

SEPARAÇÃO DA AMILOSE DE FECULA DE MANDIOCA POR PRECIPITAÇÃO QUÍMICA.

Cassava starch fractionation and amylase recovery

Cláudio CABELLO¹

Irene Miuki SAITO²

RESUMO

A determinação das concentrações de amilose e amilopectina em amidos é parâmetro de importância para indústrias de alimentos e diversos métodos têm sido propostos para efetuar esta quantificação, que necessita de padrões de um destes polissacarídeos. Buscou-se neste trabalho, separar a amilose para ser utilizada como padrão em análises de amostras da mesma espécie vegetal. Foi utilizada a precipitação com 1-butanol seguida do fracionamento através de centrifuga de alta rotação, eliminando-se frações contaminantes, tendo sido isoladas concentrações razoáveis de amilose. Análises por cromatografia de permeação em gel por exclusão de tamanho (GPC) indicaram a eficácia do processo de separação. Verificou-se que a concentração de 0,1 mg de iodo no reagente foi a mais adequada para complexação com 0,4 mg de amilose. A metodologia aplicada revelou-se simples e eficiente, permitindo a obtenção de amilose de mandioca por processo simplificado.

Palavras-chave: precipitação química, fracionamento de amido, permeação em gel, GPC.

SUMMARY

Starch is a polysaccharide composed by amylose and amylopectin. The proportion of these polymers is an important parameter for the food industry. Several methods have been employed to identify the structure and functional properties of these polymers. This work had as purpose to evaluate a new methodology to isolate the amylose fraction from cassava starch to use it as pattern in starch analysis. It was used precipitation with 1-butanol and fractionation in centrifuge. The gel permeation chromatography (GPC) of the amylose, showed the efficiency of the process. The results showed that 0.1 mg of iodine in the reagent was the ideal concentration to complex with 0.4 mg of amylose. The method studied can be considered simple and accurate and could be an alternative to obtain amylose from cassava starch at low cost.

Keywords: *chemical precipitation, starch fractionation, gel permeation, GPC.*

¹ Prof. Dr. Diretor CERAT/Botucatu, e-mail dircerat@fca.unesp.br

² Bolsista Pós-Doutorado no CERAT/UNESP/Botucatu, e-mail imsaito@fca.unesp.br

1. INTRODUÇÃO

A fécula de mandioca é obtida por extração mecânica de raízes trituradas e apresenta um teor médio de amido de aproximadamente 97% em peso seco (Cereda, 1979). Submetendo-se uma suspensão aquosa de fécula a um aumento progressivo da temperatura, observa-se sua transformação numa substância gelatinosa, de aspecto esbranquiçado, quando é ultrapassada a faixa de 52 a 65°C. Esta goma viscosa é composta por dois polissacarídeos principais: a amilose de cadeia linear e a amilopectina com cadeia ramificada (Bobbio & Bobbio, 1989). Estes polissacarídeos são constituídos de unidades de D-glicose, unidas por ligações do tipo α -1,4 e α -1,6 que podem ser hidrolisadas por tratamento ácido/térmico ou enzimático através de enzimas amilolíticas (Whistler & Daniel, 1984). Os polissacarídeos diferem-se pelo fato da amilopectina apresentar ramificações laterais à cadeia principal de grande tamanho e conseqüentemente exigir um tratamento diferenciado para sua completa hidrólise. Este polissacarídeo apresenta-se em cadeias de elevadas massas moleculares, o que confere às suas soluções características de alta viscosidade e encontram aplicações em alimentos. Os grânulos de amido apresentam também outros componentes tais como: proteínas, lipídios e minerais, que em maior ou menor proporção, afetam o comportamento de suas pastas.

A amilose formada por unidades de D-glicose ligadas entre si por ligações do tipo α -1,4 pode apresentar um pequeno número de ramificações e o seu grau de polimerização (DP) médio varia conforme a origem botânica do

amido assim como a concentração percentual em relação à amilopectina (Buleon et al., 1998). O conteúdo de amilose num amido é um parâmetro de importância na indústria de alimentos, uma vez que ele pode influenciar fortemente as propriedades físico-químicas da fécula, tais como viscosidade, retrogradabilidade, solubilidade e absorção de água, bem como sua interação com outros componentes do alimento aonde seja adicionada (Suortti et al., 1998). A concentração de amilose nos amidos varia conforme a sua origem botânica, a variedade da espécie e também do método utilizado para a separação. Por esta razão é de interesse dispor de um método preciso para avaliar o conteúdo de amilose numa fécula considerando a sua origem botânica.

O clássico método de separação do polissacarídeo amilose é realizado por precipitação seletiva, utilizando-se a propriedade de complexação com 1-butanol e conseqüente separação por centrifugação. Diversas variações deste método têm sido utilizadas (Taki et al., 1988). Na determinação das concentrações de amilose em amostras de amidos, o método de escolha tem sido o de espectrofotometria molecular, medindo o complexo cromóforo formado pela amilose e íons de iodo, conseqüência da formação de um complexo na forma de hélice (Knutson, 1999). Devido à sua razoável reprodutibilidade e principalmente à rapidez e baixo custo das análises efetuadas tem sido intensamente utilizado em procedimentos analíticos.

O objetivo deste trabalho foi descrever uma metodologia simplificada para obtenção de amilose de fécula de mandioca e utilizá-la como

padrão em determinações de concentrações deste polissacarídeo, nas amostras de material de mesma origem botânica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A fécula utilizada nos experimentos, é produzida comercialmente na região de Palmital e Candido Mota, SP, onde predominam as variedades Branca de Santa Catarina e Roxinha. Foi utilizada fécula de mandioca de um mesmo lote, fornecida pela Halotek-Fadel Ltda - Palmital-SP.

2.2 Purificação da fécula

As amostras de fécula foram suspensas em água à pH neutro e temperatura ambiente e, após a sua decantação, que ocorreu em aproximadamente 2 horas, a fase aquosa foi removida e o precipitado lavado com água. Após serem realizadas cinco operações de lavagem, a fécula foi submetida a uma pré secagem em estufa a 40°C/24 horas. Em seguida foi seca até peso constante a 105°C.

Uma amostra de aproximadamente 50 g da fécula lavada e seca foi colocada em um aparelho Soxhlet para extração dos lipídios por refluxo com etanol, por aproximadamente 8 horas, sendo então removida e submetida a uma pré secagem em estufa a 40 °C/24 horas. Em seguida, foi seca até peso constante a 105°C em estufa com circulação de ar.

2.3 Fracionamento da fécula

2.3.1 Gelatinização e desramificação

Foi preparada uma suspensão aquosa de fécula purificada a 5% (p/v), ajustado o pH a 4,5 com adição de tampão acetato 2 M e adicionado 0,3 mL de enzima Pululanase da NOVO Nordisk. A suspensão foi então colocada em banho maria com agitação lenta por 30 minutos a 58°C e, em seguida, a temperatura foi elevada a 100°C e mantida por 15 minutos quando ocorreu a completa gelatinização. A temperatura foi abaixada para 58°C, tendo sido adicionado 0,3 mL de enzima Pululanase, e o sistema foi deixado em banho maria por 5 horas, após o que foi efetuada a inativação térmica da enzima. Na seqüência, foram adicionados 40 ml de 1-butanol, promovida uma forte agitação e mantido o material em repouso por 16 horas.

2.3.2 Etapa I da centrifugação

O material preparado conforme item 2.3.1 foi aquecido a 40°C e colocado para centrifugar por 30 minutos a 16.000 g em tubos plásticos tipo Eppendorf. O sobrenadante e aproximadamente 15% do volume da fração inferior do precipitado foram removidos e descartados. O material restante teve sua temperatura elevada a 100°C em banho maria por 10 minutos e, na seqüência, foram adicionados 40 mL de 1-butanol, seguido de agitação vigorosa e repouso por 16 horas.

2.3.3 Etapa II da centrifugação

O material preparado conforme item 2.3.2 foi aquecido 40 °C e colocado para centrifugar por 15 minutos a 16.000 g. O sobrenadante de aproximadamente 20% do volume da fração superior e 15% do volume da fração inferior do precipitado foram removidos e descartados. O

material restante foi estocado em solução etanólica a 50%.

2.4 Purificação do extrato de amilose

Uma amostra de aproximadamente 15 g da amilose obtida na etapa II da centrifugação, foi lavada com água para remover o etanol e dispersa em 50 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e aquecida em banho maria a 85 °C/15 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 mL de água destilada a 80 °C e o sistema foi colocado em banho maria a 100 °C/5 minutos. Foram adicionados 50 mL de 1-butanol, seguido de agitação e repouso por 3 horas. A seguir, o material foi centrifugado a 16.000 g/15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado recuperado com etanol para remoção do DMSO. Este precipitado foi lavado com água destilada e disperso num volume de 20 mL de água destilada formando um concentrado de amilose.

2.5 Identificação da amilose

A amilose foi identificada através da sua reação de complexação com o iodo, utilizando-se a espectrofotometria de absorção molecular. A solução de iodo foi preparada, dissolvendo-se 0,0330 g de iodo P.A em 0,1079 g de iodeto de potássio P.A e elevando o volume a 1000 ml. Cada mililitro desta solução apresenta 0,033 mg de íon iodato. As amostras de amilose de aproximadamente 0,4 mg foram misturadas a 3 ml desta solução de iodo, repousavam por 15 minutos e a seguir foram feitas as medidas no espectrofotômetro. Foi utilizado um espectrofotômetro da Hewlett Packard modelo 8453, equipado com detector de varredura

(“diodo array”), para obtenção de curvas de absorção na faixa de 250 a 800 nm.

2.6 Permeação em coluna cromatográfica

Foram utilizadas colunas marca Amersham Pharmacia Biotech modelo XK 26/100 com diâmetro interno de 26 mm e comprimento total de 100 cm, sendo providas de dupla parede (jaqueta) que permitiu a manutenção de temperatura controlada através de circulação de água termostaticada a 25°C.

Foram utilizados no enchimento das colunas Sephadex G-75 grau médio que tem faixa de exclusão para dextrina estimada entre 1×10^2 a 1×10^4 Daltons. Soluções de amilose foram aplicadas no injetor de amostra na quantidade de 8,5 mL e introduzidas na coluna por arrastamento pela fase móvel água deionizada à taxa de 20 mL/hora. O coletor automático foi programado para coletar em cada tubo de ensaio, frações de 100 gotas que equivalem a 3 mL sendo que o início da coleta de frações foi em 2 horas após injeção da amostra, pois antes destes tempos nenhum soluto permeou completamente o gel e emergiu da coluna. Ao final da corrida cromatográfica, quando se atingia o último tubo, o coletor era desligado juntamente com o bombeamento da fase móvel. Em cada amostra coletada foi medida a concentração de carboidratos conforme item 2.7 e comprimento de onda máximo de absorção do complexo amilose-iodo formado pela adição de solução de iodo descrita no item 2.5.

2.7 Determinação da concentração de amilose

Nas amostras de permeado obtidas na cromatografia da amilose, foram realizadas determinações da concentração de carbono orgânico total utilizando um espectrofotometro gasoso de absorção no infravermelho marca Shimadzu, modelo TOC-5000A instalado no Laboratório de Análises do CERAT/UNESP. Cada amostra era previamente filtrada em membrana 0,22 μm e foi tomado o valor médio de três injeções de amostras consecutivas para determinar a concentração em ppm de carbono. Amostra padrão de biftalato de potássio ($\text{C}_8 \text{H}_5 \text{O}_4 \text{K}$) equivalente a 1.000 ppm de carbono foi injetada para efetuar ajustes na curva de calibração. A concentração de amilose foi determinada indiretamente através do valor da concentração de carbono multiplicado conforme metodologia proposta por Silva & Cabello (2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma amostra qualquer de fécula de mandioca amido gelatinizada após reagir com uma solução de iodo, apresenta espectro do complexo formado entre o iodo e os polissacarídeos amilose e amilopectina, com três picos principais, que ocorrem nos intervalos de: 288 a 292 nm; 349 a 352 nm e 628 a 640 nm.

Algumas variações nestes valores podem ser observadas, as quais dependem das concentrações relativas do iodo e de amilose e/ou amilopectina. Verificou-se experimentalmente, que 3,0 mL da solução de reagente iodo (0,1 mg) foram suficientes para as dosagens de amostras com até 0,4 mg de amilose. McGrance et al. (1998) utilizaram

metodologia semelhante e observaram uma concentração mínima de 72,7 mg/L de amilose para 57,5 mg/L de iodo.

A Tabela 1 mostra os comprimentos de onda (nm) dos picos de absorção de diferentes massas de fécula de mandioca gelatinizada e os respectivos valores de absorbância. A presença da amilose na reação de complexação com o iodo, produz uma diminuição no valor da absorção na faixa de 288 nm e simultâneo incremento na faixa de 630 nm. Jarvis & Walker (1993) também observaram este efeito utilizando amilose pura para produção do complexo com iodo. Na Figura 1 estão apresentados os espectros da solução de iodo e as amostras. Observam-se os picos característicos da solução de iodo com absorção máxima em 288 e 352 nm, os quais apresentaram menor altura quando esta solução complexava com 0,2, 0,4 e 0,6 mg de amido hidrolisado.

TABELA 1. Absorbância (A) máxima do complexo do iodo com correspondentes massas de fécula de mandioca gelatinizada.

AMOSTRA	PICO 1 (nm)	A (AU)	PICO 2 (nm)	A (AU)	PICO 3 (nm)	A (AU)
Reagente iodo*	288	1.485	352	0.986	n/c	0
Hidrolisado (0,2 mg)	288	1.341	352	1.037	653	0.612
Hidrolisado (0,4 mg)	289	1.339	351	1.159	627	1.149
Hidrolisado (0,6 mg)	290	1.131	351	1.091	639	1.503

* O reagente iodo foi usado como referência.
n/c – não caracterizado

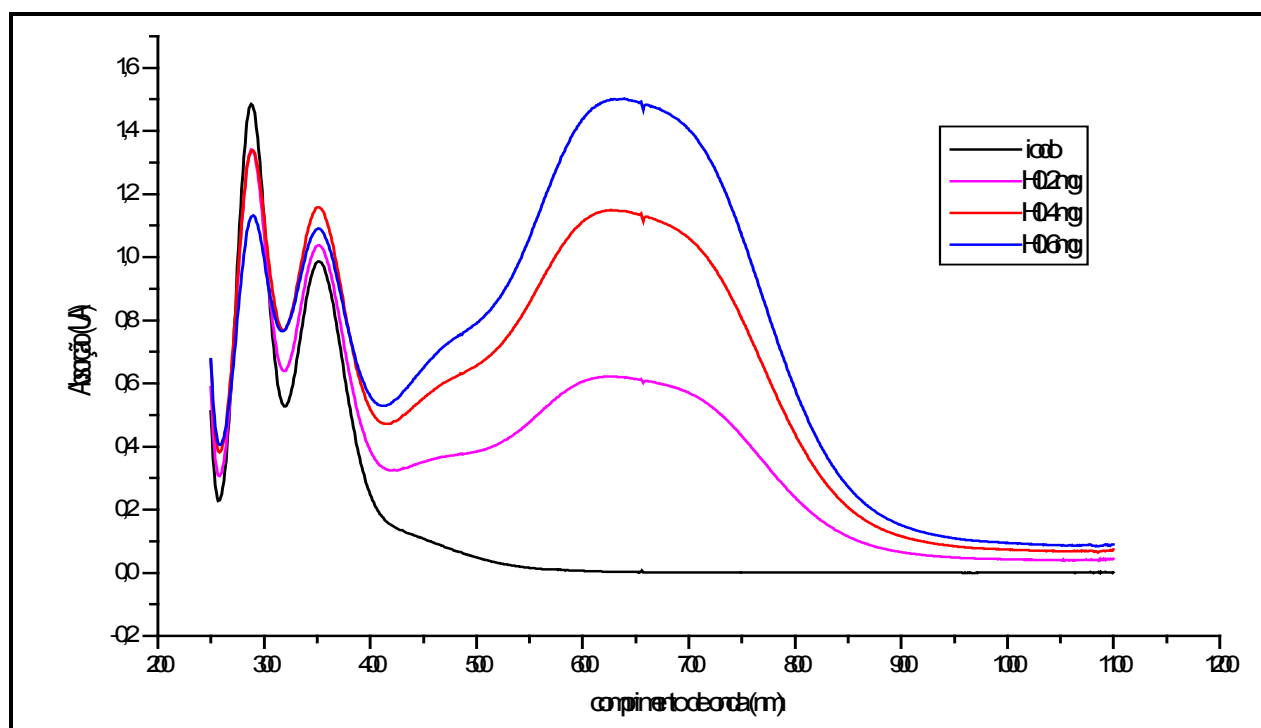


FIGURA 1. Curvas dos espectros da solução de iodo complexado com 0,2, 0,4 e 0,6mg de hidrolisado de fécula de mandioca gelatinizada.

Através dos espectros da Figura 1, observa-se que a partir de 400 nm o reagente iodo diminui sua absorção enquanto que o complexo formado com a amilopectina e a amilose incrementa fortemente atingindo seu máximo em torno de 630 nm. Knutson (1999) observou que as absorções máximas do

complexo iodo-amilose ocorrem entre 609 a 624 nm e quando utilizava compostos com amilose de conhecida massa molecular este valor de absorção ocorre abaixo de 600 nm. Jarvis & Walker (1993) verificaram que as absorções ocorrem na faixa de 620-680 nm. Banks, Greenwood & Khan (1971) verificaram que o

comprimento de onda de máxima absorção do complexo com iodo está relacionado com o tamanho da cadeia polimérica da amilose segundo uma isoterma de absorção de Langmuir. Os ensaios efetuados consideraram a mesma amostra e mesma temperatura ambiente em torno de 25°C. Os espectros da Figura 1 sugerem a utilização da relação 0,1 mg de iodo para 0,4 mg de hidrolisado, por permitir identificar pequenas variações de concentração, sem afetar outras faixas do espectro.

No fracionamento da fécula, conforme estabelecido no item 2.3, houve necessidade de dois tratamentos com enzima pululanase, na concentração de aproximadamente uma unidade enzimática por grama de fécula, pois a presença de amilopectina, deixou altamente viscoso o hidrolisado, prejudicando deste modo a precipitação do complexo amilose-butanol. Foram realizados ensaios com outras concentrações de suspensões de fécula e verificou-se que a primeira concentração, de 5% (p/v), foi a mais adequada. Verifica-se na literatura a utilização de enzima desramificante isoamilase, para hidrólise das ligações tipo α -1,6, que também pode ser promovida pela enzima pululanase. A opção de utilização de pululanase deveu-se às suas características de suportar as condições de operação, tais como: pH de 4,5; temperatura de 60°C e pelo fato desta enzima ser considerada segura para a produção de alimentos (Jensen & Norman, 1984).

Na etapa I de centrifugação, retirou-se a parte inferior do precipitado, para remoção das fibras e outras substâncias insolúveis da fécula. Já na etapa II, a remoção da parte inferior do

precipitado visava remover algum contaminante remanescente, enquanto na parte superior, buscava-se remover amilose contaminada com algumas moléculas de amilopectinas que formavam uma massa gelatinosa de consistência de média viscosidade.

A etapa II objetivou aumentar a pureza da fração amilose e utilizou o DMSO como desramificante de amilose e amilopectina, facilitando a separação de molécula remanescentes de amilopectina “entrelaçadas” nas estruturas de amilose. A posterior precipitação do complexo amilose-butanol seguida de centrifugação, mostrou ser importante para a garantia de pureza da amilose recuperada.

No gráfico da Figura 2 pode-se observar os espectros das frações amilopectina que foi retirada do sobrenadante, amilose precipitada e reagente iodo. A absorção máxima da amilopectina ocorre em 541 nm e em seguida começa a diminuir rapidamente e simultaneamente ocorre um forte crescimento da curva de amilose que atinge absorção máxima em torno de 640 nm e diminui lentamente, formando uma espécie de patamar até 720 nm, quando então diminui abruptamente. Estes perfis sugerem a eficácia dos dois tratamentos para separação através da precipitação, que pode ser verificada pelas afinidades do reagente iodo com os respectivos polissacarídeos ocorrerem em faixas bastante distintas do espectro, quais sejam;

- amilopectina em 541 nm, complexo cromóforo de cor castanho avermelhado;
- amilose em 640 nm, complexo cromóforo de cor azul marinho.

A extinção máxima para a amilose foi observada em 640 nm.

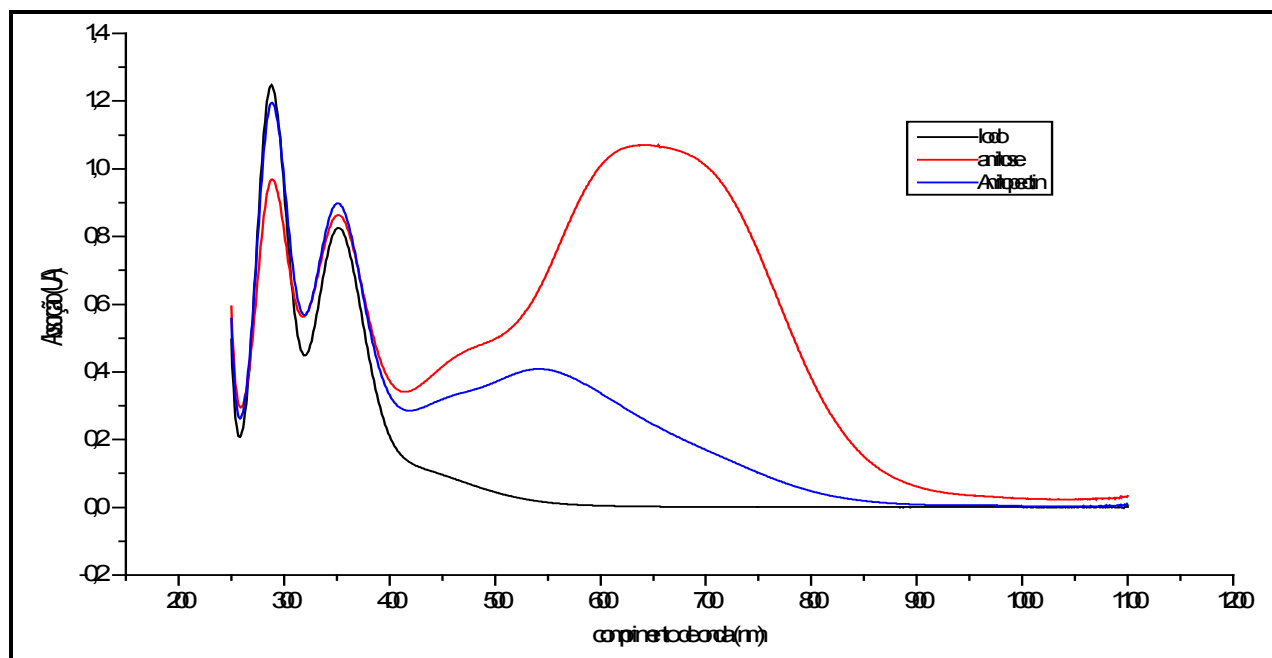


FIGURA 2. Espectro do reagente iodato complexado com amilose e amilopectina em comparação com o reagente sem complexação.

Estes valores de absorção também foram observados por Matheson & Welsh (1988) que utilizaram a propriedade cromófora da ligação iodo-amilose em amostras onde a amilopectina tinha sido removida utilizando uma lecitina, a Concanavalin A. Esta substância quando utilizada em determinadas condições de pH, temperatura e força iônica, efetua uma complexação com as cadeias de amilopectina através da extremidade não-redutora e provoca a precipitação deste complexo. Yun & Matheson, (1990) observaram que a fração precipitada com a Concanavalin A tinha peso molecular semelhante ao da amilopectina e formava complexo cromóforo com iodato com absorção máxima em 560 nm. O método pôde ser considerado eficiente mas não é adaptável para ser utilizado rotineiramente em determinações

quantitativas de amilopectina e/ou amilose pois requer muitas etapas na marcha analítica e consome reagentes de maior custo quando comparado a outros métodos. Gibson et al. (1997) observaram que o comprimento de onda máximo de absorção do complexo iodo-amilose aumentava com o incremento do grau de polimerização do polissacarídeo, mas neste trabalho não foi possível constatar este fato, pois a amostra utilizada de amido era de uma única variedade de mandioca.

Na Figura 3 observa-se o perfil de concentração de carboidratos das frações coletadas na permeação de amostra de amilose conforme descrito nos itens 2.6. Indica também os correspondentes comprimentos máximos de absorção do complexo amilose-iodo produzido

pelas reações de cada fração com iodo conforme item 2.5.

No intervalo K_{Av} 0,1 a 0,26 ocorre a permeação de praticamente toda a amilose injetada que produz uma variação de absorção do complexo cromóforo formado com o iodo com máximo em 648 e mínimo em 615 nm. No intervalo K_{Av} 0,27 a 0,40, o eluído ainda apresentava compostos com carbono mas que não foram capazes de produzir complexação com iodo, e indicando provavelmente serem

dextrinas com grau de polimerização menor do que seis unidades de "glicose anidra" (McGrance, Cornell & Rix, 1998). No outro intervalo de K_{Av} 0,68 a 0,85 observou-se um composto com carbono em sua composição mas que não complexava com o iodo. Análises com cromatografia líquida de alta resolução identificou como sendo traços remanescentes de 1-butanol que fora utilizado na etapa de separação.

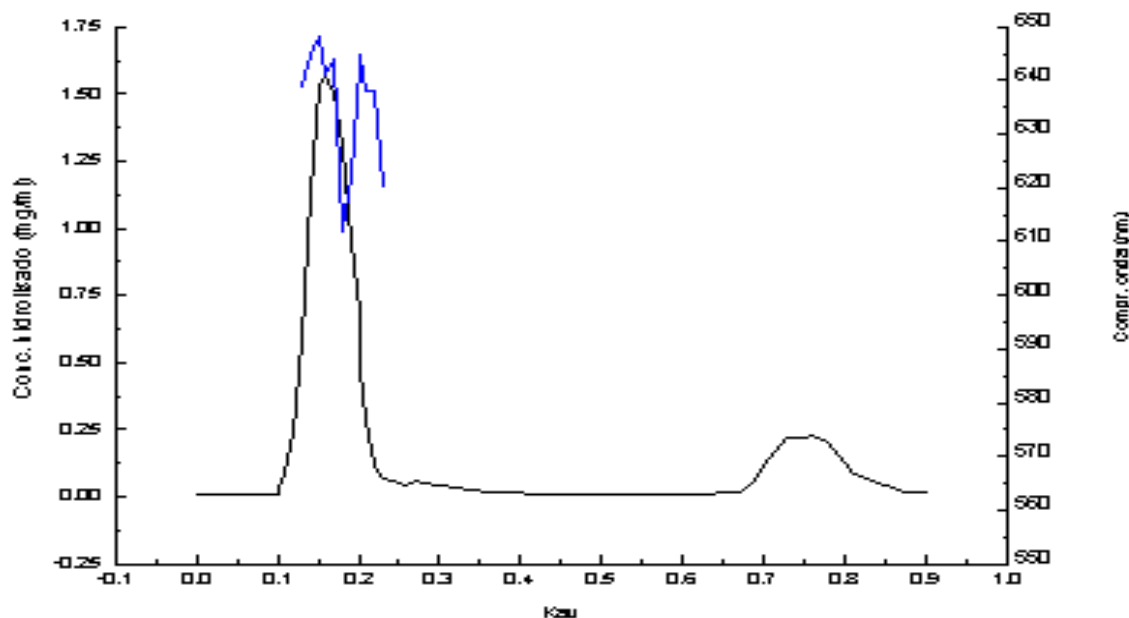


FIGURA 3. Perfil de eluição de amostra de amilose indicando as concentrações e respectivo comprimento de onda de absorção máxima em função do K_{Av} .

Observa-se no perfil de eluição que os carboidratos permeados que absorveram iodo são de tamanho aproximado e formam um conjunto de semelhante composto cromóforo absorvendo numa região típica e característica de amiloses.

4. CONCLUSÕES

Considerando o perfil cromatográfico e os correspondentes compostos cromóforos obtidos, pode-se concluir com relativa segurança que o processo de separação da amilose foi eficaz e produziu amilose concentrada com pureza

elevada. A metodologia aplicada para separação da amilose, foi considerada simples e de pequeno consumo de tempo, e com potencialidade de aplicação a amidos de outras espécies vegetais.

5. REFERENCIAS

- BARHAN, D.; TRINDER, P. Improved color reagent for determination of blood glucose by oxidase system. **Analyst**, New York, v. 97, p. 142-145, 1972.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Editora Varela Ltda, 11-70, 1989.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 23, p. 85-112, 1998.
- CEREDA, M. P. **Tecnologia do amido e fécula** - Introdução. Botucatu: Departamento de Tecnologia de Produtos Agropecuários, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 1979, 13p.(Mimeografada).
- GIBSON, T. S.; SOLAH, V. A.; McCLEARY, B. V. A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. **Journal of Cereal Science**, v. 25, p. 111-119, 1997.
- HOLM, J.; BJORCK, I.; DREWS, A.; ASP, N.-G. A rapid method for the analysis of starch. **Starch**, v. 38, p. 224-226, 1986.
- JARVIS, C. E.; WALKER, J. R. L. Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin. **J. Sci. Food Agric.** v. 63, p. 53-57, 1993.
- JENSEN, B. F.; NORMAN, B. E. Bacillus acidopullulyticus: Application and regulatory aspects for use in the food industry. **Process Biochemistry**, v. 8, p. 129-134, 1984.
- KNUTSON, C. A. Evaluation of variations in amylose-iodine absorbance spectra. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 65-72, 1999.
- LLOYD, N. E., NELSON, W. J. Glucose and fructose containing sweeteners from starch. In: WHISTLER, R.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. **Starch Chemistry and Technology**, 2nd ed. Orlando: Academic Press, 1984. p. 611-60.
- MATHESON, N. K.; WELSH, L. A. Estimation and fractionation of the essentially unbranched (amylose) and branched (amylopectin) components of starches with concanavalin A. **Carbohydrate Research**, v. 199, p. 195-205, 1990.
- McGRANCE, S. J.; CORNELL, H. J.; RIX, C. J. A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products. **Starch**, v. 50, p. 158-163, 1998.
- TAKI, M.; SUZUKI, K.; TAKI, A.; HISAMATSU, M.; YAMADA, T. Gel chromatography of residue and extract obtained from starch granules by hot aqueous 1-butanol solution treatment. **Starch**, v. 40, p. 177-181, 1998.

SILVA, F. I.; CABELLO, C. Caracterização das estruturas moleculares de amido de mandioca utilizando metodologia de permeação em gel. **Energia na Agricultura**, v. 21, n. 1, p. 50-68, 2006.

SUORTTI, T.; GORENSTEIN, M. V.; ROGER, P. Determination of the molecular mass of amylose. **Journal of Chromatography A**, v. 828, p. 515-521, 1998.

YUN, S. H.; MATHESON, N. K. Estimation of the amylose content of starches after precipitation of amylopectin by concanavalin A. **Starch**, v. 42, p. 302-305, 1990.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Molecular structure of starch. In: WHISTLER, R.; BeMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. **Starch Chemistry and Technology**, 2^aed. Orlando:Academic Press, 1984. p. 153-82.