mês e os teores médios apresentados no topo, meio e extremidade inferior foram 5,95%, 7,75% e 8,70% respectivamente.

Ao final do processo de produção do açúcar bruto, uma fina camada de xarope é intencionalmente depositada na superfície do cristal. A pureza da camada que recobre o puro cristal, não é superior a 55-60 %. O açúcar bruto contém em média 97,52% de sacarose; 0,48% de água e 2% de impurezas. A composição das impurezas inclui açúcares redutores (23%), cinza solúvel (38,5%), impurezas suspensas (3%) e constituintes indeterminados (35,3%) (MAX et al., 1972).

Geralmente existe uma relação entre a qualidade do açúcar bruto recebido pela refinaria e as dificuldades encontradas durante o processamento para transformá-lo em um açúcar branco de boa qualidade (WASTON e WILSON, 1975).

Estudos realizados mostraram que o teor de açúcares redutores diminui durante a maturação enquanto o teor de sacarose aumenta, e que o volume e

a qualidade do caldo de cana-de-açúcar apresentam mudanças significativas dependendo da época de colheita. Os estudos apontaram que o índice de maturação é considerado como o mais importante para a determinação dos fatores de qualidade (HUMBERT, 1968).

O amido é um produto primário da fotossíntese e é temporariamente estocado nas folhas da cana-de-açúcar como reserva de energia e pode ser convertido em açúcar (BOYES, 1958).

Amido é insolúvel em água fria e parcialmente solúvel em água quente. A massa molecular da molécula de amido, de modo geral, pode variar 300.000 a 2.000.000 Da (CUDDIHY et al., 2006).

Segundo VIGNES (1974) o amido de cana-de-açúcar existe como grânulos semicristalinos que possuem tamanho de 1-10 μm e contém aproximadamente 19% de amilose e 81% de amilopectina.

WHAYMAN e WILLERSDORF (1976) estimaram o conteúdo de amilose em amido de cana-de-açúcar das variedades N:Co 310 e Q 58 e encontraram o valor de 15% comparando com o amido de batata que possui 23% de amilose. Os autores sugeriram que a amilopectina de cana-de-açúcar era mais ramificada do que a amilopectina de amido de milho ou batata. O topo do colmo e as folhas de cana-de-açúcar são ricos em amido e açúcares redutores. Desta forma a colheita mecânica da cana-de-açúcar resulta em maior quantidade de amido no caldo.

BATTA e SINGH (1986) estudaram a síntese e estocagem da sacarose e amido em cana-de-açúcar cultivada em diferentes condições climáticas, correlacionando as enzimas sacarose sintase, sacarose-fosfato sintase e invertase. Com a maturação o acúmulo de sacarose no colmo aumentou gradualmente com concomitante diminuição no conteúdo de glicose e frutose. Independente da porção do colmo, o conteúdo de amido atingiu a concentração máxima na fase de amadurecimento, declinando na maturidade. As concentrações de amido no topo, meio e base do colmo foram respectivamente $10,3 \pm 0,6$ mg/g; $8,4 \pm 0,5$ mg/g e $6,2 \pm 0,5$ mg/g na fase de amadurecimento enquanto que diminuíram para $7,6 \pm 0,3$ mg/g; $5,2 \pm 0,5$ mg/g e $3,8 \pm 0,5$ mg/g

(base fresca) na fase de pleno amadurecimento da cana. Nas três porções do colmo o conteúdo de amido foi cerca de 6 a 4 vezes maior na fase de amadurecimento e maturidade respectivamente, comparada com a fase de alongamento do colmo.

O amido está presente no caule da cana-de-açúcar, mas é mais abundante nas folhas e no ápice do caule. O amido é encontrado em todos produtos da cana-de-açúcar, na usina e refinaria, incluindo açúcar bruto e refinado, porém a concentração varia amplamente dependendo da estação, variedade, ocorrência de doenças na cana, maturidade, condições de processamento e método de análise (IMRIE, TILBURY, 1972).

EBRAHIM et al. (1998) estudaram o efeito da temperatura de crescimento no acúmulo de sacarose e amido em cana-de-açúcar. As plantas foram cultivadas durante 10 meses em estufa a 27°C, considerada a temperatura ótima, a baixa temperatura (15°C) e a alta temperatura (45°C). Foi verificado que os teores de sacarose e amido nas folhas de cana-de-açúcar cultivada à 15°C foram muito superior aos teores das plantas cultivadas a 45°C. A concentração de sacarose no colmo da planta crescida a 15°C e 27°C foi a mesma, porém foi menor em plantas cultivadas a 45°C.

KAMPEN (2006) relatou que o teor de amido na cana-de-açúcar varia durante o dia porque os produtos da fotossíntese são temporariamente estocados nas folhas como amido. À noite, este é convertido em açúcares que movem das folhas para o resto da planta. Nas folhas o menor teor de amido é verificado diversas horas após o nascer do sol e o maior é encontrado ao pôr-do-sol. Os grânulos do amido de cana-de-açúcar apresentaram tamanho variável de 1-10 μ aproximadamente e cerca de 20% de amilose e 80% de amilopectina. Concentrações de 2780 ppm de amido em caldo misto e 2017 ppm de amido em xarope clarificado foram encontradas em usinas de açúcar da Louisiana (EUA). Segundo o autor concentrações de 1000 ppm de α -amilase em relação a amido (base seca) são suficientes para a remoção desse polissacarídeo e isto corresponde a 2,5 ppm de α -amilase no caldo misto.

CUDDIHY et al. (2006) estudaram o teor de amido de quatro variedades de cana-de-açúcar da Austrália e concluíram que o teor de amido é uma característica da variedade. Observaram que o teor de amido na cana-de-açúcar não sofreu mudança significativa durante os últimos três meses de maturidade e que o açúcar bruto produzido no começo da safra pode apresentar altos níveis de amido. Foi verificado que após o processo de extração cerca de 30 a 40% do amido presente no caldo de cana-de-açúcar ainda permaneceu no açúcar cristal branco.

Várias pesquisas indicam que a presença de polissacarídeos, contribuem para uma produção ineficiente e perdas nas usinas de açúcar. O amido e a dextrana presente em caldo de cana interferem nos processos de clarificação, filtração e cristalização. Durante o processo, aumentam a viscosidade, inibem a cristalização e aumentam as perdas de sacarose no melaço. Podem também contribuir para distorção da polarização. Polissacarídeos como o amido são conhecidos por não serem extraídos durante o processamento e acabarem sendo incorporados ao açúcar cristal bruto. Estudos têm mostrado que concentrações de 200-250 ppm de amido em açúcar bruto na refinaria podem causar problemas durante o processamento (CUDDIHY et al. 2006).

O amido é considerado um fator importante de qualidade da cana-de-açúcar. Na África do Sul seu teor é monitorado no açúcar bruto, e caso o conteúdo no açúcar seja superior a 150 ppm são aplicadas penalidades como o pagamento de multas. Na safra 2003/2004 cerca de US\$ 11 513 foram pagos em penalidades (MOHABIR e KHESWA, 2003).

De acordo com SCHOONEES (2006) a safra de moagem de cana-de-açúcar, na África do Sul, compreende 10 meses, de Março a Dezembro, e somente uma das usinas opera com moenda enquanto que as outras usam um ou dois difusores em paralelo. Foi verificado que o ponto recomendado de aplicação da enzima α -amilase, prática realizada no país há aproximadamente 30 anos, seria o terceiro ou quarto evaporador de série de cinco onde a temperatura seria alta o suficiente para gelatinizar o amido, mas baixa

suficiente para prevenir a inativação da enzima. A utilização de difusores produz caldo com menor teor de amido, da mesma cana-de-açúcar, comparada com a extração por moenda. A autora sugeriu que a utilização de temperatura mais elevada no difusor assegurava a completa gelatinização dos grânulos de amido e por consequência maior hidrólise pela enzima. No estudo da hidrólise de amido usando metodologia de superfície de resposta foi verificado que as melhores condições para a atuação da α -amilase em amostras com alto teor de amido (>800ppm) foram °Brix baixo (25 °Brix) e pH baixo (pH~5,0). No entanto estas condições também favorecem a ação da invertase presente na cana-de-açúcar, embora alta temperatura possa ser usada para inativar a invertase da cana (SCHOONEES, 2006).

A dextrana e o amido são derivados de duas fontes. O amido é formado por atividades metabólicas do crescimento da planta, e a dextrana é formada por microrganismos que crescem na planta.

Altas concentrações de amido em conjunção com teores médios de dextrana podem resultar num aumento sinérgico dos problemas de viscosidade. A combinação desses polissacarídeos dificulta o processamento do açúcar (JOHNSON, 1989).

O teor de amido no açúcar bruto diminui enquanto o caldo é filtrado. Isto explica porque o processo de filtração remove 75% do amido presente no açúcar bruto e explica também porque altos teores do polissacarídeo retardam o processo de filtração (ANYANGWA, et al., 1993).

EL-SYIAD (2000) estudou a qualidade do açúcar bruto produzido no Egito em relação à sacarose, açúcares redutores, cinza, amido, dextrana, filtrabilidade e cor e verificou que as propriedades físico-químicas variavam com a estação. O amido de açúcar bruto foi obtido por precipitação com álcool etílico 95%. Após filtração e lavagem com etanol 80%, o precipitado de amido foi redissolvido em solução 30% de cloreto de cálcio e determinado espectrofotometricamente de acordo com o método da Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C, 1980). O conteúdo de sacarose no açúcar bruto variou de 99,33% a 99,55% com uma média de 99,49%. Baixa velocidade de

filtração era devido à presença de amido e dextrana. O conteúdo de amido no açúcar bruto variou de 190 ppm a 230 ppm e o de dextrana variou de 141 ppm a 374 ppm.

CHEN & CHOU (1993) obtiveram concentrações de 0,001 – 0,100% de amido em caldo de cana-de-açúcar cultivada em Lousiana (EUA) em relação ao teor de sólidos ou 0,018 Libras por tonelada de cana-de-açúcar. E verificaram que concentrações de aproximadamente 0,05% de amido na cana podem causar problemas operacionais na obtenção de açúcar.

EGGLESTON et al. (2007) determinaram o teor de amido em caldo de cana-de-açúcar utilizando o método rápido iodométrico SPRI com algumas modificações. As soluções de caldo de cana foram aquecidas por 5 minutos para completa solubilização do amido. A absorbância da solução azul/violeta formada pelo complexo amido – iodo foi medida a 600 nm. O teor de amido foi monitorado em três usinas de Lousiana (EUA). As concentrações de amido encontradas nos caldos de cana-de-açúcar de 3 usinas foram aproximadamente 1850 ppm/^oBrix, 1600 ppm/^oBrix e 800 ppm/^oBrix, respectivamente. As amostras de caldo de cana da usina 1 apresentaram o maior teor de amido, pois as análises foram realizadas no início da safra quando a cana-de-açúcar estava imatura; as amostras da usina 2 apresentaram teor intermediário e as amostras da usina 3 apresentaram menor teor de amido, pois as análises foram realizadas no final da safra quando a cana já estava madura.

GODSHALL et al. (1998) determinaram o teor de polissacarídeos e sólidos totais e o teor de amido em 6 variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Lousiana (EUA), durante os anos de 1990, 1991 e 1992. As variedades de cana-de-açúcar CP72-370, CP79-318, LCP82-89, CP65-357, CP74-383 e CP70-321 apresentaram teores médios de amido iguais a 1625 ppm, 1021 ppm, 602 ppm, 603 ppm, 612 ppm, 245 ppm baseados em sólidos. Estes valores correspondem a mg/Kg.%^oBrix.

O Centro de Tecnologia Copersucar – (CTC) realizou um estudo no qual o teor de amido no caldo de 7 variedades de cana-de-açúcar foi monitorado no

período de Maio à Outubro de 2005. Os teores médio de amido encontrados nas variedades RB72-454, SP80-1816, SP80-1842, SP81-3250, SP89-1115, SP901638, SP90-3414 foram respectivamente 811 mg / Kg.%Brix; 1118 mg / Kg. %Brix; 1202 mg / Kg. %Brix; 1175 mg / Kg. %Brix; 1323 mg / Kg. %Brix; 598 mg / Kg. %Brix; 923 mg / Kg. %Brix (OLIVEIRA, 2006).

2.2. Extração de amido

A extração de amido na indústria de alimentos é realizada através de diferentes métodos, apresentando diferentes características, eficiência de extração e propriedades funcionais. Condições ideais de extração causam pequenas ou nenhuma mudança estrutural dos componentes extraídos. No caso do amido, o objetivo é não causar danos na estrutura cristalina ou despolimerização (HAN e HAMAKER, 2002).

O fracionamento é um método físico que isola amido das proteínas. Outros métodos utilizam soluções alcalinas para solubilizar proteínas, possibilitando a extração de amido puro de farinhas. Agentes de extração incluem compostos alcalinos como detergentes e hidróxido de sódio e o número de estágios de extração pode variar (LIM et al. 1999; MATSUNAGA, et al. 2003).

O amido de mandioca e de milho, contém, respectivamente 17% de amilose + 83% de amilopectina e 24% de amilose + 76% de amilopectina (BEMILLER e WHISTLER,1996).

STEVENSON e WHAYMAN (1976) descreveram a extração de amido de cana-de-açúcar. O caldo de cana-de-açúcar foi centrifugado e o precipitado foi lavado com água destilada até que o sobrenadante descartado estivesse claro. Então o precipitado foi ressuscitado em água e transferido para funil de separação e a solução foi tratada com solventes orgânicos imiscíveis em água, como clorofórmio ou tolueno para a remoção dos compostos coloridos. A suspensão foi misturada vigorosamente, e colocada em balão de separação. A

emulsão formada se separou em duas fases. Os grânulos de amido foram encontrados na fase aquosa. Esta operação foi realizada sucessivas vezes, para completa remoção das substâncias coloridas. Em seguida os grânulos de amido foram concentrados por centrifugação e estocados a 2°C. O objetivo dos autores foi analisar as características do amido extraído da cana-de-açúcar comparando com o amido de batata. Os autores verificaram que os grânulos de amido de cana-de-açúcar quando observados no microscópio eletrônico possuíam formato irregular, predominando grânulos esféricos e ovalados de diâmetro estimado em 1 – 5 µm.

PARK et al. (1985) estudaram a remoção enzimática de amido de caldo de cana. Foi verificado que a concentração de amido em caldo de cana pode variar de 0,01-0,1%, dependendo da estação e fase de desenvolvimento da planta. O diâmetro dos grânulos de amido pode variar de 1 a 6 µm. Os autores verificaram que o amido (intacto) de cana-de-açúcar é susceptível às α -amilases bacterianas e fúngica, porém a hidrólise é demorada. O amido de cana-de-açúcar apresentou temperatura de gelificação na faixa de 65°C - 80°C. O amido gelatinizado de cana foi rapidamente hidrolisado pelas α -amilases de *Bacillus licheniformis* (Termamyl), comercializada pela Novo Nordisk, *Bacillus subtilis* (HT1000) comercializada pelo laboratório Miles Inc. e de *Aspergillus oryzae* preparada como descrito por Park e Sato (1982). Para a remoção rápida do amido foi necessário gelatinizar o amido por aquecimento preferencialmente até 80°C. A α -amilase bacteriana pode ser adicionada antes do aquecimento e então aquecida a 80°C - 90°C por 30 minutos. A α -amilase bacteriana hidrolisou o amido em dextrina e oligossacarídeos de grau de polimerização 1-7 e mostrou-se adequada para a remoção de amido de caldo de cana-de-açúcar e produção de sacarose cristalina. A α -amilase fúngica hidrolisou o amido produzindo principalmente maltose e pequena quantidade de glicose e maltotriose. Os autores relataram que como a preparação enzimática de α -amilase fúngica contém invertase, esta preparação seria adequada para a fermentação do caldo de cana-de-açúcar integral.

2.3. Enzimas amilolíticas desramificantes

A degradação enzimática dos grânulos de amido e o posterior estudo dos produtos formados e resíduos da hidrólise permitem obter informações a respeito da estrutura destes grânulos. A descoberta e utilização de enzimas desramificantes altamente purificadas que hidrolisam especificamente as ligações glicosídicas α -1-6, em combinação com métodos cromatográficos de separação dos produtos da digestão enzimática tem possibilitado o estudo mais detalhado da organização das cadeias de α -D-glucanas ramificadas e da amilopectina em particular (FRANCO e CIACCO, 1997).

Enzimas desramificantes como isoamilases e pululanases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,6 especificamente de α -glucanas. São capazes também de catalisar reações de condensação em misturas com alto teor de maltooligossacarídeos e ciclodextrinas. Além disso, catalisam reações de transglicosilação quando α -maltofluorídeo é usado como substrato. Isoamilases são conhecidas por serem produzidas por *Pseudomonas amyloclavata*, *Cytophaga sp.*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Escherichia coli* e *Flavobacterium sp.* (YAMAMOTO, 1994).

As isoamilases de *Pseudomonas sp.* hidrolisam as ligações α -1,6 glicosídicas do amido, amilopectina, glicogênio liberando cadeias lineares. A isoamilase hidrolisa preferencialmente cadeias lineares sendo que o substrato mínimo é o oligossacarídeo maltosil - maltotriose.

Pululanases são produzidas por *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Bacillus acidopullulyticus*, *Thermoanaerobium sp.* e *Clostridium thermosulfurogenes*. Pululanase e isoamilase são utilizadas pela indústria para a produção de glicose e maltose em combinação com glicoamilase ou β -amilase, respectivamente (YAMAMOTO, 1994).

A pululanase é uma enzima que hidrolisa especificamente as ligações glicosídicas α -1,6 de amido e derivados contendo no mínimo duas unidades de glicose nas cadeias laterais ramificadas. Sendo que o substrato mínimo da pululanase é o oligossacarídeo maltosil maltose (ABDULLAH e FRENCH,

1970). Sua ação consiste em remover as ramificações da cadeia e transformar o amido em dextrinas lineares (FERNANDES, 2007). WALLENFELS et al. (1966) estudaram a aplicação de pululanase na hidrólise de polissacarídeos ramificados e concluíram que esta enzima hidrolisava facilmente as cadeias curtas, por exemplo, resíduos de maltose e maltotriose de β -dextrina limite e α -dextrina limite de amilopectina.

As glicoamilases, também conhecidas como amiloglicosidases hidrolisam as ligações α - 1,4; α - 1,6 e α 1,3 glicosídicas do amido e derivados liberando unidades de glicose. As glicoamilases comerciais são utilizadas na etapa de sacarificação de amido liquefeito e produção de glicose (RIAZ, 2007).

A glicoamilase de *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* são capazes de hidrolisar o amido gelificado e também amido *in natura* em menor velocidade (WANKHEDE e RHATEKE, 1982).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar

As variedades de cana-de-açúcar RB86-7515, SO83-2847, RB72-454, SP80-3280 e RB85-5536, cultivadas em maior quantidade para a obtenção de açúcar na usina Furlan foram escolhidas para o estudo.

As amostras foram coletadas aproximadamente a cada 15 dias durante o período de Maio a Novembro de 2007 na usina de açúcar Furlan situada em Santa Bárbara D'Oeste, região de Campinas. No ato da coleta os funcionários preenchem um formulário com informações como a variedade da cana-de-açúcar, temperatura na hora da colheita, umidade relativa do ar, local de colheita e °Brix do caldo de cana-de-açúcar para serem realizadas as correlações com as condições edafoclimáticas.

A concentração de amido em caldo de cana-de-açúcar foi determinada pelo método adotado oficialmente na indústria açucareira da Austrália (2001) e usado no Centro de Tecnologia Canavieira da Copersucar (2005). Na metodologia é utilizado amido de batata como padrão. Foi testado também amido extraído do caldo de cana-de-açúcar para comparação.

Para a determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar, uma amostra de 50 mL de caldo de cana foi filtrada em algodão, desprezando-se os primeiros 10 mL do filtrado. Amostras de $3,6 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ foram pesadas em dois balões volumétricos de 50 mL identificados como balão 1 (prova em branco) e balão 2 (amostra).

Foi adicionado em cada balão $15,00 \text{ mL} \pm 0,05 \text{ mL}$ da solução de cloreto de cálcio/ácido acético (solução 40% de cloreto de cálcio ajustada para pH 3,0 com solução de ácido acético 0,033 mol/L) e em seguida a mistura foi homogeneizada.

Os balões foram fechados e colocados em banho de água em ebulição por $15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$. Os balões foram removidos do banho, resfriados em água

corrente até a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado em cada balão 15 mL de solução de ácido acético 0,033 mol/L. No balão 1 (prova em branco) foi adicionado água deionizada até completar o volume. No balão 2 (amostra) foi adicionado 10 mL da solução de iodeto/iodato de potássio (composta por 10,0 mL \pm 0,5mL de solução 10% de iodeto de potássio em 90,0 mL \pm 0,5mL de água deionizada e 100,0 mL \pm 0,5 mL de solução de iodato de potássio 0,0017mol/L) e o volume completado com água deionizada. Após homogeneização a absorbância das soluções foi medida a 700 nm no intervalo de 10 a 20 min após a adição de iodeto/iodato, usando a solução contida do balão 1 como prova em branco.

Para a preparação da curva de calibração foi adicionado 3,60 g \pm 0,2 g de sacarose em 9 balões volumétricos de 50 mL. Foram adicionados diferentes quantidades de água destilada e soluções padrões de amido de 45 mg/L, 180 mg/L ou 900 mg/L para obtenção de concentrações de amido 0; 25; 50; 100; 150; 200; 250; 350 e 500 mg /Kg. Os frascos foram agitados para dissolução do açúcar. Em seguida foi adicionado 15 mL de solução de cloreto de cálcio/ácido acético em cada balão. Os balões tampados foram colocados em banho-maria em ebulição. Após 15 minutos os balões foram retirados do banho e resfriados em água corrente até a temperatura ambiente. Então foi adicionado 15 mL de solução de ácido acético 0,033 mol/L. Em seguida foi adicionado 10 mL de solução de iodeto/iodato de potássio em cada balão e o volume completado com água deionizada. Após homogeneização a absorbância das soluções foi medida a 700 nm, no intervalo de 10 a 20 min após a adição da solução de iodeto/ iodato, utilizando água destilada como branco. A concentração de amido foi expressa como mg de amido por Kg de açúcar e porcentagem de grau Brix. Os resultados abaixo do limite de detecção foram expressos como < 25mg/kg%^oBrix. O teor de amido das variedades de cana-de-açúcar foi relacionado com a temperatura e índice pluviométrico na região de Santa Bárbara D'Oeste.

As temperaturas médias e os índices pluviométricos, no período de Maio a Dezembro de 2007, da região de Santa Bárbara D'oeste onde as amostras

de cana-de-açúcar foram obtidas no site do CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura.

3.2. Extração e purificação do amido de caldo de cana-de-açúcar

O amido de caldo de cana-de-açúcar foi extraído como descrito por Park et al. (1985). Uma amostra de 2 L de caldo de cana-de-açúcar foi filtrada em tecido e em seguida centrifugada a $9.630 \times g$ por 15 minutos a 5°C . O precipitado foi lavado diversas vezes com água destilada até que o sobrenadante descartado estivesse claro e límpido. A suspensão de amido em água foi tratada diversas vezes, com o mesmo volume de clorofórmio, em funil de separação, para separação dos compostos coloridos como descrito por STEVENSON e WHAYMAN (1976). A fase aquosa contendo amido foi recolhida do funil de separação e centrifugada para a separação dos grânulos de amido. O amido precipitado foi lavado com etanol diversas vezes. A amostra de amido foi armazenada em dessecador. Para obtenção de maior quantidade de amido, uma amostra de 50 L de caldo de cana foi centrifugada em centrífuga contínua CEPA – LE. O amido obtido foi purificado como descrito acima.

3.3. Estudo da estrutura dos grânulos de amido de cana-de-açúcar

A estrutura dos grânulos de amido de cana-de-açúcar foi observada em microscópio eletrônico de varredura (JEOL modelo JSM 5800 LV). Os grânulos de amido extraídos de cana-de-açúcar foram dispersos em fita adesiva dupla para fixação e depósito de ouro em *Sputter* (Balzer modelo SCP 050). O tamanho médio dos grânulos de amido de cana-de-açúcar foi estimado com base na barra métrica fornecida pelo equipamento. Amostras de amido de batata, milho e mandioca foram utilizadas para comparação.

3.4. Espectro de absorção do complexo amido e iodo

Os perfis do espectro de absorção das soluções de amido de cana-de-açúcar, milho ceroso, milho, amido de batata solúvel, batata e amido com 99% de amilopectina complexado com iodo foram determinadas em Espectrofotômetro Beckman Coulter DU 640 na faixa de 380 a 700 nm, de acordo com o método descrito por Archibald et al. (1988), com modificações.

Amostras de 10 mg de amido foram pesadas em balança analítica e transferidas para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água destilada. Em seguida os tubos de ensaio tampados com filme plástico foram aquecidos em banho-maria em ebulição por 5 minutos para completa gelificação do amido. Os tubos foram resfriados até temperatura ambiente, em água corrente. Adicionou-se 5 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,9 nos tubos de ensaio e uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubos de ensaio contendo 4 mL de solução de iodo-KI 0,01N. O espectro de absorção das soluções de amido foram determinados calibrando o equipamento com água destilada.

3.5. Determinação da temperatura de gelificação do amido de cana-de-açúcar

A temperatura de gelificação do amido de cana-de-açúcar foi determinada como descrito por PARK et al. (1985). Tubos de ensaio contendo amostras de suspensão 1% de amido em água destilada foram aquecidos, em banho-maria, na faixa de 50°C - 80°C. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas em diferentes tempos e transferidas para tubos de ensaio. Em seguida as amostras foram coradas com solução de iodo-KI 0,01 N e o intumescimento ou gelificação dos grânulos de amido foi observado em microscópio óptico.

3.6. Determinação da filtrabilidade da solução de amido de cana-de-açúcar

No estudo da filtrabilidade foram preparadas suspensões 0,02% de amido de cana-de-açúcar e de amido de batata como controle.

As amostras de suspensão de 20 mg de amido em 100 mL de água destilada foram adicionadas em frascos béquer de 250 mL e os frascos foram aquecidos em ebulição durante 6 minutos e em seguida resfriados em água corrente até temperatura ambiente. As amostras de amido gelificado foram filtradas em membranas de porosidade de 0,2 μm , 0,8 μm e 5 μm utilizando-se kitassato e vácuo. Para a verificação da presença de amido nas membranas e nas amostras de solução filtrada foi utilizada solução 0,01N de iodo-KI.

3.7. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à diferentes enzimas amilolíticas

3.7.1. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima glicoamilase

A susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima glicoamilase foi testada usando-se amido *in natura* e gelificado como descrito por SATO (1991). Para o teste com amido *in natura*, amostras de 1 g de amido de cana-de-açúcar, batata, mandioca, milho e arroz ceroso foram pesadas e transferidas para duas séries de tubos de ensaio (controle e teste). Em seguida adicionou-se 5 mL de água destilada e 5 mL de tampão acetato 0,1 M pH 4,5 e os tubos foram agitados vigorosamente. Foram adicionados 30 μL de glicoamilase comercial aos tubos testes e 30 μL de água destilada aos tubos controle. Os tubos foram incubados em banho a 50°C durante 1h e em seguida, foram transferidos para banho de gelo, para paralisar a reação. As

amostras foram diluídas 1:50 e os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (1945), utilizando-se glicose como padrão. A absorbância das amostras foi determinada a 540 nm.

No estudo da susceptibilidade do amido gelificado à glicoamilase, amostras de 0,1 g de amido de cana-de-açúcar, batata, mandioca, milho e arroz ceroso foram transferidas para duas séries dois tubos de ensaio (controle e teste). Após a adição de 5 mL de água destilada os tubos de ensaio foram incubados em banho em ebulição durante 5 minutos e resfriados em água corrente até a temperatura ambiente. Adicionou-se 5 mL de tampão acetato 0,1 M pH 4,5 e os tubos foram agitados vigorosamente. Foram adicionados 30 µL de solução de glicoamilase comercial na diluição 1:10 aos tubos testes e 30 µL de água destilada aos tubos controle. Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 50°C durante 1h. Em seguida os tubos foram transferidos em banho de gelo, para paralisar a reação. As amostras foram diluídas 1:50 e os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (1945) como descrito anteriormente.

3.7.2. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima pululanase

A susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima pululanase foi testada como descrito por SATO (1991) utilizando-se amido de mandioca, batata, milho, arroz ceroso e milho ceroso para comparação. As amostras de 10 mg de amido e 5 mL de água destilada foram transferidas para duas séries de tubos de ensaio (teste e controle). Os tubos de ensaio foram tampados com papel alumínio e aquecidos em banho-maria em ebulição durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 5 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 e os tubos de ensaio foram incubados em banho a 40°C durante 10 minutos. Nos tubos teste foi adicionado 0,1 mL de pululanase e nos tubos controle foi adicionado 0,1 mL de água destilada. Após incubação a 40°C durante 30 minutos, os tubos foram transferidos para banho de gelo para paralisar a reação.

Para o teste de atividade de pululanase em diferentes tipos de amido pela coloração com reagente de iodo, alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram adicionadas a tubos contendo 0,1 mL de solução 0,01 N de iodo-KI e em seguida foi adicionado 5 mL de água destilada. Foi preparado tubo “branco” contendo 0,5 mL de água destilada, 0,1 mL de solução 0,01 N de iodo-KI diluído e 5 mL de água destilada para calibrar o equipamento. A absorbância das soluções foi medida a 620 nm. Para o teste de determinação da atividade de pululanase com reagente de iodo, uma unidade de atividade de pululanase foi definida como aumento de 0,001 na absorbância a 620 nm por mL de enzima em um minuto.

Para o teste de atividade de pululanase pela determinação de açúcares redutores formados a partir da hidrólise dos diferentes amidos, alíquotas de 0,1 mL da mistura de reação foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,4 mL de água destilada. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (1945). Uma unidade de pululanase foi definida como o aumento de 1 μ mol de açúcares redutores por mL de enzima em um minuto.

3.7.3. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima isoamilase

Foi testada a hidrólise do amido de cana-de-açúcar pela enzima amilolítica desramificante isoamilase produzida pela linhagem *Flavobacterium sp.* A cultura de *Flavobacterium sp.* em tubos inclinados de ágar nutriente contendo 0,5% de amilopectina de arroz foi inoculada na forma de segmento de reta em placas de ágar nutriente contendo 0,5% de amido de cana-de-açúcar. Também foram preparadas placas de ágar nutriente contendo 0,5% de amido de mandioca, milho, milho ceroso ou arroz ceroso para comparação. Após incubação a 25°C durante 24 a 48 horas, foi adicionado solução de iodo-KI diluída para observação do halo de hidrólise ao redor da colônia (SATO, 1979).

3.7.4. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar às α -amilases bacterianas e fúngica comerciais

A susceptibilidade enzimática do amido de cana-de-açúcar foi testada como descrito por SATO (1991) utilizando-se enzimas α -amilases comerciais de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Aspergillus oryzae*. Para comparação foram utilizados amido de batata, mandioca, milho ceroso e arroz ceroso.

As atividades enzimáticas das enzimas comerciais foram determinadas e padronizadas em unidades SKB (SANDSTED, 1939). Foi utilizada a curva padrão de atividade de α -amilase expressa em unidades SKB (SATO, 1991).

Para o estudo da susceptibilidade do amido às α -amilases de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* as amostras de 1g de amido foram pesadas em balança analítica e transferidas para tubos de ensaio. Adicionou-se 5mL de água destilada e 5 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0 e os tubos foram agitados vigorosamente. Foi adicionado 1,0 mL de solução de 1000 SKB de α -amilase de *Bacillus licheniformis* (72 μ L/mL) ou 1000 SKB de α -amilase de *Bacillus subtilis* (20 μ L/mL) e os tubos foram incubados respectivamente em banho à 80°C e 70°C durante 1h com agitação periódica. Em seguida, os tubos foram resfriados até temperatura ambiente. Amostras de 1cm do capilar (10 μ L) de cada solução foram aplicadas no papel de cromatografia Whatman nº1. Uma alíquota de 10 μ L de solução de mistura de açúcares padrões (glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e α -limite dextrina) foi aplicada no papel de cromatografia. A cromatografia descendente em papel foi realizada utilizando-se sistema de solvente butanol:piridina:água destilada na proporção 6:4:3 (v:v). O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 48 hs para fita de papel de 46 cm de comprimento. Os açúcares redutores foram revelados com AgNO₃ e NaOH alcoólico como descrito por Trevelyan et al. (1950).

No estudo da susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à α -amilase comercial Fungamyl 800L de *Aspergillus oryzae*, as amostras 1,0 g de amido foram transferidas para tubos de ensaio. Adicionou-se 5 mL de água destilada e 5 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 5,0 e os tubos foram agitados vigorosamente. Foi adicionado 1,0 mL de solução de 1000 SKB de α -amilase fúngica (15,8 μ L/mL) e os tubos foram incubados em banho à 50°C durante 1h com agitação periódica. Os açúcares redutores formados foram analisados por cromatografia descendente em papel como descrito acima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar

Os teores de amido de cinco variedades de cana-de-açúcar foram determinados nas amostras coletadas a cada 15 dias durante o período de 29 de Maio a 6 de Novembro de 2007, utilizando-se amido de batata e amido de cana-de-açúcar como padrão.

A Tabela 1 - 1 ilustra os teores de amido das variedades de cana-de-açúcar determinados utilizando-se amido de batata e amido extraído de cana-de-açúcar para a preparação da curva padrão.

Tabela 1 - 1: Teores de amido * (mg / Kg. %°Brix) em variedades de cana-de-açúcar, determinados utilizando-se curva padrão de amido de batata (AB) e de cana-de-açúcar (AC)

Data	RB86-7515		SO83-2847		RB72-454		SP80-3280		RB85-5536	
	AC	AB	AC	AB	AC	AB	AC	AB	AC	AB
29/5/07	1695	1678	2015	1991	1568	1552	1609	1593	1342	1330
15/6/07	2364	2334	2411	2381	2082	2059	1677	1660	2178	2150
29/6/07	2411	2378	1221	1213	2006	1982	1898	1875	2408	2376
25/7/07	1761	1741	1014	1009	1666	1648	1494	1479	1592	1575
21/8/07	2818	2779	1375	1364	1387	1375	1806	1785	1792	1772
31/8/07	2518	2482	1856	1834	2670	2633	1957	1931	1444	1429
18/9/07	2940	2896	1791	1769	-	-	-	-	1913	1888
2/10/07	2843	2799	1181	1171	-	-	-	-	1519	1502
16/10/07	3853	3791	1678	1659	-	-	-	-	2347	2313
6/11/07	3073	2932	2245	2193	-	-	-	-	1440	1403
MÉDIA	2628	2581	1679	1658	1896	1875	1740	1721	1798	1774

(*) Testes feitos em triplicata; (-) amostras não enviadas no período.

Foi realizada a análise estatística pelo programa Minitab versão 14 através do teste de Tukey com 95% de significância e verificou-se que não há diferença entre os valores de teor de amido nos caldos de cana-de-açúcar

determinados para cada variedade de cana-de-açúcar com as curvas padrões de amido de batata e de cana-de-açúcar (Anexo1).

As variedades de cana-de-açúcar RB86-7515 e SO83-2847 apresentaram respectivamente maior e menor teor médio de amido (2581 mg/ Kg%°Brix e 1658 mg/ Kg%°Brix), (curva padrão de amido de batata) durante a safra de Maio a Novembro de 2007 entre as variedades de cana-de-açúcar estudadas.

GODSHALL et al. (1998) determinaram o teor de polissacarídeos totais e o teor de amido em 6 variedades de cana-de-açúcar cultivadas na região de Lousiana (EUA) durante os anos de 1990, 1991 e 1992. As variedades de cana-de-açúcar CP72-370, CP79-318, LCP82-89, CP65-357, CP74-383 e CP70-321 apresentaram, respectivamente, teores médios de amido iguais a 1625 ppm, 1021 ppm, 602 ppm, 603 ppm, 612 ppm e 245 ppm baseados em sólidos. Esses valores correspondem a mg/ Kg.%°Brix.

O Centro de Tecnologia Copersucar – (CTC) realizou um estudo no qual os teores de amido nos caldos de 7 variedades de cana-de-açúcar foram monitorados no período de Maio à Outubro de 2005. Os teores médios de amido encontrados nas variedades RB72-454, SP80-1816, SP80-1842, SP81-3250, SP89-1115, SP901638, SP90-3414 foram 811 mg / Kg %°Brix; 1118 mg / Kg %°Brix; 1202 mg / Kg %°Brix; 1175 mg / Kg %°Brix; 1323 mg / Kg %°Brix; 598 mg / Kg %°Brix e 923 mg / Kg %°Brix, respectivamente (OLIVEIRA, 2006).

Segundo EGGLESTON et al. (2004) o teor de amido é maior na cana-de-açúcar imatura do que na cana madura. Os autores observaram que durante a safra houve um decréscimo no teor de amido em todas amostras e sistemas de clarificação do açúcar, e atribuíram ao aumento da maturidade da cana-de-açúcar.

EGGLESTON et al. (2007) determinaram o teor de amido em cana-de-açúcar processadas em três usinas de Lousiana (EUA). As concentrações de amido encontradas nos caldos de cana-de-açúcar de 3 usinas foram aproximadamente 1850 ppm/°Brix, 1600 ppm/°Brix e 800 ppm/°Brix. As amostras de caldo de cana-de-açúcar da usina 1 apresentaram o maior teor de

amido, pois as análises foram realizadas no início da safra quando a cana-de-açúcar estava imatura, as amostras da usina 2 apresentaram teor intermediário e as amostras da usina 3 apresentaram menor teor de amido pois as análises foram realizadas no final da safra quando a cana-de-açúcar já estava madura.

A Figura 1 - 1 ilustra os teores de amido nas diferentes variedades de cana-de-açúcar no período de Maio a Novembro de 2007 e a Figura 1 - 2 ilustra a variação da temperatura e índice pluviométrico (mm) no período de Maio a Dezembro de 2007.

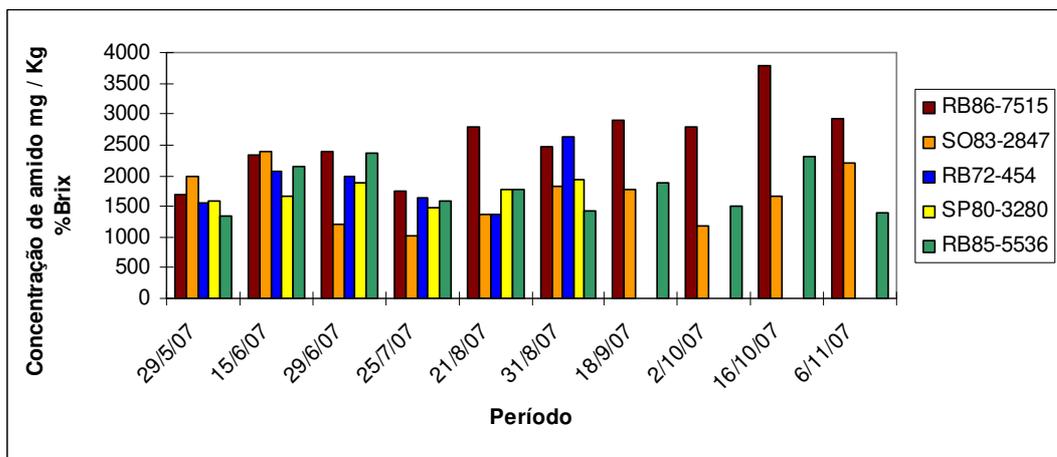


Figura 1 - 1: Teores de amido nas variedades de cana-de-açúcar, utilizando-se curva padrão de amido de batata

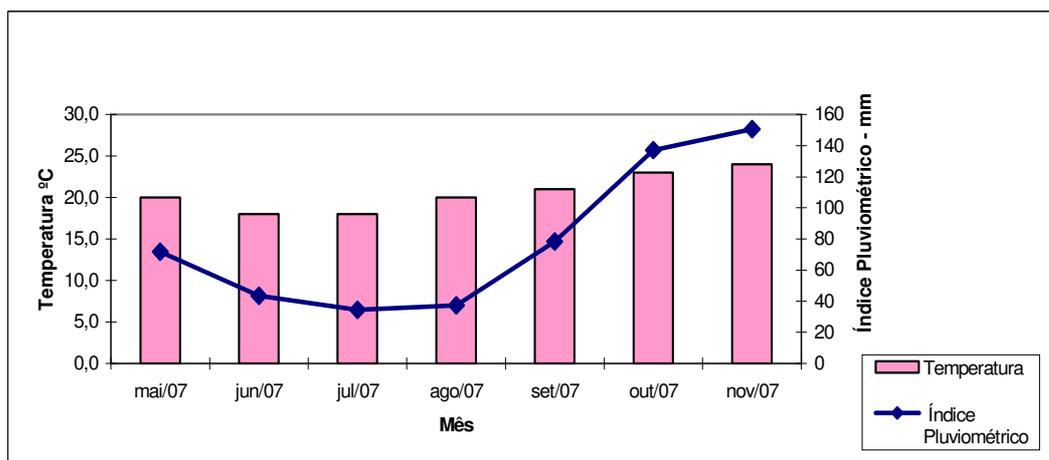


Figura 1 - 2: Temperatura e Índice Pluviométrico na região de Santa Bárbara D'Oeste no período de Maio a Novembro de 2007

Os meses de junho e julho de 2007 apresentaram os menores valores de temperatura e índice pluviométrico.

Não foi observado correlação entre os teores de amido nos caldos das cinco variedades de cana-de-açúcar coletados no período de Março a Novembro de 2007 e os fatores temperatura e índice pluviométrico.

Segundo ANYANGWA et al. (1993) o amido é um polissacarídeo natural da cana-de-açúcar e sua concentração depende de diversos fatores como condições de crescimento, variedade da planta, solo de cultivo, método de colheita.

Concentrações de 2780 ppm de amido em caldo misto e 2017 ppm de amido em xarope clarificado foram encontradas em usinas de açúcar da Louisiana (EUA) (KAMPEN, 2006).

EBRAHIM et al. (1998) estudaram o efeito da temperatura de crescimento no acúmulo de sacarose e amido em cana-de-açúcar. As plantas foram cultivadas durante 10 meses em estufa a 27°C, considerada a temperatura ótima, a baixa temperatura (15°C) e a alta temperatura (45°C). Foi verificado que os teores de sacarose e amido nas folhas da cana-de-açúcar cultivada à 15°C foi muito superior aos teores das plantas cultivadas a 45°C. A concentração de sacarose no colmo da planta crescida a 15°C e 27°C foi a mesma, porém foi menor em plantas cultivadas a 45°C.

CUDDIHY et al. (2006) estudaram o teor de amido de quatro variedades de cana-de-açúcar da Austrália e concluíram que o teor de amido é uma característica da variedade. Observaram que o teor de amido na cana-de-açúcar não sofreu mudança significativa durante os últimos três meses de maturidade e que o açúcar bruto produzido no começo da safra pode apresentar altos níveis de amido e que após o processo de extração cerca de 30 a 40% do amido presente no caldo de cana ainda permaneceu no açúcar cristal branco.

4.2. Estudo da estrutura dos grânulos de amido de cana-de-açúcar

As Figuras 1 - 3 (a, b, c e d) mostram respectivamente a aparência dos grânulos de amido de cana-de-açúcar, batata, mandioca e milho em microscópio eletrônico com aumento de 1.000x. Os grânulos de amido de cana-de-açúcar são consideravelmente menores que os grânulos de amido de batata, mandioca e milho.

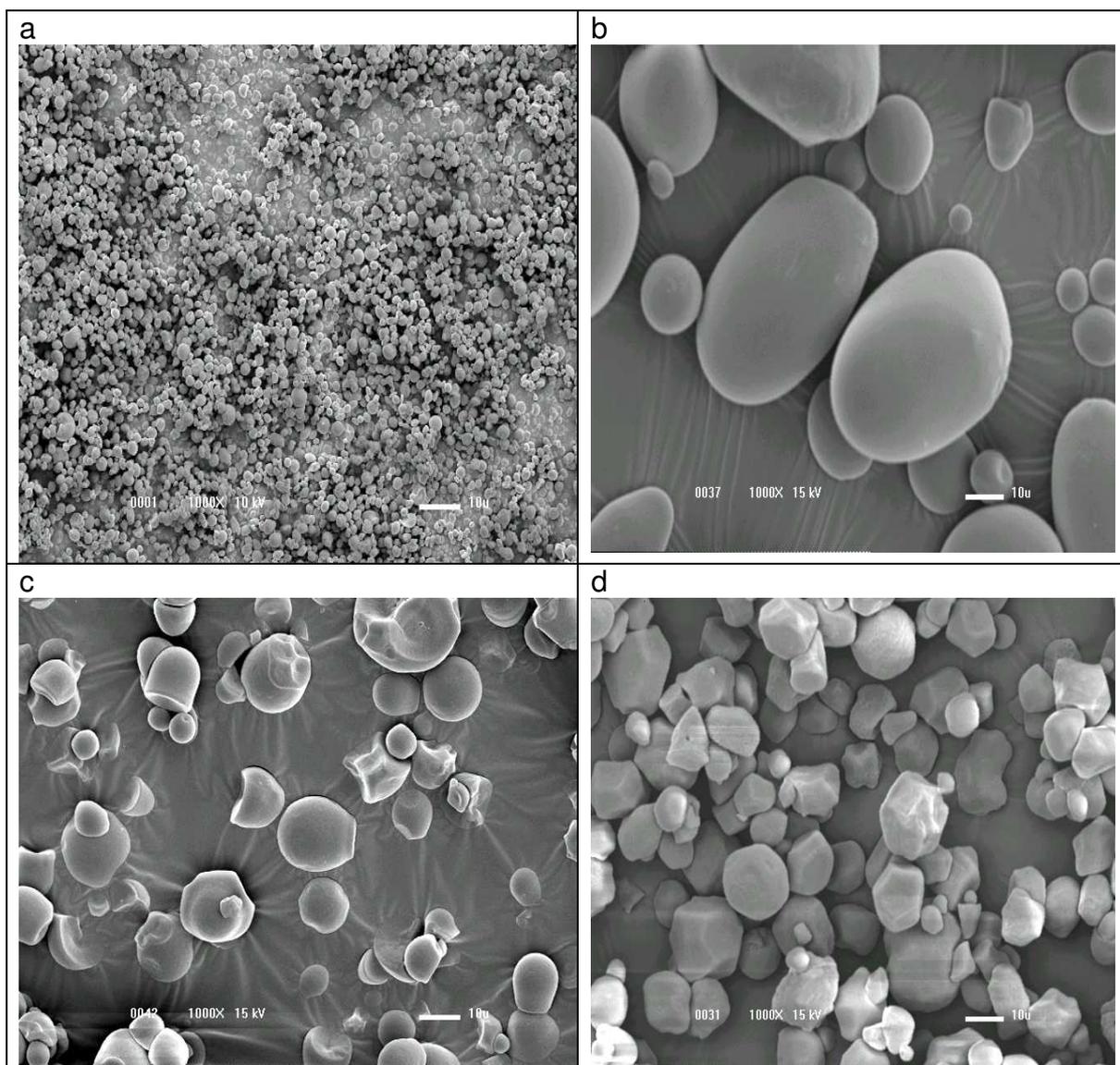


Figura 1 - 3: Grânulos de amido de cana-de-açúcar (a), amido de batata (b), amido de mandioca (c) e amido de milho (d) (aumento 1000x)

A Figura 1 - 4 ilustra a aparência dos grânulos de amido de cana-de-açúcar, em microscópio eletrônico de varredura com aumento de 10.000x. Os

grânulos apresentaram formas globulares, ovaladas e meia esfera e tamanho aproximado de 1 – 3 μm . VIGNES (1974) e KAMPEN (2006) relataram que os grânulos de amido de cana-de-açúcar apresentaram tamanho aproximado de 1 – 10 μm enquanto STEVENSON e WHAYMAN (1976) e PARK et al. (1985) verificaram que os grânulos de amido de cana-de-açúcar apresentaram diâmetro aproximado de 1-5 μm .

Os grânulos de amido de batata, milho e mandioca apresentaram tamanho aproximado de 20 – 50 μm , 10 - 15 μm e 8 – 20 μm , respectivamente.

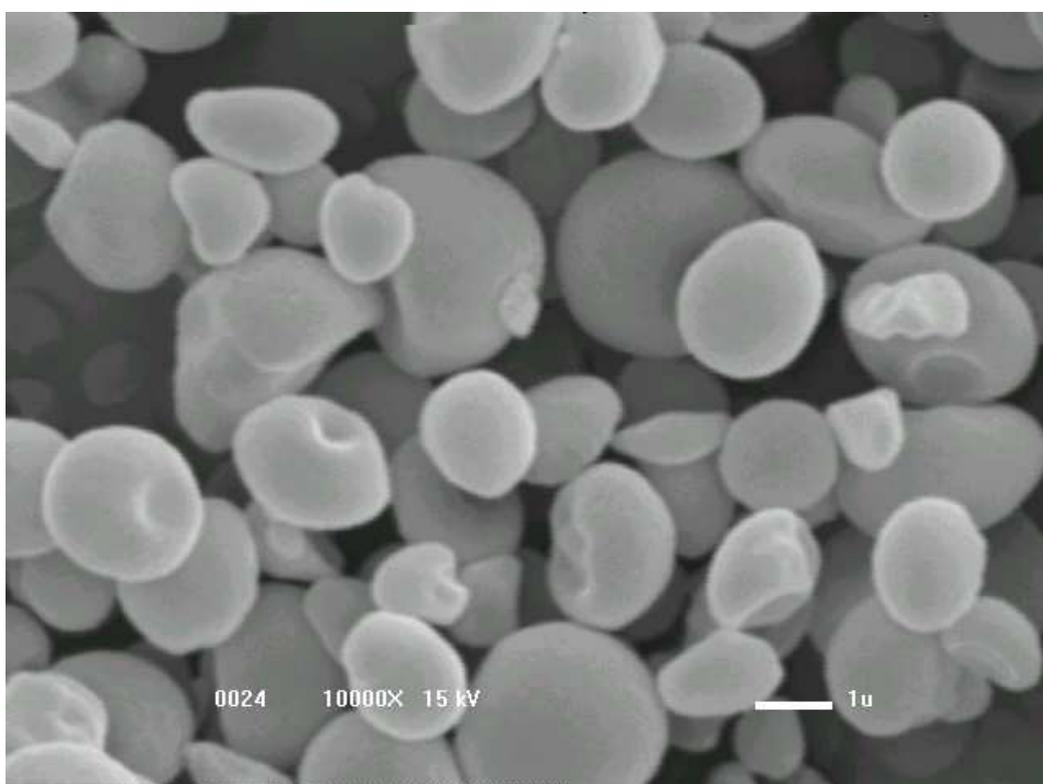


Figura 1 - 4: Grânulos de amido de cana-de-açúcar (aumento de 10.000x).

4.3. Espectro de absorção do complexo amido e iodo

A Figura 1 - 5 mostra os perfis de absorção das soluções de iodo complexado com amido de milho ceroso (λ_{max} 426), milho (λ_{max} 526), amido

solúvel (λ_{max} 553), batata (λ_{max} 565), amido com 99% de amilopectina (λ_{max} 453) e cana-de-açúcar (λ_{max} 585). Os amidos de cana-de-açúcar, milho, batata, e amido solúvel apresentaram maior absorção na faixa de 540 a 620 nm. Os amidos de milho e de batata apresentam normalmente 75% de amilopectina e 25% de amilose.

VIGNES (1974) relatou que os grânulos de amido de cana-de-açúcar contém 19% de amilose e 81% de amilopectina enquanto que KAMPEN (2006) observou que contém 20% e 80% de amilopectina.

Os amidos de milho ceroso e amido com 99% de amilopectina que contém alto teor da fração amilopectina apresentaram maior absorção na faixa de 380 a 540 nm (Figura 1 - 5). Amilopectinas e glicogênios apresentaram absorção máxima no comprimento 540 nm e 460 nm, respectivamente (ARCHIBALD et al.,1988).

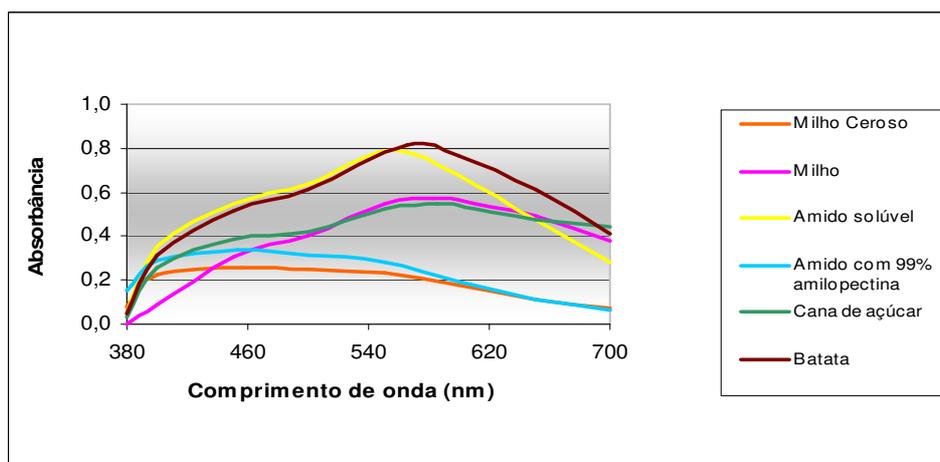


Figura 1 - 5: Perfis de absorção dos complexos de amido iodo

4.4. Determinação da temperatura de gelificação do amido de cana-de-açúcar

Os grânulos de amido de cana-de-açúcar apresentaram gelificação na faixa de temperatura 70°C - 75°C (Figura 1 - 6). PARK et al. (1985) verificaram que o amido de cana-de-açúcar apresentou gelificação na faixa de 65°C – 80°C

e relataram que a temperatura de gelificação era consideravelmente superior ao amido de mandioca que apresenta temperatura de gelificação na faixa de 55°C a 65°C. Os amidos de milho, arroz e batata apresentam gelificação na faixa de temperatura de 56 a 72°C, 80°C, e 56 a 66°C, respectivamente (CIACCO e CRUZ, 1982).

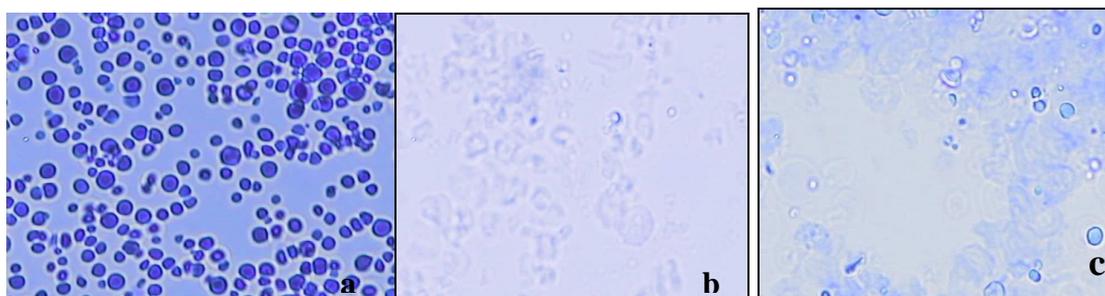


Figura 1 - 6: Grânulos de amido de cana em suspensão à temperatura ambiente (a), gelificado à 70°C (b) e gelificado à 75°C (c) (aumento 1000x em microscópio óptico)

4.5. Estudo da filtrabilidade da suspensão de amido de cana-de-açúcar

No estudo da filtrabilidade da suspensão de 0,02% de amido de cana-de-açúcar gelificado em membranas de porosidade de 0,2 μm , 0,8 μm e 5,0 μm verificou-se que tanto os filtrados como o retentados apresentaram coloração azul com solução de iodo-KI 0,1N, indicando a presença de frações menores que 0,2 μm e maiores que 5,0 μm .

A suspensão 0,02% de amido de batata gelificado também apresentou frações menores que 0,2 μm e maiores que 5,0 μm .

O amido de cana-de-açúcar pode causar problemas de filtrabilidade de soluções de açúcar bruto. Segundo CUDDIHY et al. (2006), concentrações de amido em açúcar bruto a partir de 200 a 250 ppm começam a gerar problemas de filtração durante o processamento.

Os principais fatores que influenciam na etapa de filtração geralmente são pressão, tempo, área de filtração, viscosidade da solução e as

características dos sólidos a serem filtrados. Nas refinarias de açúcar a filtração é realizada para promover a descoloração da solução de açúcar e para obtenção de soluções de açúcar com a qualidade desejada utilizando poucos recursos. As refinarias da América do Norte utilizam filtros de sílica e de diatomáceas para garantir a clarificação. Pesquisas vem sendo realizadas para promover a adequação e padronização dos filtros utilizados pelas refinarias de açúcar, as empresas fabricantes dos filtros e as refinarias de açúcar estão cooperando para a produção de filtros de aplicação mais econômica (CUMMINS e WEYMOUTH, 1942).

4.6. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à diferentes enzimas amilolíticas

4.6.1. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima glicoamilase

A hidrólise do amido de cana-de-açúcar foi testada com as enzimas glicoamilase, α -amilases bacterianas, α -amilase fúngica, pululanase e isoamilase.

A Figura 1 - 7 ilustra a produção de açúcares redutores a partir de amido *in natura* de diferentes fontes utilizando-se glicoamilase. O amido de cana-de-açúcar *in natura* mostrou maior susceptibilidade à enzima glicoamilase em relação aos amido de milho ceroso, mandioca e batata. O amido de arroz ceroso *in natura* apresentou maior susceptibilidade à glicoamilase entre todos os amidos testados.

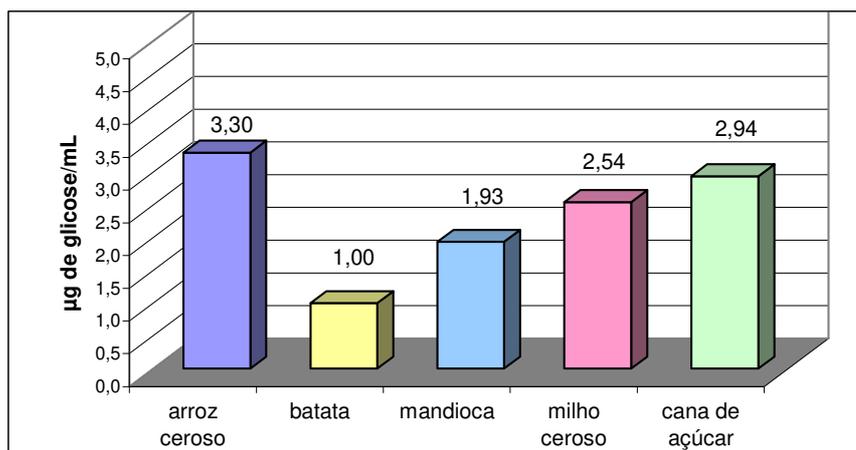


Figura 1 - 7: Hidrólise de diferentes amidos *in natura* pela enzima glicoamilase, 50°C durante 1h.

As glicoamilases, também conhecidas como amiloglicosidases hidrolisam as ligações α - 1,4, α - 1,6 e α -1,3 glicosídicas do amido e derivados liberando unidades de glicose. As glicoamilases comerciais são utilizadas na etapa de sacarificação de amido liquefeito e produção de glicose (RÍAZ et al., 2007).

A glicoamilase de *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* são capazes de hidrolisar o amido gelificado e também amido *in natura* em menor velocidade (WANKHEDE e RHATEKE, 1982).

A Figura 1 - 8 ilustra a produção de açúcares redutores a partir de amido gelificado de diferentes fontes utilizando-se glicoamilase. O amido de cana-de-açúcar gelificado mostrou maior susceptibilidade à enzima glicoamilase entre todos os amidos testados. O amido de batata tanto *in natura* quanto na forma gelificada apresentaram menor susceptibilidade à glicoamilase entre os amidos testados.

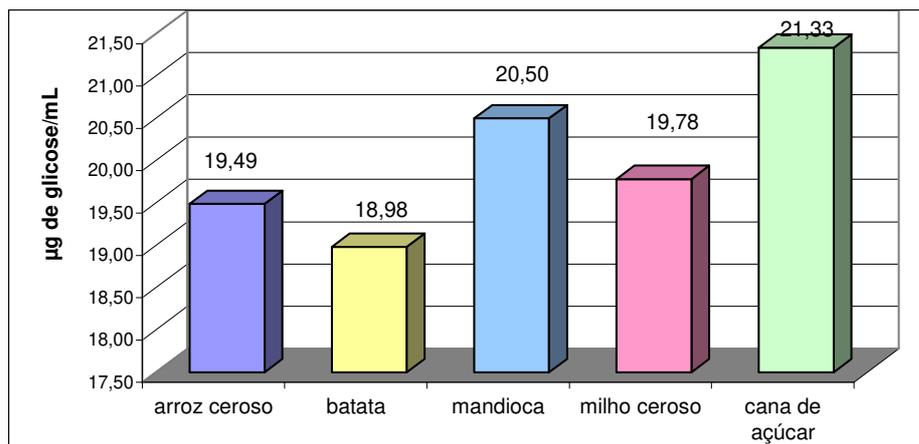


Figura 1 - 8: Hidrólise de diferentes amidos gelificados pela enzima glicoamilase.

Foi observado que a glicoamilase hidrolisou com maior intensidade as amostras de amido gelificado do que em amido *in natura*, indicando que o tratamento térmico usado para gelificação expõe as cadeias de amilose e amilopectina facilitando a atuação da enzima.

4.6.2. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima amilolítica desramificante pululanase

A hidrólise do amido de cana-de-açúcar e de outros tipos de amido pela pululanase foi determinada através do teste de coloração dos produtos com reagente de iodo e determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson.

A Figura 1 - 9 ilustra que no estudo da susceptibilidade à enzima amilolítica desramificante pululanase, avaliado pelo teste de coloração dos produtos com reagente de iodo, o amido de cana-de-açúcar mostrou susceptibilidade similar ao amido de arroz ceroso, que apresenta alto teor de amilopectina. O amido de batata apresentou menor susceptibilidade à pululanase entre todos os amidos testados.

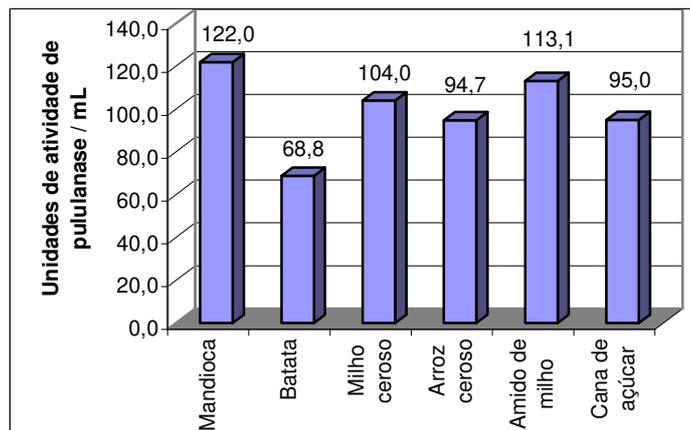


Figura 1 - 9: Hidrólise de diferentes tipos de amido pela enzima amilolítica desramificante pululanase, determinada pelo teste de coloração com reagente de iodo.

A Figura 1 - 10 mostra que no estudo da susceptibilidade à enzima amilolítica desramificante pululanase, avaliado pela determinação de açúcares redutores produzidos, o amido de cana-de-açúcar mostrou susceptibilidade similar ao amido de milho ceroso, que apresenta alto teor de amilopectina.

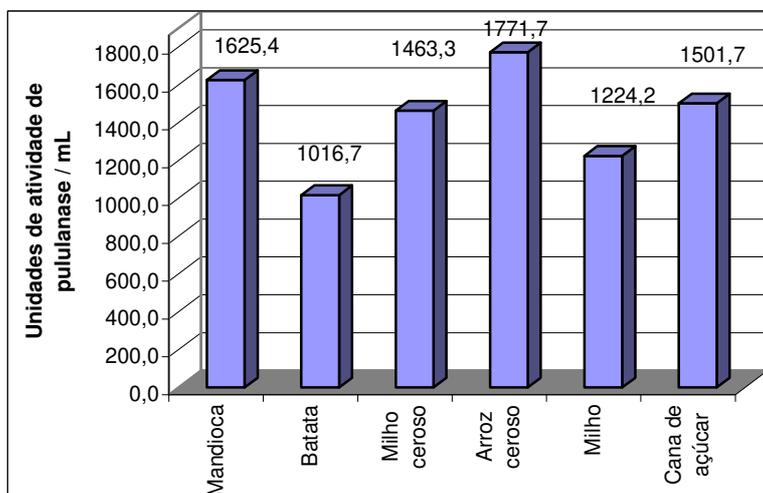


Figura 1 - 10: Hidrólise de diferentes tipos de amido pela enzima amilolítica desramificante pululanase, determinada pela formação de açúcares redutores.

A pululanase é uma enzima que hidrolisa especificamente as ligações glicosídicas α -1,6 de amido e derivados contendo no mínimo duas unidades de glicose nas cadeias laterais ramificadas (ABDULLAH e FRENCH, 1970). Sua

ação consiste em remover as ramificações da cadeia e transformar o amido em dextrinas lineares (FERNANDES, 2007). WALLENFELS et al. (1966) estudaram a aplicação de pululanase na hidrólise de polissacarídeos ramificados e concluíram que esta enzima hidrolisava facilmente as cadeias curtas, por exemplo, resíduos de maltose e maltotriose de β -dextrina limite e α -dextrina limite de amilopectina.

WHAYMAN e WILLESDORF (1976) relataram que o amido de cana-de-açúcar das variedades N:Co310 e Q58 apresentaram 15% de amilose enquanto que o amido de batata possui 23% de amilose. Os autores sugeriram que a amilopectina de cana-de-açúcar era menos ramificada do que a amilopectina de amido de milho ou batata.

4.6.3. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar à enzima amilolítica desramificante isoamilase

A placa de meio de cultura ágar nutriente contendo 0,5% de amido de cana-de-açúcar (Figura 1-11a) apresentou coloração azul de fundo indicando que o amido contém amilose. Observou-se que o microrganismo *Flavobacterium sp.* produziu isoamilase extracelular que hidrolisou a amilopectina liberando cadeias lineares de amilose intensificando a coloração azul ao redor da colônia (Figura 1-11a).

As Figuras 1-11b e 1-11c mostram que os meios de cultura contendo amido de mandioca e amido de milho apresentam coloração de fundo azul indicando a presença de amilose. O amido de mandioca e de milho contém, respectivamente, 17 % de amilose + 83 % de amilopectina e 28% de amilose + 72% de amilopectina (BEMILLER e WHISTLER,1996).

O microrganismo *Flavobacterium sp.* produziu isoamilase que hidrolisou a fração de amilopectina dos amidos de milho e mandioca (Figura 1-11b) e (Figura 1-11c) liberando cadeias lineares de amilose intensificando a coloração azul ao redor das colônias.

As Figuras 1-11d e 1-11e ilustram que os amidos de arroz ceroso e milho ceroso contem alto teor de amilopectina apresentando coloração de fundo

avermelhada com solução de iodo-KI e a produção de isoamilase pelo microrganismo *Flavobacterium sp.* resultou na hidrólise da amilopectina e liberação de cadeias lineares de amilose que apresentam coloração azul com iodo.

A isoamilase de *Flavobacterium sp* hidrolisa preferencialmente as ligações α -1,6 glicosídicas da amilopectina envolvendo cadeias lineares longas. Isto indica que os amidos de cana-de-açúcar contem a fração ramificada de amilopectina que pode ser hidrolisada pela isoamilase.

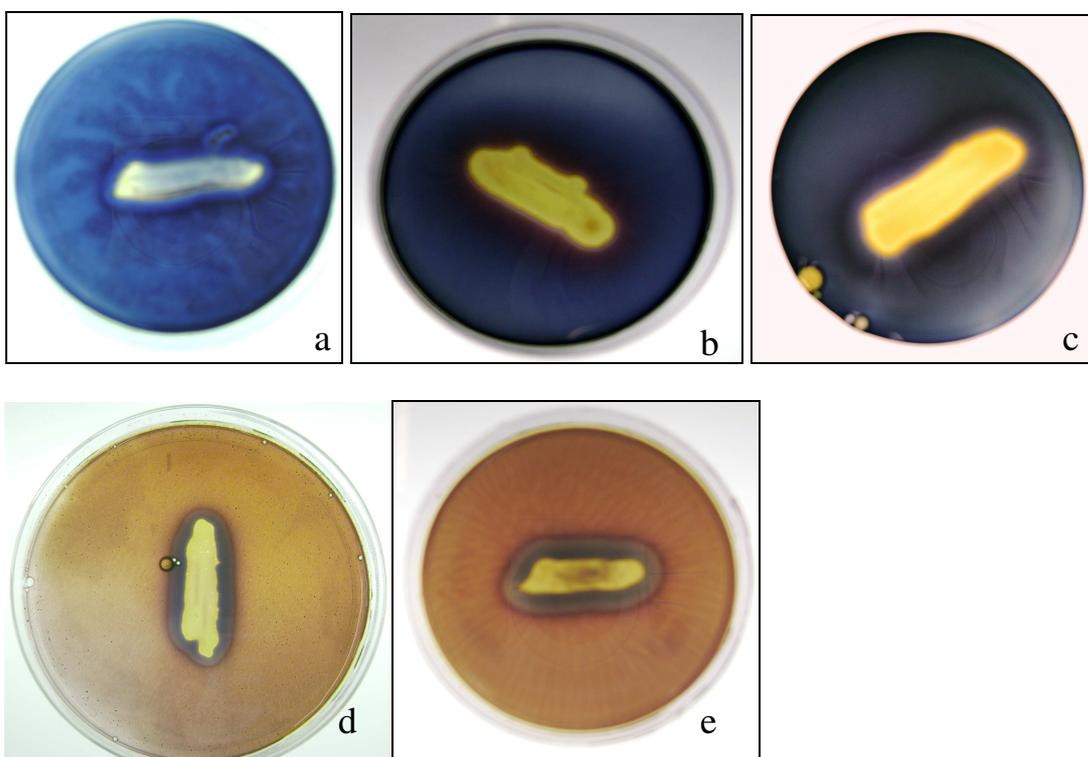


Figura 1 - 11: Hidrólise de amido de cana-de-açúcar (a), milho (b), mandioca (c), arroz ceroso (d), milho ceroso (e), pela enzima amilolítica desramificante isoamilase de *Flavobacterium sp.*

4.6.4. Susceptibilidade do amido de cana-de-açúcar às α -amilases bacterianas e fúngica comerciais

A Figura 1-12 ilustra os açúcares redutores produzidos na hidrólise de amido de arroz ceroso, batata, mandioca, milho ceroso e cana-de-açúcar pela α -amilase Termamyl obtida de *Bacillus licheniformis*. Na hidrólise de amido de

cana-de-açúcar foi observada formação de glicose, maltose, maltotriose e menor quantidade de maltotetraose em relação aos demais amidos testados.

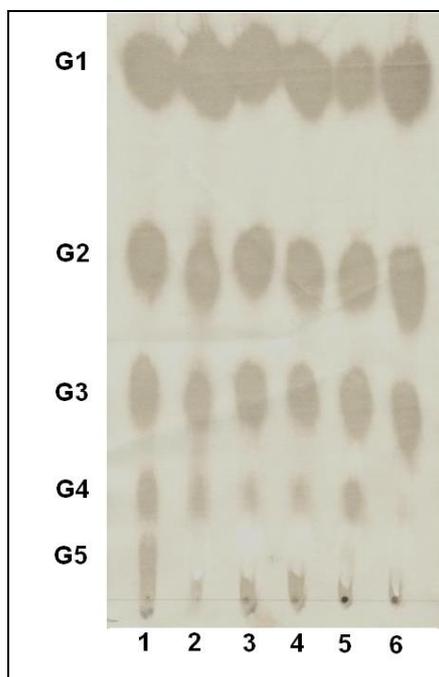


Figura 1 - 12: Açúcares redutores formados após hidrólise de amido de arroz ceroso, batata, mandioca, milho ceroso e cana-de-açúcar com α -amilase de *Bacillus licheniformis*.

[(G1) glicose; (G2) maltose; (G3) maltotriose; (G4) maltotetraose; (G5) maltopentose]

(1) açúcares padrão; (2) amido de arroz ceroso hidrolisado com α -amilase de *B. licheniformis*; (3) amido de batata hidrolisado com α -amilase de *B. licheniformis*; (4) amido de mandioca hidrolisado com α -amilase de *B. licheniformis*; (5) amido de milho ceroso hidrolisado com α -amilase de *B. licheniformis*; (6) amido de cana-de-açúcar hidrolisado com α -amilase de *B. licheniformis*.

A α -amilase de *Bacillus licheniformis* hidrolisa as ligações α -1,4 glicosídicas do amido ao acaso diminuindo a viscosidade e o poder de coloração do amido e derivados com reagente de iodo. A α -amilase de *B. licheniformis* é uma enzima termoestável e é utilizada na liquefação do amido e produção de maltodextrinas.

A Figura 1 - 13 ilustra os açúcares redutores produzidos após hidrólise de amido de arroz ceroso, batata, mandioca, milho ceroso e cana-de-açúcar pela α -amilase de *B. subtilis*.

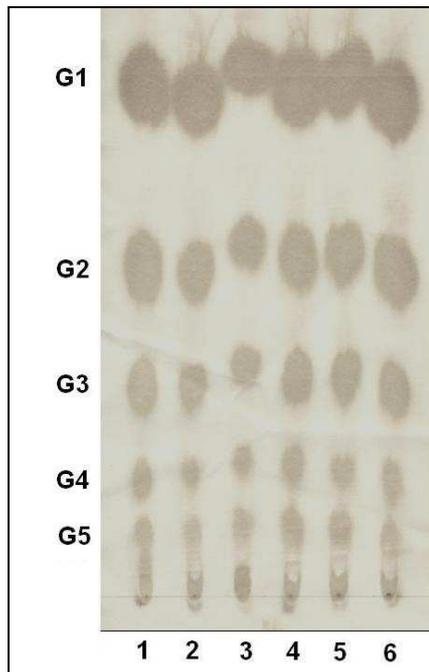


Figura 1 - 13: Açúcares redutores formados após hidrólise de amido de arroz ceroso, batata , mandioca, milho ceroso e cana-de-açúcar com α -amilase de *B. subtilis*.

[(G1) glicose; (G2) maltose; (G3) maltotriose; (G4) maltotetraose; (G5) maltopentose]

(1) açúcares padrões; (2) amido de arroz ceroso hidrolisado com α -amilase de *B. subtilis*; (3) amido de batata hidrolisado com α -amilase de *B. subtilis*; (4) amido de mandioca hidrolisado com α -amilase de *B. subtilis*; (5) amido de milho ceroso hidrolisado com α -amilase de *B. subtilis*; (6) amido de cana-de-açúcar hidrolisado com α -amilase de *B. subtilis*.

Na hidrólise de amido de cana-de-açúcar pela α -amilase de *Bacillus subtilis* foi observado a formação de glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose e outros oligossacarídeos de maior massa molecular. O amido de cana-de-açúcar mostrou susceptibilidade à α -amilase de *B. subtilis* de modo similar aos outros amidos testados.

A α -amilase de *Bacillus subtilis* hidrolisa as ligações α -1,4 glicosídicas do amido diminuindo a viscosidade e o poder de coloração com reagente de iodo.

A α -amilase de *Bacillus subtilis* é menos termoestável que a α -amilase de *B. licheniformis* e é utilizada para liquefação do amido e produção de maltodextrina.

PARK et al. (1985) verificaram que o amido (intacto) de cana-de-açúcar é susceptível às α -amilases bacterianas e fúngica porém a hidrólise é demorada. O amido de cana apresentou temperatura de gelificação na faixa de 65°C -80°C. O amido gelatinizado de cana-de-açúcar foi rapidamente hidrolisado pelas α -amilases de *Bacillus licheniformis* (Termamyl), *Bacillus subtilis* (HT1000) e de *Aspergillus oryzae*. Para a remoção rápida do amido foi necessário gelatinizar o amido por aquecimento preferencialmente até 80°C. Os autores sugeriram que a α -amilase bacteriana pode ser adicionada antes do aquecimento e então aquecida a 80-90°C por 30 minutos. A α -amilase bacteriana hidrolisou o amido em dextrina e oligossacarídeos de grau de polimerização 1-7 e mostrou-se adequada para a remoção de amido de caldo de cana e produção de sacarose cristalina.

A Figura I - 14 ilustra os açúcares redutores produzidos na hidrólise de amido de arroz ceroso, batata, mandioca, milho ceroso e cana-de-açúcar pela α -amilase de *Aspergillus oryzae*. O amido de cana-de-açúcar foi hidrolisado pela α -amilase de *Aspergillus oryzae* de forma similar aos amidos testados, sendo observado a formação de açúcares redutores glicose e maltose e pequena formação de maltotriose e outros oligossacarídeos.

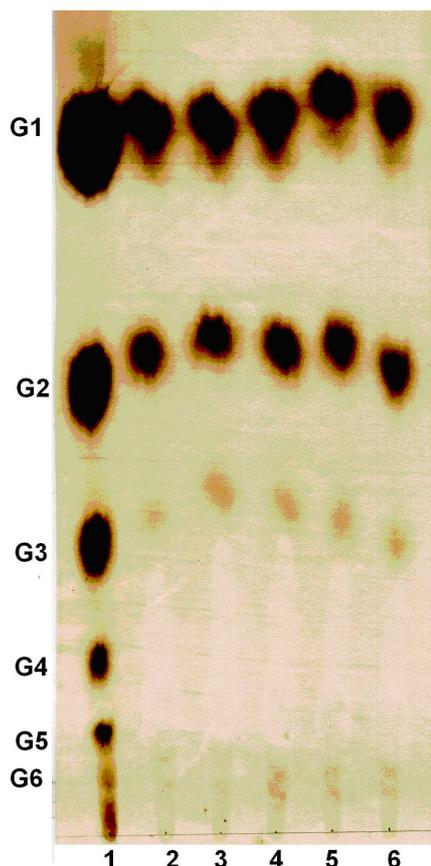


Figura 1 - 14: Açúcares redutores formados após hidrólise de amido de arroz ceroso, batata, mandioca, milho ceroso e cana-de-açúcar com α -amilase de *Aspergillus oryzae*.

[(G1) glicose; (G2) maltose; (G3) maltotriose; (G4) maltotetraose; (G5) maltopentose]

(1) açúcares padrões; (2) amido de arroz ceroso hidrolisado com α -amilase de *A. oryzae*; (3) amido de batata hidrolisado com α -amilase de *A. oryzae*; (4) amido de mandioca hidrolisado com α -amilase de *A. oryzae*; (5) amido de milho ceroso hidrolisado com α -amilase de *A. oryzae*; (6) amido de cana-de-açúcar hidrolisado com α -amilase de *A. oryzae*.

A α -amilase de *Aspergillus oryzae* hidrolisa as ligações α -1,4 glicosídicas do amido ao acaso liberando grande quantidade de glicose e maltose. Essa enzima é termosensível e é utilizada em panificação para hidrolisar amido e produzir açúcares fermentescíveis glicose e maltose. Diferente das α -amilases bacterianas, a α -amilase fúngica é inativada em temperaturas de 70°C evitando a hidrólise extensiva do amido durante a etapa de cozimento do pão.

PARK et al. (1985) verificaram que a α -amilase fúngica hidrolisou o amido de cana-de-açúcar produzindo principalmente maltose e pequena quantidade de glicose e maltotriose. Os autores verificaram que como a preparação enzimática de α -amilase fúngica contém invertase, esta preparação seria adequada para a fermentação do caldo de cana integral.

5. CONCLUSÕES

O método de determinação de amido em cana-de-açúcar adotado pelo CTC - Centro de Tecnologia Copersucar no qual a curva padrão é preparada com amido de batata é adequado, pois após a análise estatística pelo programa Minitab versão 14 através do teste de Tukey verificou-se que não há diferença entre os valores de teor de amido nos caldos de cana-de-açúcar determinados para cada variedade de cana-de-açúcar com as curvas padrões de amido de batata e de cana-de-açúcar

Não foi observada correlação entre o teor de amido em caldos das variedades de cana-de-açúcar RB86-7515, SO83-2847, RB72-454, SP80-3280 e RB85-5536 e os fatores temperatura e o índice pluviométrico, indicando que outros fatores influenciam na síntese do amido.

As variedades de cana-de-açúcar RB86-7515 e SO83-2847 apresentaram respectivamente maior e menor teor médio de amido (2581 mg/Kg%^oBrix e 1658 mg/Kg%^oBrix) durante a safra de Maio a Novembro de 2007 entre as variedades de cana-de-açúcar testadas.

Os grânulos de amido de cana-de-açúcar são esféricos e apresentam tamanho aproximado de 1-3 μ . Os grânulos de amido de cana-de-açúcar, são cerca de 5 vezes menores que o amido de mandioca e 15-20 vezes menores que os grânulos de amido de batata. O amido de cana-de-açúcar apresentou temperatura de gelificação na faixa de 70-75°C. No estudo da filtrabilidade em membranas observou-se que frações menores que 0,2 μ m e maiores que 5,0 μ m estão presentes na suspensão de amido de cana-de-açúcar gelificado.

O amido de cana-de-açúcar apresentou susceptibilidade à enzima amilolítica desramificante pululanase de forma similar aos amidos de milho ceroso e de arroz ceroso que contem alto teor de amilopectina.

O amido de cana-de-açúcar gelificado apresentou maior suscetibilidade à enzima glicoamilase do que na forma *in natura*. O amido de cana-de-açúcar *in*

natura mostrou maior susceptibilidade à glicoamilase em relação aos amidos de milho ceroso (alto teor de amilopectina), amido de batata e amido de mandioca. E o amido de cana-de-açúcar gelificado apresentou maior susceptibilidade à glicoamilase do que os amidos gelificados de arroz ceroso, batata, mandioca e milho ceroso.

O amido de cana-de-açúcar mostrou ser susceptível às enzimas comerciais α -amilase de *Bacillus licheniformis* (Novozymes), α -amilase de *Bacillus subtilis* e α -amilase de *Aspergillus oryzae* (Novo Nordisk) de forma semelhante aos amidos de arroz ceroso, batata, mandioca e milho. Na hidrólise pela enzima α -amilase de *Aspergillus oryzae* houve formação de glicose, maltose como açúcares redutores principais e pequena formação de maltotriose.

Na hidrólise de amido de cana-de-açúcar com α -amilase de *Bacillus licheniformis* foi observada formação de glicose, maltose, maltotriose como açúcares redutores principais e menor quantidade de maltotetraose; e na hidrólise com α -amilase de *Bacillus subtilis* foi verificada formação de glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose como açúcares redutores principais e outros oligossacarídeos de maior massa molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M.; FRENCH, D. - Substrate specificity of pullulanase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 137, p.483-493, 1970.

ANYANGWA, E.M.; KAPSEU, C.E.; MUSONGE, P. - The effect and removal of starch the sugar refining industry, **Institute Sugar Journal**, v. 95, p.210-213, 1993.

ARCHIBALD, A.R.; FLEMING, I.D.; LIDDLE, A.M.; MANNERS, D.J.; MERCER, G.A e WRIGHT, A. - α - 1,4 – Glucosans. Part XI . The Absorption Spectra of Glycogen – and Amylopectin –Iodine Complexes, p.1183-1190, 1988.

BANCO DE DADOS DE BIOMASSA, http://infoener.iee.usp.br/scripts/biomassa/br_cana.asp (acesso em 20 de janeiro de 2009)

BATTA, S.K.; SINGH, R. – Sucrose metabolism in sugar cane grown under varying climatic conditions: synthesis and storage of sucrose in relation to the activities of sucrose synthase, sucrose-phosphate synthase and invertase. **Phytochemistry**, v. 25, n^o11, p.2431-2437, 1986.

BEMILLER, J.N.; WHISTLER, R.L. Food Chemistry, edited Owen R. Fenema, 3th ed., p.158-221, 1996.

BOYES, P.N. - Quantitative determination of some non-sugars and partial removal of one in particular- starch, **Proc SA Sugar Technology Association**, v. 32, p.37-43, 1958.

CHEN, J.C.P.; CHOU, C.C. - Cane Sugar Handbook, 12 th Ed, John Wiley & Sons, 1993.

CIACCO, C.F., CRUZ, R. – Fabricação do amido e sua utilização. SP – Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, v.27, nº4, p. 152, 1982.

CUDDIHY, J. A.; PORRO, M.E.; RAUH, J.S.- The presence of total polysaccharides in sugar production and methods for reducing their negative effects. www.midlandresearchlabsinc.com, 2006.

CUMMINS, A. B.; WEYMOUTH, L. E. – Filtration of sugar solutions: Some factors determined by laboratory test procedures, Johns – Manville Research Laboratories, Marville, 1942.

EBRAHIM, M. K.; ZINGSHEIM, O. - EL-SHOUBAGY, M.N.; MOORE, P.H.; KOMOR, E. – Growth and sugar storage in sugarcane grown at temperatures below and above optimum. **Journal Plant Physiol.** v. 153, nº5-6, p.593-602, 1998.

EGGLESTON, G; LEGENDRE, B.; TEW,T. - Indicators of freeze-damaged sugarcane varieties which can predicts processing problems. **Food Chemistry**, v.27, nº1, p.119-133, 2004.

EGGLESTON, G.; MONTES, B.; MONGE, A.; GUIDRY, D.- Optimization of α -amylase application in U.S. factories (abstract). **Sugar Journal**, v. 70, nº 31. 2007.

EL-SYIAD, S. I. - Egyptian raw sugar quality in relation to refining requirements. **Food Chemistry**, v.68, p.253-257, 2000.

FRANCO,C.M.L; CIACCO, C.F. – Estrutura dos grânulos de amido de milho normal e ceroso, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, nº 3, 1997

FERNANDES, L.P.; Ulhoa, J.C; Asquieri, E.R. ; Monteiro, V.N. - Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Rev. Eletrônica de Farmácia**. v. 4, nº 1, p.43-51, 2007.

GODSHALL, M.A. LEGENDRE, B.L. CLARKE, M.A. MIRANDA X.M. AND BLANCO R.S. - Starch, polysaccharide and proanthocyanidin in Louisiana sugarcane varieties, **International Sugar Journal**, v.98, p. 144-148, 1998.

HAM, X.Z.; HAMAKER, B.R. - Partial leaching of granule- associated proteins from rice starch during alkaline extraction and subsequent gelatinization, **Starch-Starke**, v. 54, p.454-460, 2002.

HUMBERT, R.P., The growing of sugarcane, London: Elsevier, 1968.

IMRIE, F.K.E.; TILBURY, R.H. - Polysaccharides in sugar cane and its products – **Sugar Technology Reviews**, v. 1, p.291-361, 1972

JOHNSON, T. P. - Experience with starch and dextran in a refinery, Presented at SIT Meeting, New Orleans, L.A., 1989 .

KAMPEN, W.H. – The action of alpha-amylase on sugarcane starch, www.midlandresearchlabsinc.com; 15/08/2006.

LASZLO, T. – Refining cane sugar in beet sugar factory, **Sugar Journal**, p.7-12, 1984.

LIM, S.T.; LEE, J.H.; SHIN, D.H.; LIM, H.S. - Comparison of protein extraction solutions for rice starch isolation and effects of residual protein content on starch pasting properties. **Starch-Starke**, v. 54, p.120 -125, 1999.

MATSUNAGA, N.; TAKAHASHI, S.; KAINUMA, K. - Rice starch isolation from newly developed rice cultivars by improved alkali method, **Journal of Applied Glycoscience**, v. 50, p.9-13, 2003.

MAX, A., CHOEN, O., DIONISIO, G., STANFORD, J.D. – Quality problems in refined cane sugar, **Sugar Journal**, p.8-16, 1972.

MEADE, G.P., CHEN, J.C.P. – Cane Sugar Handbook, 10 th ed. John Wiley and Sons, v.22 p.136-137, 1977.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA – <http://www.agricultura.gov.br/portal/> (05 de dezembro de 2008)

MOHABIR,R; KHESWA, Y. - A study of enzyme activity and starch reduction, Tongaat-Hulett Sugar Limited TMD, nº. 49/03, 27 october, 14 pp.

QUDSIEH, H.Y.M.; YUSOF, S.; OSMAN, A.; RAHMAN, R.A. –Physico-chemical changes in sugarcane (*Saccharum officinarum var yellow cane*) and the extracted juice at different portions of the stem during development and maturation, **Food Chemistry** , v.75, p.131-137, 2001.

OLIVEIRA, D.T.- Consultor da Copersucar, Limeira –Sp, 2006.

PARK, Y.K.; SATO, H.H. - Fungal invertase as an aid for fermentation of cane molasses into ethanol, **Appl. Environ Microbiol**, v.44, p.988-989, 1982.

PARK, Y.K.; MARTENS, I.S.H.; SATO, H.H. – Enzymatic removal of starch from sugarcane during sugarcane processing. **Process Biochemistry** p.57-59, 1985.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO - <http://www.portaldoagronegocio.com.br/> (05 de dezembro de 2008).

RÍAZ, M.; PERVEEN,R.; JAVED, M.R.; NADEEN, H.; RASHID, M.H. – Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola sp.*, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p.558 – 564, 2007.

SATO,H.H. – Produção, purificação e estudos das propriedades da Isoamilase de *Flavobacterium sp.* – Tese de Mestrado apresentada na Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 1979.

SATO,H.H. - Estudo das Características bioquímicas da pululanase de *Klebsiella sp.* e sua aplicação -Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Engenharia de Alimentos –Unicamp, 1991.

SANDSTEDT, R.M.; KENEEN,E.; BLISH, M.J. - A standardized Wohlgemuth procedure for alpha-amylase activity, **Cereal Chemistry**, v.16, p. 712, 1939.

SCHOONEES, B.M. – Starch hydrolysis using α -amilase: A laboratory evaluation using response surface methodology, **International Sugar Journal**, v. 57, nº1286, 2006.

SOMOGYI, M.A. – A new reagent for the determination of sugars, **Journal of Biology and Chemistry**, v.160, p.61-68, 1945.

STEVENSON, J.C.; WHAYMAN,E. - Cane Starch -Part I-Isolation and iodine affinity. **International Sugar Journal**, p. 44-46, 1976.

TREVELYAN,W.E.; PROCTER,D.P.; HARRISON,J.G.- Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v.166, p.444-445, 1950.

VIGNES, E.C. - Notes on Cane Starch and its Determinations. **Proc 15 th Congress of ISSCT**, v. 3, p.1288-1295, 1974.

WALLENFELS, K.; BENDER, H.; RACHED, J.R. - Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*; Production in a cell-bound state. Purification and properties of the enzyme, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 22, nº 3, p.254-161, 1966.

WANKHEDE, D.B.; RHATEKE, R.S. – Synergistic digestibility of several native starches by amylolytic enzymes, **Starch/ Starke**, v. 39, nº9, p.309-312, 1982.

WASTON, A.J.; WILSON, N. M. – Sugar technology reviews, Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1975.

WHAYMAN, E.; WILLERSDORF, A.L. – Cane Starch – Part II - Starch components and their iodine complex spectra, **International Sugar Journal**, p.67-68, 1976.

YAMAMOTO, T. – Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes, ed. **The Amylase Research Society of Japan**,1994.

CAPÍTULO II – DETERMINAÇÃO DE α -AMILASE RESIDUAL EM AÇÚCAR BRUTO

RESUMO

A cana-de-açúcar sintetiza amido como um polissacarídeo de reserva que depois é convertido em sacarose. O amido sintetizado na cana-de-açúcar é encontrado em todos os produtos derivados de cana-de-açúcar, nas usinas e refinarias incluindo açúcar bruto e refinado. Açúcar bruto contendo alta concentração de amido tem menor valor comercial no mercado internacional. A α -amilase bacteriana é usada, na usina de açúcar, para hidrolisar o amido e facilitar a filtração e a cristalização da sacarose. A determinação da atividade residual de α -amilase no açúcar bruto é requerida para fins de exportação. Este trabalho visou a adequação de metodologia para a determinação de atividade de α -amilase residual em açúcar bruto. Foram testados os métodos de Bernfeld baseado na determinação de açúcares redutores, método Iodométrico baseado na descoloração do complexo amido-iodo, método de Phadebas baseado na hidrólise do amido complexado com corante Cibacron Blue F3GA e o método usando-se o substrato BPNPG7 (benzylidene blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside, Megazyme, Ireland) baseado na hidrólise do substrato e liberação do p-nitrofenol para a determinação de α -amilase residual em açúcar bruto. O método de Bernfeld se mostrou mais adequado para a quantificação de α -amilase residual em açúcar bruto.

SUMMARY

Sugarcane synthesizes starch as a storage polysaccharide that is later converted into sucrose. Starch is found in all the sugarcane products in the factory and refinery, including the raw and refined sugars. Raw sugar containing a high starch concentration has reduced commercial value on the international market. Bacterial α -amylase is used in sugar factories to hydrolyze the starch and facilitate filtration and crystallization of the sucrose. The determination of residual α -amylase in the raw sugar is required for the product to be exported. This work aimed at the adequacy of the methodologies used to determine the residual α -amylase in raw sugar. The Bernfeld method is based on the determination of the reducing sugars by an Iodometric method based on discoloration of the starch-iodine complex. The Phadebas method is based on the hydrolysis of the starch polymer dyed with Cibachron Blue F3GA, and the method using BPNPG7 p – nitrophenyl maltoheptaoside (benzylidene blocked maltoheptaoside, Megazyme, Ireland) is based on the hydrolysis of the substrate, releasing p-nitrophenol. These three methods were tested for the determination of residual α -amylase in raw sugar, and the Bernfeld method was shown to be more adequate.

1. INTRODUÇÃO

O amido é sintetizado na cana-de-açúcar como um polissacarídeo de reserva e consiste de cerca de 20% de amilose e 80% de amilopectina, embora ocorram variações de acordo com a variedade e maturidade da planta (KAMPEN, 2006).

Em caldo de cana-de-açúcar foram encontradas concentrações médias de amido na faixa de 275 até 1867 ppm (GODSHALL et al., 1998).

O amido é considerado uma impureza indesejável presente na cana-de-açúcar, pois causa problemas durante o processamento nas usinas e refinarias. Os cristais de sacarose podem encobrir o amido e causar aumento da viscosidade do melão. O amido é responsável pelo aumento do custo do processamento, pois aumenta a viscosidade do caldo, dificulta a cristalização e reduz a taxa de centrifugação e reduz a filtrabilidade. Durante a carbonatação, que é uma etapa do processamento de açúcar bruto na refinaria, o lodo de filtração é particularmente obstruído quando o açúcar bruto possui concentração de amido acima de 250 ppm/°Brix. A taxa de produção é drasticamente afetada sendo muito baixa e a refinaria corre o risco de não cumprir com os prazos contratuais assumidos. Por estas razões usinas de Louisiana (EUA) são estimuladas a produzir açúcar bruto com concentrações de amido inferiores a 250 ppm/°Brix, para serem posteriormente purificadas nas refinarias (EGLESTON et al., 2007).

Na África do Sul as usinas que produzem açúcar bruto contendo concentrações de amido superiores a 130 ppm/°Brix são penalizadas. Nos Estados Unidos não há penalização para as usinas que produzem açúcar com altos teores de amido e sim uma política informal de cooperação entre usinas e refinarias de carbonatação que têm obtido sucesso. As práticas de cooperação incluem aplicação de α -amilase nas usinas para hidrolisar o amido presente no caldo de cana-de-açúcar, e a realização de um método colorimétrico de fácil

execução, desenvolvido pela refinaria, para monitorar e controlar a concentração de amido (SCHOONEES, 2006).

Na usina de açúcar a enzima α -amilase bacteriana é usada, para hidrolisar o amido e facilitar a filtração e a cristalização da sacarose. O uso estimado de α -amilase pelas usinas associadas à Copersucar é de 60.000 Kg de α -amilase Termamyl por safra, com custo estimado de 350 mil dólares/safra, sendo que a enzima é utilizada durante toda safra de produção do açúcar bruto. A determinação da atividade residual de α -amilase no açúcar bruto é requerida para o produto para exportação. No entanto não existe metodologia padronizada para a determinação de α -amilase residual em açúcar bruto (OLIVEIRA, 2006).

Foram estudados os métodos de Bernfeld (determinação de açúcares redutores formados a partir do amido), Iodométrico (descoloração do complexo amido-iodo), Phadebas (hidrólise do amido complexado com corante Cibachron Blue) e BPNPG7 (hidrólise do substrato benzylidene blocked p -nitrophenyl maltoheptaoside) para determinação de α -amilase residual de açúcar bruto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aplicação de enzimas no processamento do açúcar

As enzimas dextranase fúngica e α -amilases bacterianas têm sido utilizadas, respectivamente, para a remoção de dextrana e amido de caldo de cana-de-açúcar, para a diminuição da viscosidade, aumento do rendimento e da qualidade do açúcar produzido.

A dextranase hidrolisa as ligações α -1,6 glicosídicas da dextrana e é utilizada em caldo de cana-de-açúcar nas épocas chuvosas devido ao aumento da contaminação da cana-de-açúcar por microorganismos produtores de polissacarídeos como *Leuconostoc mesenteroides*.

A enzima α -amilase hidrolisa as ligações α -1-4 glicosídicas do amido, ao acaso, diminuindo rapidamente a viscosidade e o poder de coloração com reagente de iodo. As α -amilases são produzidas por bactérias, leveduras e fungos (VALLEE, 1959).

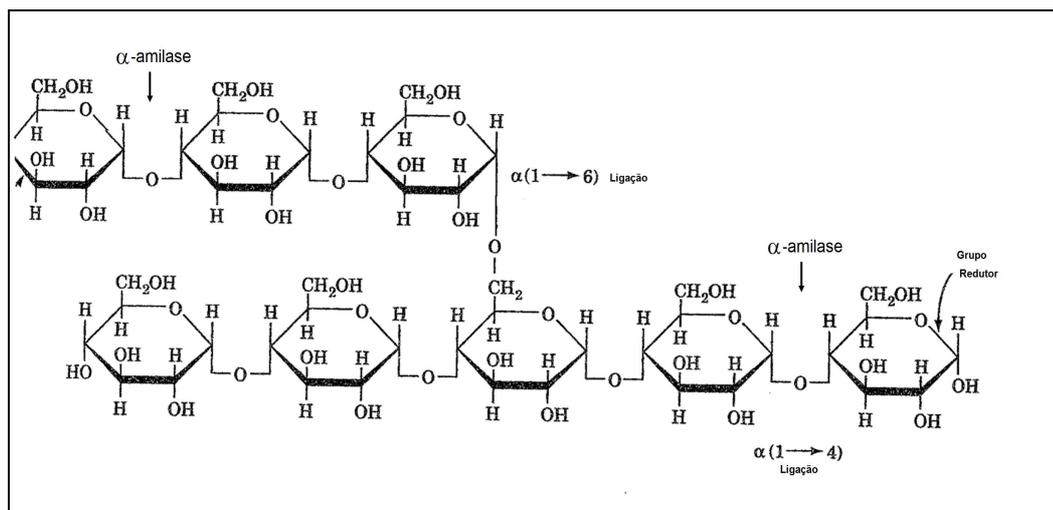


Figura II - 1: Hidrólise do amido com α -amilase

A α -amilase é uma enzima de grande importância industrial utilizada na liquefação de amido, hidrólise do amido em produtos de panificação, aditivo em detergentes, remoção de amido de materiais têxteis (SHAW et al., 1995).

Diferentemente das dextranases, as α -amilases possuem um grande volume de vendas com um amplo mercado, incluindo produtos de panificação, xarope de milho com alto teor de frutose, fabricação de cerveja, indústria têxtil, fabricação de papel e detergente. Um reflexo desse mercado é a grande quantidade de pesquisas acadêmicas e industriais que tem sido desenvolvidas sobre as α -amilases. O objetivo das pesquisas é desenvolver α -amilase através de engenharia genética, com características desejáveis pela indústria como alta atividade em condições de pH extremos e altas temperaturas. Entretanto, a utilização de α -amilase na produção de açúcar ainda é relativamente pequena em vista dos outros mercados dessa forma não tem sido desenvolvidas α -amilases especificamente para as condições encontradas nas usinas (EGLESTON et al., 2007).

A enzima dextranase possui um custo muito elevado quando comparada ao custo das enzimas α -amilases que são utilizadas durante toda a safra.

As enzimas dextrana e α -amilase são altamente específicas e uma mistura pode ser utilizada para hidrólise simultânea dos polissacarídeos amido e dextrana (CUDDIHY et al., 2006).

A remoção do amido no processamento de cana-de-açúcar aumenta a capacidade, volume e qualidade de produção (ANYANGWA et al., 1993).

BOURNE et al. (1979) encontraram atividade amilolítica em preparações de proteínas solúveis de frações de cloroplastos de cana-de-açúcar. A enzima degradou amido com a formação de maltose, maltotriose e oligossacarídeos de maior massa molecular. O pH ótimo de atividade da α -amilase nas frações de cloroplastos de cana-de-açúcar foi 6,9.

Segundo ALEXANDER (1974) o caldo de cana contém a enzima α -amilase naturalmente em sua composição, a qual hidrolisaria o amido caso ele estivesse gelatinizado. As amilases da cana-de-açúcar possuem atividade ótima em pH 5,5 - 5,7 e 65°C, mas podem ser inativadas em temperaturas acima de 75°C. Entretanto para se utilizar essas enzimas endógenas seria necessário promover condições adequadas e tempo suficiente para sua ação. Além disso, a quantidade e o tipo da enzima que ocorre naturalmente na cana-de-açúcar não pode ser controlada ou prevista.

A hidrólise do grânulo de amido pela enzima α -amilase é muito mais eficiente quando o grânulo de amido se encontra solubilizado e gelatinizado quando comparado ao grânulo cristalino. Durante a clarificação e evaporação, os grânulos de amido são aquecidos progressivamente, então ocorre a gelatinização e ruptura dos grânulos com liberação da amilose e amilopectina, resultando em uma solução amorfa viscosa.

GODSHALL et al (1998) descreveu que o amido está solubilizado quando deixa o último terno de moenda antes da clarificação, especialmente se embebido em água morna. Moléculas lineares de amilose são capazes de formar hélices e podem se associar à água através de pontes de hidrogênio, para formar rede de gel, enquanto que a cadeia de amilopectina não é capaz. Esse fenômeno de associação das moléculas de amilose é conhecido como retrogradação.

Uma das reações primárias da adição de α -amilase nas usinas é impedir a retrogradação da amilose e formação de soluções muito viscosas após a etapa de evaporação. Essa solução viscosa é então progressivamente hidrolisada em dextrinas médias e pequenas e em maltodextrinas de cadeias menores pela ação de endo-amilases que agem randomicamente clivando ligações glicosídicas α -1,4 entre moléculas de glicose na cadeia de amilose de amido gelatinizado (EGGLESTON et al., 2007).

A maior parte das α -amilases utilizadas pela indústria de açúcar nos Estados Unidos para controlar o nível de amido no caldo de cana-de-açúcar, possuem temperatura de estabilidade intermediária (acima de 85°C, temperatura ótima próximo a 70°C), e são produzidas por *Bacillus subtilis*.

A α -amilase produzida por *Bacillus licheniformis* possui temperatura intermediária de estabilidade e é estável acima de 85°C. A enzima é cálcio dependente, o que não representa um obstáculo para a usina, pois durante o processo de clarificação é adicionado carbonato de cálcio, mantendo a concentração de cálcio livre adequada. O microrganismo *Bacillus stearothermophilus* produz uma α -amilase estável a elevadas temperaturas (acima de 105°C) e baixa necessidade de cálcio. Porém esta enzima não foi desenvolvida especialmente para a indústria açucareira, e como a enzima é muito estável a elevadas temperaturas ela pode não ser desnaturada durante o processamento, resultando em transferência de atividade para o açúcar bruto e melaço, e conseqüentemente no açúcar refinado e produtos alimentícios. Nos Estados Unidos houve dois casos de usinas que venderam o melaço final contendo atividade residual de α -amilase para indústrias fabricantes de molho de churrasco, o que causou a liquefação do molho de churrasco. Com o objetivo de se evitar novas ocorrências em produtos alimentícios, os clientes das refinarias estão solicitando que não sejam utilizadas α -amilases estáveis a elevadas temperaturas para produção de açúcar bruto (EGLESTON et al., 2007).

A α -amilase bacteriana termoestável Termamyl utilizada nas usinas de açúcar do Brasil é obtida de *Bacillus licheniformis* e apresenta atividade ótima em pH 6,0 - 7,0 e a 90°C. A meia vida da enzima após tratamento térmico a 98°C em pH 5,5 e pH 6,5 e na presença de 70 ppm de íons Ca^{++} foi estimada em 5 e 400 minutos, respectivamente. A α -amilase termoestável é usada para liquefação do amido e produção de maltodextrinas.

A α -amilase de *Bacillus licheniformis* também é conhecida por sua alta estabilidade térmica, porém é ligeiramente menos estável quando comparada a α -amilase de *Bacillus stearothermophilus*. Sendo capaz de hidrolisar 54 – 81% de amido quando aplicada no segundo evaporador com uma dosagem de 1,27 – 6,20 g de amilase/ tonelada (CHEN e CHOU, 1993).

A Tabela II - 1 ilustra as principais características bioquímicas das α -amilases produzidas por *Bacillus*.

Tabela II - 1: Características bioquímicas das α -amilases produzidas por diferentes espécies de *Bacillus*

	<i>B.subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. stearothermophilus</i>
Temperatura Ótima	70°C	90°C	95°C
Temp. máxima efetiva	>85°C	>105°C	115°C
Temperatura de estabilidade	90°C perdeu 48% da atividade (tratamento por 1 hora) pH 7,0 em tampão 0,1 M fosfato	98°C retém 50% da atividade (tratamento por 5 minutos) pH 5,0	>105°C
Faixa de pH ótimo	5,5 – 8,5	5,5 – 9,0	5,5 – 6,5
Faixa de pH efetiva	5,0 – 10,0	5,0 - 9,0	4,0 - 7,0
Faixa de pH de estabilidade	5-11	7-10	6-11
Quantidade de Ca requerida - ppm	150 - 400	5 – 40	0 – 75

Segundo SCHOONEES (2006) a α -amilase bacteriana tem sido aplicada nas usinas da África do Sul para controlar altos níveis de amido no caldo de cana

clarificado, como operação rotineira, há aproximadamente 20 - 30 anos. A α -amilase é aplicada em alguns períodos durante a safra, especificamente na estação chuvosa de Outubro a Dezembro. A autora recomenda a aplicação da enzima no terceiro ou quarto evaporador em série, onde são encontradas condições ótimas que favorecem a ação da enzima.

EGGLESTON et al. (2007) estudaram a otimização da aplicação da α -amilase em 3 usinas de cana-de-açúcar em Lousiana (EUA). Os autores utilizaram o método de Phadebas, substrato de amido complexado com corante Cibachrome Blue, com modificações, para avaliar a atividade de α -amilase. Foi estudada a influência de diversos parâmetros como as propriedades das enzimas comerciais, ponto de aplicação, forma de aplicação e concentração na atividade da α -amilase em usinas de açúcar da Lousiana (EUA). A usina 1 possuía capacidade para processar 10.000 toneladas de cana/ dia e a α -amilase de *Bacillus subtilis* (59 KNU/L) foi adicionada sem diluição primária no último evaporador com um tempo de retenção de aproximadamente 18 minutos, pH 6,3 – 6,4, temperatura do caldo em torno de 60°C e temperatura de saída 65°C. A usina 2 possuía capacidade para processar 13.000 toneladas de cana/ dia e a α -amilase de *Bacillus subtilis* (59 KNU/L) foi adicionada sem diluição primária no último evaporador com um tempo de retenção de aproximadamente 18 minutos, temperatura do caldo em torno de 65°C e temperatura de saída 62 - 65°C. Também foi adicionada em outro experimento enzima α -amilase de *Bacillus subtilis* (545,3 KNU/mL). A enzima foi adicionada sem diluição nas concentrações 0, 2 e 5 ppm e como uma solução de trabalho com fator de diluição 1:3 em água destilada. A usina 3 possuía capacidade para processar 14.000 toneladas de cana/dia e a α -amilase de *Bacillus subtilis* (59 KNU/L) e (545,3 KNU/L) foi adicionada sem diluição primária e como uma solução de trabalho com fator de diluição 1:5 em água destilada no último evaporador com um tempo de retenção de aproximadamente 18 minutos e temperatura do caldo em torno de 62,8°C e temperatura de saída 65°C. Os autores constataram que em relação à eficiência na hidrólise do amido no caldo de

cana, melhores resultados foram obtidos utilizando α -amilase de *Bacillus subtilis* (545,3 KNU/mL) em forma de solução de trabalho diluída 1:3 em água destilada, pois promoveu o maior contato da enzima com o substrato quando comparada com a eficiência da enzima aplicada sem diluição e o melhor ponto de aplicação encontrado foi no último evaporador.

2.2. Determinação da atividade de α -amilase

Não há nenhum órgão regulatório nos Estados Unidos que padroniza o método de determinação de atividade e unidades das α -amilases comerciais. A falta de padronização de unidades que expressam a atividade da α -amilase confunde quem trabalha nas usinas, pois cada empresa fabricante de α -amilase expressa a unidade de atividade de uma forma e as enzimas não podem ser comparadas. Nos Estados Unidos, por exemplo, as unidades podem ser expressas em MWU/mL, BAU/gm e MWU/g. Baseado nesses fatos há uma urgente necessidade de padronização do método de determinação de α -amilase nas usinas (EGLESTON et al., 2007).

A atividade de α -amilase pode ser determinada por métodos colorimétricos, viscosimétricos, nefelométricos, fluorométricos, difusão em gel, cromatográficos e imunológicos (ASP, 1990). Diversos métodos foram desenvolvidos na área de análise clínica para medir α -amilase em saliva, urina ou sangue e depois modificados para medir a atividade da enzima em cereais e outros produtos. Considerações na escolha de um método para medir a atividade de α -amilase inclui rapidez, simplicidade, custo, especificidade, sensibilidade, confiabilidade e aceitabilidade (KRUGER e LINEBACK, 1987). Usualmente nem todos os critérios podem ser alcançados, mas esforços devem ser feitos para atender o maior número possível.

Vários métodos para determinação da atividade de α -amilase tem sido descritos na literatura. Esses métodos são baseados na diminuição da intensidade da cor do complexo amido-iodo, aumento de açúcares redutores, determinação de compostos coloridos liberados de substratos complexados e diminuição da viscosidade em suspensões de amido (GUPTA, 2003).

Segundo ZAJONCOVÁ (2004) os métodos mais utilizados para determinação de α -amilase: são o amiloclástico e o sacarogênico, baseados respectivamente na diminuição da intensidade da coloração do complexo amido-iodo e na formação de açúcares redutores, medida como maltose, ou glicose equivalente. As desvantagens desses métodos são a longa duração, a interferência de glicose endógena e a instabilidade da reação colorimétrica resultando em baixa reprodutibilidade e confiabilidade.

A atividade de α -amilase de preparações enzimáticas comerciais para panificação é determinada usando amido solúvel como substrato. O método de determinação da atividade de α -amilase em unidades SKB (SANDSTEDT et al., 1939) baseia-se na determinação do tempo necessário para hidrolisar o amido à dextrina de tamanho definido, indicado pela cor do complexo iodo-dextrina e comparado com solução padrão de coloração marrom (MILES LABORATORIES; SATO, 1991). A atividade de α -amilase é determinada utilizando-se curva padrão de atividade de α -amilase expressa em unidades SKB. Essa metodologia tem sido utilizada há décadas para determinação de α -amilase de preparações de α -amilase para panificação e indústrias de amido.

ZAJONCOVÁ et al. (2004) desenvolveram um biosensor para determinação da atividade de α -amilase. O método é baseado na determinação da maltose gerada utilizando um eletrodo de peróxido equipado com glicose oxidase, α -glicosidase e mutarotase imobilizadas em uma membrana de celofane. Segundo os autores a principal vantagem desse sistema é a relativa facilidade de construção e não ser necessário a imobilização de todas as enzimas. Foram

preparadas amostras de α -amilase misturando 50 μ L de tampão fosfato pH 6,9 (contendo 1% de amido e 5 mmol/L NaCl) e 50 μ L solução estoque diluída (1:1000) de α -amilase testada. A solução estoque foi preparada dissolvendo 2 mg de α -amilase pancreática suína Merck em tampão fosfato pH 6,9 ou diluindo saliva humana com o mesmo tampão na faixa de 1:50. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. As amostras foram analisadas também pelo método de Somogyi-Nelson (1945) e uma curva de calibração com α -amilase de pâncreas suíno foi construída para análise dos resultados. Os resultados de determinação de α -amilase de saliva humana, obtidos com os métodos do biosensor com membrana contendo glicose oxidase e α -glicosidase, biosensor com membrana contendo glicose oxidase, α -glicosidase e mutarotase e Somogyi-Nelson foram 100,8 IU/L, 11,97 IU/L e 97,70 IU/L, respectivamente. Os resultados de determinação de α -amilase pancreática suína, obtidos com os métodos do biosensor com membrana contendo glicose oxidase e α -glicosidase, biosensor com membrana contendo glicose oxidase, α -glicosidase e mutarotase e Somogyi-Nelson foram 227,60 IU/L, 229,27 IU/L e 201,25 IU/L, respectivamente. O limite de detecção do método com a membrana contendo ou não a mutarotase foi de 50 IU/L, sendo eficiente para utilização em análises clínicas.

Vários métodos colorimétricos foram desenvolvidos para analisar α -amilase (ASP, 1990).

BOURNE (1979) utilizaram uma modificação do método de BERNFELD (1955) para a determinação da atividade de α -amilase de cloroplastos de cana-de-açúcar. A atividade enzimática foi determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados a partir de solução de amido solúvel, usando o método de redução do cobre em meio alcalino conhecido como reagente de Somogyi-Nelson. A metodologia de determinação da atividade de α -amilase segundo método de BERNFELD foi recomendada por ROBYT e WHELAN (1965). ASP (1990) relatou que o método usando reagente de Somogyi-Nelson (1945) é mais preciso do que

o método de 3,5 dinitrosalicilato porque o reagente de cobre é mais seletivo na oxidação dos açúcares do que o ferricianeto.

FERNÁNDEZ et al. (2001) estudaram a atividade de α -amilase intestinal em cinco espécies de peixes do Mediterrâneo. A atividade de α -amilase foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (1945). A solução de amido solúvel (2%) foi utilizada como substrato e foi incubada com 20 μ L de solução enzimática em tampão citrato – fosfato 0,1M, pH 7,5 durante 30 minutos. A atividade foi determinada através da medida de açúcares redutores liberados durante a reação. Uma unidade de atividade foi definida como quantidade de enzima necessária para produzir 1 mg de maltose por minuto. Para preparação da curva de calibração, α -amilase pancreática suína (Sigma, A6255) foi utilizada como referência. A atividade mínima encontrada foi $6,2 * 10^3$ U/ mg proteína na espécie *Diplodus annularis* e a atividade máxima encontrada foi $40,9 * 10^3$ U/ mg de proteína para a espécie *Boops boops*.

A atividade da α -amilase pode ser medida através do aumento de açúcares redutores formados durante a hidrólise do amido, ou pelo aumento de compostos coloridos solúveis liberados por substratos de amido complexado com corante durante a degradação enzimática. Sendo que os métodos utilizando substratos de amido complexado com corante são relativamente fáceis de serem executados e não são afetados por substâncias redutoras presentes na amostra, porque a intensidade da cor é proporcional ao fragmento solúvel liberado na solução pelo substrato amido-corante (CESKA et al., 1969).

Os tabletes de Phadebas compostos de microesfera de amido complexado com corante Cibacron Blue F3GA (Figura II – 2) são usados para determinar atividade de amilase em diversos materiais, por exemplo, em materiais obtidos de casos judiciais para indicação da presença de saliva para posterior análise de DNA; controle de qualidade de mel; detecção de amilase em géis de eletroforese.

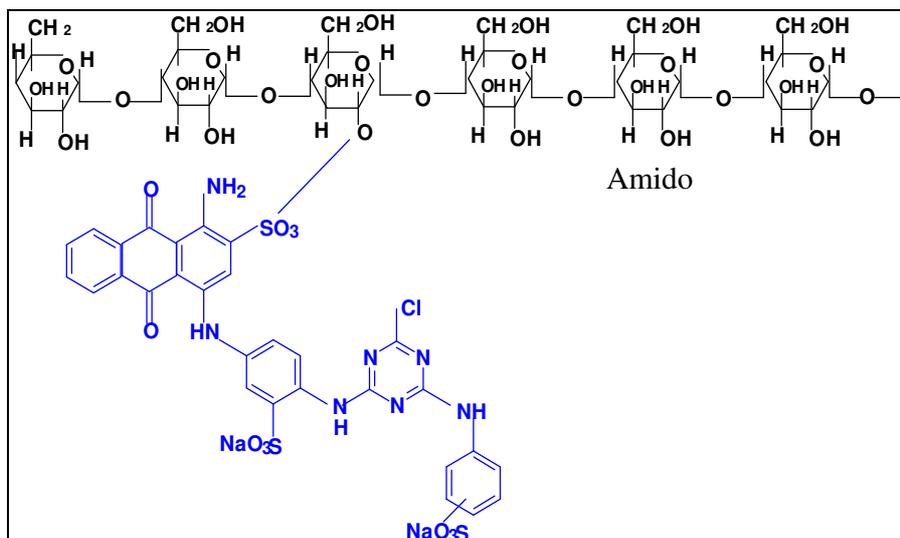


Figura II - 2: Amido complexado com corante Cibacron Blue

Segundo WONG et al. (2000) o substrato Phadebas tem sido utilizado para análises qualitativas e talvez semi-quantitativas, para medida da atividade de α -amilase em concentrações muito baixas. Os autores utilizaram o substrato Phadebas para monitorar concentrações muito baixas de α -amilase produzidas por células de leveduras recombinante que expressam o gene da α -amilase de cevada. A reação foi realizada utilizando-se 25 ng de enzima. Os autores observaram que o aumento da absorvância versus tempo foi linear no intervalo 1 - 10 minutos e que a reação também permaneceu linear com o aumento da concentração da enzima numa faixa de 0 - 50 ng. Os resultados foram comparados com outro método colorimétrico baseado na medida de açúcares redutores formados usando ácido *bicinchoninic* (BCA) e sulfato de cobre de acordo com WAFFENSHMIDT e JAENICKE (1987). Foi observado que o método BCA - cobre se mostrou mais sensível do que o substrato amido-corante Phadebas. Entretanto o limite de detecção do método Phadebas está dentro da faixa de trabalho das concentrações de enzima da maioria dos experimentos e possui ainda a vantagem de não sofrer interferência de substâncias redutoras ou

outros interferentes potenciais como altas concentrações de íons de metal e proteínas na amostra.

EGGLESTON (2005) propuseram uma modificação do método Novozymes PhadebasTM amylase test (2001) para a determinação relativa de α -amilase em açúcar bruto usando tabletes de Phadebas composto de microesferas de polímero de amido de batata com o corante Cibacron Blue F3GA ligado covalentemente. A α -amilase hidrolisa o polímero de amido-corante, insolúvel em água, liberando fragmentos solúveis de coloração azul que podem ser quantificados pela medida absorvância a 620 nm. A atividade de α -amilase foi determinada usando curva padrão de α -amilase bacteriana Termamyl. A autora relatou que o método é mais adequado para determinação qualitativa de α -amilase em açúcar bruto. O método se baseia na hidrólise aleatória do amido complexado com corante Cibachron Blue pela α -amilase e liberação de fragmentos de menor massa molecular complexados com o corante que são filtrados e podem ser quantificados pela medida da absorvância a 410 nm.

TORLEY et al. (2004) estudaram a atividade de α -amilase em oito tipos de mel e o efeito da enzima presente no mel na qualidade de produtos contendo amido. A atividade de α -amilase foi determinada utilizando-se o método de Phadebas descrito por BORGDANOV (1997), baseado na hidrólise de amido complexado com o corante Cibacron Blue. As soluções contendo mel foram incubadas com o substrato de amido complexado com corante à 40°C durante 15 minutos. A absorvância da solução resultante foi medida a 620 nm e expressa como número de diástase utilizando a equação dada por BORGDANOV et al. (1997). A atividade de α -amilase nas amostras expressas em número de diástase apresentaram valores na de faixa 5,0 - 39,1. Os valores em número de diástase foram considerados normais de acordo com a literatura para as amostras de mel. Os autores concluíram que a α -amilase presente no mel é responsável por diferenças nas propriedades de gelatinização do amido, com correlações significativas entre atividade da α -amilase e parâmetros viscosimétricos.

Diversos substratos sintéticos têm sido utilizados para a determinação de α -amilase.

YAMAGUCHI et al. (2004, 2006) utilizaram o substrato Gal-G2-CNP (2-cloro-4-nitrofenil-4-O- β -D-galactopiranosil-maltosídeo) para determinar a atividade de α -amilase salivar usando um monitor manual para avaliar o estresse fisiológico. Foram dissolvidos 15 mMol/L 2-cloro-4-nitrofenil-4-O- β -D-galactopiranosil-maltosídeo, 1,0 mol/L de tiocianato de potássio (KSCN), e 300 nmol/L de maltose em tampão contendo ácido 2-morfolinoetanosulfônico como principal componente. O substrato Gal-G2-CNP é um novo composto cromogênico que vem sendo utilizado para determinação de α -amilase em sangue, e atua como um substrato para a α -amilase, KSCN foi adicionado ao tampão para estabilizar o substrato. Uma fita dupla face foi confeccionada e o reagente foi aplicado para determinação da atividade de α -amilase. Quando a saliva foi aplicada na fita de dupla face o substrato 2-cloro-4-nitrofenil-4-O- β -D-galactopiranosil-maltosídeo foi hidrolisado liberando produto de coloração amarela. Os valores médios encontrados nas amostras de saliva foram 33,8 KU/L pré-estresse, 58,0 KU/L médio-estresse e 61,5 KU/L para pós-estresse. O método se mostrou apropriado para determinação de α -amilase salivar na faixa de 0–200 KU/L, tempo de reação dentro de 150 segundos. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor, maltose, em 1 minuto. O método mostrou-se sensível sendo possível determinar a atividade de α -amilase usando somente 30 μ L de saliva.

DA VELA et al. (2006) descreveu que a identificação de amilase em amostras forenses é um passo muito importante antes da codificação do DNA. Altos níveis de amilase em um fluido sugerem a presença de saliva e então de células nucleadas em um material, o qual pode indicar com sucesso a detecção do DNA do doador. Métodos manuais e semi-automáticos são normalmente utilizados para identificação de α -amilase, porém esses métodos podem ser afetados por

uma ampla variedade de fatores afetando o substrato. Os autores avaliaram a eficiência de um sistema químico automático para análise de amostras forenses (envelopes velhos, gomas de mascar, pontas de cigarro) e compararam com o sistema semi-automático e visual. A α -amilase catalisa a hidrólise do substrato sintético 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriosídeo (CNPG3) em 2-cloro-4-nitrofenol (CNP), 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltosídeo (CNPG2), maltotriose (G3) e glicose. As amostras foram incubadas por 70 segundos a 37°C, a absorção devido a formação de 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) foi medida utilizando a técnica de leitura bicromática (405, 577 nm). A calibração de todos os métodos foi realizada com diluições em série de α -amilase de pâncreas humano (Sigma, A 9972) na faixa de 600U/L à 1 U/L. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1,0 mg de maltose a partir do amido em 3,0 minutos a pH 6,9 à 20°C. Todas as amostras contendo saliva apresentaram atividade de α -amilase, na faixa de 47 a 221 U/L para velhos envelopes, 400 – 500 U/L para gomas de mascar e 20-30 U/L para pontas de cigarro. A sensibilidade do método de detecção automática de α -amilase foi alta em relação a outros métodos testados, no entanto foi observado que os resultados devem ser avaliados poucos minutos após a reação, pois os tubos deixados à temperatura ambiente por períodos de 30 ou mais minutos desenvolveram coloração amarela nas amostras negativas.

BASSINELO et al. (2002) compararam diversos substratos e métodos para avaliar a atividade amilolítica em frutas. A atividade amilolítica foi determinada usando banana como modelo. A atividade amilolítica total usando substrato amido foi estimada através da determinação de açúcares redutores pelo método de DNS e através da reação com solução de iodo. A atividade de α -amilase também foi determinada usando os substratos amilose-azure, BPNPG7 e PNPG5. Os autores verificaram que os métodos usando os substratos p-nitrofenol BPNPG7 e PNPG5 se mostraram mais específicos, reprodutíveis e simples para determinar

respectivamente a atividade de α e β -amilases em amostras complexas como frutas.

O método de determinação de atividade com o substrato BPNPG7, da empresa Megazyme, baseia-se no uso do substrato maltoheptosídeo tendo em uma extremidade um grupo terminal p-nitrofenol ligado ao oxigênio do C1 da glicose (nº1) e na outra extremidade do oligossacarídeo os grupos hidroxilas dos carbonos C4 e C6 da glicose (nº7) bloqueados, e da enzima coadjuvante α -glicosidase. No teste de determinação de atividade, a α -amilase hidrolisa o maltoheptosídeo ao acaso e em seguida a α -glicosidase hidrolisa os subprodutos liberando o p-nitrofenol. A mistura de reação é alcalinizada desenvolvendo a coloração amarela do p-nitrofenol que é medida espectrofotometricamente.

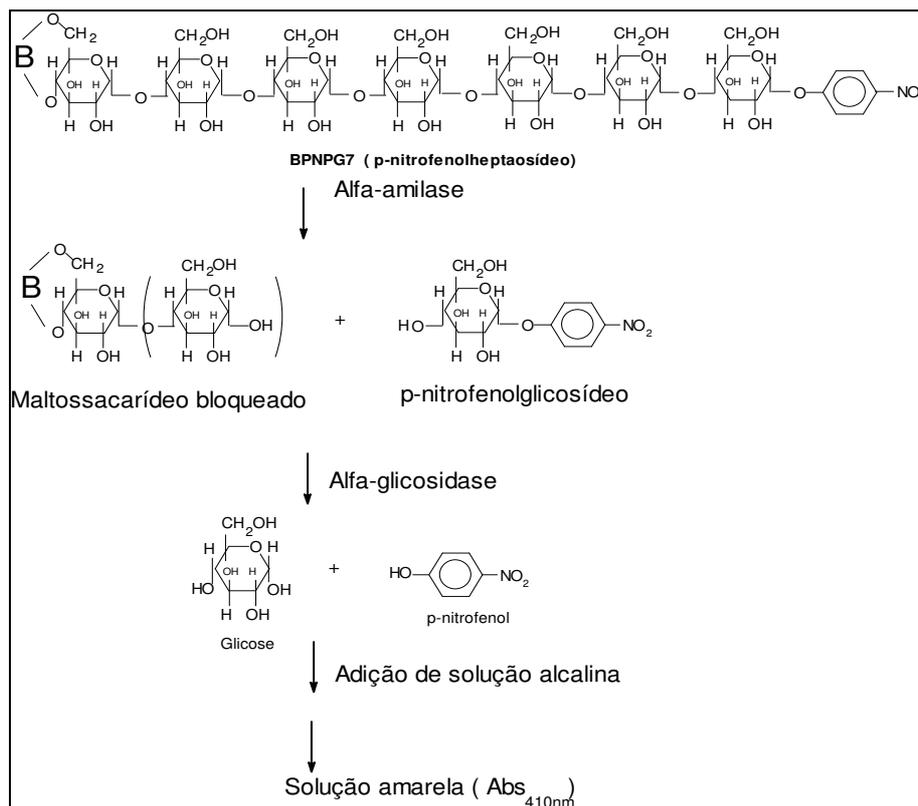


Figura II - 3: Reação de determinação de α -amilase utilizando-se o substrato p-nitrofenil-maltoheptosídeo BPNPG7 e α -glicosidase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Determinação de α -amilase residual em açúcar bruto

Foram testados diferentes métodos para a determinação da atividade residual de α -amilase em açúcar bruto. Foram utilizados amido solúvel Merck, amido de milho ceroso, sacarose PA. Merck, tabletes Phadebas Magle, BPNPG7 Megazyme e α -amilase bacteriana Termamyl.

3.2. Extração e concentração de α -amilase de açúcar bruto

Para a extração e a concentração de α -amilase em açúcar bruto, amostras de 100,0 g de açúcar bruto foram pesadas em balança semi-analítica e dissolvidas em 150 mL de água destilada. Em seguida foi adicionado 400 mL de etanol 99,3°GL Chemco resfriado a -5°C. O precipitado de cada amostra foi coletado em um único frasco de 250 mL através da centrifugação da mistura a 9.360 x *g* durante 15 minutos a 5°C. O precipitado foi dissolvido em 4 mL de água destilada ou como indicado e a solução foi usada para a determinação de α -amilase.

3.3. Determinação de α -amilase pelo Método Iodométrico

Para a preparação da solução estoque de iodo-KI, 4,4 g de iodeto de potássio foram dissolvidos em 60 mL de água destilada e foram adicionados 2,2 g de iodo metálico, o volume foi completado para 100 mL com água destilada. Para a preparação da solução diluída de iodo-KI, 2 mL da solução estoque e 20 g de iodeto de potássio foram adicionados em balão volumétrico de 500 mL contendo

250 mL de água destilada. A solução foi homogeneizada e o volume foi completado para 500 mL com água destilada.

Para a preparação da curva padrão uma amostra de 200 mg de α -amilase foi pesada em balança analítica em um béquer. A enzima foi transferida para balão volumétrico de 1L, lavando-se o béquer diversas vezes com água destilada. O volume foi completado com água destilada. A partir dessa solução foram feitas diferentes diluições desta solução, completando-se o volume com solução de 0,6322g de CaCl_2/L . Foram preparadas soluções de 0,1 mg/L a 160 mg/L de α -amilase comercial Termamyl.

A solução de substrato foi preparada, pesando-se 2 g de amido de milho ceroso em um béquer com 50 mL de água destilada. A suspensão de amido de milho ceroso foi transferida para béquer contendo 90mL de água em ebulição e fervida por 2 minutos. Em seguida, a solução foi resfriada, em banho de água de torneira, até temperatura ambiente e adicionou-se 50 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0. O substrato foi transferido para balão volumétrico de 200 mL e o volume foi completado com água destilada.

Para a determinação da atividade de α -amilase tubos de ensaio contendo 5mL da solução de amido de milho ceroso, 1 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 foram pré-incubados por 10 minutos a 80°C. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução enzimática e os tubos foram incubados por 20 minutos a 80°C. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de HCl 0,1M. Foram retiradas alíquotas de 1mL da mistura de reação e adicionados em tubos contendo 5 mL de solução diluída de iodo-KI. A absorbância foi medida a 620 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como diminuição de 0,001 na absorbância a 620 nm por mL de enzima por minuto. Foi testado também amido solúvel Merck como substrato.

3.4. Determinação de α -amilase pelo Método de Phadebas

A atividade de α -amilase no açúcar bruto foi testada pelo método Novozymes Phadebas Amylase Test (2001) modificado por EGGLESTON (2005).

O método baseia-se na hidrólise de polímero insolúvel de amido-Cibachron Blue pela α -amilase e liberação de fragmentos de coloração azul. A absorvância da solução azul foi medida a 620 nm.

Para a determinação da atividade de α -amilase três tubos de ensaio contendo 5 mL de tampão fosfato 0,089M pH 6,4 e 1 mL de extrato enzimático, numerados T1, T2 e branco, foram incubados por 5 minutos a 65°C. Após o aquecimento os tubos foram retirados do banho-maria a 65°C. Em seguida foi adicionado 1mL de solução de NaOH 1,0 M no tubo branco. Após a adição de 1 tablete de PhadebasTM, os tubos T1 e T2 foram agitados 15 segundos em agitador de tubos. Os três tubos foram incubados a 65°C. Após 15 minutos, os tubos foram removidos do banho e foi adicionado 1 mL de solução de NaOH 1,0M nos tubos T1 e T2 para paralisar a reação. Os tubos foram misturados por inversão 5 vezes e as misturas de reação foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 4. A absorvância da solução filtrada foi medida a 620 nm. Curvas padrões foram preparadas utilizando-se as concentrações de α -amilase Termamyl, 0,15 NU/mL, 0,30 NU/mL, 0,60 NU/mL, 0,90 NU/mL e 1,20 NU/mL.

3.5. Determinação de α -amilase utilizando-se substrato *p*-nitrofenil-maltoheptaosídeo BPNPG7

A atividade de α -amilase foi testada usando o substrato *p*-nitrofenil-maltoheptaosídeo BPNPG7 (benzylidene blocked *p*-nitrophenyl maltoheptaoside, Megazyme, Ireland), como descrito por BASSINELO et al. (2000).

A enzima α -glicosidase utilizada no ensaio foi preparada incubando-se frasco Erlenmeyer contendo 30 g da levedura de panificação *S. cerevisiae* e 100 mL de meio de cultura composto de 1% de maltose e 0,5% de extrato de levedura em agitador rotatório a 150 rpm, 30°C durante 24 horas. Após a incubação o meio de cultivo foi centrifugado a 9630 x g durante 10 minutos a 5°C e a massa celular foi ressuspensa em água destilada e centrifugada novamente nas mesmas condições. A massa celular ressuspensa em 50 mL tampão fosfato 0,05 M pH

6,0, foi resfriada a 5°C e submetida a tratamento em ultrasonicador a 200 watts durante 20 segundos. Em seguida a amostra foi centrifugada nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi utilizado como preparação de α -glicosidase, sendo armazenado a 0°C.

Para a preparação do substrato, 54,5 mg de BPNPG7 foi dissolvido em 10 mL de solução de α -glicosidase contendo 0,24 U/mL.

A mistura de 200 μ L de solução de substrato BPNPG7 + α -glicosidase e 200 μ L de solução de α -amilase foi incubada a 40°C por 20 min. A reação foi paralisada pela adição de 3,0 mL de solução 1% de Na₃PO₄ (pH >11) e a absorbância foi medida a 410 nm. A curva padrão foi preparada utilizando α -amilase Termamyl na faixa de 0,05 μ L/mL a 0,25 μ L/mL. A determinação de α -amilase também foi testada nas temperaturas de incubação de 35°C e 50°C.

3.6. Determinação de α -amilase pelo Método de Bernfeld modificado

A atividade de α -amilase no açúcar bruto foi testada pelo método de BERNFELD modificado por BOURNE et al. (1979), através da medida de açúcares redutores formados a partir do substrato amido solúvel. A α -amilase residual da amostra de açúcar bruto foi extraída como descrito no item anterior. Para a preparação do substrato a suspensão de 3 g de amido solúvel Merck em 50 mL de água destilada foi aquecida por 10 minutos em ebulição. Após resfriamento até temperatura ambiente foi adicionado 50 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,9 e o volume foi completado para 100 mL com água destilada.

A mistura de 2,0 mL de solução 3% de amido solúvel em tampão fosfato 0,1M pH 6,9; 0,1 mL de solução 0,5 M de cloreto de cálcio, 0,4 mL tampão fosfato 0,1M pH 6,9 e 1,0 mL de solução de α -amilase foi incubada a 50°C por 20 minutos. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram transferidas para tubos de ensaio e os açúcares redutores determinados pelo método de Somogyi – Nelson (1945). Foram testadas também concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; 4,0% de

substrato amido na mistura de reação e diferentes temperaturas de incubação das misturas de reação 30°C, 40°C, 50°C, 60°C e 65°C.

3.7. Teste de repetibilidade do Método de Bernfeld modificado para determinação de α -amilase

Foi testado a repetibilidade do método de Bernfeld modificado para a validação da metodologia.

Foi realizada a extração da enzima α -amilase residual em 10 amostras distintas de açúcar bruto. Em seguida foram realizadas 4 repetições do método de Bernfeld para determinar a concentração de α -amilase residual em cada uma das amostras de açúcar bruto.

Os resultados obtidos pelo método de Bernfeld modificado foram analisados através da ferramenta Gage R&R (Repetibilidade e reprodutibilidade) disponível no programa Minitab versão 14.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação de α -amilase utilizando-se o Método Iodométrico

A determinação de α -amilase residual em açúcar bruto pelo método iodométrico foi testada inicialmente com amido solúvel Merck, no entanto foram obtidos melhores resultados utilizando-se amido de milho ceroso.

A Figura II - 4 ilustra a curva padrão de α -amilase determinada pelo método iodométrico.

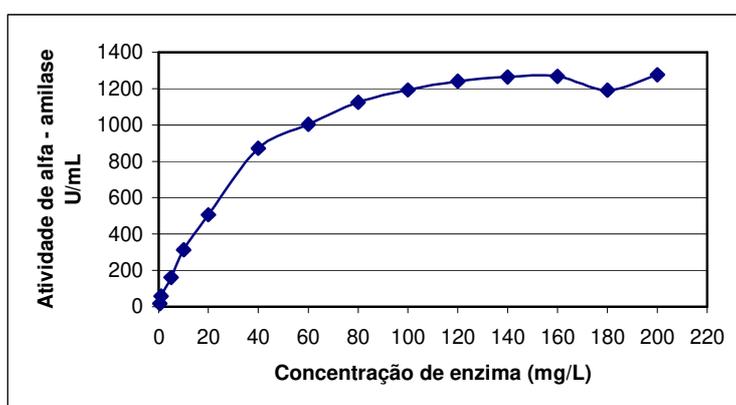


Figura II - 4: Curva padrão de α -amilase por Método Iodométrico.

Para a extração e concentração da α -amilase de 100 g de açúcar bruto das amostras 1 e 2, os precipitados obtidos após adição de etanol foram dissolvidos em 4 mL e 2 mL de água destilada, no entanto os tempos apresentados pelas amostras 1 e 2, para descolorir a solução de amilopectina com o reagente de iodo-KI, foram muito longos, 255 e 120 minutos respectivamente. A quantidade de α -amilase necessária para causar diminuição de 0,1 na absorbância, nas condições do ensaio foi cerca de 20 mg/L. O método iodométrico não se mostrou viável para determinação de α -amilase residual em açúcar bruto, porque não foi obtida uma relação linear entre concentração de enzima e unidades de atividade enzimática.

O método iodométrico é pouco sensível e não se mostrou adequado para determinar a concentração de α -amilase residual em açúcar bruto.

O método iodométrico é um dos métodos mais conhecidos para determinação de α -amilase principalmente na indústria de panificação, porém o método não é adequado para quantificar a α -amilase residual presente nas amostras de açúcar cristal bruto.

4.2. Determinação de α -amilase utilizando-se Método de Phadebas

A Figura II - 5 ilustra a curva padrão de α -amilase Termamyl (1 a 10 $\mu\text{g/mL}$) utilizando-se o método de Phadebas baseado na hidrólise do amido complexado com corante Cibachron Blue.

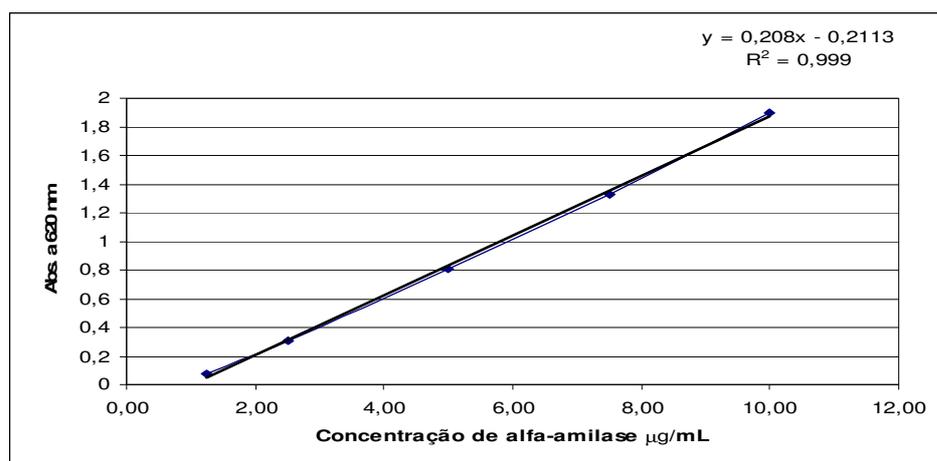


Figura II - 5: Curva padrão de α -amilase utilizando-se o Método de Phadebas

As concentrações de α -amilase nas amostras de açúcar bruto 1 e 2 foram estimadas em 0,19 ppm e 0,29 ppm, respectivamente.

O método Phadebas de determinação de α -amilase utilizando-se o substrato amido complexado com o corante Cibachron Blue não se mostrou adequado para a determinação quantitativa de α -amilase residual em açúcar bruto.

Segundo WONG et al. (2000) o substrato Phadebas tem sido utilizado para análises qualitativas e talvez semi-quantitativas, para medida da atividade de α -amilase em concentrações muito baixas.

EGGLESTON (2005) relatou que o método é mais adequado para determinação qualitativa de α -amilase em açúcar bruto. O método se baseia na hidrólise aleatória do amido complexado com corante Cibachron Blue pela α -amilase e liberação de fragmentos de menor massa molecular complexados com o corante que são filtrados e podem ser quantificados pela medida da absorbância a 410 nm.

O alto custo do reagente de Phadebas e do papel de filtro Whatman nº4 torna a metodologia cara para a determinação de α -amilase residual em açúcar bruto, além disso o prazo de validade do reagente é curto.

4.3. Determinação de α -amilase utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil-maltoheptaosídeo BPNPG7

A determinação da atividade de α -amilase utilizando-se o substrato BPNPG7 (benzylidene blocked *p*-nitrophenyl maltoheptaoside), foi testada nas temperaturas de 35°C, 40°C e 50°C, sendo que foi obtido melhor resultado a 40°C.

Verificou-se que a α -glicosidase de *S. cerevisiae* Sigma (G5003) é facilmente desnaturada. A α -glicosidase de levedura de panificação foi facilmente extraída por tratamento em ultrasonicador por 200 watts durante 20 segundos, porém a enzima é termosensível e foi desnaturada nos ensaios a 50°C. Para a determinação da atividade de α -amilase usando-se o substrato BPNPG7 e α -glicosidase utilizou-se a temperatura de 40°C.

A Figura II - 6 ilustra a curva padrão na determinação de α -amilase, utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil-maltoheptaosídeo BPNPG7 e a enzima α -glicosidase.

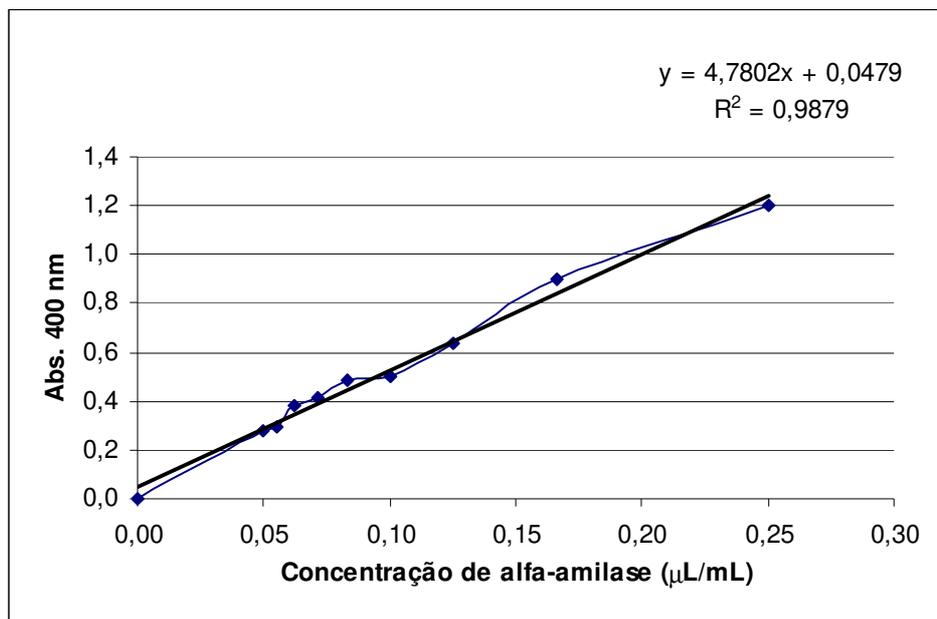


Figura II - 6: Determinação de α -amilase pelo Método ρ -nitrofenil-maltoheptaosídeo BPNPG7

O método utilizando-se o substrato BPNPG7 e a α -glicosidase baseado na hidrólise do substrato benzylidene blocked ρ -nitrophenyl maltoheptaoside não se mostrou adequado para a determinação de α -amilase residual em açúcar bruto, pois a solução enzimática contendo α -amilase extraída de açúcar bruto apresenta coloração e essa causa interferência no método.

4.4. Determinação de α -amilase pelo Método de Bernfeld modificado

No estudo do efeito da concentração de amido e da temperatura na determinação quantitativa de α -amilase pelo método de Bernfeld Modificado foram obtidos melhores resultados utilizando-se 3% de amido, temperatura de 50°C e concentração de α -amilase na faixa de 0,02 a 0,14 $\mu\text{L/mL}$.

A mistura de reação composta de 2,0 mL solução 3% de amido solúvel Merck em tampão fosfato 0,1 M pH 6,9; 0,1 mL de solução 0,5 M de CaCl_2 , 0,4 mL tampão fosfato 0,1 M pH 6,9 e 1,0 mL de solução de α -amilase foi incubada a

50°C durante 20 minutos. A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (1945).

As Figuras II - 7 e II - 8 ilustram duas curvas padrões de α -amilases Termamyl determinadas usando-se o método de Bernfeld baseado na hidrólise de amido com α -amilase e quantificação de açúcares redutores.

Para a determinação de α -amilase residual em amostras de açúcar bruto foi preparada uma curva padrão de α -amilase para cada um dos ensaios.

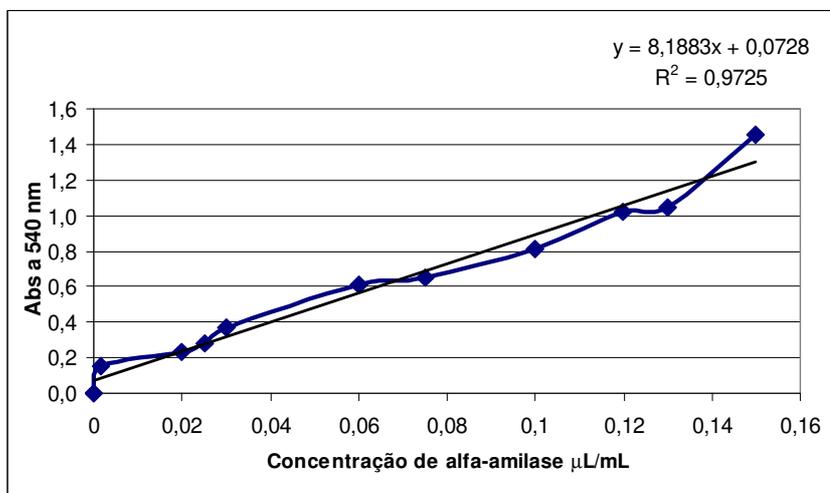


Figura II - 7: Curva padrão de α -amilase - Método de Bernfeld modificado - Determinação de α -amilase em açúcar bruto 1

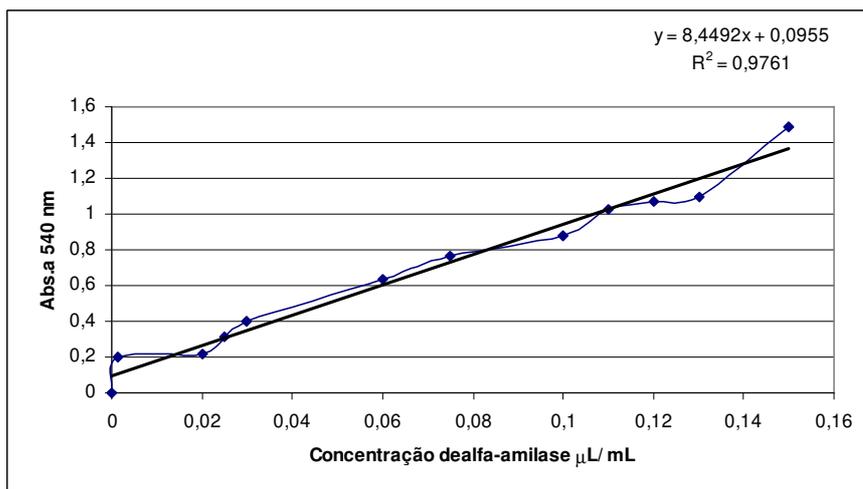


Figura II - 8: Curva padrão de α -amilase - Método de Bernfeld modificado - Determinação de α -amilase em açúcar bruto 2

As amostras de açúcar bruto nº1 e nº2 apresentaram 1 ppm e 2,6 ppm de α -amilase residual, respectivamente.

4.5. Teste de repetibilidade da determinação de α -amilase pelo Método de Bernfeld modificado

O teste de repetibilidade foi realizado utilizando dez amostras de açúcar bruto e foram realizadas 4 repetições por amostra, de forma aleatória. Os resultados foram analisados pelo programa Minitab versão 14.

A ferramenta Gage R& R, significa repetibilidade e reprodutibilidade, é uma ferramenta estatística que mede a quantidade de variação no sistema de medida e dos operadores que trabalham com análises que envolvem medições. Porém nesse trabalho avaliamos somente a repetibilidade do método já que para análise de reprodutibilidade seria necessário mais de um operador.

Os resultados de um estudo R&R são utilizados para avaliar o sistema de medição, para determinar a variação obtida em um processo e de um operador quando mede a mesma amostra diversas vezes, variação de equipamentos, a diferença na média das medidas realizada por operadores diferentes que utilizam o mesmo método para medir a mesma amostra, variação de operador para operador (Minitab do Brasil).

A Tabela II-2 e Figura II-9 ilustram as concentrações de α -amilase residual (ppm) em açúcar bruto e os desvios padrões de cada amostra.

Tabela II - 2: Resultados da análise de Repetibilidade (R&R) da determinação de α -amilase (ppm) em 10 amostras de açúcar bruto pelo Método de Bernfeld modificado

Amostra	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Repetição 4	Média	DP
	ppm de α -amilase					
1	0,90	1,40	1,00	0,60	0,98	0,33
2	0,80	1,20	1,20	0,60	0,95	0,30
3	5,20	5,50	6,40	5,70	5,70	0,51
4	4,00	3,60	3,80	3,50	3,73	0,22
5	0,00	0,50	0,76	0,48	0,44	0,32
6	1,20	1,60	2,60	2,40	1,95	0,66
7	2,30	2,40	3,00	2,60	2,58	0,31
8	0,30	0,44	1,00	1,10	0,71	0,40
9	0,60	0,68	1,30	1,10	0,92	0,34
10	0,10	0,24	0,52	0,48	0,34	0,20

DP= Desvio Padrão

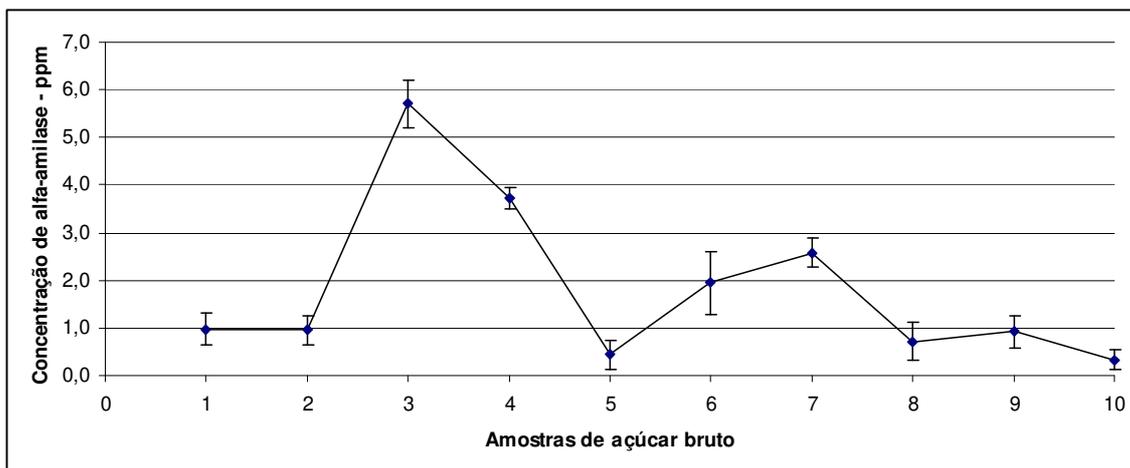


Figura II - 9: Concentração média de α -amilase em 10 amostras de açúcar bruto determinadas pelo Método de Bernfeld modificado.

Tipicamente uma variação (%Study Var) devido ao sistema de medição menor que 30% é aceitável, sendo que menor que 10% seria o ideal. Quando o %Study Var para o sistema de medição é maior do que 30%, o sistema de medição precisa de melhorias e pode não ser capaz de detectar a diferença entre as amostras (Measurement Systems Analysis, 2002).

Tabela II - 3: Análise de repetibilidade do Método Bernfeld modificado para determinação de α -amilase residual em açúcar bruto

Fonte	Desvio Padrão (DP)	(6*DP)	(%DP)
Total Gage R&R	0,38110	2,2866	21,65
Repetibilidade	0,38110	2,2866	21,65
Parte-e-Parte	1,71851	10,3111	97,63
Variação Total	1,76026	10,5616	100,00

A variação do sistema de medição do método de Bernfeld modificado foi de 21,65% estando assim dentro da faixa aceitável, ou seja, o método é capaz de repetir os resultados em uma mesma amostra além de diferenciar as amostras entre si.

5. CONCLUSÕES

A α -amilase bacteriana termoestável Termamyl, obtida de *Bacillus licheniformis* utilizada para remover o amido presente no caldo de cana-de-açúcar resiste ao processamento térmico e desta forma o açúcar bruto contém atividade residual de α -amilase.

O método colorimétrico de determinação de α -amilase baseado na descoloração do complexo de amido com corante de iodo não se mostrou adequado para a quantificação de α -amilase residual em açúcar bruto, o aumento da concentração da enzima não foi proporcional a diminuição da absorbância do complexo amido-iodo. O método de determinação de α -amilase baseado na descoloração do complexo amido – iodo, é pouco sensível sendo necessário cerca de 20 mg/L de α -amilase para causar diminuição de 0,1 na absorbância a 620 nm a 50°C.

O método Phadebas de determinação de α -amilase utilizando-se o substrato amido complexado com o corante Cibachron Blue não se mostrou adequado para a determinação quantitativa de α -amilase, o método é mais adequado para determinação qualitativa de α -amilase em açúcar bruto.

O método utilizando-se o substrato BPNPG7 e a α -glicosidase não se mostrou adequado para a determinação de α -amilase residual em açúcar bruto, pois a solução enzimática contendo α -amilase extraída de açúcar bruto apresenta coloração que causa interferência no método.

O método de Bernfeld baseado na hidrólise de amido com α -amilase e quantificação de açúcares redutores foi capaz de quantificar α -amilase residual nas amostras de açúcar bruto. Na análise R&R para determinação da variação do sistema de medição o método de Bernfeld modificado foi obtido valor 21,65% estando assim dentro da faixa aceitável, ou seja, o método é capaz de repetir os resultados em uma mesma amostra além de diferenciar as amostras entre si.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J.B. - Some notes on starch in the sugar industry, **Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.**, v. 46: p.100-104, 1974.

ANYANGWA, E.M.; KAPSEU, C.E.; MUSONGE, P. - The effect and removal of starch the sugar refining industry, **Institute Sugar Journal**, v. 95, p.210-213, 1993.

ASP, E. H. - Laboratory methods for alpha-amylase analyses, **Cereal Foods World**, v. 35, p.941-946, 1990.

BASSINELO, P.Z.; CORDENUNSI, R.B.; LAJOLO, F.M.- Amylolytic activity in fruits: Comparison of different substrates and methods using banana as model. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.5781-5786, 2002.

BOURNE, E.J.; DAVIES, D.R.; PRIDHAM, J.B. - α -amylase activity in sugar cane (*Saccharum officinarum*) chloroplasts. **Phytochemistry** v.9, p.345-348, 1979.

CESKA, M.; HULTMAN, E.; INGELMAN, B.G. - A new method for determination of α -amilase. **Experientia**, v. 25, p. 555-556, 1969.

CHEN, J.C.P.; CHOU, C.C. - Cane Sugar Handbook, 12 th Ed, John Wiley & Sons, 1993.

CUDDIHY, J. A.; PORRO, M.E.; RAUH, J.S.- The presence of total polyssacharides in sugar production and methods for reducing their negative effects. www.midlandresearchlabsinc.com, 2006.

DA VELA, G.; BERTINO, M.G.; FUSINI, F.; RICCI, U.- Evaluation of an automated system for amylase detection in forensic samples, International Congress Series, v.1288, p 636 – 638, 2006.

EGGLESTON, G., MONTES, B., OGIER, B.E.- Preheating and incubation of cane juice prior to liming: A comparison of intermediate and cold lime clarification, **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 50, p. 484-490, 2002.

EGGLESTON,G.- Factory relative alpha-amylase activity Assay- USDA-ARS- Southern Research Center, New Orleans, LA, (2005).

EGGLESTON, G.; MONTES, B.; MONGE, A.; GUIDRY, D.- Optimization of α -amylase application in U.S. factories (abstract). **Sugar Journal**. v. 70: 31. 2007.

FERNANDES, L.P.; Ulhoa, J.C; Asquieri, E.R. ; Monteiro, V.N. - Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Rev. Eletrônica de Farmácia**. v. 4, nº 1,;p.43-51, 2007.

FERNÁNDEZ, I.; MOYANO, F.J.; DÍAZ, M.; MARTÍNEZ, T.- Characterization of α -amilase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei), **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, vol 262, pag. 1-12, 2001.

GODSHALL, M.A.; LEGENDRE, B.L.; CLARKE, M.A.; MIRANDA X.M. AND BLANCO R.S. - Starch, polysaccharide and proanthocyanidin in Louisiana sugarcane varieties, **International Sugar Journal**, p.144-148, 1998.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. - Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, **Process Biochemistry**, v.38, p.1599-1616, 2003.

KAMPEN, W.H. – The action of alpha-amylase on sugarcane starch, www.midlandresearchlabsinc.com; 15/08/2006.

KRUGER, J.E.; LINEBACK, D.R. – Carbohydrate-degrading enzymes in cereals. In: Enzymes and their role in cereal technology. J.E. Kruger, D. Lineback , C.E. Stauffer, Eds. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, 1987.

MILES LABORATORIES INC. - Technical information- Determination of liquefying amylase (Modified Wolgemuth Method) assay, nº 2-124.

OLIVEIRA,D.T. – Consultor da Coopersucar, Limeira SP, 2006.

MEASUREMENT SYSTEMS ANALYSIS, Reference Manual, 3th edition, 2002.

MINITAB DO BRASIL, <http://www.minitabdobrasil.com.br>, (10 de dezembro de 2008).

ROBYT, J.F.; EKLUND, S.H. - Stereochemistry involved in the mechanism of action of dextransucrase in the synthesis of dextran and the formation of acceptor products. **Bioorg. Chem.** v.11, p.115-132, 1982

SCHOONEES, B.M. - Starch hydrolysis using α -amylase: A laboratory evaluation using response surface methodology. **International Sugar Journal**, v CVIII, nº 1286, p.73-82, 2006.

SHAW, J.F.; LIN, F.P.; CHEN, S. Ch.; CHEN, H.Ch.- Purification and properties of an extracellular α -amilase from *Thermus sp.*, **Bot. Bull.Acad. Sin.**, v. 36, p.195-200, 1995.

SOMOGYI, M.A. – A new reagent for the determination of sugars, **Journal of Biology and Chemistry**, v.160, p.61-68, 1945.

TERASHIMA, M.; KATOH, S. - Modification of alpha-amylase functions by protein engineering. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**,v. 799, p. 65-69, 1996.

TORLEY, P.J.; RUTGERS, R.P.G.; D'ARCY, B.D.; BHANDARI, B.R., Effect of honey types and concentration on starch gelatinization, **Lebensm. – Wiss. U. Technology**, v. 37, p. 161-170, 2004.

VALLEE, B.L.; STEIN, E.A.; SUMMERWILL, W.N.; FISHER E.H. - Metal content of α -amylases of various origins. **Journal Biology Chemistry**, v. 234, p. 2901 -2905, 1959.

WAFFENSHMIDT, S.; JAENICKE, L. - Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-biquinoline. **Anal. Biochem.** v.165, p.337-340, 1987.

WONG, D.W.S.; BATT, S.B.; ROBERTSON, G.H.- Microassay for rapid screening of α -amylase activity, **Journal Agricultural Chemistry**, v. 48, p.4540-4543, 2000.

YAMAGUCHI, M.; KANEMORI, T.; KANEMARU, M.; TAKAI, N.; HIGASHI, T.; MIZUNO, Y.; YOSHIDA, H. – Performance evaluation of salivary activity monitor. **Biosensors and Bioelectronics** v.20, p.491-497, 2004.

YAMAGUCHI, M.; DEGUCHI, M.; WAKASUGI, J.; ONO, S.; TAKAI, N.; HIGASHI, T.; MIZUNO, Y. – Hand –held monitor of sympathetic nervous system using salivary amylase activity and its validation by driver fatigue assessment. **Biosensors and Bioelectronics** v.21, p.1007-1014, 2006.

ZAJONCOVÁ, L.; JÍLEK, M.; BERANOVÁ, V.; PEC, P. – A biosensor for the determination of amylase activity, **Biosensors Bioelectronics**, v.20, p.240-245, 2004.

ANEXO 1

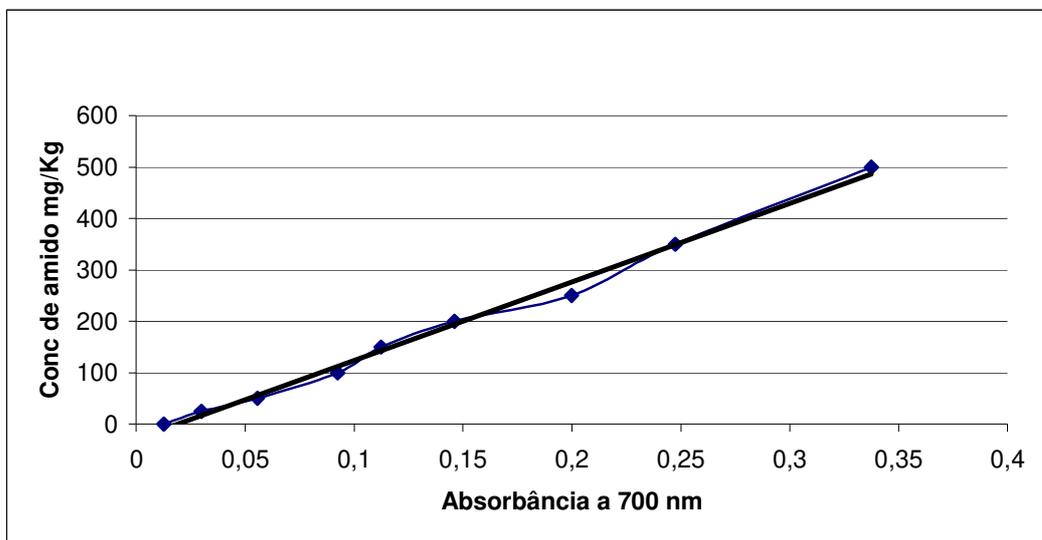


Figura: Curva padrão para determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar utilizando amido de batata como padrão.

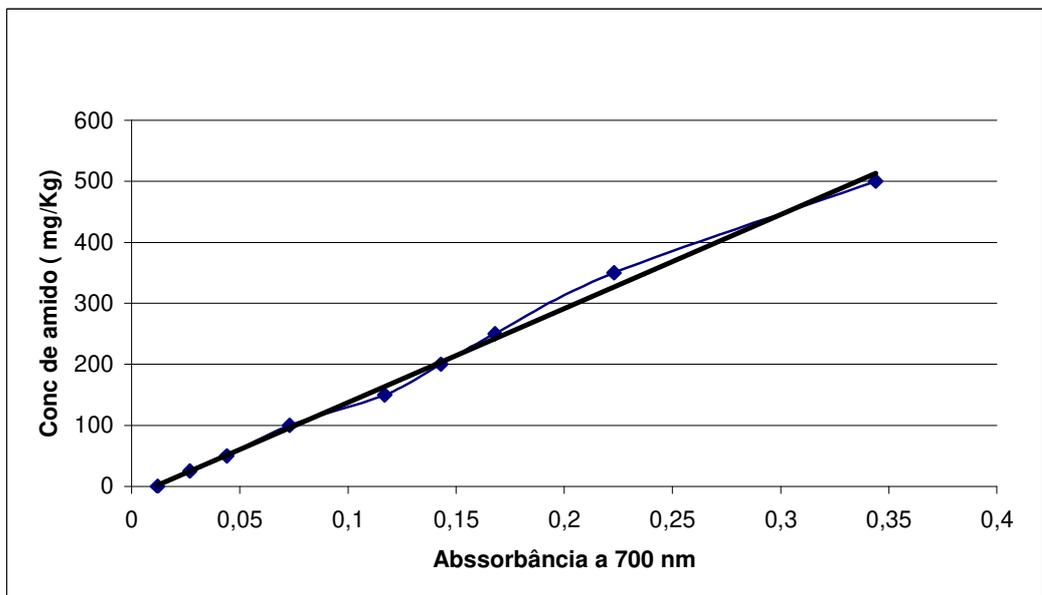


Figura: Curva padrão para determinação de amido em caldo de cana-de-açúcar utilizando amido de cana-de-açúcar como padrão