

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

MARCELO SIQUEIRA ALVES

**QUANTIFICAÇÃO DE AMIDO EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ VIA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA, COM DETERMINAÇÃO DA GLICOSE POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO
(HPLC-RI)**

Porto Alegre
2016

MARCELO SIQUEIRA ALVES

**QUANTIFICAÇÃO DE AMIDO EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ VIA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA, COM DETERMINAÇÃO DA GLICOSE POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO
(HPLC-RI)**

Trabalho de Conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de conclusão de curso – QUI” do curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof(a). Dr(a). Tânia Mara Pizzolato
Orientadora

Prof(o). Dr(o) Marco Flôres Ferrão
Co-orientador

Porto Alegre
2016

Dedico este trabalho a todos que estiveram
comigo nesta longa e incrível jornada, e
que de uma forma ou outra me ajudaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me oferecer esta maravilhosa oportunidade, que é viver. À minha família, que esteve sempre presente me apoiando, e incentivando a ir atrás dos meus objetivos. À minha mãe, que me ensinou que as dificuldades só são se tratá-las como tal. Por me ensinar e mostrar importantes valores que o ser humano deve cultivar, como o Respeito ao próximo, indiferente à posição social. Por ser minha mãe, e meu pai, e me ensinar que não devo esmorecer a cada derrota, e sim levantar mais forte, e confiante, porque tempos melhores sempre virão. Por ter a incrível oportunidade de viver com uma mulher maravilhosa.

A minhas irmãs, pelas palavras de apoio e pelo companheirismo durante estes anos.

Aos meus sobrinhos, por mostrarem em seus olhares esperança, por uma sociedade mais igualitária, consciente, formadora de opinião, livre de preconceitos, e acima de tudo, que respeite o próximo.

À minha tia, por ser minha segunda mãe, e me apoiar em todos os meus objetivos, e sonhos.

Ao meu companheiro, Augustín, pelo amor, amizade, companheirismo, e por todos os momentos maravilhosos divididos durante esta jornada.

Aos velhos, e novos amigos, aos que já foram, e aos que permaneceram, por ter a oportunidade de aprender com eles, e por me ajudarem a superar os obstáculos.

Um agradecimento em especial aos meus orientadores. À Prof(a). Dr(a). Tânia Mara Pizzolato, pela confiança, atenção e apoio. Ao Prof(o). Dr(o) Marco Flôres Ferrão, pelos ensinamentos e atenção no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Souza Cruz, e aos meus colegas, pela oportunidade de me desenvolver profissionalmente ao longo destes anos.

Gênio é 1% de inspiração e 99% de transpiração.

Thomas Edison

RESUMO

O amido é um polissacarídeo, mais especificamente um homopolissacarídeo, formado por unidades de glicose (monossacarídeo). É sintetizado e armazenado nos cloroplastos ou nos amiloplastos das células vegetais, que estão presentes em sementes, raízes, caules e folhas. Sua função é de armazenamento de glicose, a qual fornece energia para os organismos. Dentre os materiais vegetais que possuem amido como reserva energética temos o arroz. Está entre os cereais mais consumidos no mundo e destaca-se pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. Existem vários métodos destinados à quantificação de amido, descritos na literatura. Dentre os métodos podemos citar o químico e o enzimático. O método químico é baseado na solubilização do polissacarídeo por ácido perclórico ou ácido sulfúrico, e subsequente quantificação por antrona, ou por fenol seguido de ácido sulfúrico. É um método excelente para espécies que possuem como reserva principal o amido, mas não é adequado para tecidos que contêm outros polissacarídeos além do amido, como por exemplo, a celulose, o que introduz grandes variações nos resultados finais. O presente trabalho baseia-se na quantificação do amido através do método enzimático, o qual é um processo específico, e que pode ser utilizado para determinar o percentual do analito em presença de outros polissacarídeos, em diferentes variedades de arroz disponíveis no mercado porto-alegrense. As principais etapas na determinação do amido consistem na gelatinização dos grânulos do polissacarídeo, solubilização e hidrólise dos mesmos. A metodologia proposta baseia-se na utilização de duas enzimas amilolíticas. A primeira enzima utilizada foi a α -amilase, e a segunda a amiloglucosidase, ambas em soluções tamponadas. Cada hidrólise ocorre de forma separada, respeitando as temperaturas e pH ótimos de cada enzima. Após o processo de hidrólise, a amostra foi filtrada e submetida ao processo de extração em fase sólida (SPE). A glicose gerada no meio foi separada através de cromatografia líquida, e detectada com auxílio do detector de índice de refração (HPLC-RI). Os resultados em percentual obtidos para as amostras mostraram-se coerentes de acordo com as características e origens inerentes de cada variedade de arroz estudada. O procedimento de hidrólise foi otimizado utilizando a metodologia de análise de superfície. As variáveis quantitativas estudadas foram: tempo, e concentrações enzimáticas. O procedimento mostrou-se eficiente, e obtiveram-se menores tempo de hidrólise, e concentrações enzimáticas no meio.

Palavras-chave: Amido. Hidrólise. Carboidrato. α -amilase. Amiloglucosidase. Análise por cromatografia líquida com detector de índice de refração.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do grão de arroz	14
Figura 2 – Esquema geral de um cromatógrafo líquido.....	24
Figura 3 – Princípio de detecção de um detector de índice de refração	25
Figura 4 – Caminho ótico de um detector de índice de refração	25
Figura 5 – Fluxograma representando as etapas da determinação de amido em arroz via hidrólise enzimática	32
Figura 6 – Gráfico de probabilidade normal obtido para o Experimento 1	35
Figura 7 – Superfície de resposta obtida para o Experimento 1 – Variáveis: tempo de hidrólise e concentração de α -amilase	35
Figura 8 – Superfície de resposta obtida para o Experimento 1 – Variáveis: concentração de amiloglicosidase e concentração de α -amilase.....	36
Figura 9 – Gráfico de probabilidade normal obtido para o Experimento 2	38
Figura 10 – Superfície de resposta obtida para o Experimento 2 – Variáveis: tempo de hidrólise e concentração de amiloglicosidase	38
Figura 11 – Gráfico de probabilidade normal obtido para o Experimento 3	40
Figura 12 – Superfície de resposta obtida para o Experimento 3 – Variáveis: tempo de hidrólise e concentração de amiloglicosidase	40
Figura 13 – Cromatograma obtido para a amostra de arroz Arbório	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de amido total, proteínas, lipídios, cinzas e fibra total do arroz branco polido, parboilizado polido e integral, em base seca	15
Tabela 2 – Soluções de calibração de D-(+)-glicose	29
Tabela 3 – Experimento 1 – Planejamento Composto Central – Modelo Quadrático – Três Variáveis.....	33
Tabela 4 – Resultados obtidos para o Experimento 1	34
Tabela 5 – Experimento 2 – Planejamento Composto Central – Modelo Quadrático – Duas Variáveis	36
Tabela 6 – Resultados obtidos para o Experimento 2.....	37
Tabela 7 – Experimento 3 – Planejamento Composto Central – Modelo Quadrático – Duas Variáveis	39
Tabela 8 – Resultados obtidos para o Experimento 3.....	39
Tabela 9 – Comparativo entre o procedimento A e o B.....	41
Tabela 10 – Dados da curva de calibração de D-(+)-glicose.....	42
Tabela 11 – Resultados obtidos para cada amostra estudada.....	44

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

MOPS – Ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico, do inglês 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês Solid Phase Extraction

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

USDA & FAS – United States Department of Agriculture & Foreign Agricultural Service

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Arroz.....	13
2.1.1 <i>Morfologia e composição do grão</i>	14
2.1.2 <i>Formas de consumo</i>	16
2.2 Métodos de quantificação do amido	17
3 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE	20
3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração	20
4 OBJETIVO	26
4.1 Objetivo geral	26
4.2 Objetivos específicos	26
5 METODOLOGIA	27
5.1 Soluções utilizadas.....	27
5.2 Curva de calibração	29
5.2.1 <i>Solução estoque de D-(+)-Glicose 2,5000 mg/mL</i>	29
5.2.2 <i>Curva de calibração</i>	29
5.3 Hidrólise Enzimática.....	30
5.4 Extração em fase sólida	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
6.1 Metodologia de superfície de respostas: Planejamento Composto Central (CCD)	33
6.2 Quantificação do percentual de amido nas diferentes variedades de arroz	41
7 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DE CARBOIDRATOS E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	49
APÊNDICE B – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMIDO EM ARROZ VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	57
APÊNDICE C – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE D-(+)-GLICOSE	58
APÊNDICE D – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES DE CALIBRAÇÃO DE D-(+)-GLICOSE	59

APÊNDICE E – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DOS PONTOS 2 E 3 DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE D-(+)-GLICOSE, E A AMOSTRA DE ARROZ BRANCO.....	60
APÊNDICE F – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE ARROZ ANALISADAS	61

1 INTRODUÇÃO

As plantas sintetizam o amido como resultado da fotossíntese, processo no qual a energia proveniente do sol é convertida em energia química. O amido é sintetizado nos plastídeos encontrados nas folhas, como um composto de reserva para respiração durante os períodos noturnos. É também sintetizado nos amiloplastos encontrados nas sementes e nas raízes. Nestas organelas, grandes quantidades de amido são acumuladas como grânulos insolúveis em água. O amido é um polissacarídeo, formado por dois tipos de polímeros de glicose: a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero de cadeia linear, formado por até 6000 unidades de glicose, conectadas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. A amilopectina é altamente ramificada e consiste de cadeias curtas α -1,4, de 10 a 60 unidades de glicose, e cadeias α -1,6, de 15 a 45 unidades de glicose. A molécula de amilopectina contém em média cerca de 2.000.000 unidades de glicose, sendo uma das maiores biomoléculas encontradas na natureza. Dependendo da origem, e do material vegetal, o amido possui diferentes proporções de amilose e de amilopectina.

Culturas de subsistência que contêm amido formam um constituinte importante na dieta humana, e uma larga proporção de alimentos consumidos pela população mundial é proveniente destas culturas. Além da utilização destas culturas diretamente na alimentação, o amido é processado quimicamente ou enzimaticamente em uma variedade de produtos, como xaropes de glicose, frutose, derivados de amidos ou maltodextrina, ou ciclodextrinas. O arroz está entre os materiais vegetais mais consumidos no mundo. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas no mundo. O Brasil é o nono maior produtor mundial, e sua produção está distribuída nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso. O arroz é capaz de suprir 20% da energia e 15% de proteína da necessidade diária de um adulto, além de conter vitaminas, sais minerais, fósforo, cálcio e ferro, segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2016). No Brasil, o consumo anual é de, em média, 25 quilos por habitante. O Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz irrigado. Já a área plantada com arroz de sequeiro, em terras altas, fica concentrada na região Centro-Oeste (Mato Grosso e Goiás); Nordeste (Piauí e Maranhão) e Norte (Pará e Rondônia). As pesquisas atuais priorizam ações para consolidar a presença da cultura em sistemas de produção de grãos nas regiões no Cerrado e, especialmente, com adaptação ao

sistema de plantio direto. Entre 1975 e 2005, o Brasil reduziu a área de plantio em torno de 26% e, mesmo assim, aumentou sua produção de arroz em 69%, graças ao aumento de 128% na produtividade média. O crescimento da produção permitiu ao país tornar-se autossuficiente em arroz na safra 2003/2004. Em 2005, o Brasil chegou a exportar 272 mil toneladas de arroz. Hoje, apenas 5% da produção nacional é destinada à exportação.

Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia analítica para determinar o percentual de amido presente em amostras de diferentes variedades de arroz, obtidas no mercado porto-alegrense, através da hidrólise enzimática do polissacarídeo em unidades de glicose, e posterior separação e detecção do analito por cromatografia líquida com detector de índice de refração. A escolha da hidrólise enzimática baseou-se no desenvolvimento de uma metodologia mais seletiva, sendo possível determinar o percentual de amido na presença de outros polissacarídeos, como a celulose. Amplamente utilizada, a metodologia de hidrólise química possui um revés no que tange a alteração dos resultados obtidos em materiais vegetais, que possuem polissacarídeos de parede celular (celulose).

Utilizou-se a metodologia de superfícies de resposta como ferramenta, com o objetivo de otimizar a etapa de hidrólise enzimática, que compreenderam os fatores: tempo de hidrólise e concentrações das enzimas amilolíticas utilizadas (α -amilase e amiloglucosidase).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arroz

A diversidade da alimentação e as escolhas alimentares do homem são únicas entre os primatas. A alimentação dos homínídeos constituía-se essencialmente de frutos e raízes coletadas, complementados com um pequeno porte proteico proveniente da caça. Apenas no início do período neolítico, com o surgimento da agricultura no Oriente Próximo, no Oriente Médio, e depois na Europa, iniciou-se a cultura de cereais, principalmente o trigo e o centeio (FLANDRIN; MONTANARI, 1998).

Quanto ao arroz, não se tem certeza se é originário da Índia ou da China. Mas sabe-se que por volta de 2.800 a.C. era a planta sagrada do imperador da China (FLANDRIN; MONTANARI, 1998).

Este cereal foi introduzido no Brasil pela frota de Pedro Álvares Cabral, porém seu cultivo em território nacional só foi relatado após 1530, na capitania de São Vicente. Espalhou-se mais tarde por outras regiões do litoral, sempre em pequenas lavouras de subsistência, principalmente na região Nordeste (PEREIRA, 2002).

Foi em 1904, no município de Pelotas, no estado do Rio Grande do Sul, que surgiu a primeira lavoura empresarial, já então irrigada. Depois, a cultura chegou a Cachoeira do Sul, no mesmo estado, e, a partir de 1912, teve grande impulso, graças aos locomóveis. Segundo Pereira (2002), estes veículos, movidos a vapor, acionavam bombas de irrigação, o que facilitava a inundação das lavouras de arroz.

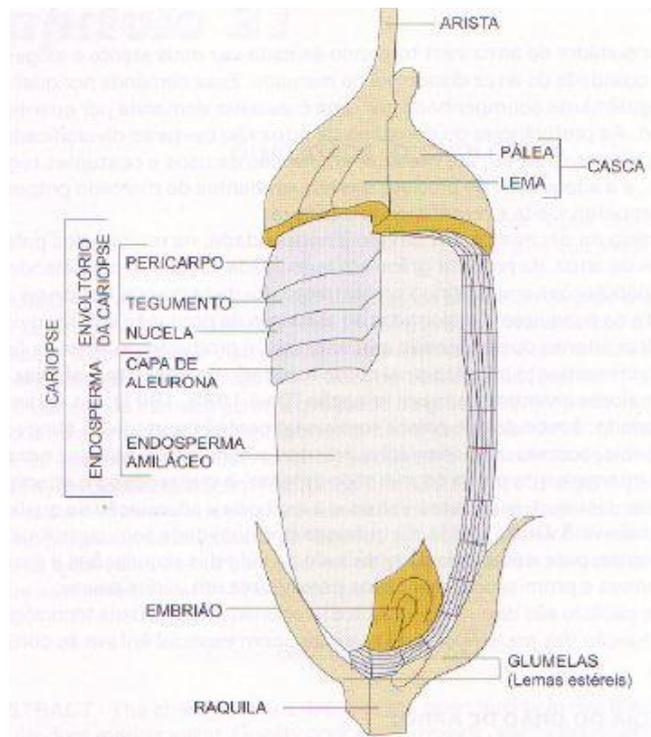
O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como o principal alimento de mais da metade da população mundial. Somente na Ásia, de 60 a 70% do consumo calórico de mais de dois bilhões de pessoas é proveniente do arroz e seus subprodutos, de acordo com a FAO (2004). A produção mundial estimada do grão é mais de 475 milhões de toneladas, sendo 8,3 milhões de toneladas produzidas no Brasil (USDA; FAS, 2016).

A fundamentação teórica acerca de carboidratos, bem como hidrólise enzimática, que auxilia na compreensão de características, e termos utilizados, encontra-se no Apêndice A.

2.1.1 Morfologia e composição do grão

O arroz é uma planta da família das gramíneas, do gênero *Oryza*, que possui em torno de vinte espécies, sendo a mais cultivada a *Oryza sativa* (JULIANO, 1993). O grão é formado pelo tegumento, que envolve a semente e se encontra diretamente ligado ao pericarpo, membrana que envolve o fruto. O pericarpo é envolvido pelas glumelas, pela lema e pela pálea, que constituem a casca e são removidas durante o beneficiamento de acordo (VIEIRA, 1999). Na Figura 1 é mostrado um esquema ilustrativo do grão de arroz.

Figura 1 – Estrutura do grão de arroz



Fonte: VIEIRA, 1999.

Segundo a Instrução Normativa número 6/2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2009), arroz em casca natural é o produto que, antes do beneficiamento, não passa por qualquer preparo industrial ou processo tecnológico. O arroz beneficiado é o produto maduro que foi submetido a algum processo de beneficiamento e se encontra desprovido, no mínimo, da sua casca. Já o arroz descascado ou arroz integral (esbromado), composto pelo endosperma e

pelo farelo (camada encontrada entre a casca e o endosperma), é o produto do qual somente a casca foi retirada durante o beneficiamento.

A presença do farelo atribui ao arroz integral maior conteúdo de fibras, lipídios, vitaminas e minerais, e valor nutritivo superior ao branco polido.

O arroz polido, forma mais tradicionalmente consumida, é o produto do qual, ao ser beneficiado, são retirados o germe (embrião), o pericarpo e a maior parte da camada interna (aleurona). O polimento do grão resulta em redução no teor de nutrientes, exceto o amido, o que ocasiona diferenças na composição entre o arroz polido e o integral (AVILA et al., 2008).

O arroz parboilizado é o produto que foi submetido à parboilização, que consiste em um processo hidrotérmico, anterior às etapas de descasque e polimento, no qual o arroz em casca é imerso em água, a uma temperatura acima de 58°C, seguido de gelatinização parcial ou total do amido e secagem. Neste processo, algumas substâncias hidrossolúveis, como vitaminas e minerais, são transportadas para o centro do grão, aumentando o valor nutritivo deste arroz em relação ao polido. Segundo Ferreira (1999), o arroz parboilizado é disponível na forma de parboilizado polido e parboilizado integral.

Na Tabela 1 constam os teores de amido, proteínas, lipídios, cinzas e fibra total do arroz branco polido, parboilizado polido e integral, em base seca.

Tabela 1 – Percentual de amido total, proteínas, lipídios, cinzas e fibra total do arroz branco polido, parboilizado polido e integral, em base seca

Constituinte	Arroz branco polido	Arroz parboilizado polido	Arroz integral
Amido total	87,58	85,08	74,12
Proteínas	8,94	9,44	10,46
Lipídios	0,36	0,69	2,52
Cinzas	0,30	0,67	1,15
Fibra Total	2,87	4,15	11,76

Fonte: STORK, 2004.

O arroz é constituído principalmente por carboidratos e possui proteínas, lipídios, vitaminas e minerais. Segundo Zhou et al. (2002) a proporção dos nutrientes no grão é influenciada pela variação genotípica, condições do clima, fertilizantes, qualidade do solo, processamento/beneficiamento, armazenamento e cozimento.

O conteúdo de minerais no arroz é significativamente influenciado pelas condições de cultivo, incluindo fertilização e condições do solo, e pelo processamento, estando presente em maior concentração nas camadas externas do grão (NAVES, 2007).

2.1.2 Formas de consumo

No Brasil, o arroz é consumido especialmente na forma de grãos inteiros, sendo conhecidos, em função da forma de processamento pós-colheita, como arroz branco, arroz integral e arroz parboilizado (VIEIRA, 2006).

Quase 95% dos brasileiros consomem arroz e mais da metade o fazem no mínimo uma vez por dia. Segundo Barata (2005) a preferência nacional de consumo é pelo arroz da classe longo fino, comercialmente conhecido como arroz-agulhinha, que é translúcido e apresenta a característica de ser mais solto, macio e firme após o cozimento. O maior consumo, pouco mais de 70% do total, ainda é de arroz branco polido. Em segundo lugar aparece o arroz parboilizado, cujo consumo quintuplicou nas duas últimas décadas, e se aproxima de 25%, ficando o arroz integral com 3 a 4% do que é consumido no Brasil (ELIAS et al., 2012).

Existem, ainda, variedades de arroz pigmentado, com camadas de farelo ricas em antocianinas, sendo as cores mais comuns a vermelha e a roxa, quase negra. Também conhecido no Brasil como arroz-da-terra, o arroz vermelho tem o seu cultivo atualmente restrito a pequenas áreas do semi-árido nordestino, sendo cultivado predominantemente por agricultores de base familiar, e se sobressaindo em relação ao arroz polido em conteúdos de ferro e zinco (PEREIRA et al., 2009).

Quanto maior o conteúdo de amilose numa determinada variedade, mais organizados e estáveis serão os grânulos de amido e, portanto, maiores serão a quantidade de água, a temperatura e o tempo necessários para cozinhar os grãos (MCGEE, 2014). Segundo Dors et al. (2006) o arroz com alta proporção de amilopectina em relação à amilose, depois de cozido, fica mais pastoso e colante, sendo indicado para preparações culinárias como o risoto italiano, à base de arroz arbóreo.

A depender da variedade do arroz, também é possível consumi-lo na forma de paellas espanholas, que são preparadas com arroz arbóreo ou parboilizado, e sushi, feito a partir do arroz cateto (MCGEE, 2014). No Brasil, sua utilização mais

comum é na forma de arroz com feijão, uma tradição no país, independentemente do estrato social (FISBERG et al., 2002).

2.2 Métodos de quantificação do amido

As principais etapas compreendidas nos diferentes métodos são: a gelatinização, a solubilização e a hidrólise do amido.

O processo de gelatinização visa à hidratação dos grânulos, o qual consiste em aquecer o tecido contendo amido em água ou etanol fervente, o que facilita o acesso dos reagentes de solubilização e hidrólise do polímero (MANNERS, 1985).

A solubilização ocorre pela quebra do polímero em fragmentos menores de amilose e amilopectina, através da utilização de ácido perclórico ou de uma solução de hidróxido de sódio diluída (MCCREADY, 1970).

Por fim, é através da quebra dos polímeros de amilose e amilopectina em unidades individuais de glicose, usando o processo de hidrólise por ácidos fortes ou digestão enzimática. A detecção da glicose, normalmente, é feita por métodos colorimétricos.

Dentre os métodos químicos de dosagem de amido disponíveis na literatura científica, o de McCready et al (1950) é um dos mais conhecidos. Este método é baseado na solubilização do amido por ácido perclórico, ou ácido sulfúrico. “Apesar de ser relativamente laborioso, esse método foi amplamente utilizado no Brasil até a década de 70 devido a sua precisão”, como cita Buckeridge et al. (2007, p. 426). É um método excelente para espécies que possuem como reserva principal o amido, como é o caso da batata, arroz, e grãos em geral, mas não é adequado para tecidos que apresentam outros polissacarídeos além do amido. E este fato é verificado, pois os ácidos podem extrair e hidrolisar outros polissacarídeos de parede celular, como a celulose, as pectinas e até polissacarídeos menos solúveis. “Este aspecto da metodologia introduz grandes variações nos resultados finais, superestimando a quantidade de amido nos tecidos e tornando os resultados menos exatos”, segundo Buckeridge et al. (2007, p. 426).

Outros métodos químicos têm sido utilizados em substituição ao método de McCready, mas apenas para a extração do material vegetal, sendo que os procedimentos recentes de quantificação de amido envolvem sua hidrólise e quantificação de amido envolvem sua hidrólise e dosagem através do uso de

enzimas específicas. Existem dois reagentes amplamente utilizados para extração de amido, o hidróxido de sódio, como citado por Áreas et al. (1980), e o dimetilsulfóxido, segundo Carpita et al. (1987). O hidróxido de sódio é comumente utilizado na solubilização e separação de polissacarídeos de parede celular. Soluções diluídas de hidróxido de sódio extraem pectinas metil-esterificadas e hemiceluloses, de acordo com Gorshkova et al. (1996), o que leva a superestimar o conteúdo de amido. O uso de dimetilsulfóxido também apresenta limitações, pois pode extrair hemiceluloses da parede celular, especialmente arabinoxilanos, como verificado para folhas de milho, e para suspensões celulares de tabaco (CARPITA et al., 1987).

Segundo Buckeridge et al.:

Com os métodos enzimáticos, apesar da precisão de ataque das enzimas de hidrólise de amido, o uso de enzimas como amiloglicosidase ou glucoamilase, deve ser feito com cuidado, pois frequentemente os extratos comerciais apresentam contaminação por celulasas e outras glucosidases, que liberam monossacarídeos de polímero da parede celular (BUCKERIDGE et al., 2007, p. 427).

Cada metodologia tem um tipo de limitação, alterando precisão e exatidão dos resultados em diferentes níveis. A metodologia proposta por Buckeridge et al. (2007, p. 427), envolve “extrações consecutivas com etanol 80%, a 80°C, por 20 minutos, a fim de remover açúcares, pigmentos, fenóis e outras substâncias solúveis, que possam interferir na quantificação do amido”. Após as extrações, o material é seco, durante uma noite, até a completa evaporação do etanol. É realizada a hidrólise do polissacarídeo através de duas enzimas, a α -amilase e a amiloglicosidase, diluídas em suas respectivas soluções tampão. Após a hidrólise enzimática, a glicose do meio é quantificada através de método colorimétrico.

O presente trabalho propõe a utilização das enzimas amilolíticas α -amilase e amiloglicosidase, em suas respectivas soluções tampão, sem a necessidade de lavagem da amostra, filtração do material para material volumétrico, *clean-up* do extrato utilizando extração em fase sólida, e separação e quantificação da glicose proveniente da hidrólise do amido, por cromatografia líquida, com detector de índice de refração.

2.3 Metodologia de superfície de resposta: planejamento composto central

Com o objetivo de otimizar a etapa de hidrólise da metodologia, utilizou-se uma Metodologia de Superfície de Resposta, o Planejamento Composto Central, no qual seleciona-se fatores significativos, e aplica-se uma metodologia de análise de superfícies de respostas, “com o objetivo de encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, ou seja, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores” (TEÓFILO et al., 2006, p. 343).

Ainda, de acordo com Teófilo et al.:

A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos, que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização (TEÓFILO, 2006, p. 343).

Um planejamento experimental construído para estimar coeficientes, segundo algum modelo aproximado, deve reunir certos critérios desejáveis, sendo os principais: “proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos e, fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste” (TEÓFILO et al., 2006, p. 343).

Dentre as classes de planejamento mais utilizadas para ajustar modelos quadráticos descritas na literatura, e que apresentam todos os critérios descritos anteriormente, temos o Planejamento Composto Central (CCD – *Central Composite Design*) e Doehlert. Neste trabalho utilizou-se o Planejamento Composto Central, o qual é utilizado na construção de um modelo de segunda ordem para a variável resposta, sem a necessidade de usar um modelo com três níveis completos, o qual necessita de muitos experimentos para um pequeno número de fatores, mesmo para planejamentos fracionários, como cita Teófilo et al. (2006, p. 344). “É uma composição entre o planejamento fatorial 2^k (com um ou mais pontos centrais) e uma parte axial”.

Os fatores significativos selecionados da metodologia estudada, referente à etapa de hidrólise enzimática, foram: tempo de hidrólise, concentração de α -amilase e de amiloglicosidase no meio. Selecionaram-se estas etapas, pois envolvem fatores como a redução de tempo de aplicação da metodologia, e a economia com as enzimas amilolíticas utilizadas, visto que tais reagentes apresentam valores expressivos no mercado.

Para a análise dos dados obtidos, bem como a construção das superfícies de resposta, foi utilizada uma “planilha eletrônica, com todos os cálculos inerentes à aplicação do planejamento composto central”, desenvolvida por Teófilo et al. (2006, p. 338) e disponível no web site do Laboratório de Quimiometria Teórica e Aplicada do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE

O método de quantificação de amido mais descrito na literatura é o método espectrofotométrico de absorção, através de uma metodologia de oxidação da glicose.

Os métodos colorimétricos, de modo geral, possuem limitações relacionadas com diversos interferentes, reprodução de resultados e com a estabilidade de reagentes cromóforos.

A quantificação da glicose também pode ser feita através de técnicas instrumentais mais sofisticadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência, com auxílio de detector de índice de refração (RID), ou detector evaporativo por espalhamento de luz (ELSD).

3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração

A cromatografia líquida é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação. As razões para essa popularidade são a sua detectabilidade, a sua pronta adaptabilidade às determinações quantitativas com exatidão, a sua adequação para a separação de compostos não-voláteis ou termicamente instáveis e, acima de tudo, a sua ampla aplicação a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público. Exemplos desses materiais incluem aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, carboidratos, drogas, terpenoides, agrotóxicos, antibióticos, esteroides, espécies organometálicas e uma variedade de substâncias inorgânicas.

Vários termos têm sido utilizados para denominar esta técnica: alta velocidade, alta pressão, alto desempenho, alta resolução e alta eficiência. O nome mais empregado em português é “cromatografia líquida de alta eficiência” (CLAE).

Somente a partir da década de 1970, houve um avanço considerável da cromatografia líquida moderna, que até então era subdesenvolvida e baseava-se nos experimentos sobre cromatografia em coluna, hoje chamada “cromatografia líquida clássica”, iniciada nos primeiros anos do século XX.

Há sete diferentes mecanismos que governam as separações em cromatografia líquida de alta eficiência. Mediante a troca da fase estacionária e da fase móvel, é possível utilizar cada um deles com o mesmo equipamento. São elas:

- 1) Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção: baseia-se na competição entre moléculas da amostra e as da fase móvel, para ocupar os sítios ativos na superfície da fase estacionária;
- 2) Cromatografia líquido-líquido ou por partição: baseia-se nas diferentes solubilidades que apresentam os componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária;
- 3) Cromatografia líquida com fase ligada: baseia-se na partição, levando alguns autores a considerá-la uma cromatografia líquido-líquido. Por outro lado, como essa fase estacionária também apresenta influência de grupos ativos (polares) da própria fase estacionária, ou da superfície do suporte, também ocorre o mecanismo de adsorção;
- 4) Cromatografia líquida quiral: baseia-se na formação prévia de diastereoisômeros com reagentes quirais opticamente puros, os quais, por apresentarem propriedades físico-químicas diferentes, podem ser separados empregando-se fases estacionárias não-quirais;
- 5) Cromatografia por troca iônica: a fase estacionária é um tipo de fase ligada com grupos iônicos, no fim de uma cadeia alifática curta;
- 6) Cromatografia por bioafinidade: as separações ocorrem devido às interações bioquímicas altamente específicas. A fase estacionária contém grupos específicos de moléculas que podem adsorver o analito se somente certas condições estéreas e relacionadas à carga forem satisfeitas;
- 7) Cromatografia por exclusão: não se baseia em interações das moléculas da amostra com a fase estacionária, e sim no tamanho das moléculas da amostra.

Um aparelho de cromatografia líquida é equipado com um ou mais reservatórios de vidro, cada um deles contendo um ou mais solventes, os quais são

submetidos a processos de desgaseificação, e filtração, a fim de remover gases dissolvidos e partículas presentes nos líquidos, respectivamente. Os gases dissolvidos podem formar bolhas na coluna, conduzindo à irreprodutibilidade das vazões e ao alargamento da banda, além de interferirem no desempenho da maioria dos detectores.

Em cromatografia líquida de alta eficiência a fase móvel desempenha um papel muito importante, pois sua composição é fundamental no processo de separação. As principais características que a fase móvel deve possuir são: ser de alto grau de pureza; dissolver a amostra sem decompor seus componentes; não decompor ou dissolver a fase estacionária; ter baixa viscosidade e ponto de ebulição; ser compatível com o tipo de detector utilizado; e em misturas, ter miscibilidade completa.

Uma eluição com um único solvente ou com uma mistura de solventes de composição constante é chamada de eluição isocrática. Na eluição por gradiente, dois ou mais, sistemas de solventes os quais diferem significativamente em polaridade são empregados e variam em composição durante a separação. A razão entre os dois solventes varia em uma forma pré-programada, algumas vezes continuamente, e outras vezes em uma série de etapas.

Os requisitos para as bombas de cromatografia líquida incluem a geração de pressões de até 414 bar, fluxo livre de pulso, vazões na faixa de 0,1 a 10 mL/min, reprodutibilidade relativa da vazão de 0,5% ou melhor, e resistência à corrosão a uma grande variedade de solventes.

O método mais empregado de introdução da amostra em cromatografia líquida está baseado em um sistema com alça de amostragem (*loop*), o qual é parte integrada dos equipamentos e têm alças intercambiáveis disponíveis para permitir a escolha do volume de amostra de 1 μ L a 100 μ L ou mais. A maior parte dos cromatógrafos possuem injetores automáticos, ao quais são capazes de injetar as amostras dentro do sistema a partir de recipientes em um carrossel de amostras.

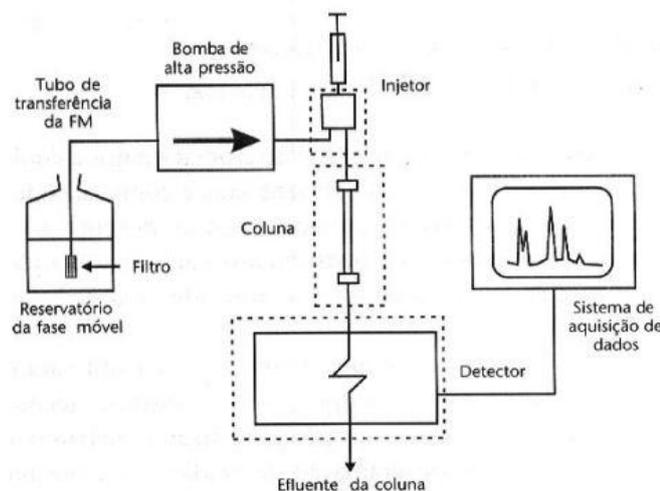
As colunas para cromatografia líquida são, geralmente, construídas a partir de tubos de aço inoxidável. Algumas vezes, as colunas são feitas a partir de tubos de vidro de paredes grossas e de tubos poliméricos, como polieteretercetona. São disponíveis comercialmente centenas de colunas recheadas diferindo no tamanho e no recheio. A maioria das colunas para cromatografia líquida apresenta comprimento na faixa de 5 a 25 cm, com diâmetros interno de 3 a 5 mm, e os tamanhos das

partículas de recheio mais empregados são de 3 a 5 μm . Com frequência, uma coluna de guarda curta é introduzida antes da coluna analítica para aumentar o tempo de vida útil da coluna, devido à remoção não somente do material particulado e dos contaminantes dos solventes, mas também dos componentes da amostra que podem se ligar irreversivelmente à fase estacionária. No presente trabalho utilizou-se uma coluna analítica feita de resina sulfonada (troca catiônica), com próton como contra-íon, de base polimérica de estireno-divinilbenzeno reticulado. Esta coluna é específica para separação de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos.

Os instrumentos comerciais mais modernos encontram-se equipados com fornos que controlam a temperatura da coluna com tolerância de poucos décimos de graus da temperatura próxima à da ambiente até 150°C. Frequentemente obtém-se cromatogramas melhores e mais reprodutíveis mantendo-se a coluna à temperatura constante.

Os detectores de cromatografia líquida têm sido instrumentos analíticos adaptados com células de fluxo para medir baixas concentrações de solutos no fluxo líquido. Os detectores são de dois tipos: detectores de propriedades universais, que respondem às propriedades da fase móvel como um todo, como índice de refração, constante dielétrica ou densidade, a qual é medida pela presença dos solutos; os detectores de propriedade do soluto respondem a algumas propriedades do soluto, como absorvância no UV, fluorescência ou corrente de difusão, que não incluem a fase móvel. Os detectores mais amplamente empregados em cromatografia líquida são baseados na absorção da radiação ultravioleta ou visível. Os detectores por fluorescência, índice de refração e eletroquímico também são amplamente usados. Os detectores espectrométricos de massas (MS) estão, atualmente, tornando-se bastante populares.

Figura 2 – Esquema geral de um cromatógrafo líquido

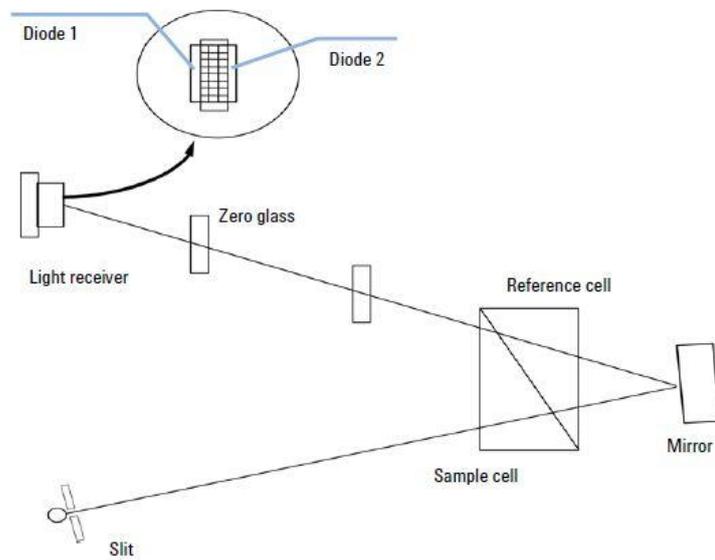


Fonte: WATERS CORPORATION, 2012.

No presente trabalho, para determinação da glicose, um carboidrato, utilizou-se o detector por índice de refração, o qual tem a vantagem significativa de responder a quase todos os solutos, isto é, é um detector universal. O índice de refração do meio é afetado por alguns fatores, como o comprimento de onda do feixe de luz incidente, o qual deve se manter constante. Também é afetado pela densidade do meio, a qual é afetada pela composição, temperatura e pressão. Devem ser mantidos em uma temperatura constante, dentro de um intervalo de alguns milésimos de graus centígrados. Além disso, eles não são tão sensíveis quanto à maioria dos outros tipos de detectores, e não são compatíveis com os métodos de eluição por gradiente.

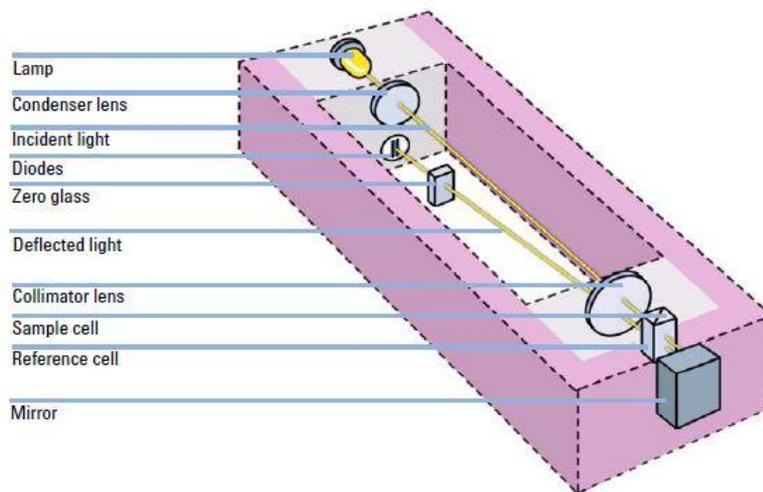
Um feixe de luz proveniente da lâmpada atravessa a célula de fluxo, a qual é dividida diagonalmente, em células de referência e de amostra. Na parte traseira da célula de fluxo um espelho reflete a luz através da célula de fluxo e um vidro zero, o qual afeta o caminho do feixe de luz, ao receptor. O receptor de luz possui dois diodos, os quais produzem uma corrente elétrica proporcional à quantidade de luz que diminui. As figuras 3 e 4 mostram o princípio de detecção e caminho ótico de um detector de índice de refração, respectivamente.

Figura 3 – Princípio de detecção de um detector de índice de refração



Fonte: AGILENT, 2012.

Figura 4 – Caminho óptico de um detector de índice de refração



Fonte: AGILENT, 2012.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Determinar o percentual de amido em diferentes variedades de arroz, comparando-se e relacionando-as às suas origens e características, através da hidrólise enzimática do polissacarídeo em glicose, e quantificação da mesma por cromatografia líquida com detecção por índice de refração.

4.2 Objetivos específicos

Através do desenvolvimento de um procedimento de hidrólise enzimática do amido, utilizando a metodologia de superfície de resposta a fim de otimizar a hidrólise, e quantificação da glicose liberada no meio por cromatografia líquida de alta eficiência com auxílio de detector de índice de refração, espera-se que os seguintes objetivos sejam atingidos:

- Levantamento das principais variedades de arroz disponíveis no mercado porto-alegrense;
- Determinar a concentração de amido, nas amostras selecionadas, utilizando a metodologia enzimática a fim de quantificar os níveis em cada conjunto de amostras estudadas;
- Determinar o percentual de amido nas amostras;
- Utilizar planejamento fatorial para otimizar o processo de hidrólise enzimática;
- Utilizar ferramentas estatísticas para avaliar a relação entre as amostras de arroz, no que diz respeito à concentração de amido.

5 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do trabalho, foram selecionadas nove variedades de arroz disponíveis no mercado porto-alegrense. Selecionaram-se diferentes amostras com o objetivo de relacionar a quantidade de amido de cada variedade, com suas características de origem, e organolépticas. As amostras selecionadas foram:

- 1) Arroz Branco – de origem brasileira;
- 2) Arroz Integral – de origem brasileira;
- 3) Arroz Sasanishiki – de origem japonesa;
- 4) Arroz Vermelho – de origem francesa;
- 5) Arroz Negro – de origem chinesa;
- 6) Arroz Jasmin – de origem tailandesa;
- 7) Arroz Basmati – de origem indiana;
- 8) Arroz Arbório – de origem italiana;
- 9) Arroz Carnaroli – de origem italiana.

Na primeira etapa do estudo, com o objetivo de otimizar a hidrólise enzimática, selecionou-se a amostra de arroz branco, para aplicar a metodologia de superfície de resposta. Os fatores significativos selecionados da metodologia estudada, referente à etapa de hidrólise enzimática foram: tempo de hidrólise, concentração de α -amilase e de amiloglicosidase no meio. Selecionaram-se estas etapas, pois envolvem fatores como a redução de tempo de aplicação da metodologia, e a economia com as enzimas amilolíticas utilizadas, visto que tais reagentes têm elevado custo.

As amostras estudadas foram moídas em moinho de bolas e armazenadas em pacotes de alumínio.

5.1 Soluções utilizadas

- **Solução tampão de ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico (MOPS) 0,1 mol/L – pH 6,5:** pesou-se em balança analítica aproximadamente 2,0926 g de ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico em um béquer de vidro de 100 mL. Dissolveu-se o reagente com água ultrapura, e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL, cujo volume foi completado;

- **Solução tampão de acetato de sódio 1 mol/L e ácido acético – pH 4,5:** pesou-se em balança analítica aproximadamente 8,2000 g de acetato de sódio em um béquer de 250 mL, dissolvendo-se o sal com 150 mL de água ultrapura. Adicionou-se 6,2 mL de ácido acético glacial, e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL, e completou-se o volume com água ultrapura;
- **Solução de α -amilase 27,9 U/mL em solução tampão de ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico (MOPS) 0,1 mol/L:** transferiu-se, com auxílio de pipetador automático, 9,3 mL de α -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* 3.000 U/mL para um balão volumétrico de 1000 mL. Completou-se o volume do balão com a solução tampão de ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico (MOPS) 0,1 mol/L – pH 6,5.
- **Solução de Amiloglucosidase 30,2 U/mL em solução tampão acetato de sódio 0,1 mol/L e ácido acético – pH 4,5:** transferiu-se, com auxílio de pipetador automático, 9,25 mL de amiloglucosidase termoestável de *Aspergillus niger* 3.260 U/mL para um balão volumétrico de 1000 mL. Completou-se o volume do balão com a solução tampão de acetato de sódio 1 mol/L e ácido acético – pH 4,5.
- **Solução de ácido sulfúrico 0,1 mol/L:** transferiu-se, com auxílio de pipetador automático, 0,5 mL de ácido sulfúrico 98% para um balão volumétrico de 100 mL, contendo aproximadamente 60 mL de água ultrapura. Completou-se o volume do balão com água ultra pura;
- **Fase Móvel – Solução de ácido sulfúrico 5 mmol/L:** adicionou-se 1 litro de água ultrapura em um balão volumétrico de 2 litros. Transferiu-se, com auxílio de pipetador automático, 4 mL de uma solução de ácido sulfúrico 2,5 mol/L padronizada, disponível comercialmente. Completou-se com água ultrapura o volume do balão. A fase móvel foi filtrada à vácuo, com auxílio de sistema de filtração dotado de membrana filtrante inerte, de acetato e nitrato de celulose. A fase móvel filtrada foi desgaseificada com auxílio de ultrassom.

5.2 Curva de calibração

5.2.1 Solução estoque de D-(+)-glicose 2,5000 mg/mL

Pesou-se, em béquer de vidro de 50 mL, aproximadamente 0,5000 g de D-(+)-glicose, dissolvendo-a com auxílio de água ultrapura. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume com água ultrapura.

5.2.2 Soluções de calibração

Transferiram-se, com auxílio de pipetador automático, alíquotas da solução estoque de D-(+)-glicose para balões volumétricos, avolumando-se com água ultrapura, como resumido na Tabela 2:

Tabela 2 – Soluções de calibração de D-(+)-glicose

Nível de Calibração	Volume (mL) da solução estoque D-(+)-Glicose 2,5000 mg/mL	Balão Volumétrico (mL)	Concentração de D-(+)-Glicose (mg/mL)
1	0,4000	100,0	0,0100
2	2,0000	50,0	0,1000
3	12,0000	50,0	0,6000
4	20,0000	50,0	1,0000
5	30,0000	50,0	1,5000
6	40,0000	50,0	2,0000

Fonte: o Autor.

Transferiram-se alíquotas de cada solução de calibração para vials de 2 mL, e lacrou-se os mesmos com tampa.

5.3 Hidrólise Enzimática

Para a determinação do amido nas amostras de diferentes variedades de arroz, pesou-se 100 mg de amostra, moída, em um erlenmeyer de vidro, com capacidade para 125 mL, dotado de tampa esmerilhada. Adicionou-se ao erlenmeyer, com auxílio de pipetador automático, 12,5 mL da solução de α -amilase 27,9 U/mL em solução tampão de ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico (MOPS) 0,1 mol/L. O erlenmeyer foi submetido ao aquecimento e agitação em banho-maria, a 75°C por 6 minutos. Adicionou-se novamente 12,5 mL da solução de α -amilase 27,9 U/mL em solução tampão de ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico (MOPS) 0,1 mol/L, e submeteu-se novamente ao aquecimento e agitação em banho-maria, a 75°C por 6 minutos. Após esta primeira etapa de hidrólise enzimática, o sistema de aquecimento foi ajustado a 50°C, e aguardou-se o sistema atingir a temperatura citada. Após o equilíbrio térmico, adicionou-se 12,5 mL da solução de amiloglicosidase 30,2 U/mL em solução tampão acetato de sódio 1 mol/L e ácido acético, e agitou-se a amostra por 6 minutos. Após este período, repetiu-se o procedimento, por 6 minutos, adicionando 12,5 mL da solução de amiloglicosidase 30,2 U/mL em solução tampão acetato de sódio 1 mol/L e ácido acético. Após a hidrólise enzimática, deixou-se a amostra arrefecer. Adicionou-se 1 mL de uma solução de ácido sulfúrico 0,1 mol/L a fim de cessar a hidrólise enzimática. A amostra foi filtrada, com auxílio de papel filtro quantitativo, para um balão volumétrico de 100 mL. Lavou-se o papel filtro, o funil, e avolumou-se o balão volumétrico com água ultrapura. Homogeneizou-se o balão volumétrico, e procedeu-se à extração em fase sólida (SPE).

5.4 Extração em fase sólida

Com o objetivo de realizar um *clean-up* das amostras analisadas, utilizou-se a extração em fase sólida (SPE). O cartucho utilizado para o *clean-up* possuía como fase estacionária o SAX, que é definido como um sorbente de sílica, com grupo de amina quaternária, o qual permanece positivamente carregado, apresentando um forte mecanismo de retenção de troca iônica, de, por exemplo, íons carboxilato. O cartucho utilizado possuía 500 mg de fase estacionária, com capacidade de 3 mL.

Para a etapa de condicionamento do cartucho, adicionou-se 6 mL de metanol, em duas etapas de 3 mL.

Para a etapa de equilíbrio do cartucho, adicionou-se 6 mL de água ultrapura, em duas etapas de 3 mL. A solução resultante dos processos de condicionamento e equilíbrio foi descartada, e novos tubos foram utilizados para a etapa de carregamento da amostra.

Para a etapa de carregamento da amostra, adicionou-se 1 mL da solução da amostra no cartucho, e procedeu-se à extração em fase sólida. O analito em estudo, a glicose, não possui afinidade com a fase estacionária utilizada. A glicose é eluída diretamente no tubo. Após o carregamento do cartucho com a amostra, adicionou-se 1 mL de água ultrapura, e recolheu-se o eluato. Repetiu-se o procedimento de eluição com 1 mL de água ultrapura.

A solução resultante contida no tubo foi homogeneizada, e uma alíquota foi transferida para um vial de 2 mL. As amostras foram analisadas em triplicata em um cromatógrafo líquido da marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, constituído pelos seguintes módulos: Degasser (G1322A), Bomba Isocrática (G1310B), Termostato (G1330B), Amostrador automático (G1329B), Forno (G1316A), e Detector de Índice de Refração (G1362A). Os parâmetros cromatográficos encontram-se no Apêndice B. O fluxograma mostrado na Figura 5 resume as etapas de análise.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Metodologia de superfície de respostas: Planejamento Composto Central (CCD)

Foram realizados três experimentos, a fim de otimizar a etapa de hidrólise enzimática. As variáveis estudadas foram: tempo de hidrólise, concentração de α -amilase, e concentração de amiloglucosidase no meio reacional.

Encontram-se na Tabela 3 o Experimento 1, o qual possui cinco níveis e as três variáveis estudadas.

Tabela 3 – Experimento 1 – Planejamento Composto Central – Modelo Quadrático – Três Variáveis

Variáveis	Níveis				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Tempo (min) (X_1)	3,2	10	20	30	36,8
Concentração de α -amilase (U/mL) (X_2)	1,8	4,5	8,5	12,5	15,2
Concentração de Amiloglucosidase (U/mL) (X_3)	1,8	4,5	8,5	12,5	15,2

Fonte: o Autor.

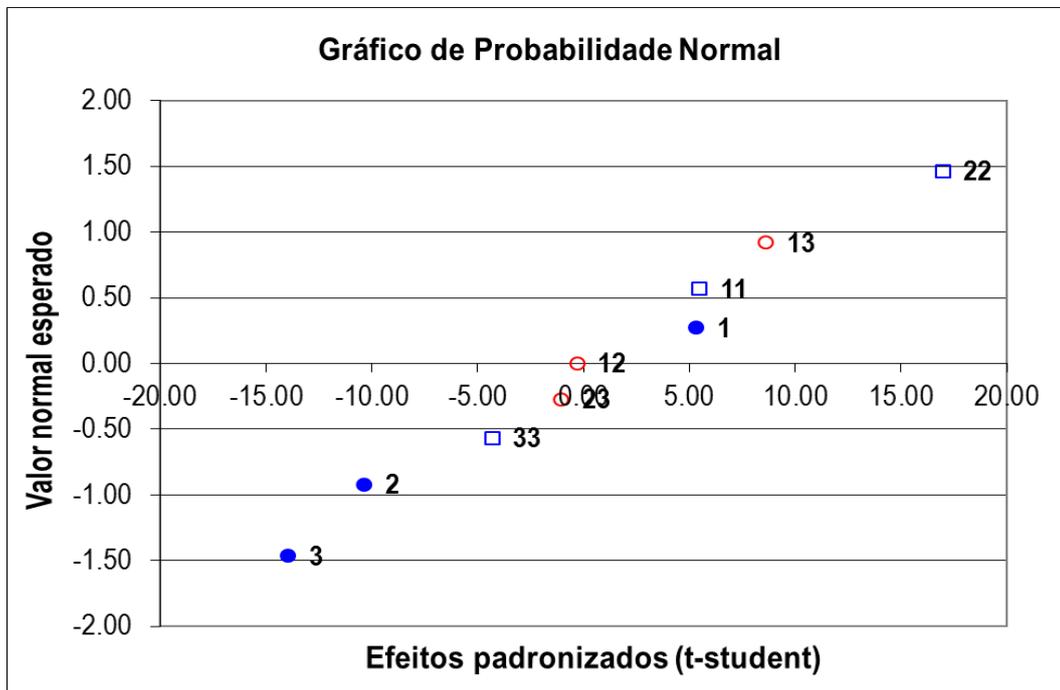
Na tabela 4, encontram-se os resultados obtidos para cada ensaio estudado, com suas respectivas variáveis, e os níveis de cada uma. A Figura 6 mostra o gráfico de probabilidade normal obtido para o Experimento 1. A Figura 7 mostra a superfície de resposta obtida para o Experimento 1, na qual confrontou-se as variáveis tempo de hidrólise e concentração de α -amilase. A Figura 8 mostra a superfície de resposta obtida para o Experimento 1, na qual confrontou-se as variáveis concentração de amiloglucosidase e concentração de α -amilase.

Tabela 4 – Resultados obtidos para o Experimento 1

Planejamento				
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Resultados (%)
1	-1	-1	-1	87,52
2	1	-1	-1	88,28
3	-1	1	-1	85,30
4	1	1	-1	84,09
5	-1	-1	1	83,20
6	1	-1	1	86,57
7	-1	1	1	78,62
8	1	1	1	83,66
9	-1,682	0	0	83,48
10	1,682	0	0	82,99
11	0	-1,682	0	86,76
12	0	1,682	0	86,76
13	0	0	-1,682	81,90
14	0	0	1,682	78,57
15	0	0	0	82,04
16	0	0	0	82,71
17	0	0	0	82,13

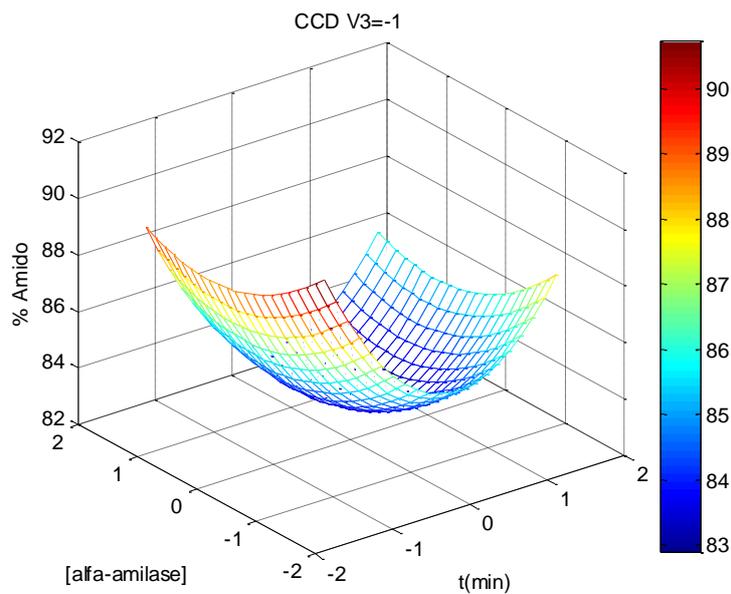
Fonte: o Autor.

Figura 6 – Gráfico de probabilidade normal obtido para o Experimento 1



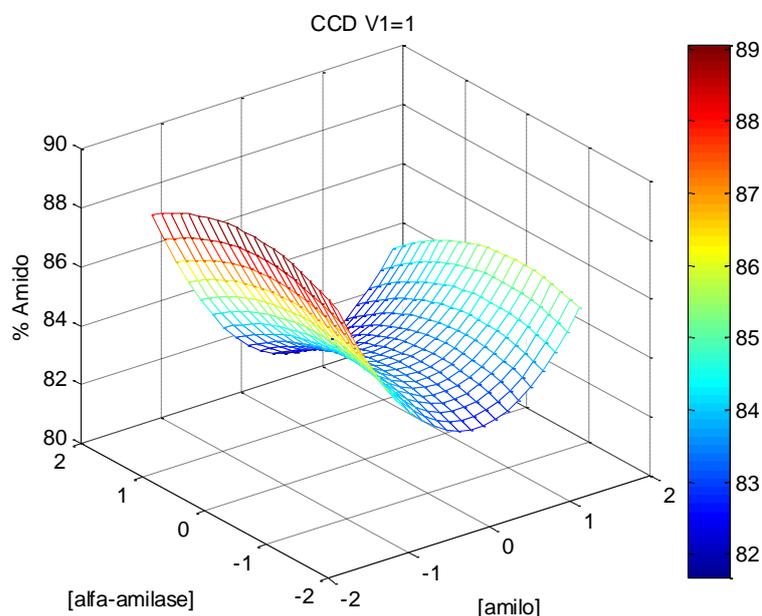
Fonte: o Autor.

Figura 7 – Superfície de resposta obtida para o Experimento 1 – Variáveis: tempo de hidrólise e concentração de α -amilase



Fonte: o Autor.

Figura 8 – Superfície de resposta obtida para o Experimento 1 – Variáveis: concentração de amiloglicosidase e concentração de α -amilase



Fonte: o Autor.

A fim de confrontar as variáveis concentração de amiloglicosidase e tempo de hidrólise, realizou-se o Experimento 2, o qual fixou-se a concentração de α -amilase. Encontram-se na Tabela 5 o Experimento 2, o qual possui cinco níveis e as variáveis citadas.

Tabela 5 – Experimento 2 – Planejamento Composto Central – Modelo Quadrático – Duas Variáveis

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Tempo (min) (X_1)	5,9	10	20	30	34,1
Concentração de Amiloglicosidase (U/mL) (X_2)	2,9	4,5	8,5	12,5	14,1
Concentração de α -amilase (U/mL) (X_3)	-	4,5	-	-	-

Fonte: o Autor.

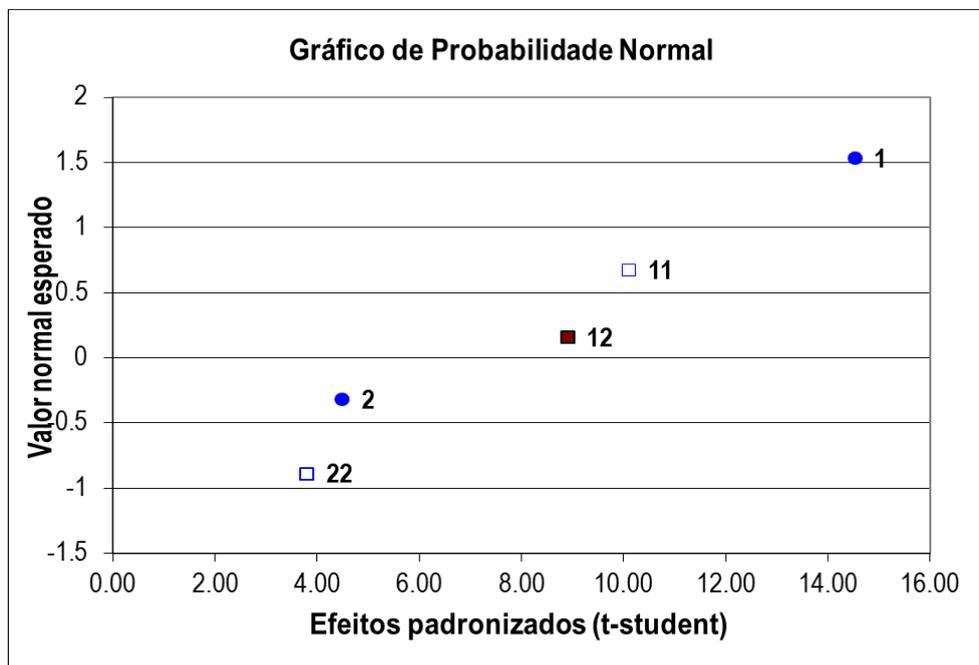
Na Tabela 6, encontram-se os resultados obtidos para cada ensaio estudado, com suas respectivas variáveis, e os níveis de cada uma. A Figura 9 mostra o gráfico de probabilidade normal obtido para o Experimento 2. A Figura 10 mostra a superfície de resposta obtida para o Experimento 2.

Tabela 6 – Resultados obtidos para o Experimento 2

Planejamento				
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Resultados (%)
1	-1	-1	-1	85,87
2	1	-1	-1	84,89
3	-1	1	-1	80,98
4	1	1	-1	86,97
5	-1,41	0	-1	78,93
6	1,41	0	-1	86,76
7	0	-1,41	-1	78,02
8	0	1,41	-1	83,53
9	0	0	-1	80,82
10	0	0	-1	80,67
11	0	0	-1	81,41

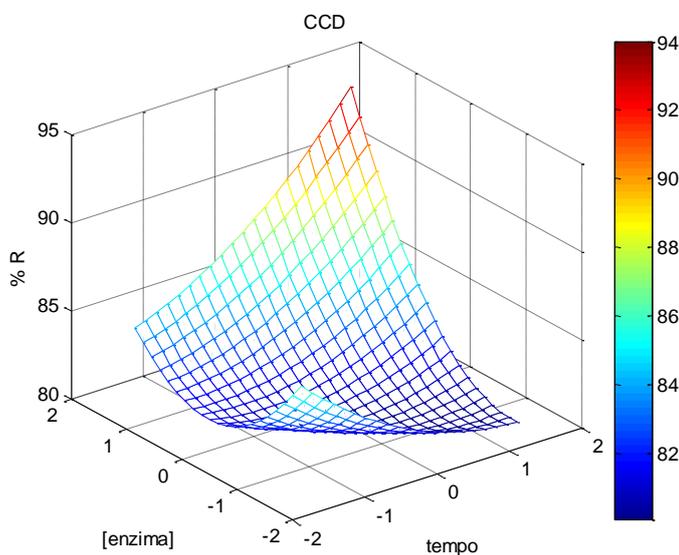
Fonte: o Autor.

Figura 9 – Gráfico de probabilidade normal obtido para o Experimento 2



Fonte: o Autor.

Figura 10 – Superfície de resposta obtida para o Experimento 2 – Variáveis: tempo de hidrólise e concentração de amiloglucosidase



Fonte: o Autor.

Realizou-se um Experimento 3, a fim de confrontar as variáveis concentração de α -amilase e tempo de hidrólise. Encontram-se na Tabela 7 o Experimento 3, o qual possui cinco níveis e as variáveis citadas.

Tabela 7 – Experimento 3 – Planejamento Composto Central – Modelo Quadrático –
Duas Variáveis

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Tempo (min) (X_1)	5,9	10	20	30	34,1
Concentração de α -amilase (U/mL) (X_2)	2,9	4,5	8,5	12,5	14,1
Concentração de Amiloglucosidase (U/mL) (X_3)	-	4,5	-	-	-

Fonte: o Autor.

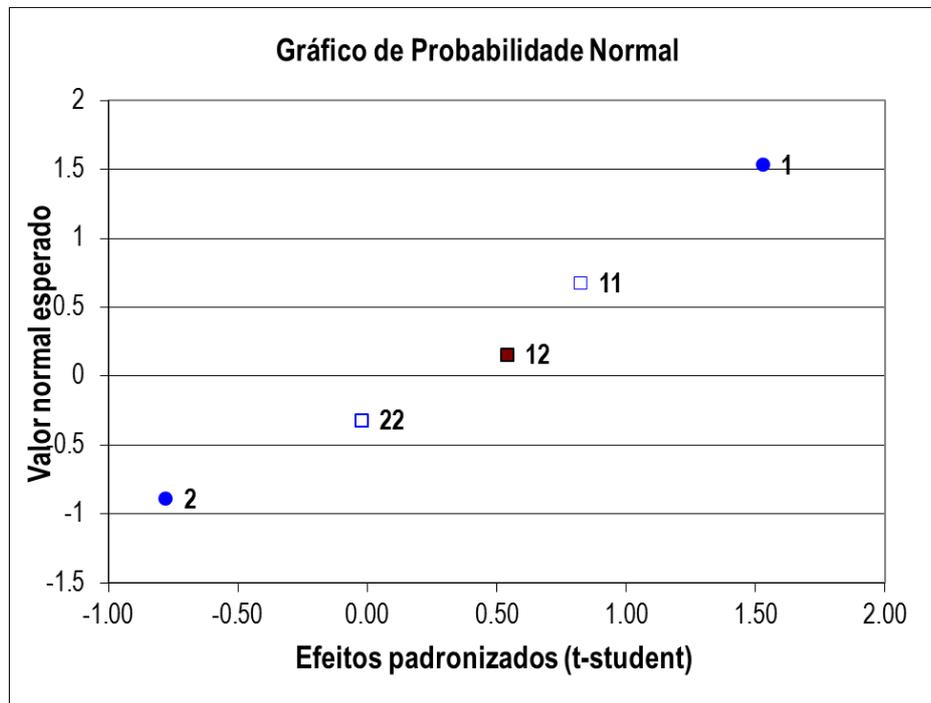
Na Tabela 8, encontram-se os resultados obtidos para cada ensaio estudado, com suas respectivas variáveis, e os níveis de cada uma. A Figura 11 mostra o gráfico de probabilidade normal obtido para o Experimento 3. A Figura 12 mostra a superfície de resposta obtida para o Experimento 3.

Tabela 8 – Resultados obtidos para o Experimento 3

Planejamento					
Ensaio	X_1	X_2	X_3	Resultados (%)	
1	-1	-1	-1	86,04	
2	1	-1	-1	87,40	
3	-1	1	-1	80,15	
4	1	1	-1	85,27	
5	-1,41	0	-1	80,44	
6	1,41	0	-1	86,47	
7	0	-1,41	-1	80,85	
8	0	1,41	-1	81,12	
9	0	0	-1	80,62	
10	0	0	-1	80,00	
11	0	0	-1	86,30	

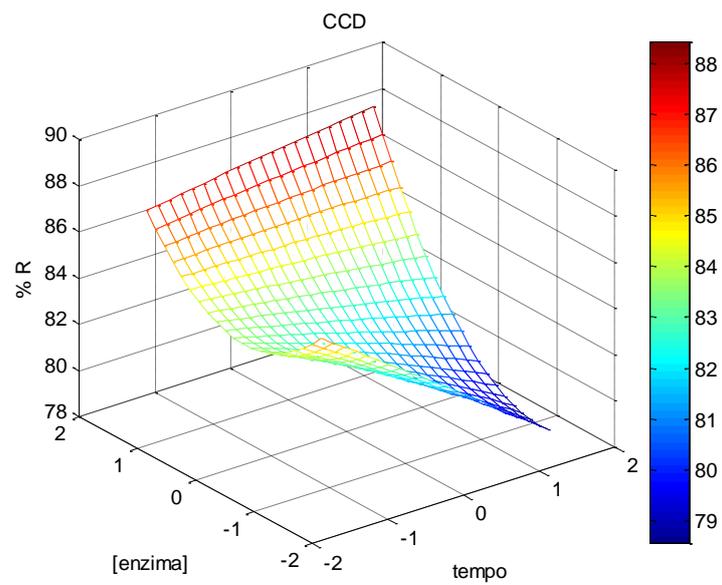
Fonte: o Autor.

Figura 11 – Gráfico de probabilidade normal obtido para o Experimento 3



Fonte: o Autor.

Figura 12 – Superfície de resposta obtida para o Experimento 3 – Variáveis: tempo de hidrólise e concentração de amiloglucosidase



Fonte: o Autor.

Pode-se verificar através dos resultados obtidos, com a ajuda das figuras das superfícies de resposta obtidas, para cada experimento, que os valores de resposta obtidos (concentração de amido), apresentaram coerência e concordância entre os mesmos, sem apresentar discrepâncias para algum experimento, e nível estudado. As diferenças encontradas entre os resultados obtidos encontram-se já na reprodutibilidade da metodologia analítica, uma vez, por exemplo, que a detecção do analito foi feita com auxílio do detector de índice de refração, um detector universal, que apresenta uma menor sensibilidade se comparado com o detector de UV/Vis. Cabe ressaltar também que o detector de índice de refração é afetado por algumas variáveis, como, por exemplo, a temperatura, a qual deve se manter constante durante a detecção, pois qualquer alteração da temperatura leva a uma alteração da densidade do meio, que por sua vez, altera a refração do meio.

Logo, através dos resultados obtidos com os experimentos testados, estabeleceram-se as novas condições para a etapa de hidrólise da metodologia analítica (procedimento B), como mostra a Tabela 9, as quais foram as condições dos níveis mais baixos do planejamento composto central aplicado. Estas novas condições foram utilizadas para a determinação do percentual de amido nas amostras estudadas por apresentarem menor tempo de hidrólise, e menores concentrações enzimáticas.

Tabela 9 – Comparativo entre os procedimentos A e o B

	A	B
Tempo de Hidrólise	120 minutos	24 minutos
Concentração de α-Amilase	120 U/mL	27,9 U/mL
Concentração de Amiloglucosidase	130 U/mL	30,2 U/mL

Fonte: o Autor.

6.2 Quantificação do percentual de amido nas diferentes variedades de arroz

As amostras de arroz foram analisadas e quantificadas com auxílio do software *OpenLab*, software disponível para o cromatógrafo líquido da marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, através de uma curva de calibração de D-(+)-glicose, utilizando modelo de regressão linear, como mostra a Tabela 10:

Tabela 10 – Dados da curva de calibração de D-(+)-glicose

Tempo de Retenção (min)	Composto	Nível	Concentração (mg/mL)	Área
20,409	D-(+)-glicose	1	0,010	5783
		2	0,100	57103
		3	0,601	347530
		4	1,003	580470
		5	1,504	871720
		6	2,007	1161900

Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

Encontra-se no Apêndice C o modelo de regressão linear, a fim de quantificar as amostras estudadas.

Seguem abaixo a equação da reta obtida, para o modelo de regressão linear utilizado, bem como os coeficientes de correlação e determinação obtidos:

- $y = 579287,934x - 352,44785$;
- Coeficiente de correlação (r): 1,0000;
- Coeficiente de determinação (r^2): 1,0000.

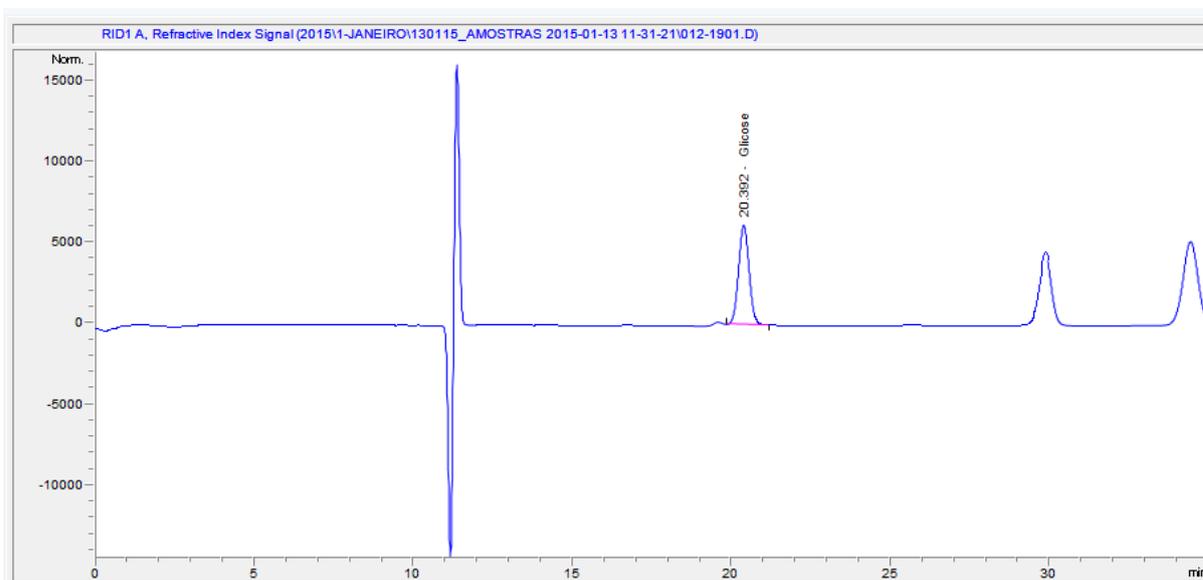
O tempo de retenção determinado para o sinal registrado da D-(+)-glicose foi em torno de 20,4 minutos. Os pontos da curva de calibração foram sobrepostos, a fim de verificar o aumento de sinal (área), com o acréscimo da concentração. Esta sobreposição encontra-se no Apêndice D.

A amostra de arroz branco foi avaliada previamente, com o objetivo de verificar se a concentração encontrada estaria dentro da faixa de trabalho utilizada. Verificou-se que a concentração encontrada estava dentro da faixa de trabalho que compunha a curva de calibração de D-(+)-glicose. O sinal obtido para a amostra de

arroz branco situou-se entre os pontos 2 e 3, 0,1001 e 0,6010 mg/mL, respectivamente. A sobreposição encontra-se no Apêndice E.

As amostras foram analisadas em triplicata, e em dias diferentes. Para cada dia de análise, a curva analítica foi injetada juntamente com as amostras provenientes daquele dia. O cromatograma obtido para a amostra de arroz Arbório encontra-se na Figura 13, e os demais cromatogramas obtidos, para cada amostra analisada, encontram-se no Apêndice F.

Figura 13 – Cromatograma obtido para a amostra de arroz Arbório



Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

A equação linear da curva de calibração de D-(+)-glicose foi utilizada para calcular a concentração de glicose proveniente de amido nas amostras, como segue abaixo:

$$x = y - b/a$$

onde:

- x: concentração de glicose na amostra hidrolisada;
- y: área obtida para a amostra hidrolisada;
- b: coeficiente linear (intercepto no eixo y) da curva de calibração de D-(+)-glicose;
- a: coeficiente angular (slope) da curva de calibração de D-(+)-glicose.

A partir da concentração de glicose encontrada nas amostras, calculou-se o percentual de amido nas amostras como segue:

$$\% \text{Amido} = \text{concentração de glicose} \times V \times 3,5 \times 100/m$$

onde:

- V: volume da diluição da amostra no balão volumétrico (100 mL);
- 3,5: fator de diluição da extração em fase sólida (SPE);
- 100: percentual;
- m: massa de amostra (mg).

As concentrações de glicose proveniente de amido, através da hidrólise enzimática do polissacarídeo, das amostras de arroz disponíveis no mercado da cidade de Porto Alegre, são mostradas na Tabela 11, bem como a média, o desvio padrão, e o coeficiente de variação obtidos:

Tabela 11 – Resultados obtidos para cada amostra estudada

Amostra	Replicata 1 (mg/mL)	Replicata 2 (mg/ml)	Replicata 3 (mg/mL)	Média (mg/mL)	Percentual médio de amido (%)	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
Sasanishiki	0,2468	0,2413	0,2484	0,2455	85,93	0,0037	1,51
Vermelho	0,2134	0,2183	0,2155	0,2157	75,50	0,0025	1,16
Negro	0,2070	0,2082	0,2117	0,2090	73,15	0,0024	1,15
Jasmin	0,2388	0,2303	0,2338	0,2343	82,01	0,0043	1,84
Basmati	0,2385	0,2376	0,2393	0,2385	83,48	0,0009	0,38
Arbório	0,2259	0,2273	0,2223	0,2252	78,82	0,0026	1,15
Carnaroli	0,2415	0,2411	0,2466	0,2431	85,09	0,0031	1,28
Branco	0,2575	0,2524	0,2497	0,2532	88,62	0,0040	1,58
Integral	0,1938	0,1951	0,1908	0,1932	67,62	0,0022	1,14

Fonte: o Autor.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com a otimização da metodologia analítica proposta, através da metodologia de superfície de resposta, especificamente o planejamento composto central, pode-se concluir que mesmo nos experimentos com as variáveis em mais baixos níveis (tempo, concentração de α -amilase e amiloglicosidase), os valores encontrados apresentaram semelhança entre os mesmos, demonstrando que o experimento, com os menores níveis poderiam ser adotados. Verificou-se que a diferença entre os valores encontrados para cada experimento já estaria na variabilidade da metodologia analítica, ou seja, as diferenças aplicadas para cada experimento, não resultaram em grandes discrepâncias entre os valores. Devido a este fato, selecionaram-se os níveis mais baixos das variáveis estudadas, possibilitando trabalhar com uma hidrólise enzimática com menor tempo e menores concentrações das enzimas utilizadas. Com estas otimizações, a metodologia analítica proposta mostrou-se mais rápida, e com um custo menor, uma vez que enzimas são reagentes com valores expressivos no mercado.

Os resultados obtidos para cada amostra de arroz analisada, que estavam disponíveis no mercado da cidade de Porto Alegre, mostraram-se coerentes com as características pertinentes a cada uma. Amostras de arroz com maior concentração de amido, como por exemplo, os arrozes Sasanishiki, Carnaroli, depois de cozidos, ficam mais pastosos e colantes. Já por outro lado, amostras com menor concentração, como por exemplo, as variedades de arroz Vermelho e Negro, necessitarão de mais água, temperatura e tempo para cozinhar os grãos. As propriedades tecnológicas ligadas ao arroz, também, estão diretamente relacionadas com o amido. Por ser o componente majoritário no grão, as propriedades intrínsecas do amido, a estrutura do grânulo, bem como as alterações sofridas por ele, refletem no desempenho tecnológico e nutricional do grão.

A metodologia analítica proposta neste trabalho pode ser aplicada para quantificação de amido em outros materiais vegetais, além do arroz, na presença de outros polissacarídeos, como por exemplo, a celulose, sem comprometer a exatidão, mostrando-se uma metodologia específica.

REFERÊNCIAS

- AGILENT. **Agilent 1260 infinity refractive index detector**: user manual. Waldbronn, 2012.
- AMARAL, L. I. V. do et al. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Buckeridge – Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 425-431, 1 tab., 2007.
- ARÊAS, J.A.G.; LAJOLO, F.M. Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 20, p. 307-318, 1980.
- BARATA, T. S. **Caracterização do consumo de arroz no Brasil**: um estudo na Região Metropolitana de Porto Alegre. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Cepan, Porto Alegre, RS, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6, de 16 de fevereiro de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 fev. 2009, Seção 1, p. 3.
- BUCKERIDGE, M.S. et al. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (eds.). **Germinação, do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 163-185.
- CAREY, F. A.; GIULIANO, R. M. **Organic chemistry**. 8. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2011.
- CARPITA, N.C.; KANABUS, J. Extraction of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay. **Analytical Biochemistry**, v. 161, p. 132-139, 1987.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.
- DORS, G. C; CASTIGLIONI, G. L.; AUGUSTO-RUIZ, W. Utilização da Farinha de Arroz na Elaboração de Sobremesa. **Vetor**, Rio Grande, v. 16, n. 1/2, p. 63-67, 2006.
- ELIAS, M. C. F. et al. Industrialização de arroz por processo convencional e por parboilização. In: ELIAS, M. C. F.; OLIVEIRA, M.; VANIER, N. L. (Ed.). **Qualidade de arroz da pós-colheita ao consumo**. Pelotas: Ed. Universidade da UFPEL, 2012. cap. 4, p.43-55.
- FERREIRA, C. M.; YOKOYAMA, L. P. **Cadeia produtiva do arroz na Região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Produção de Informações, 1999. 110 p.
- FISBERG, M.; WEHBA, J.; COZZOLINO, S. M. F. **Um, dois, feijão com arroz**: a alimentação no Brasil de Norte a Sul. São Paulo: Atheneu, 2002.
- FLANDRIN, J. L.; MONTANARI, M. **História da alimentação**. São Paulo: Estação Liberdade, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **International year of rice.** 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/en/rice-us.htm>>. Acesso em: 04 abr. 2016.

GORSHOKOVA, T.A. et al. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. **Plant Physiology**, v. 110, p. 721-729, 1996.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

JULIANO, B. O. Rice in human nutrition. Rome. FAO, 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E00.htm#Contents>>. Acesso em: 04 abr. 2016.

MANNERS, D. Starch. In: Dey, P.; Dixon, R. (eds.). **Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants.** London: Academic Press, 1985. p. 149-203.

MATHESON, N. K. The chemical structure of amylose and amylopectin fractions of starch from tobacco leaves during development and diurnally-nocturnally. **Carbohydrate Research**, v. 282, p. 247-262, 1996.

MCCREADY, R.M. Starch and Dextrin. In: JOSLYN, M. (ed.). **Methods in Food Analysis.** London: Academic Press, 1970. p. 541-563.

MCCREADY, R.M. et al. Determination of starch and amylose in vegetables: application to peas. **Analytical Chemistry**, v. 22, p. 1156-1158, 1950.

MCGEE, Harold. **Comida & cozinha: Ciência e Cultura da Culinária.** 2. ed. São Paulo: Editora WMF Martins Fontes, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. L. **Princípios de bioquímica.** 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

OLIVEIRA NETO, Aroldo Antônio de. A cultura do arroz. Brasília: Conab – Companhia Nacional de Abastecimento, 2015.

PEREIRA, J. A. **Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história.** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos.** Pelotas, RS: Editora Universitária – UFPel, 1996. vol. 1.

STORCK, C. R. **Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos.** Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2004.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

USDA/FAS. **Grain**: world markets and trade. May, 2015. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2016.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2002.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L. V. Qualidade Tecnológica. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. cap. 21, p. 582-604.

VIEIRA, N. R. A.; RABELO, R. R. Qualidade tecnológica. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. Santo Antônio da Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. cap. 23. p. 869-900.

APÊNDICE A – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DE CARBOIDRATOS E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

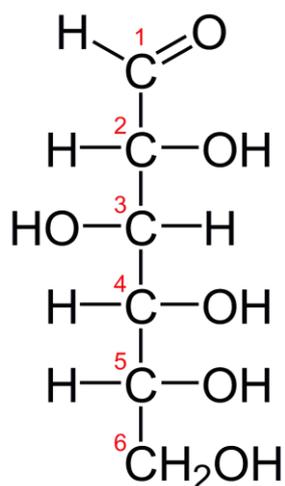
1 Carboidratos

Os carboidratos compõem uma porção substancial dos alimentos que consumimos, e fornecem a maior parte da energia que mantém o ser humano. São componentes estruturais das paredes das células, de exoesqueletos de insetos, lagostas e caranguejos. Os carboidratos são encontrados em todas as superfícies celulares, onde eles fornecem a base molecular para a comunicação celular. (CAREY et al, 2011).

Historicamente, os carboidratos foram uma vez considerados como “hidratos de carbono”, pois suas fórmulas moleculares em muitos casos correspondem a $C_n(H_2O)_m$. É mais realístico definir carboidrato como um aldeído polihidroxilado ou uma cetona polihidroxilada, definição esta que seria estruturalmente mais próxima da realidade e mais sugestiva no que tange à reatividade química (CAREY et al, 2011).

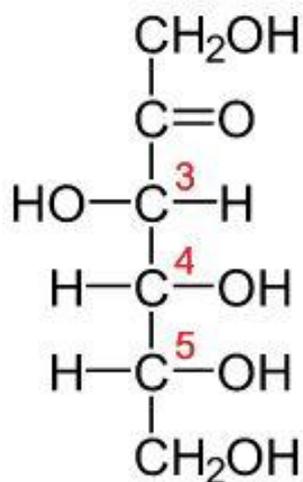
Os carboidratos são classificados em monossacarídeos, oligossacarídeos (dissacarídeos, trissacarídeos), e polissacarídeos. Os monossacarídeos são carboidratos simples que não sofrem processos de hidrólise. Um exemplo de monossacarídeo é a glicose ($C_6H_{12}O_6$). Cerca de 200 tipos diferentes de monossacarídeos são conhecidos. Eles podem ser agrupados de acordo com o número de átomos de carbono, e se são aldeídos ou cetonas polihidroxilados. Os monossacarídeos que são aldeídos polihidroxilados são chamados de aldoses; àqueles que são cetonas polihidroxiladas são classificados como cetoses.

Estrutura química da glicose (aldose) – Projeção de Fischer



Fonte: SIGMA-ALDRICH

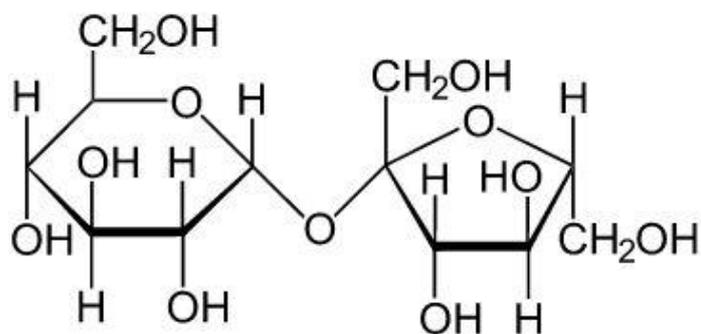
Estrutura química da frutose (cetose) – Projeção de Fischer



Fonte: SIGMA-ALDRICH

Os dissacarídeos, um dos grupos que compõem os oligossacarídeos, estão suscetíveis a processos de clivagem, que levam à formação de dois monossacarídeos, os quais podem ser iguais ou diferentes. A sacarose é um exemplo de dissacarídeo, o qual produz uma molécula de glicose e uma de frutose.

Estrutura química da sacarose



Fonte: SIGMA-ALDRICH

Segundo cita Carey et al (2011, p. 1024) os polissacarídeos são, na maioria das vezes, misturas de moléculas tendo similar, mas não necessariamente o mesmo, comprimento da cadeia. Um exemplo conhecido é o amido, o qual é um polissacarídeo que fornece milhares de moléculas de glicose no meio, através da hidrólise. É uma fonte de energia direta para animais fornecida pelo amido encontrado nas plantas.

2 Amido

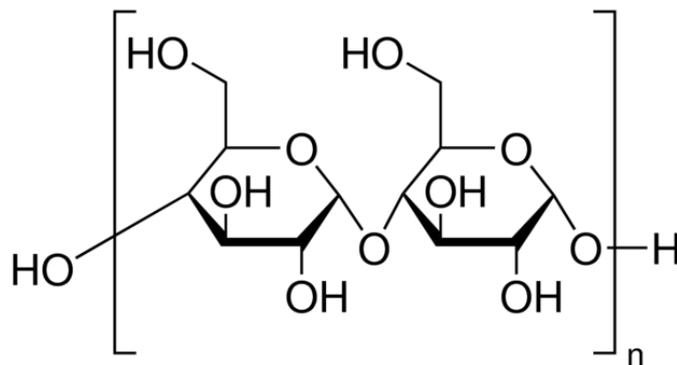
O amido é um dos principais compostos de reserva em plantas. Estes organismos sintetizam amido como um resultado da fotossíntese, nos plastídeos, encontrados em folhas como um composto de reserva utilizado no processo de respiração durante os períodos noturnos segundo van der Maarel et al. (2002, p. 138). É também sintetizado nos amiloplastos encontrados em tubérculos, sementes e raízes, como um composto de reserva de acordo com van der Maarel et al. (2002, p. 138). Nos amiloplastos, grandes concentrações de amido acumulam-se como grânulos insolúveis em água segundo van der Maarel et al. (2002, p. 138). Os amiloplastos são encontrados em vários tecidos e órgãos não fotossintetizantes, como parênquima de raízes e caules, tubérculos, endosperma ou cotilédones de sementes.

Ao longo da evolução tem sido usado não somente como reserva para a própria planta, mas também como uma das mais importantes fontes de energia para

os níveis subsequentes da cadeia alimentar nos ecossistemas, segundo Amaral et al. (2007, p. 425).

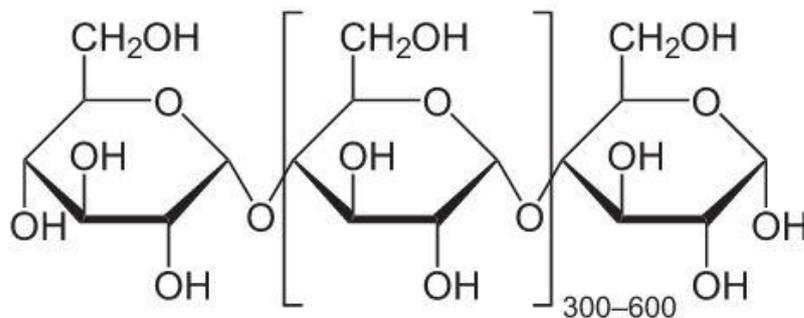
Como cita van der Maarel et al. (2002, p. 138) o amido é um polímero de glicose ligados através de uma ligação glicosídica, e é composto de dois tipos de polímeros, especificamente homopolissacarídeos, de glicose: amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear constituído de até 6000 unidades de glicose com ligações glicosídicas α -1,4, e a amilopectina, constituída por, em média, 2.000.000 unidades de glicose, unidas por ligações α -1,4 (15-45 unidades de glicose) lineares e ligações α -1,6 (15-45 unidades de glicose) ramificadas de acordo com van der Maarel et al. (2002, p. 138).

Estrutura química do amido



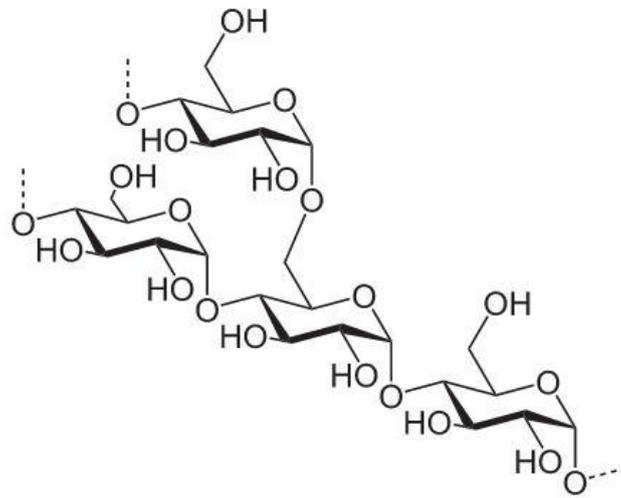
Fonte: SIGMA-ALDRICH

Estrutura química da amilose



Fonte: SIGMA-ALDRICH

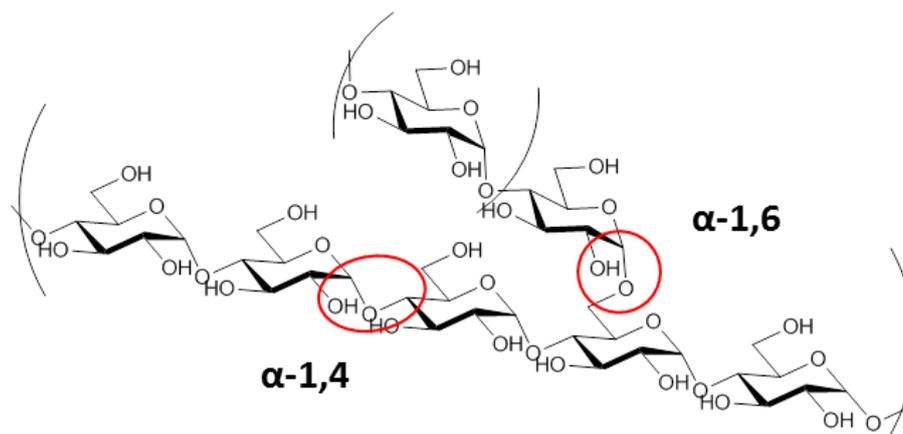
Estrutura química da amilopectina



Fonte: SIGMA-ALDRICH

Como o amido, a celulose, principal componente estrutural da matéria vegetal, é um polissacarídeo de glicose. Contudo, ao contrário da celulose, a qual possui ligações glicosídicas tipo β , o amido possui ligações do tipo α , segundo Carey et al (2011, p. 1048).

Ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 da molécula de amido:



Fonte: SIGMA-ALDRICH

Como cita Amaral et al. (2007, p. 425) dependendo da origem, o amido possui diferentes proporções de amilose e amilopectina, variando em torno 1:3 e 1:4.

Os grânulos de amido são formados ao redor de um núcleo, chamado hilo, pela disposição em camadas concêntricas ou não, da mistura de moléculas lineares de amilose com moléculas ramificadas de amilopectina. Em cada camada há regiões ou sítios cristalinos, resultantes de alinhamento paralelo de seções das moléculas, o que causa difícil acesso à água. Mas entre cada camada nova formada há uma película de hidratação.

Os microrganismos têm acesso relativamente mais fácil ao amido do que aos polissacarídeos de estrutura (celulose), o que é a razão principal porque o amido pode funcionar como reserva energética dos vegetais. Enquanto os açúcares simples, quando presentes, são prontamente utilizados, o amido só é à medida que faltam aqueles.

A hidrólise do amido é mais facilmente realizada do que a da celulose, química ou enzimaticamente. Isso decorre de sua estrutura macromolecular, a qual é fortemente hidrofílica. Por isso o amido é classificado como hidrocolóide, ou seja, segundo Staudiger (1950), uma macromolécula que somente se pode dissolver como colóide, dado o seu elevado peso molecular.

Pelo aquecimento (agitação térmica), o qual fornece a energia para romper as ligações intermoleculares das regiões menos cristalinas das moléculas do amido, facilita-se a absorção de água, devido à alteração da rigidez das moléculas: elas se tornam mais flexíveis e intumescem. Contudo, somente a temperaturas acima de 50 ou 60°C, suficiente agitação ou ambos os fatores, conseguem romper os grânulos.

3 Hidrólise enzimática de amiláceos

A hidrólise dos polissacarídeos somente se verifica mediante a catálise ácida, básica ou enzimática.

A hidrólise enzimática em relação às demais é da maior relevância, porque é capaz de se desenvolver nas condições brandas de temperatura e de concentração iônicas existentes e necessárias aos processos celulares.

Sendo um polissacarídeo, o amido é um carboidrato de reserva porque a macromolécula não pode penetrar na célula através da membrana celular. Esgotados os carboidratos simples pela respiração celular (glicólise), que possibilita a germinação, a reserva amilácea dos grãos é hidrolisada pelas enzimas, amilases

no caso, contidas no cereal, transformando-se em carboidratos simples, prontamente utilizável.

Muitas enzimas, a maioria delas hidrolases, estão envolvidas na mobilização do amido. As cadeias de glicose podem ser atacadas de forma endo, ou seja, no centro da molécula, ou exo, na porção terminal não redutora da molécula de acordo com Buckeridge et al. (2004).

3.1 α -amilase

A α -amilase é uma enzima extracelular, ou seja, existe no meio, fora da célula, embora produzidas na célula. Hidrolisa aleatória, mas simultaneamente várias ligações α -1,4 não terminais de moléculas de amilose, amilopectina, glicogênio e dextrinas, não atuando sobre as ligações α -1,6. Portanto seu ataque é do tipo endo, ou seja, dentro da molécula, e ocorre sobre o grânulo de amido intacto. Os produtos finais da hidrólise com α -amilase são 70 a 90% de maltose, oligossacarídeos e dextrinas, a maioria com quatro a oito unidades de glicose.

O ataque se dá primeiramente, e preferencialmente sobre cada passo da espiral helicoidal da amilose ou da amilopectina. De forma secundária, são atacadas cada duas ligações α -1,4 das dextrinas originadas, incluindo as ligações α -1,4, vizinhas às ramificações da amilopectina, resultando maltose.

Entretanto, a produção de glicose pela α -amilase é vagarosa, porque a hidrólise das ligações glicosídicas se dá em duas etapas: a primeira, de rápida liberação de grupos redutores, e a segunda fase, a qual é muito mais lenta.

A faixa de pH ótima para a atuação das α -amilases varia entre 4,6 e 9,2, situando-se geralmente entre 5,0 e 7,0. A temperatura ótima está entre 55 e 75°C..

3.2 Amiloglucosidase

É uma enzima extracelular, que cinde as ligações α -1,4 e α -1,6 da amilose, amilopectina, dextrinas, glicogênio, além da maltose, hidrolisando-as sucessiva e quase totalmente, a partir da extremidade não redutora das cadeias, até glicose. Logo, seu ataque também é do tipo exo, formando em torno de 2% de maltose, isomaltose e cerca de 3% de oligossacarídeos.

As amiloglucosidases atuam na faixa de pH entre 3,0 e 5,5, apresentando atividade ótima no pH 5,0, e sua maior estabilidade está entre 4,0 e 5,0. A temperatura ótima está entre 50 e 60°C.

Características das enzimas amilolíticas α -amilase e amiloglucosidase:

	α-amilase	Amiloglucosidase
Hidrólise das ligações α-1,4	+	+
Hidrólise das ligações α-1,6	-	+
Mecanismo de ataque	Endo	Exo
Produção de glicose	Vagarosa	Rápida
Temperatura	55-75°C	50-60°C
pH	5,0-7,0	4,0-5,0

Fonte: AMARAL, 2007.

APÊNDICE B – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMIDO EM ARROZ VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

(AMIDO.M)

- Coluna: Hi-Plex – tipo L17 (USP) – Comprimento: 30 cm; Diâmetro interno: 7,8 mm; Tamanho de partícula: 8 µm. Fase estacionária: Resina de troca catiônica, dotada de grupo sulfônico, reticulado de copolímero estireno-divinilbenzeno.
- Pré-coluna: Carbo-H – Dimensões: 4 mm x 3 mm.

Bomba:

- Eluição Isocrática;
- Fluxo: 1 mL/min.

Injetor:

- Volume de injeção: 20 µL

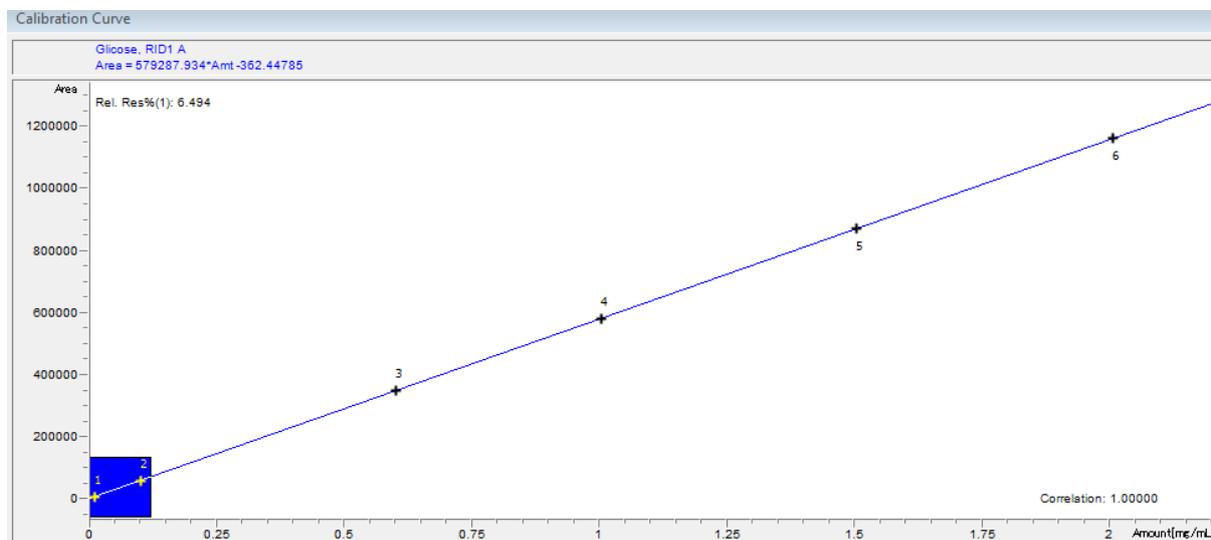
Forno:

- Temperatura: 35°C

Detector:

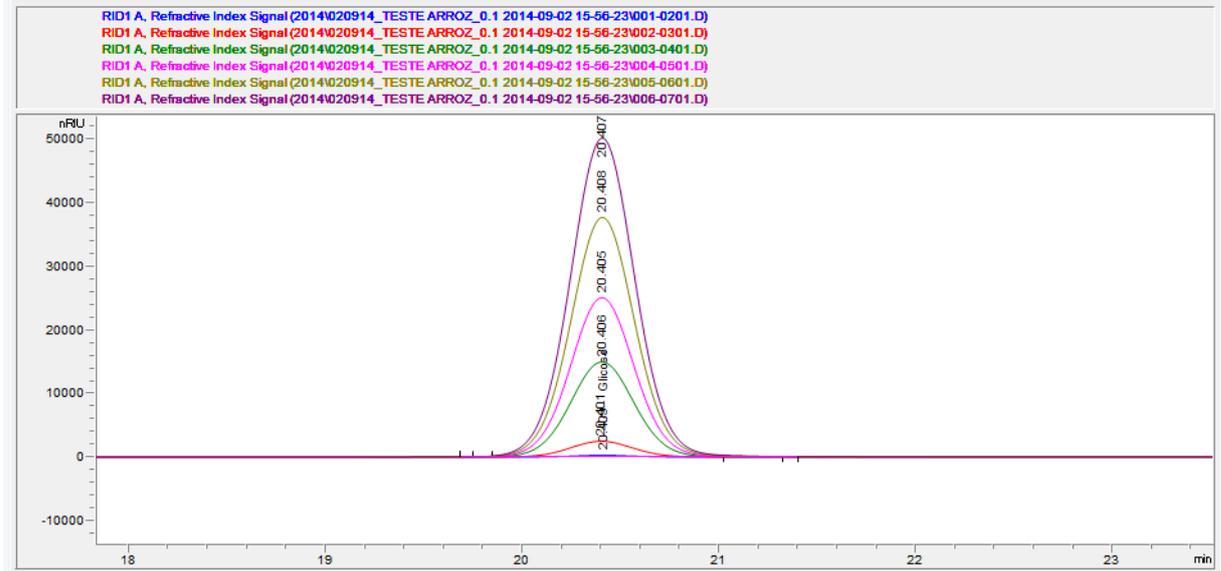
- Índice de Refração;
- Temperatura: 45°C;
- Polaridade: Positiva;
- Tempo de corrida: 35 min.

APÊNDICE C – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE D-(+)-GLICOSE



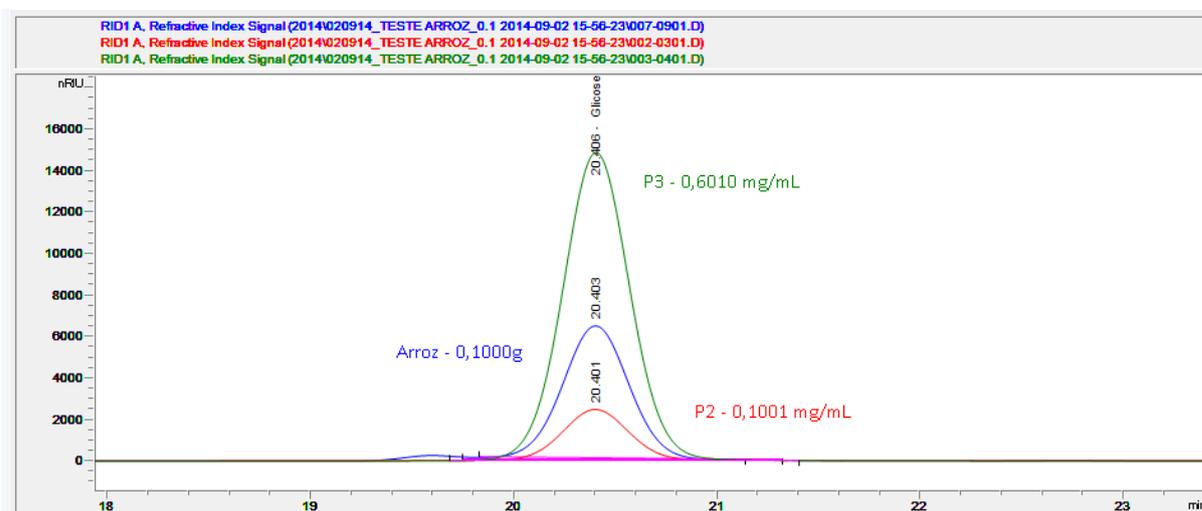
Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

APÊNDICE D – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES DE CALIBRAÇÃO DE D-(+)-GLICOSE



Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

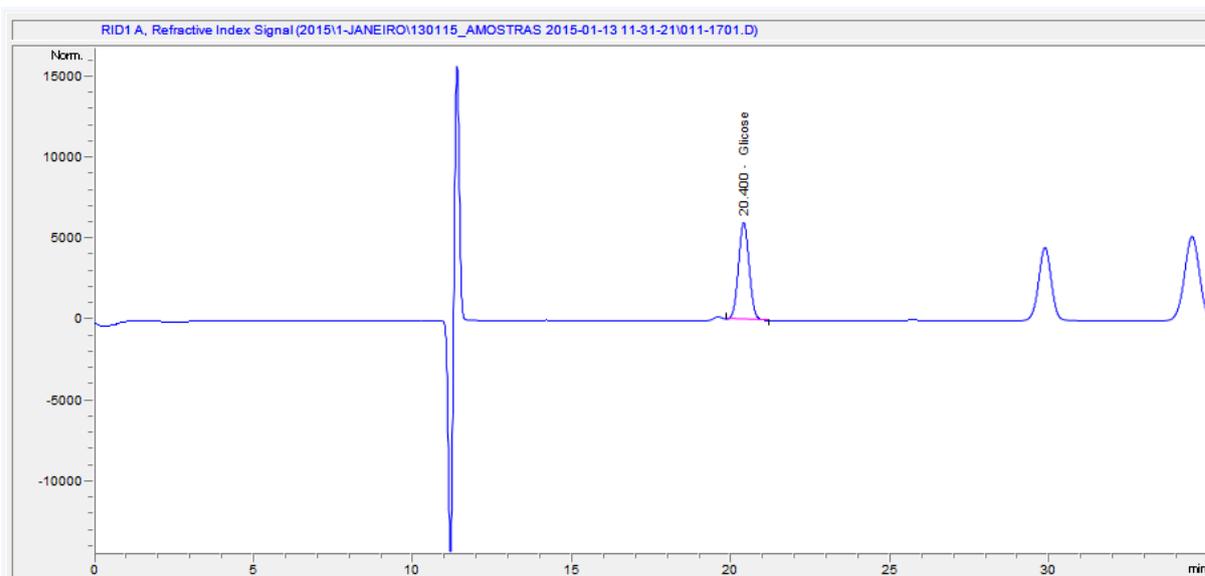
**APÊNDICE E – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DOS PONTOS 2 E 3
DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE D-(+)-GLICOSE, E A AMOSTRA DE ARROZ
BRANCO**



Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

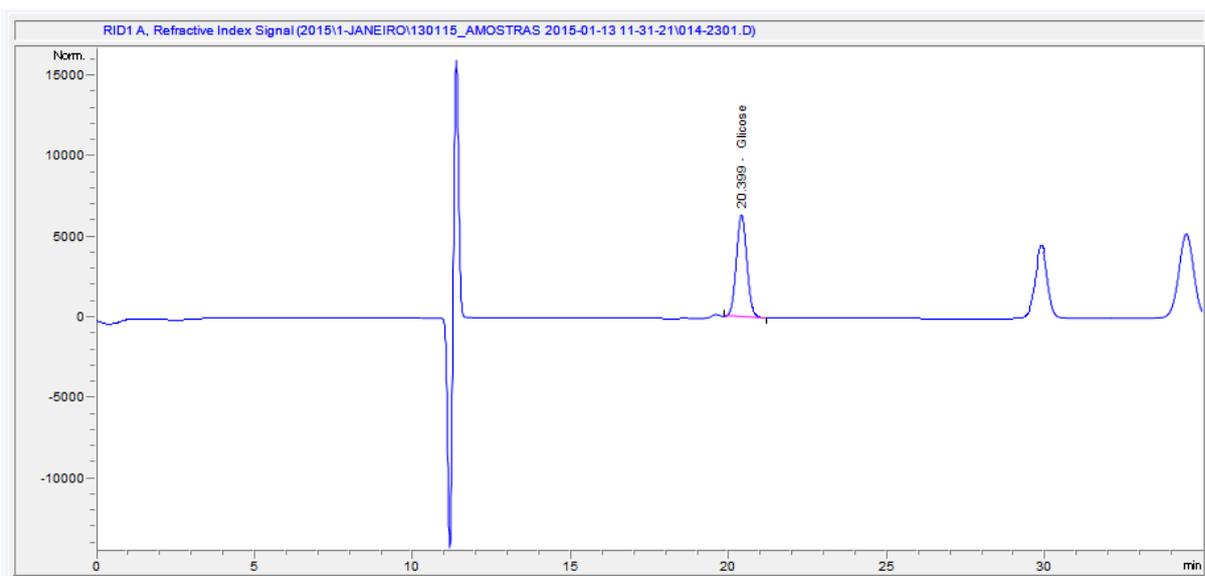
APÊNDICE F – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE ARROZ ANALISADAS

- Arroz Basmati.



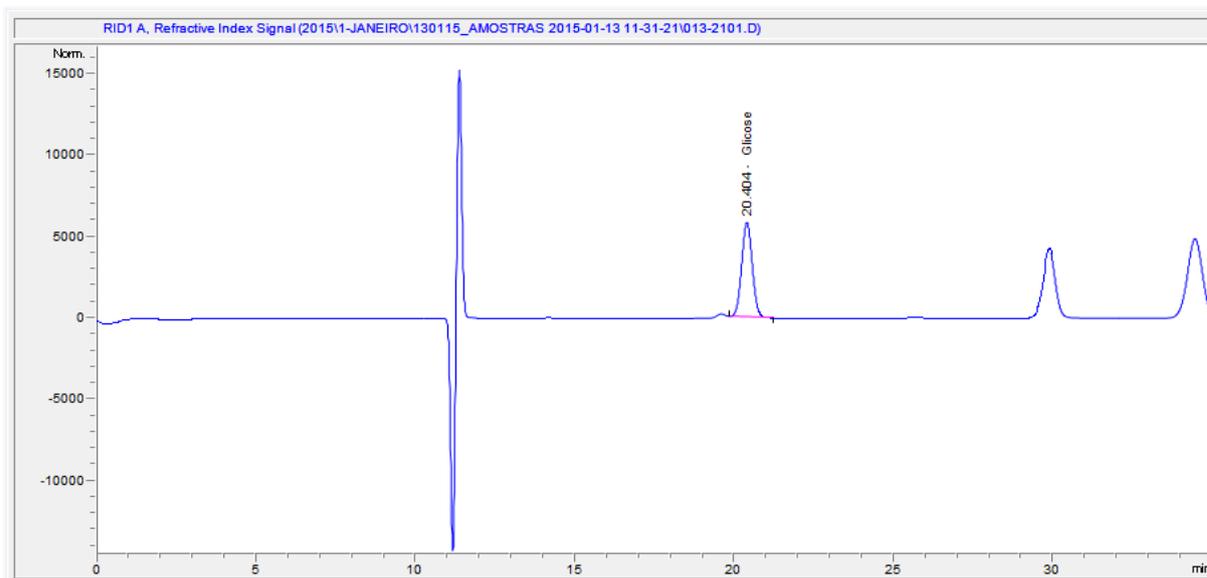
Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

- Arroz Branco.



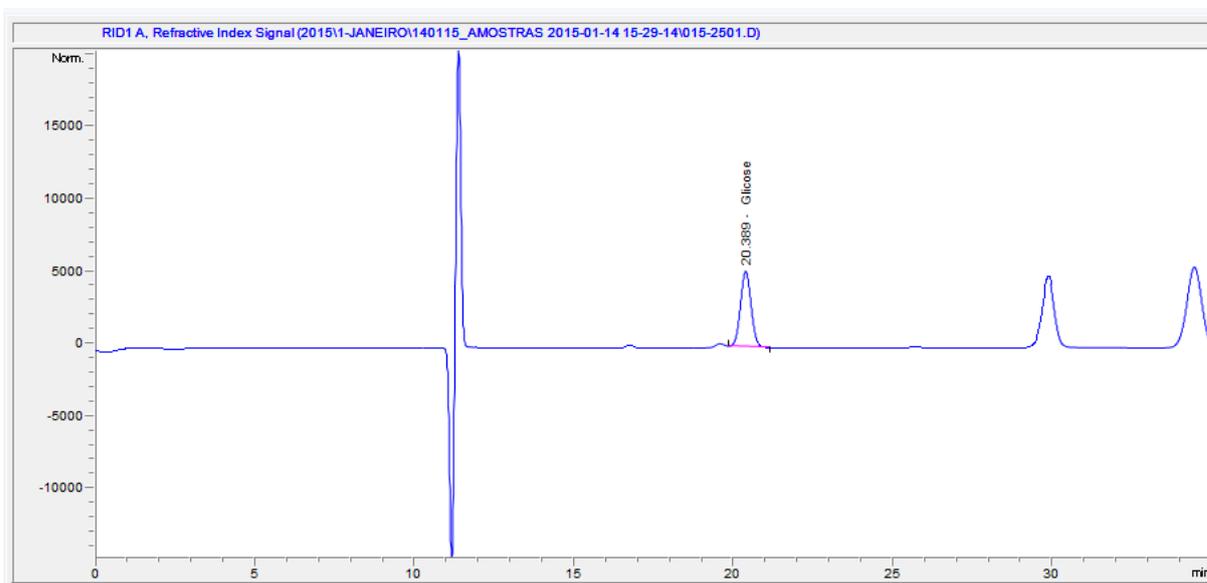
Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

- Arroz Carnaroli



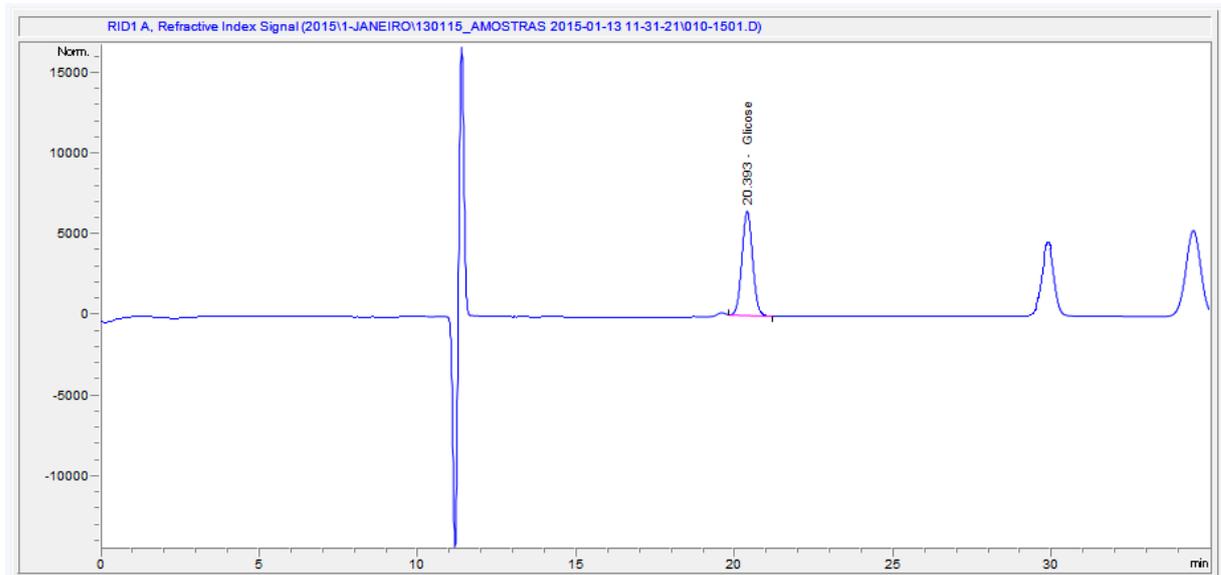
Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

- Arroz Integral



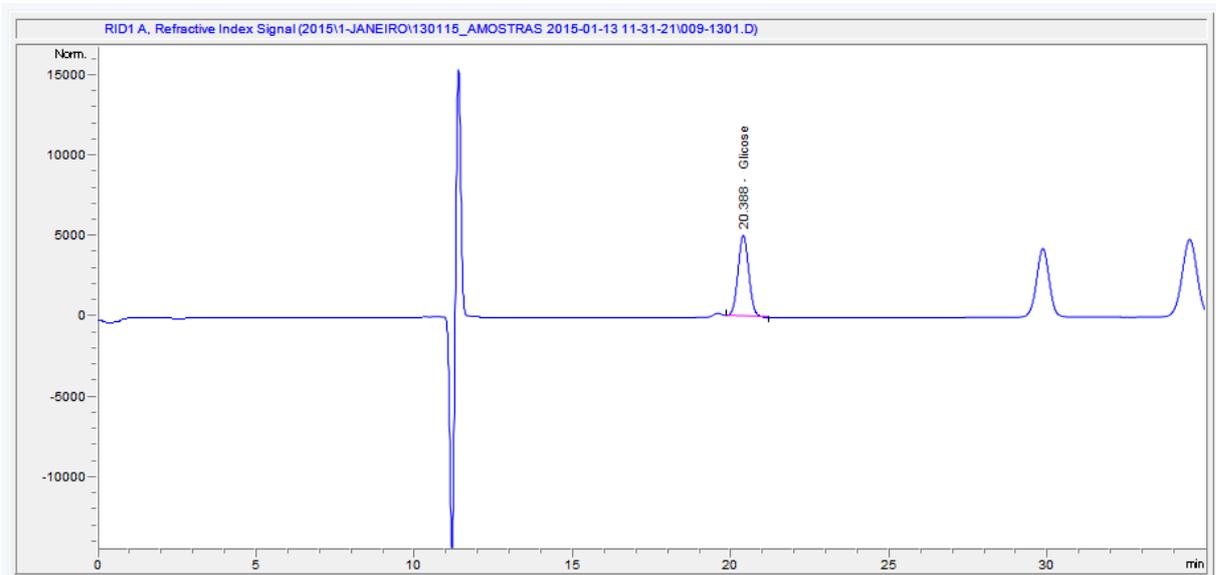
Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

- Arroz Jasmin



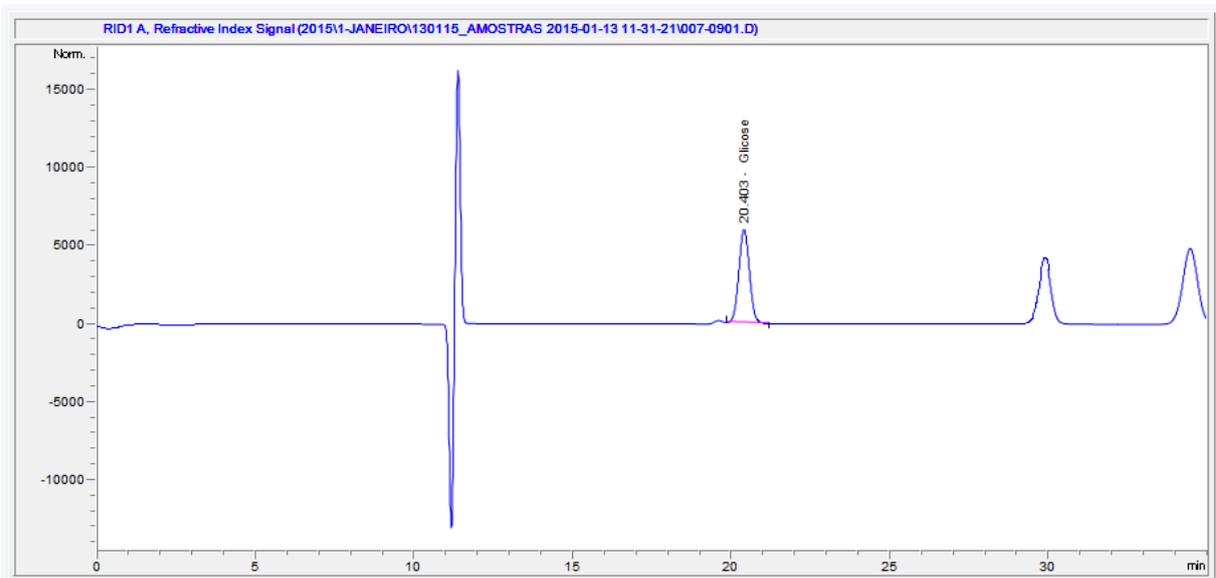
Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

- Arroz Negro



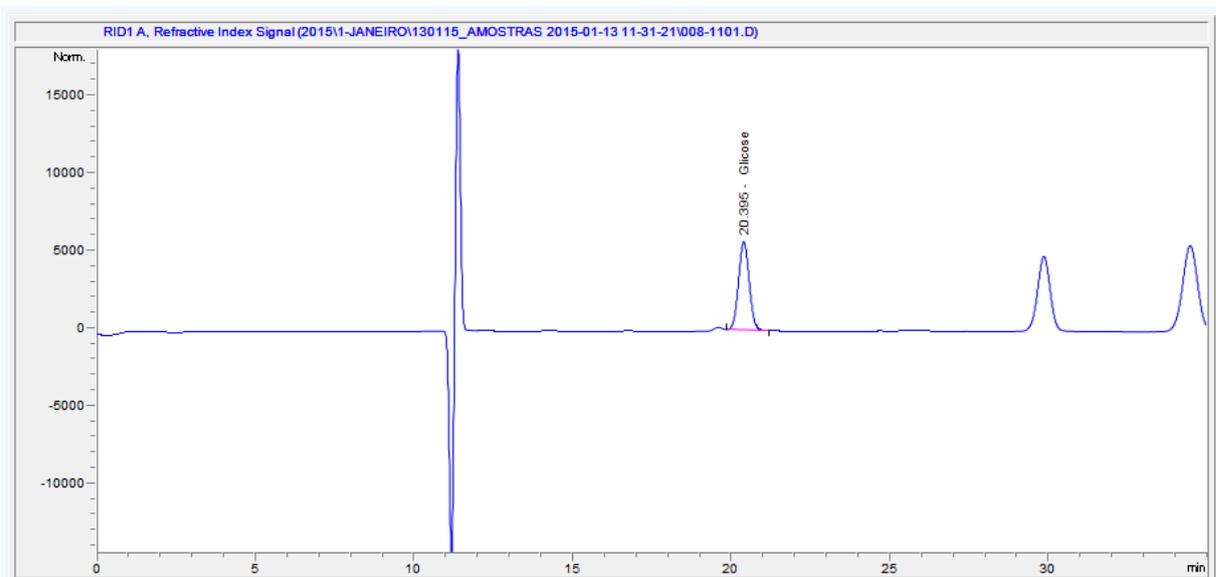
Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

- Arroz Sasanishiki



Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies

- Arroz Vermelho



Fonte: Software Openlab – Agilent Technologies