UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Caracterização parcial de carboidrases, morfologia do grão
de amido e composição centesimal de raízes de maca**
(Lepidium meyenii Walpers)

Gerby Giovanna Rondán Sanabria

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Flávio Finardi Filho

São Paulo
2005

Gerby Giovanna Rondán Sanabria

**Caracterização parcial de carboidrases, morfologia do grão
de amido e composição centesimal de raízes de maca
(*Lepidium meyenii* Walpers)**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Flávio Finardi Filho
Orientador presidente

Deborah Helena Markowicz Bastos
1º. examinador

Ursula Maria Lanfer Márquez
2º. examinador

São Paulo, 14 de dezembro de 2005

Aos meus queridos pais Edgar e Paquita, por terem me guiado durante o transcorrer da minha vida profissional com responsabilidade e amor, e pela oportunidade de poder realizar este trabalho.

Aos meus anjos da guarda que sempre me protegeram: à virgem de Chapí, minha adorada vovó, minha querida irmã e minha amiga Anita, que Deus as tenha em sua glória.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realizar o Mestrado e pela contribuição a minha formação profissional.

Quero agradecer de forma especial a meu orientador professor Dr. Flávio Finardi Filho por me aceitar como sua aluna, pela orientação, apoio e confiança durante o transcorrer deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Às professoras Úrsula Maria Lanfer e Deborah H. Markowicz Bastos por terem participado da banca de qualificação, pelos comentários, correções e valiosas sugestões que ajudaram a melhorar o trabalho.

Ao professor Pedro Kiyohara do laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física - USP, pela realização das fotografias do amido da maca.

Um agradecimento especial a Tatiana da Costa Raposo Pires pelo carinho e amizade, pela atenção e disponibilidade de corrigir meu português durante o transcorrer do trabalho.

À professora Úrsula Maria Lanfer e às técnicas Rosa e Cynthia do laboratório de alimentos pela disponibilidade do uso dos aparelhos e pela atenção.

Aos meus irmãos Julio, Mary, Yeny, Manuel e Diana, pela força e incentivo durante esta importante fase de minha vida, em especial ao meu querido irmão Edgar pelo apoio incondicional desde minha chegada ao Brasil.

Ao Juan Roberto Rodriguez, pelo amor, apoio, compreensão e paciência, apesar da distância e das dificuldades.

Às colegas e amigas do laboratório pela companhia e colaboração em especial a Patrícia, Mariana e Cintião pela amizade, momentos de alegria e pelos ensinamentos de português.

Aos meus amigos de sempre Érika e Saul que sempre torceram por mim desde o Peru.

À minha cunhada Márcia Almeida pela amizade e pela convivência agradável.

À Joana por manter o laboratório limpo e agradável para trabalhar.

E a todos os alunos e funcionários do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental que contribuíram direta o indiretamente para a elaboração deste trabalho.

RESUMO

A maca é uma raiz aromática com 52 a 76% de carboidratos e seu período de conservação pós-colheita é bastante longo, sem demonstrar sinais de deterioração. O mecanismo de degradação do amido e dos componentes da parede celular via ação enzimática não eram ainda conhecidos. O objetivo do trabalho foi caracterizar a ação de enzimas amilolíticas e pectinolíticas nessas raízes, bem como a morfologia do grânulo de amido e a composição centesimal. Os resultados mostraram que foi obtida a purificação parcial de β -amilase com peso molecular aproximado de 57 kDa, com atividade máxima a 40,7 °C e pH de 5,1. A pectinesterase foi extraída a pH 6,0 com maior atividade a 49,4°C e pH 6,6 a maior atividade da poligalacturonase foi a 46 °C e pH 5,4, quando extraída a pH 8,5. O teor de amido total foi de 8,92%, os grânulos apresentaram morfologia oval em observados em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

ABSTRACT

Maca is an aromatic root that contends 52 to 76 per cent of carbohydrates and is very stable for a long period without signals of deterioration. The degradation mechanisms of the reserve carbohydrates and the cell wall components by enzymatic way had not been described yet. The main objective of this study was the identification of inner enzymes which degrades the starch and the pectins; the others objectives were the analysis and the morphology of the starch grains as well as the root's contend composition.

The results showed that was obtained the partial purification of a β -amylase, characterized by the molecular mass of 57 kDa, with a highest activity at 40.7 °C and pH 5.1. The pectinesterase was extracted with a pH of 6.0 and its maximum activity was at 49.4 °C and pH 6.6; the polygalacturonase was extracted with a pH of 8.5 and its top activity was achieved at 46 °C and pH 5.4. The total contend of starch was 8.92 % and the grains had an oval morphology observed by SEM.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Amido.....	7
2.2 Enzimas amilolíticas.....	10
2.2.1 α -Amilases.....	10
2.2.2 β -Amilases.....	13
2.2.3 Glicoamilases.....	15
2.2.4 Isolação e purificação de enzimas amilolíticas.....	16
2.3 Pectina.....	18
2.4 Enzimas pectinolíticas.....	19
2.4.1 Pectinesterase.....	20
2.4.2 Poligalacturonase.....	21
2.4.3 Pectato liase.....	22
3. OBJETIVO.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Material vegetal e reagentes.....	25
4.2 Métodos.....	25
4.2.1 Composição centesimal.....	25
4.2.1.1 Umidade.....	26
4.2.1.2 Lipídeos.....	26
4.2.1.3 Proteína.....	26
4.2.1.4 Cinza	26
4.2.1.4 Fibra.....	26
4.2.2 Extração, purificação e caracterização parcial de enzimas amilolíticas	27
4.2.2.1 Extrato enzimático.....	27
4.2.2.2 Determinação da atividade amilolítica.....	27

4.2.2.3	Determinação de açúcares redutores.....	29
4.2.2.4	Determinação do teor de proteínas.....	29
4.2.2.5	Fracionamento com sulfato de amônio.....	29
4.2.2.6	Cromatografia em DEAE-Celulose.....	30
4.2.2.7	Cromatografia em Carboximetilcelulose.....	31
4.2.2.8	..Eletroforese.....	31
4.2.2.9	Determinação do peso molecular nativo da enzima purificada.....	32
4.2.2.10	Metodologia de superfície de resposta.....	32
4.2.3.	Extração e caracterização parcial de enzimas pectinolíticas.....	4
4.2.3.1	Extrato enzimático.....	34
4.2.3.2	Determinação da atividade pectinesterásica (PE).....	35
4.2.3.3	Determinação da atividade poligalacturonásica (PG).....	36
4.2.4	Caracterização de grânulos de amido.....	37
4.2.4.1	Extração do amido.....	37
4.2.4.2	Determinação do teor de amido total.....	38
4.2.4.3	Morfologia dos grânulos de amido.....	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	Composição centesimal.....	39
5.2	Atividade amilolítica total, amido total e açúcares redutores.....	40
5.3	Purificação da enzima amilolítica.....	43
5.3.1	Fracionamento com sulfato de amônio.....	43
5.3.2	Purificação da β -amilase.....	45
5.3.3	Homogeneidade das etapas de purificação.....	51
5.3.4	Metodologia de superfície e resposta (MSR) para a otimização dos valores ótimos de pH e temperatura para atividade β -amilásica.....	53
5.4	Extração e caracterização parcial de enzimas pectinolíticas.....	57
5.4.1	Extração e detecção de atividade PE e PG.....	57
5.4.2	Metodologia de superfície de resposta e caracterização dos valores ótimos de temperatura e pH de atividade enzimática.....	58
5.4.3	Valores ótimos de pH e temperatura para atividade PG.....	60
5.4.4	Valores ótimos de pH e temperatura para atividade PE.....	63
5.5	Extração do amido.....	66

5.5.1	Morfologia dos grãos de amido.....	66
6.	CONCLUSÕES	70
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

Lista de Figuras

Figura 1	A maca em seus diversos estágios de cultivo.....	3
Figura 2	Estrutura da amilose e da amilopectina em um grânulo de amido...	9
Figura 3	Estrutura primária de uma molécula de pectina.....	19
Figura 4	Hidrólise da ligação metil-éster do ácido poligalacturônico da pectina, devido à ação da PE	21
Figura 5	A PG quebra a ligação glicosídica da pectina por hidrólise.....	22
Figura 6	Quebra da ligação glicosídica da pectina por β -eliminação pela ação de pectatoliase	23
Figura 7	Distribuição da atividade amilolítica total, α e β -amilases nas deferentes frações precipitadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45
Figura 8	Perfil de eluição de proteínas de maca com atividade amilolítica, empregando cromatografia de troca aniônica (DEAE-Celulose).....	46
Figura 9	Perfil de eluição de proteínas extraídas de maca, aplicadas em cromatografia de troca catiônica (CMC).....	48
Figura 10	Eletroforese SDS e não-dissociantes.....	52
Figura 11	Curva de calibração da cromatografia de filtração em gel.....	53
Figura 12	Modelo de superfície de resposta para atividade β -amilásica em função do pH e temperatura.	56
Figura 13	MSR, valores observados versus valores previstos para atividade β -amilásica.....	56
Figura 14	pH de extração para poligalacturonase e pectinesterase.....	58
Figura 15	Modelo de superfície de resposta para atividade PG em função do pH e temperatura.....	62
Figura 16	Valores observados versus valores previstos para a melhor atividade PG em extratos de maca.....	63
Figura 17	MSR para atividade pectinesterasica	65

Figura 18 Valores observados <i>versus</i> valores previstos para a atividade pectinesterásica.....	65
Figura 19 Morfologia dos grânulos de amido de maca.....	67
Figura 20 Comparação da morfologia dos grânulos de amido da maca com outras fontes	68
Tabela 1 Composição centesimal de raízes de maca em base seca.....	4
Tabela 2 Otimização de valores de pH e temperatura, para atividade da	
Tabela 3 Otimização de valores de pH e temperatura, para pectinesterase e	
poligalacturonase.....	37
Tabela 4 Composição centesimal de raízes de maca em base úmida.....	41
Tabela 5 Composição centesimal algumas fontes de vegetais.....	41
Tabela 6 Atividade amilolítica, açúcares redutores e amido total em raízes de maca.....	42
Tabela 7 Purificação parcial de amilases de extratos de maca.....	47
Tabela 8 Purificação parcial de β -amilase de extrato de maca.....	50
Tabela 9 Condições de ensaios de pH e temperatura de atividade β -amilase de diferentes fontes encontrados na literatura.....	54
Tabela 10 Valores da atividade β -amilase a diferentes pH e temperaturas em extratos de maca, usando como substrato o amido.....	54
Tabela 11 Valores significativos para atividade β -amilase em função do pH e temperatura, usando como substrato o amido.....	55
Tabela 12 Parâmetros ótimos de temperatura e pH para atividade PG, citados na literatura.....	59
Tabela 13 Condições de pH e temperaturas ótimas para atividade PE de diferentes frutas e vegetais.....	59
Tabela 14 Atividade enzimática da PG e PE em extratos de maca.....	61
Tabela 15 Valores significativos para atividade PG, em função do pH e temperatura.....	62
Tabela 16 Valores significativos para atividade PE, em função do pH e temperatura, do extrato enzimático de maca.....	64
Tabela 17 Distribuição do tamanho dos grânulos de amido de maca.....	67
Tabela 18 Comparação das propriedades físico químicas dos grânulos de amido.....	68

Lista de Tabelas

Tabela 1	Composição centesimal de raízes de maca em base seca.....	4
Tabela 2	Otimização de valores de pH e temperatura, para atividade da enzima purificada.....	34
Tabela 3	Otimização de valores de pH e temperatura, para pectinesterase e poligalacturonase.....	37
Tabela 4	Composição centesimal de raízes de maca em base úmida.....	41
Tabela 5	Composição centesimal algumas fontes de vegetais.....	41
Tabela 6	Atividade amilolítica, açúcares redutores e amido total em raízes de maca.....	42
Tabela 7	Purificação parcial de amilases de extratos de maca.....	47
Tabela 8	Purificação parcial de β -amilase de extrato de maca.....	50
Tabela 9	Condições de ensaios de pH e temperatura de atividade β -amilase de diferentes fontes encontrados na literatura.....	54
Tabela 10	Valores da atividade β -amilase a diferentes pH e temperaturas em extratos de maca, usando como substrato o amido.....	54
Tabela 11	Valores significativos para atividade β -amilase em função do pH e temperatura, usando como substrato o amido.....	55
Tabela 12	Parâmetros ótimos de temperatura e pH para atividade PG, citados na literatura.....	59
Tabela 13	Condições de pH e temperaturas ótimas para atividade PE de diferentes frutas e vegetais.....	59
Tabela 14	Atividade enzimática de PG e PE em extratos de maca.....	61
Tabela 15	Valores significativos para atividade PG, em função do pH e temperatura.....	62
Tabela 16	Valores significativos para atividade PE, em função do pH e temperatura, do extrato enzimático de maca.....	64
Tabela 17	Distribuição do tamanho dos grânulos de amido de maca.....	67
Tabela 18	Comparação das propriedades físico químicas dos grânulos de amido.....	68

1. INTRODUÇÃO

A maca é uma planta nativa da região dos Andes, que corresponde à espécie *Lepidium meyenii*, descrita por Walpers de Gerhard em 1843. Ela pertence à família Brassicaceae, e estima-se que seja cultivada há mais de dois mil anos (Leon, 1964). Acredita-se que o cultivo da maca tenha se estendido pela América do Sul nos séculos XII a XVI na região dos Andes, abrangendo a Bolívia, Equador, Colômbia, norte do Chile e norte da Argentina (Vilches, 1998). A parte comestível da planta é uma região da raiz que se intumescce durante seu desenvolvimento, denominada hipocótilo. Neste trabalho serão usados os termos raiz e hipocótilo como sinônimos.

Atualmente, o cultivo da maca encontra-se em seu maior apogeu nos Andes Centrais do Peru, em localidades com altitudes que oscilam entre 3.700 a 4.450 m, correspondentes aos chamados picos ecológicos Suni (3.500 m a 4.100 m) e Puna (4.100.m a 4.800 m), nos estados de Junin e Cerro de Pasco, e nas ribeiras do lago Chinhaicoca, onde a temperatura varia entre 4 e 7° C, mas algumas vezes chega a -10° C. Nesses locais, o cultivo de outras plantas vegetais seria impraticável (Cárdenas, 1998).

No império dos incas, esta espécie se constituiu um alimento para os nobres e uma oferenda para os deuses, sendo seu cultivo importante e abundante durante aquele período. Acredita-se que os guerreiros incas eram alimentados com porções de maca, pois se atribuía a esta planta a capacidade de dar vitalidade e força física aos combatentes, além de aumentar sua fertilidade. Após a conquista dos espanhóis no império inca (1532), a produção

de maca diminuiu, chegando ao perigo de extinção uma vez que seu habitat foi ocupado, em sua maioria, pelo gado e por novas espécies vegetais, como o pasto e a aveia forrageira (Vilches, 1998).

Até o ano de 1980, a área cultivada da planta não superava 25 hectares. Este fato foi o motivo pelo qual a maca fosse declarada, pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, como uma espécie em perigo de extinção. Porém, desde a década seguinte, a área de cultivo vem crescendo, sendo que nos anos de 1998 e 1999, superou 1.200 hectares (Vilches, 1998; Quiroz & Cardenas, 2004).

O ciclo de cultivo da maca ocorre em duas fases distintas: a primeira, denominada “fase vegetativa” ou “de produção de raízes para o consumo”, que varia entre 8 a 9 meses. Neste caso, as sementes são plantadas nos meses de setembro e novembro, quando começam as primeiras chuvas, e os hipocótilos são colhidos ao alcançarem seu volume máximo com as folhas ainda verdes, o que ocorre nos meses de maio, junho e julho. Posteriormente, a planta é secada ao sol por aproximadamente 15 dias para ser, então, comercializada. A segunda fase, denominada “fase reprodutiva” ou “de produção de sementes”, varia entre 5 a 6 meses, no qual é feita a seleção dos melhores hipocótilos, seguindo critérios de integridade, de raízes sadias e de raiz principal completa. Os hipocótilos são enterrados em poças até enraizarem e brotarem. Posteriormente, são transplantados até a etapa de produção de sementes, sendo colhidos nos meses de janeiro e fevereiro (Tello *et al.*, 1992) (Figura 1).

Figura 1 - A maca em seus diversos estágios de cultivo: A) sementes de maca; B) a planta; C) raízes de maca para o consumo (após 8 a 9 meses de crescimento); D) plantação da raiz de maca para a produção de sementes; E) e F) germinação da raiz, floração e produção de sementes.

Fonte: (Vilches, 1998).

Esta raiz vem sendo usada por muito tempo como alimento e planta medicinal no tratamento da infertilidade em homens e mulheres nas comunidades rurais do Perú (Quiros *et al.*, 1996; Vilches, 1998; Cicero *et al.*, 2001; Gonzáles *et al.*, 2001a), sendo considerada como alimento de alto valor nutritivo, semelhante ao de grãos de cereais, como milho, arroz e trigo (Li *et*

al., 2001), embora a informação nutricional disponível na literatura a respeito da maca seja escassa e contraditória (Dini *et al.*, 1994). Foram encontrados níveis de proteína entre 10 e 18% e altos valores de carboidrato, (59 a 68%), de fibra (3,85 a 8,5%) e de lipídeos (0,2 a 2,2%), assim como uma elevada quantidade de aminoácidos livres e consideráveis teores de minerais, como, cálcio e ferro, entre outros (Tabela 1) (Dini *et al.*, 1994a; Comas *et al.*, 1997; Canales *et al.*, 2000; Tellez *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Composição centesimal de raízes de maca, em base úmida (Dini *et al.*, 1994; Comas *et al.*, 1997; Tellez *et al.*, 2002).

Composição centesimal	(g/100g)
Umidade	5,00 -- 19,62
Proteína	10,10 – 18,25
Lipídeos	0,20 – 2,20
Carboidratos	51,81 – 76,05
Fibra	3,85 – 8,50
Cinzas	3,46 – 6,43
Açúcares	22,53 – 29,54
Amido	33,64 – 36,20
Vitaminas	(mg/100g)
Niacina	37,27 – 43,03
Acido ascórbico	0,80 – 3,52
Riboflavina	0,31 – 0,76
Tiamina	0,15 – 1,17
Minerais	(mg/100g)
K	1000 – 2050
Na	18,70 – 40,00
Mg	70,00 – 114,63
Ca	150,00 – 650,35
P	183,00 – 329,00
Oligoelementos	(mg/100g)
Cu	5,90
Zn	2,80 – 6,12
Mn	0,80
Fe	9,93 – 24,37
B	12 – 29 p.p.m.

A maca vem sendo consumida em diversas preparações: como suplemento em alimentos processados, especialmente dirigidos para crianças; em sucos, extratos e licores fermentados, consumidos por adultos com o objetivo principal de aumentar a fertilidade e a vitalidade sexual, e também como erva medicinal visando minimizar os sintomas da menopausa (Dini *et al.*, 1994). Mas a principal forma pela qual a maca invadiu o mercado peruano e internacional é a sua apresentação em cápsulas e/ou comprimidos, o que favoreceu o acesso a este alimento, ou medicamento, até então consumido apenas localmente (Vilches, 1997).

Recentemente, foi realizado um estudo no qual a administração oral de extratos de maca promoveu o aumento da disponibilidade sexual em ratos machos e fêmeas (Zheng *et al.* 2000; Gonzáles *et al.*, 2001b; Oshima *et al.*, 2003; Kyeong-Jun *et al.*, 2004). Foi verificado, também, que a administração oral de maca pulverizada melhorou o desempenho sexual em ratos machos. Outro estudo demonstrou que a maca apresenta elevada atividade antioxidante que estaria relacionada às catequinas e epigallocatequinas presentes (Sandoval *et al.*, 2002). Também é conhecido que raízes de maca contêm alguns fitosteróis como o campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e benzil isotiocianatos (Zheng *et al.* 2000; Li *et al.*, 2001). Assim como outros estudos referentes aos compostos presentes no óleo essencial e investigação de glucosinolatos e seus derivados (Piacente *et al.*, 2002, Tellez *et al.*, 2002, Muhammad *et al.* 2002; Dini *et al.*, 2002b).

Como já foi mencionado anteriormente, a maca apresenta uma elevada porcentagem de carboidratos estáveis, mesmo durante o longo período de conservação pós-colheita, sem apresentar deterioração aparente da raiz quando armazenada à temperatura ambiente, apresentando apenas perda de água até ficar seca. Assim, as raízes podem ser estocadas durante anos, o que facilita o seu processo de comercialização (Vilches, 1997; Cardenas *et al.*, 1998; Quiros *et al.*, 2004).

Neste trabalho o interesse foi estudar a presença e a atividade de enzimas relacionadas à hidrólise de carboidratos, como as amilolíticas e as pectinolíticas, os substratos e a composição dos hipocótilos de maca na forma seca como são comercializados em mercados peruanos. Na literatura consultada ainda não existem estudos relacionados a estas enzimas, as quais poderiam estar ausentes ou inibidas para a degradação do amido e da parede celular. Foram tomados como referenciais os estudos já realizados em raízes e tubérculos também originários da região central e andina da América do Sul, como a batata doce (Hagenimana *et al.*, 1994), a mandioca (Matos da Veiga, 2000) e a mandioquinha (Pires, 2002; Pires & Finardi, 2005). Estas raízes e tubérculos apresentam teores de amido maiores que a maca e vida de prateleira relativamente curta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Amido

O amido possui características químicas e físicas únicas, além de suas qualidades nutricionais, diferentemente de outros polissacarídeos (Bemmiller & Whistler, 1996). É a reserva mais abundante de todas as plantas, servindo como fonte primária de energia para muitos animais; está presente em raízes e tubérculos, tais como a mandioca, a batata, a mandioquinha, em sementes e grãos de cereais, como o trigo, o milho, a cevada e o sorgo, bem como em frutos e leguminosas, todas cultivadas em larga escala. Muitas vezes, essa produção conta com auxílio de técnicas modernas de agricultura, para a obtenção de vastas quantidades de amido (Godfrey & West, 1996). As fontes mais importantes de amido são os grãos de cereais, representando cerca de 40 a 90% de seu peso seco, as leguminosas, entre 30 e 70%, e os tubérculos, entre 65 a 85%, em base seca (Godfrey & West, 1996).

Na indústria de alimentos, o amido é a forma de carboidrato mais amplamente utilizada como ingrediente, aditivo, ou ainda, depois de hidrolisado, na forma de xaropes de glicose, maltose ou dextrina, ingredientes fundamentais ao processamento de alimentos, inclusive no processo tradicional de panificação (Berry & Paterson, 1990).

O amido tem estrutura relativamente simples, composto por moléculas de glicose, constituído por dois diferentes polímeros, a amilose e a amilopectina, em proporções que variam de acordo com a espécie e o grau de maturação ou de senescência que são característicos de cada fonte botânica (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura da amilose e da amilopectina em um grânulo de amido (Muralikrishna *et al.*, 2005).

A amilose é uma molécula linear formada por unidades de α -D-glicose unidas por ligações α -1,4, que representam entre 20 a 30% da composição do amido, apresentando um peso molecular de até 60.000 Daltons. Essa disposição molecular forma uma estrutura helicoidal através de pontes de hidrogênio de caráter lipofílico, com grupos hidroxila posicionados no lado externo da α -hélice. Essa estrutura possui a capacidade de formar complexos de cor azul com soluções aquosas de iodo-iodeto (Whitaker, 1996).

A amilopectina é o maior componente do amido (75 a 85%). É constituída por cadeias de α -D-glicopiranoses (de 10 a 500 milhões de unidades), unidas entre si por ligações α -1,6 nos pontos de ramificação e

contém apenas uma extremidade redutora na cadeia. A amilopectina é constituída por cadeias de 10 a 500 milhões de unidades de glicopirranose, apresenta uma estrutura esférica, com um peso molecular superior a um milhão de Daltons (Figura 2) (Bemmiller & Whistler, 1996).

Cerca de 70-80% da composição de raízes e tubérculos é basicamente água, 16-24% é representado pelo amido e cerca de 4% corresponde a proteínas e lipídeos. O tamanho do grânulo varia de 1 a 110 μm , dependendo da fonte de amido. Amidos provenientes de tubérculos possuem grânulos maiores quando comparados a amidos de cereais (Hoover, 2001).

A degradação do amido frente a enzimas amilolíticas varia de acordo com a origem do amido e de seu grau de gelatinização, diferindo não apenas na extensão da hidrólise, bem como no modo de ataque ao grânulo. A suscetibilidade do amido ao ataque enzimático é influenciada por vários fatores, tais como o conteúdo de amilose e amilopectina, a estrutura cristalina, o tamanho de partícula e a presença de inibidores enzimáticos (Zhang & Oates, 1999). Além da origem botânica, a suscetibilidade dos grânulos de amido à degradação por α -amilase depende da fonte de enzima. Amidos nativos de batata ou de alguns cereais com alta concentração de amilose são conhecidos como altamente resistentes à hidrólise por α -amilase de plantas e animais. Em geral, amidos de cereais são menos resistentes à degradação enzimática do que amidos de mandioca. Amido de batata-doce, por exemplo, é mais suscetível que o de mandioca ao ataque de α -amilase e glicoamilase (Zhang & Oates, 1999).

2.2 Enzimas amilolíticas

As enzimas amilolíticas constituem uma classe de hidrolases, responsáveis pela degradação do amido, e se encontram amplamente distribuídas em microorganismos, plantas e animais (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

As enzimas amilolíticas são divididas em 3 grupos: as endo-amilases ou α -amilases (EC 3.2.1.1), que hidrolisam ligações α -1,4 ao longo da molécula de amido; as exo-amilases ou β -amilases (EC 3.2.1.2), que hidrolisam as unidades de glicose e de maltose a partir da terminação não-redutora das moléculas de amido, e as glicoamilases ou α -glucan-glicosidades (EC 3.2.1.3), que hidrolisam unidades de glicose da extremidade não redutora da molécula do amido (Berry & Paterson, 1990).

2.2.1 α -amilases

As α -amilases, também conhecidas como endoamilases, (α -1,4-D-glucan-glicano-hidrolase, E.C.3.2.1.1), hidrolisam as ligações α -1,4-glicosídicas do amido, glicogênio e ciclodextrinas. As α -amilases se encontram naturalmente distribuídas em tecidos de plantas, como sementes, tubérculos e folhas. Os principais processos biológicos que envolvem a degradação do amido, como digestão e germinação, são resultados de ataques de α -amilases, cuja ação depende da natureza do grão de amido, e da enzima a ser utilizada (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

A α -amilase hidrolisa o amido de uma forma aleatória, no interior da cadeia, através de uma hidrólise rápida na fração de amilose, quebrando

ligações α -1,4-glicosídicas, e produzindo maltose e maltotriose, provocando uma diminuição brusca da viscosidade, seguida de uma hidrólise lenta nos oligossacarídeos produzidos e conseqüentemente, na formação de moléculas de açúcares redutores como produtos finais, como glicose e maltose (Whitaker, 1996).

Uma grande variedade de α -amilase vem sendo estudada em tecidos vegetais, especialmente em cereais. Porém, essas enzimas raramente são encontradas em sementes secas. Sabe-se, no entanto, que elas podem ser sintetizadas durante a germinação das sementes (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

As α -amilases de cereais cumprem um papel importante durante a germinação por converterem o amido do endosperma da semente em nutrientes para o crescimento, por meio de expressão gênica regulada, em termos de transcrição, por ação positiva do ácido giberélico (AG) e por ação negativa pelo ácido abscísico (ABA). (Karrer *et al.*, 1991; Muralikrishna & Nirmala, 2005).

No arroz, o amido é degradado pela ação combinada de enzimas, como α -amilase e β -amilase, durante processos extremamente diferentes entre si, tais como o cozimento, o processamento industrial e a germinação, onde a α -amilase desempenha o principal papel na degradação de grânulos nativos de amido, por meio de várias isoformas (Awazuhara *et al.*, 2000)

O peso molecular da maioria das α -amilases foi relatado na ordem de 50.000 Daltons, com cada molécula contendo pelo menos um íon cálcio (Ca^{+2}) (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

Os efeitos de pH e temperatura são fatores que influenciam diretamente os parâmetros de atividade ótima, estabilidade enzimática e a eficiência catalítica. As α -amilases de plantas superiores e de mamíferos, geralmente, são estáveis entre pHs 5,5 e 8,0 (Thoma *et al.*, 1971), enquanto as α -amilases de cereais geralmente tem atividade ótima entre pHs 4,5 e 5,5. O pH é um fator importante na estabilidade de enzimas. As α -amilases sofrem inativação irreversível em pHs extremos (Nirmala & Muralikrishna, 2003). O pH ótimo para a atividade de α -amilase em batata (*Solanum tuberosum* L.) foi determinado entre 7,2 e 8,0, diferente da maioria das α -amilases de outras fontes vegetais, que situa-se em torno de 6,0 (Witt & Sauter, 1996).

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes na hidrólise enzimática. A temperatura ótima para atividade de α -amilases em cereais está entre 40 e 55°C (Nirmala & Muralikrishna, 2003). Geralmente, as α -amilases são mais termoestáveis quando comparadas com as β -amilases; no entanto, as α -amilases, que contém uma molécula de cálcio na sua estrutura, são menos sensíveis a altas temperaturas quando comparadas a β -amilases, enzimas que não necessitam de íons estabilizadores. Na mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) a temperatura ótima foi obtida a 46,0° C e o pH ótimo em torno de 6,0 para atividade amilásica. No entanto, ensaios de estabilidade térmica a 5° C apresentaram a atividade enzimática tão alta em pH 6,0, quanto em pH 9,0 (Pires, 2002). Matos da Veiga (2002) determinou parâmetros ótimos de temperatura e pH, para atividade amilásica em raízes de mandioca, apresentando atividade máxima a 55,7°C e pH 6,0, e estabilidade a 60°C por até 24 horas.

Altas concentrações de cálcio geralmente retardam a inativação térmica a 50°C, principalmente para α -amilase de cereais (Thoma *et al.*, 1971). No entanto, a maioria das α -amilases é inibida por íons metálicos como Fe^{3+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} e Zn^{2+} (Mamo & Gessesse, 1999).

2.2.2 β -amilases

As β -amilases (α -1,4-D-glucan maltohidrolase, E.C. 3.2.1.2.) hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 do amido a partir da extremidade não-redutora do polissacarídeo, e liberam maltose e maltotriose com inversão do carbono anomérico, de α para β . Essa mudança conformacional é a razão pela qual a enzima recebe denominação de β -amilase (Kohno *et al.*, 1989). As β -amilases se encontram presentes somente em plantas superiores e alguns microorganismos, não estando presentes em animais (Bemmiller & Whistler, 1996).

As β -amilases foram identificadas não apenas em plantas como batata-doce, cevada, trigo, soja, rabanete e lentilhas, mas também em culturas de bactérias. Todas são exoamilases que atacam as ligações glicosídicas, começando na extremidade não redutora, removendo unidades de maltose até toda a cadeia ser convertida em maltose, ou até que a enzima seja inativada pela ação de algum agente químico ou físico. A β -amilase não hidrolisa ligações α -1,6 na amilopectina e sua ação termina no ponto de ramificação; por essa razão, a degradação da amilopectina pela β -amilase é incompleta, formando dextrinas limite de alto peso molecular, que resultam em coloração roxa ao se complexarem com o iodo (Bernfeld, 1951, Whitaker, 1996)

A β -amilase está localizada principalmente nos vacúolos de trigo e ervilha (Ziegler, 1999). Vikso *et al.* (1997) encontraram níveis maiores de α -amilase, β -amilase e α -glicosidase em extratos brutos de tubérculos de batata em relação às folhas, as quais só apresentavam atividade β -amilásica. Em alguns vegetais, a β -amilase está sempre relacionada à degradação do amido de reserva, podendo representar uma proteína de reserva. Em alfafa, a β -amilase, é hidrolisada para fornecer nitrogênio aos aminoácidos necessários ao rebrotamento, sendo que na desfolha diminui a atividade da nitrogenase, assim como a absorção do nitrogênio do solo (Gana *et al.*, 1998).

A indústria de amido utiliza a β -amilase microbiana ou vegetal na produção de xaropes com alta concentração de maltose, empregados regularmente na fabricação de bebidas, para conferir ao produto maior viscosidade, e resistência ao escurecimento (Ziegler, 1999).

Em geral, as β -amilases possuem um maior peso molecular em relação as α -amilases, podendo chegar em até 152 KDa, exceto para batata doce, onde se apresentou como um tetrâmero de 215 KDa. As β -amilases encontradas em *Bacillus* variam de 35 a 59 Kda, sendo muito menores do que as encontradas em plantas (Ziegler, 1999).

O pH ótimo para atividade de β -amilases se encontra, geralmente, entre 4,0 a 6,0, apresentando estabilidade na faixa de pH entre 4,0 e 9,0 a 20°C, durante um período de 24 horas. Em relação aos pHs mais ácidos, as β -amilases provenientes de grãos, como a soja e a ervilha, apresentam maior estabilidade, quando comparadas com enzimas provenientes de outras fontes,

como o trigo e a cevada. O pH ótimo para o trigo, o malte e a batata-doce varia entre 5,0 e 6,0 (Thoma *et al.*, 1971; Muralikrishna & Nirmala, 2005)

2.2.3 Glicoamilases

Glicoamilases, amiloglicosidases ou α -1,4-D-glucan-glicohidrolase (EC 3.2.1.3) são enzimas exo-ativas que hidrolisam principalmente ligações α -1,4 da extremidade não redutora de amilose e compostos relacionados liberando açúcares redutores, em menor velocidade, porém, essas enzimas têm ainda a capacidade de hidrolisar ligações α -1,6. A maior parte das glicoamilases tem pH ótimo entre 4,5 e 5,0, temperatura ótima entre 40 e 60°C e peso molecular variando entre 28 e 112 KDa (Ganghofner *et al.*, 1998).

Os principais produtos resultantes da ação destas enzimas são a maltose e a isomaltose, as quais são empregadas principalmente na indústria de fermentações e de destilados, esta enzima é produzida apenas por microrganismos, e não é considerada como um fator importante em alimentos processados (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

2.2.4 Isolamento e purificação de amilases

As amilases geralmente ocorrem em formas hidrossolúveis e sua extração é simples, geralmente através de soluções-tampão, tais como o fosfato ou acetato de sódio, e Tris-HCl, e também através da utilização de cloreto de cálcio e água. O pH deve estar em torno de 4,5 para prevenir a inativação da enzima, que ocorre a pHs mais baixos. Foi verificado que o tampão fosfato

fornece melhor extração de amilases de malte quando comparado aos tampões acetato e Tris (Hill & McGregor, 1988; Nirmala & Muralikrishna, 2003).

O tratamento térmico pode ser considerado mais uma etapa de purificação, onde as proteínas/enzimas termolábeis são removidas por inativação térmica do extrato bruto. Geralmente, este processo ocorre aproximadamente a 70° C. A inativação seletiva de α - ou β -amilases, quando as duas enzimas estão presentes, envolve a diminuição do pH do extrato enzimático em pHs inferiores a 4,0 para α -amilases, ou tratamento térmico a 70°C, a pH neutro, para β -amilases. Este passo foi empregado para a purificação de α -amilases e separação de β -amilases termoestáveis. Porém, a inativação de α -amilases por aquecimento é um procedimento complexo e os resultados são difíceis de serem interpretados, pois pode depender não só da temperatura e do tempo de aquecimento, como também pode ser influenciado pelo pH e pelo teor de proteína presente no extrato (Greenwood & McGregor, 1965).

As amilases podem ser concentradas a partir de grandes volumes através de precipitação fracionada, usando sais, como sulfato de amônia, ou solventes orgânicos, como etanol e acetona. Este passo de purificação deve ser realizado a temperaturas baixas para minimizar a inativação das enzimas e a supersaturação do sal ou a concentração elevada do solvente orgânico (Ziegler, 1999).

Vários métodos clássicos são empregados para a purificação de amilases de diferentes fontes. A principal barreira na purificação de amilases é a sua ocorrência em múltipla forma, como isoenzimas. A cromatografia de

troca iônica é a ferramenta mais utilizada para a separação de proteínas com base em sua carga. Resinas de DEAE-Celulose foram usadas na purificação da maioria das amilases de cereais (Ziegler, 1999; Muralikrishna & Nirmala 2005). A carboximetilcelulose (CMC) por sua vez, tem sido pouco empregada (MacGregor, 1977). DEAE-Sephadex foi empregada como uma boa resina de troca iônica, com o objetivo de purificar isoenzimas de malte (Nirmala & Muralikrishna, 2003).

A cromatografia de afinidade é uma das melhores técnicas para a purificação seletiva de enzimas. O substrato convencional, substratos análogos, inibidores sintéticos ou protéicos, metais ligantes e anticorpos são covalentemente ligados a uma matriz de Sepharose insolúvel, e a eluição seletiva da enzima carregada resulta em uma enzima com alto grau de pureza (Ziegler, 1999; Yamasaki *et al.*, 1996).

A focalização isoeletrica é uma técnica que separa proteínas com base no ponto isoeletrico (PI) e é usada principalmente para separar isoenzimas que diferem entre si em relação ao valor do PI entre 0,05 unidades. Esta técnica foi empregada para determinar isoenzimas de amilases de cevada e α -amilase de trigo (Das & Sem-Mandi, 1992; Daussant, et al., 1981). Porém, o uso deste método está muito limitado em função do alto custo dos anfólitos, que são necessários para a eluição das proteínas.

2.3 Pectinas

As pectinas são polissacarídeos ácidos, de elevado peso molecular constituídos por unidades de ácido D-galacturônico, parcialmente esterificado com metanol (Figura 3). A pectina contém também, em menores quantidades, resíduos de β -ramnose e outras unidades neutras como galactose, arabinose e xilose. Os monômeros do ácido galacturônico formam a cadeia principal da pectina, enquanto que os resíduos neutros e a ramnose proporcionam quebras na regularidade dessa cadeia de forma randômica. O peso molecular da pectina cítrica pode variar de 23 a 71 mil Da (Blanco *et al.*, 1999).

As substâncias pécticas estão presentes na parede celular de todos os vegetais e desempenham uma função estrutural nas quais se encontram, principalmente, sob a forma de protopectinas, na lamela média e na parede celular primária de plantas, e se sobressaem no tecido parenquimatoso. Executam diversas funções na parede celular de tecidos vegetais, contribuindo para as atividades fisiológicas da planta, tais como o crescimento, a determinação do tamanho e forma da célula, a integridade e a rigidez dos tecidos, o transporte de íons, a absorção de água e o mecanismo de defesa contra infecções patogênicas na planta (Voragen *et al.*, 2001).

Nos frutos verdes, a pectina está ligada entre as microfibras de celulose e, nesta fase, toda a pectina da parede celular encontra-se insolúvel, o que proporciona rigidez à fruta. No entanto, durante o amadurecimento, a formação de grupos carboxílicos aumenta, assim como o número de ligações entre os íons cálcio e os polímeros de pectina. Com o calor, há um aumento da interação da pectina com íons cálcio e, também, uma redução na

susceptibilidade da pectina ser hidrolisada por β -eliminação. O amadurecimento, durante a estocagem das frutas frescas, é atribuído tanto à degradação enzimática da pectina pelas enzimas da própria fruta quanto à solubilização da protopectina (Blanco *et al.*, 1999).

Figura 3 - Estrutura primária de uma molécula de pectina (Voragen *et al.*, 2001)

2.4 Enzimas pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas degradam naturalmente as substâncias pécnicas. A classificação dessas enzimas é baseada no ataque à cadeia da molécula da substância pécica. São conhecidas como enzimas pécnicas, pectinases ou enzimas pectinolíticas e estão classificadas em dois grandes grupos (Blanco *et al.*, 1999):

- pectinesterases (PE) ou pectina-metil-esterases, capazes de hidrolisar ligações éster das pectinas por remoção de resíduos metoxila, produzindo metanol e ácido pécico;
- enzimas de hidrólise do polímero, que rompem as ligações glicosídicas do substrato (pectina). Estas enzimas são subdivididas em poligalacturonase (PG), enzimas que clivam as ligações glicosídicas por hidrólise, e as pectato liases (PL), que quebram as ligações glicosídicas por β -eliminação. Os dois tipos de enzimas (PG e PL) são ainda classificados quanto ao tipo de substrato utilizado

(pectina ou ácido pécico) e conforme sua forma de ação (endo ou exo-pectinase) (Blanco *et al.*, 1999).

2.4.1 Pectinesterase

As pectinaesterases (PE) (EC 3.1.1.11.) são encontradas em frutas e vegetais, sendo produzidas também por fungos, leveduras e bactérias. (Asis *et al.*, 2000).

As PEs provavelmente contribuem no metabolismo de algumas plantas e durante o amadurecimento de algumas frutas. Removem grupos metil-ésteres do ácido poligalacturônico da parede celular da pectina, formando produtos como o ácido pécico e o metanol (Figura 4) e convertendo pectinas de alto grau de metoxilação em pectinas de baixo grau de metoxilação. Posteriormente, essas pectinas são despolimerizada pela PG a pectato, diminuindo assim a adesão intracelular e a rigidez dos tecidos. Desta forma, a PE nativa poderia contribuir para melhorar a estrutura da firmeza de diferentes vegetais. As PEs são as principais enzimas responsáveis pelos efeitos desejáveis e indesejáveis durante e após o processamento de extração e de clarificação de sucos de frutas, devido aos resíduos de ácido pécico produzidos pela hidrólise, os quais reagem com os íons cálcio presentes no meio e produzem complexos insolúveis de pectatos de cálcio, induzindo a turvação dos sucos de frutas (Asis *et al.*, 2002). A turvação em extratos de vegetais é geralmente causada pela presença de substâncias pécicas suspensas, como partículas insolúveis (Blanco *et al.*, 1999).

Os valores de pH ótimos de atividade das PEs variam entre 4,0 e 8,0. O valor do pH ótimo da PE dos fungos situado entre 3,5 e 7,5 é, geralmente, menor do que os das bactérias, que variam de 6,5 a 9,0. O valor de pH ótimo relativo à atividade destas enzimas pode variar devido a presença do íon cálcio (Laast *et al.*, 1997).

Figura 4 - Hidrólise da ligação metil-éster do ácido poligalacturônico da pectina, devido à ação da PE (Jayani *et al.* 2005).

2.4.2 Poligalacturonases

As poligalacturonases são hidrolases que agem preferencialmente sobre o ácido poligalacturônico como substrato, hidrolisando as ligações glicosídicas α -1,4 do ácido galacturônico próximos ao grupo carboxílico livre. Hidrolisam pectinas com baixo grau de metoxilação a ácidos pécicos (Figura 5) (Sanders *et al.*, 2001; Ma & Barret, 2001).

Na parede celular, a hidrólise das ligações glicosídicas na protopectina por PGs é responsável pelo amaciamento que acompanha a solubilização de pectina durante a maturação dos frutos. Nos frutos imaturos, ocorre a ausência de PG, que surge próximo ao período de início do amadurecimento, sugerindo-se que ela seja responsável pela solubilização da pectina e pelo amaciamento de tecidos de plantas (Sanders *et al.*, 2001; Ma & Barret, 2001)

Figura 5 - Hidrólise da ligação glicosídica da pectina devido à ação da PG (Jayani *et al.*, 2005).

As poligalacturonases (PG) são encontradas em duas formas: as endopoligalacturonases (endo-PG) e as exopoligalacturonases (exo-PG). As PG tornam-se bastante ativas somente depois da ação da PE por terem dificuldade de romper a cadeia da pectina quando o grau de metoxilação é superior a 60-70% (Assis *et al.*, 2004). Gainvors *et al.* (1994) relataram que a hidrólise do ácido poligalacturônico foi maior que a hidrólise da pectina cítrica (63% de metoxilação), e esta foi maior que a da pectina de maçã (75% de metoxilação).

As endopoligalacturonases (endo-PG) são produzidas por um grande número de microorganismos como fungos e bactérias, e por um reduzido número de leveduras e plantas superiores. As endo-PG atuam especificamente no ácido pécico. A extensão da hidrólise diminui na medida em que o grau de metoxilação aumenta. Grupos carboxílicos livres são necessários para que haja atividade catalítica (Gainvors *et al.*, 1994).

2.4.3 Pectato liase

As pectatolases (PL) hidrolisam apenas a cadeia de ácido poligalacturônico através da reação de β -eliminação, quebrando as ligações glicosídicas adjacentes ao grupo carboxílico livre da pectina e dos ácidos pécicos, a qual também leva a formação de grupos redutores (Figura 6). Esta

enzima é encontrada em duas formas: endo- e exo-PL (Sanders *et al.*, 2001; Ma & 2001)

As endo-PL (EC 4.2.2.2) quebram a cadeia de pectina de forma aleatória, e são ativadas por íons cálcio e, em alguns casos, por outros cátions divalentes, como o magnésio, o cobalto e o estrôncio. Os substratos preferidos para a atividade endo-PL são pectinas com baixo grau de metoxilação (Whitaker *et al.* 1996)

Figura 6 - Quebra a ligação glicosídica da pectina por β -eliminação pela ação de pectatoliase (Jayani *et al.*, 2005).

A exo-PL (EC 4.2.2.9) forma açúcares insaturados a partir da extremidade redutora do polímero de ácido poligalacturônico, não apresentam preferência pelo tamanho do substrato e não atuam sobre a pectina.

As PLs podem ser facilmente diferenciadas das PGs uma vez que os valores de pH ótimo deste tipo de enzima são muito altos, variando entre 8,0 e 10,0, além de serem ativadas por íons cálcio e também pela formação do número de grupos redutores com o número de duplas ligações formadas, medidas espectrofotometricamente (Whitaker, 1994).

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi de caracterizar a ação de enzimas amilolíticas e pectinolíticas presentes em hypocótilos de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) na forma como são comercializados, através de ensaios de extração, de purificação e de otimização das condições de pH e temperatura para as determinações de atividade.

Foram também objetos de estudo:

- 1) A determinação da composição centesimal de raízes de maca;
- 2) A caracterização química e morfológica do amido de maca.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e reagentes

As raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walpers.), sadias, foram selecionadas de acordo com o tamanho e a cor (amarelas), num mercado local de Arequipa-Peru. As raízes foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% e secas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram embaladas em papel pardo para a viagem de 4 dias (Peru – Brasil). Após a chegada, as raízes foram embaladas em sacos de polietileno e armazenadas a -18 °C até a sua utilização.

Foram utilizados diversos reagentes, tais como amido de batata, a álcool oxidase, a pectina cítrica, o ácido galacturônico, o ácido poligalacturônico o acetato de sódio, e a albumina soro bovina (BSA), foram obtidos pelo Sigma Chemical Co. St. Louis. A 2-cianoacetamida foi fornecida pela Aldrich Chemical Co. Steinheim. Os substratos específicos para β - e α -amilase (Betamyl[®] e Ceralpha[®]) foram adquiridos da Megazyme. Os marcadores de peso molecular para electroforese SDS-PAGE foram adquiridos da Invitrogen, resinas de troca iônica DEAE-Celulose, Carboximetilcelulose e Sephacryl HR-S100 foram adquiridos pela empresa Sigma. Todos os outros reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

4.2 Métodos

4.2.1 Composição centesimal

A composição centesimal de raízes de maca (*Lepidium Meyenii* Walp.) foi determinada através de métodos convencionais, preconizados pelo Instituto

Adolfo Lutz, (1985) e AOAC (1980). Os resultados apresentados correspondem à média de três determinações.

4.2.1.1 Umidade

As medidas foram realizadas por dessecação em estufa a 105°C, até a obtenção do peso constante da amostra. A umidade foi calculada através da diferença entre os pesos inicial e final das amostras.

4.2.1.2 Cinzas

As determinações foram realizadas pelo método gravimétrico, através da incineração da amostra e, posteriormente, calcinação da matéria prima a 550 °C em mufla.

4.2.1.3 Lípidos

A extração lipídica residual da maca foi feita de forma continua em aparelho do tipo Soxhlet, utilizando como solvente o éter etílico.

4.2.1.4 Proteínas

As análises foram realizadas através do método micro-Kjeldahl (AOAC, 1980), que se baseia na determinação do nitrogênio. O fator de correção utilizado para a conversão do nitrogênio em proteína foi de 6,25.

4.2.1.5 Fibra

Para a análise de fibra alimentar total (FAT), foi empregado o método enzimático-gravimétrico (Prosky *et al.*, 1992) utilizando-se o tampão fosfato com algumas modificações (Filisetti-Cozzi & Lajolo, 1991). O método consiste na digestão enzimática da amostra com α -amilase termoestável, amiloglicosidase e protease para a remoção de contaminantes do amido e de proteína. A precipitação da fração solúvel foi realizada com etanol a 98% (v/v)

e posterior filtração. O resíduo e precipitado retidos foram lavados com etanol a 78%, etanol a 95% e acetona, e posteriormente, foram secos e pesados.

4.2.2 Extração, purificação e caracterização parcial de enzimas amilolíticas

4.2.2.1 Extrato enzimático

Após o descongelamento, a remoção da casca e de impurezas, as raízes de maca foram cortadas em pequenos cubos. Aproximadamente 50 g de amostra foram homogeneizadas com 150 mL de tampão fosfato 0,05M (pH 6,0), em um liquidificador comum, por aproximadamente 2 min. Após a trituração, o homogenato foi filtrado e centrifugado a 10.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. A amostra foi dialisada durante a noite contra água destilada, a temperatura de 4°C, e armazenada em microtubos de 1,5 mL, a -18 °C, para análises posteriores.

4.2.2.2 Determinação da atividade amilolítica

Inicialmente, a atividade hidrolítica total foi determinada por meio da medida do complexo amido-iodo (Street, 1974). Aliquotas de 50µL de extrato bruto foram incubadas em 200 µL de uma solução de amido de batata 0,1%, 500 µL de tampão fosfato 0,05M (pH 6,0) e 200 µL de uma solução de HCl 0,01M. Após a incubação a 30 °C, por um período de 15 min, a reação foi interrompida pela adição de 400 µL de solução de iodo (I₂ 10 mM e KI 14 mM). O volume de reação foi completado com água destilada até 10 mL e a leitura de absorbância foi feita a 578 nm em espectrofotômetro Micronal B582.

Uma unidade de atividade amilásica (1U) foi definida como a quantidade de amido (em nanogramas) hidrolisada por minuto por miligrama de proteína presente no extrato enzimático nas condições da reação.

Posteriormente, foram utilizados dois outros métodos para a detecção da atividade amilásica: a determinação para β -amilase foi realizada seguindo o método descrito por McCleary Codd (1989), utilizando-se o reagente Betamyl[®] que contém o *p*-nitrofenil-maltopentosídeo (PNPG5) como substrato. Para a determinação da atividade α -amilásica, empregou-se o método descrito por McCleary e Sheehan (1987), que utiliza o reagente Ceralpha[®] contendo como substrato *p*-nitrofenil-maltoheptosídeo bloqueado na extremidade não redutora (BPNPG7).

A reação de ambos os métodos acontece na presença de α -glicosidase, que libera o *p*-nitrofenol, o qual desenvolve uma coloração amarela em meio alcalino, possibilitando a leitura em um comprimento de onda de 410 nm. Para a detecção da atividade enzimática, foram incubados 50 μ L de extrato enzimático com 50 μ L de substrato (Megazyme[®] ou Ceralpha[®]) e, após incubação a 30°C por 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 750 μ L de 1% (p/v) Trizma-base (pH > 10) e a absorbância medida a 410 nm. Para a quantificação da atividade enzimática, foi utilizada uma curva padrão de *p*-nitrofenol. Uma unidade de atividade enzimática (1U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por μ g de proteína por min, nas condições da reação.

4.2.2.3 Determinação de açúcares redutores

Para a determinação de açúcares redutores presentes no extrato empregou-se o método descrito por Bernfeld *et al.*, (1955). Um volume de 50µL do extrato enzimático foi adicionado a 500µL de reagente DNS (1% de ácido 3,5-dinitro salicílico, contendo 30% (p/v) de tartarato de sódio e potássio, e 20% (v/v) de NaOH 2M) e incubados a 100° C, por 10 minutos, para a formação do complexo colorido entre os açúcares redutores e o DNS. Após a diluição da amostra com 2,5 mL de água destilada, prossegue-se a leitura da absorbância a 545 nm.

4.2.2.4 Determinação do teor de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976), a 595 nm, utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. A quantificação foi realizada em todos os extratos enzimáticos estudados.

4.2.2.5 Fracionamento com sulfato de amônio

A precipitação fracionada com sulfato de amônio foi empregada como etapa de purificação enzimática, tomando por base o método descrito por Dawson et al. (1986). O extrato enzimático bruto, 50 mL, foi fracionado com sulfato de amônio, sob agitação branda, até completar 20% de saturação. A solução permaneceu por 16 h a 4 °C para a completa precipitação da enzima.

Após centrifugação a 10.000 x g, por 20 min, o precipitado foi reservado e, ao sobrenadante, adicionou-se sulfato de amônio até completar 40% de

saturação e posteriormente, 60, 80 e 100% de saturação. Todos os precipitados foram reservados. As frações precipitadas (20% a 100% de saturação) foram ressuspensas em tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0) e dialisados contra água destilada, em membrana de acetato, por 24 h ou 48 h, até a remoção total dos íons sulfato, a qual foi comprovada pela reação com solução de BaCl_2 . As frações enzimáticas foram congeladas para posteriores análises.

4.2.2.6 Cromatografia em DEAE-celulose

Após o fracionamento da enzima com sulfato de amônio e diálise, o extrato foi concentrado por liofilização seguida de uma etapa de purificação por cromatografia de troca iônica em coluna (30 x 1,25 cm), utilizando a resina de DEAE-Celulose previamente tratada. Após a montagem, a resina foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M (pH 7,5) e a amostra foi aplicada e eluída, inicialmente, com o mesmo tampão de equilíbrio. Em seguida, aplicou-se uma solução Tris-HCl 0,05M (pH 7,5), com NaCl, num gradiente que variou de 0,1M a 1,0M, onde foram coletadas frações de 3 mL num fluxo de 0,2 mL/min através da utilização de um coletor de frações com registrador automático. O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm. A atividade enzimática foi determinada nas frações que apresentaram picos de absorbância nesse comprimento de onda. As frações que apresentaram maior atividade amilolítica foram reunidas e dialisadas contra água destilada por 24 h a 4 °C, e armazenadas para sua posterior purificação.

4.2.2.7 Cromatografia em carboximetilcelulose (CMC)

A fração dialisada e concentrada proveniente da purificação com DEAE-Celulose foi aplicada em coluna (30 x 1,25 cm) contendo carboximetilcelulose, previamente tratada e equilibrada com tampão fosfato a 50 mM (pH 6,0) e gradiente de concentração de NaCl de 0 a 0,5M. Foram coletadas frações de 3 mL num fluxo de 0,2 mL/min, utilizando-se um coletor de frações com registrador automático. O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm, e a atividade da enzima foi determinada nas frações que apresentaram picos de absorbância nesse comprimento de onda. As frações que apresentaram maior atividade enzimática foram reunidas e dialisadas contra água destilada por 24 h a 4 °C.

4.2.2.8 Eletroforese

A técnica de eletroforese foi utilizada para identificar proteínas do extrato bruto, monitorar as etapas de purificação, verificar a homogeneidade das frações, além de identificar bandas protéicas com atividade amilolítica. A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida, sob condições não-dissociantes e dissociantes. As corridas em condições dissociantes seguiram o método descrito por Laemmli (1970), utilizando-se tampão Tris/glicina (pH 8,8), gel de concentração de 3,5% de poliacrilamida e de 15 % no gel de separação, contendo SDS a 10%. Em condições não-dissociantes, as corridas foram realizadas em géis contendo de 6,5% de poliacrilamida no gel de separação e 3,5% no gel de concentração, no mesmo tampão sem adição de SDS (Hames, 1990). As corridas eletroforéticas foram realizadas em géis de 50

x 70 x 0,75 mm, em cuba vertical, empregando-se corrente de 120 V, 120mA. Após o término de cada corrida, os géis foram revelados com prata ou Comassie Blue R-250 (Laemmli, 1970). Para a atividade amilolítica, o gel foi corado com iodo (I_2 10 mM e KI 14 mM), a revelação de bandas protéicas foi realizada com prata.

4.2.2.9 Determinação do peso molecular nativo da enzima

O peso molecular da enzima nativa foi determinado através de cromatografia em coluna, por filtração em gel Sephacryl-S100, em coluna de 60 x 1,6 cm equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), e calibrada com os seguintes padrões (Sigma): citocromo C (12.400 Daltons), anidrase carbônica (29.000 Daltons), albumina (66.000 Daltons), álcool desidrogenase (150.000 Daltons) e β -amilase (200.000 Daltons). Todos os padrões de peso molecular foram dissolvidos em 1 mL de tampão fosfato e 5% de glicerol. O volume de exclusão do sistema foi determinado com a eluição de azul de dextrana 2.000, diluído em tampão fosfato e 5% de glicerol. Uma alíquota de enzima purificada, contendo ao redor de 15 mg de proteína, foi eluída na mesma coluna, a um fluxo de 0,2 mL/minuto, coletando-se frações do eluente de 2 mL, e monitoradas a 280 nm.

4.2.2.10 Metodologia de superfície de resposta

Para a otimização dos parâmetros ótimos de atividade enzimática, foi empregando o modelo estatístico de Metodologia de Superfície de Resposta

(MSR), considerando como variáveis independentes o pH e a temperatura, e como variável dependente, a atividade amilásica.

Empregou-se o delineamento central composto (DCC), que permite expressar duas variáveis independentes e uma dependente, como um modelo polinomial da forma:

$$y_{\text{obs}} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1x_1 + b_{22}x_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + e$$

Onde:

b_0 = constante

b_1 e b_2 = Expressa o efeito de cada variável no processo (pH e temperatura)

b_{12} = efeito de interação entre as variáveis

b_{11} e b_{22} = efeito dos quadrados das variáveis

y_{obs} = é a resposta determinada (atividade amilolítica)

x = variáveis independentes (x_1 = pH e x_2 = Temperatura)

e = erro experimental com a distribuição normal ($e = y_{\text{obs}} - y_{\text{calc}}$).

O delineamento central composto (DCC) foi usado com duas variáveis a cinco níveis e seis replicatas no ponto central, em um total de 14 experimentos. As condições experimentais no ponto central foram: pH = 5,5 e T = 30° C. Os valores experimentais e codificados estão mostrados na Tabela 2. Os valores em escala foram: $X_1 = (\text{pH} - 5,5)/0,5$, onde o pH variou de 4,8 a 6,2; $X_2 = (T - 30)/0,5$, onde a temperatura variou de 23 a 37 °C. Os dados foram avaliados pelo programa STATISTICA. A confiança do modelo é calculada através do valor R^2 , a variação da resposta do modelo, com um nível de significância de $p < 0,05$.

Tabela 2 - Condições experimentais para a otimização de valores de pH e temperatura, para atividade da enzima parcialmente purificada.

Experimentos	Valores codificados		Valores experimentais	
	X ₁	X ₂	pH	T(°C)
1	-1	-1	5,0	25
2	-1	1	5,0	35
3	1	-1	6,0	25
4	1	1	6,0	35
5	0	0	5,5	30
6	0	0	5,5	30
7	0	0	5,5	30
8	-1,41	0	4,8	30
9	1,41	0	6,2	30
10	0	-1,41	5,5	23
11	0	1,41	5,5	37
12	0	0	5,5	30
13	0	0	5,5	30
14	0	0	5,5	30

$X_1 = (\text{pH} - 5,5)/0,5$, onde o pH variou de 4,8 a 6,2; $X_2 = (T - 30)/5$, onde a T variou de 23 a 37 °C para atividade amilolítica da enzima purificada.

4.2.3 Extração e caracterização parcial de enzimas pectinolíticas

4.2.3.1 Extrato enzimático

As raízes de maca, cortadas em pequenos cubos, foram homogeneizadas com uma solução de NaCl 1,0 M (1:2) em um liquidificador comum, por aproximadamente 2 minutos. Após a centrifugação 10.000 x g, o pH do homogenato foi ajustado para 8,5 e 6,0, respectivamente, para a extração de PE e PG, através da adição de NaOH 2,0M ou ácido acético 2,0 M. O homogenato foi mantido a uma temperatura de 4 °C, com agitação constante, durante 4 h. Após a centrifugação a 10.000 x g, por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi dialisado contra água destilada a temperatura de 4 °C, por um período de 12 h.

O extrato foi armazenado em tubos eppendorf de 1,5 mL, a -18 °C, para análises posteriores.

4.2.3.2 Determinação da atividade pectinesterásica (PE)

Os ensaios de atividade pectinoesterásica, assim como nos seguintes de atividade poligalacturonásica, foram delineados para aplicação da MSR conforme descrito anteriormente, com DCC para duas variáveis em cinco níveis e seis replicatas, totalizando 14 experimentos. No entanto, As duas variáveis estudadas incluíram a variação de pH (X_1) e temperatura (X_2) de atividade da enzima.

A atividade PE foi medida através da quantificação de metanol liberado, de acordo ao método de Klavons e Bennet (1986). A 100 μ L de extrato enzimático, foram adicionados 100 μ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M ou tampão acetato 0,1M, de diferentes pHs na faixa de 5,1 a 7,9 (Tabela 3), contendo 0,1% de pectina cítrica. Os meios de reação foram incubados durante 15 minutos, a diferentes temperaturas, que variaram entre 41 a 59 °C (Tabela 3). A reação foi interrompida com aquecimento a 100 °C em banho de maria, durante 3 minutos. Após o resfriamento, foram diluídos com 2 mL de tampão Tris-HCl, 20 mM, (pH 7,5) contendo uma unidade (1U) de álcool oxidase. Após a, incubação a 25° C, por 15 minutos, foi adicionado 1,0 mL de 2,4-pentanodiona (20 mM) em fosfato de amônio (2,0 M) e a solução foi incubada a 60° C, durante 15 minutos. A absorbância foi medida a 412 nm contra o branco, preparado nas mesmas condições, mas com a adição do extrato enzimático previamente fervido por 8 minutos, para completa inativação da

enzima. Foi utilizado metanol para elaboração da curva padrão, em concentrações de 0 a 100 μ moles. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por 1,0 μ mol de MeOH x mg proteína⁻¹ x min⁻¹.

As condições experimentais no ponto central foram pH = 5,0 e T = 35° C para atividade PE, cujos valores experimentais e reais encontram-se na Tabela 3. Assim, $X_1 = (\text{pH} - 6,5)/1,0$, com variação de pH entre 5,1 e 7,9, e $X_2 = (T - 50)/5$, no qual a temperatura variou entre 43 e 57° C.

4.2.3.3 Determinação da atividade poligalacturonásica (PG)

A medida da atividade PG baseou-se na ruptura hidrolítica do ácido poligalacturônico, com a liberação de grupos redutores, medidos através da quantidade de ácido galacturônico livre, de acordo com os métodos descritos por Gross (1982) e Honda et al. (1982). Uma alíquota de 15 μ L de extrato enzimático e 30 μ L de tampão fosfato ou acetato 50 mM, a diferentes pHs, na faixa de 4,3 a 5,7 (Tabela 3), foi incubada com 150 μ L do mesmo tampão, contendo 0,2% de ácido poligalacturônico, por 2 horas, a diferentes temperaturas, que variaram entre 21 a 49° C (Tabela 3). As reações foram interrompidas pela adição de 1,8 mL de uma solução de tampão borato 0,1 M, (pH 9,0), e a adição de 200 μ L de 2-cianoacetamida 1%. Posteriormente, foram fervidas durante 10 minutos. Após o esfriamento, a concentração de açúcares redutores livres foi medida a 276 nm contra o branco; foi usado ácido galacturônico como padrão em concentrações de 0 a 300 μ g. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por 1,0 μ g de ácido galacturônico produzido x mg de proteína⁻¹ x h⁻¹.

A Tabela 3 contém os valores em escala $X_1 = (\text{pH} - 5,0)/0,5$, sendo o pH de 4,3 a 5,7 e $X_2 = (T - 35)/10$, no qual a temperatura variou de 21 a 49° C para atividade de PG. Nos ensaios do ponto central para atividade PG, o valor de pH foi 6,5 e a T foi 50° C.

Tabela 3 - Condições experimentais para a otimização de valores de pH e temperatura, para atividade de PE e PG, em raízes de maca.

Experimentos	Valores codificados		Valores experimentais			
	X_1	X_2	PE		PG	
			pH	T (°C)	pH	T (°C)
1	-1	-1	5,5	45	4,5	25
2	-1	1	5,5	55	4,5	45
3	1	-1	7,5	45	5,5	25
4	1	1	7,5	55	5,5	45
5	0	0	6,5	50	5,0	35
6	0	0	6,5	50	5,0	35
7	0	0	6,5	50	5,0	35
8	1,414	0	7,9	50	5,7	35
9	-1,414	0	5,1	50	4,3	35
10	0	1,414	6,5	41	5,0	21
11	0	-1,414	6,5	59	5,0	49
12	0	0	6,5	50	5,0	35
13	0	0	6,5	50	5,0	35
14	0	0	6,5	50	5,0	35

Para a atividade PE, $X_1 = (\text{pH} - 5,0)/0,5$, onde o pH variou de 4,3 a 5,7; $X_2 = (T - 35)/10$, onde a T variou de 21 a 49° C; para atividade PG, $X_1 = (\text{pH} - 6,5)/1,0$, onde o pH variou de 5,1 a 7,9 e $X_2 = (T - 50)/5$, onde a T variou de 43 a 57° C.

4.2.4 Caracterização de grânulos de amido

4.2.4.1 Extração do amido

O amido foi extraído a partir de 50 g de raízes de maca sem casca e trituradas num liquidificador comum por aproximadamente três minutos. Após a filtração em filtro de algodão e centrifugação a 10,000 x g, por 30 minutos, a 4 °C, o resíduo foi lavado com água destilada e novamente centrifugado. Os processos de lavagem e centrifugação foram repetidos, por no mínimo oito vezes, até a eliminação dos pigmentos e obtenção de um amido branco e limpo. O resíduo foi colocado sob sistema de circulação de ar, à temperatura ambiente. Após a secagem, o amido foi pesado e triturado em moinho (IKA A10, Labortechnik, Alemanha) para a obtenção de um pó fino.

4.2.4.2 Determinação do teor de amido total

A determinação do amido total foi realizada de acordo o método descrito por Arêas et al., (1981), com algumas modificações. O amido foi extraído com uma solução de NaOH 0,5M e neutralizado com ácido acético 0,5M. Após a precipitação com etanol absoluto, o amido foi hidrolisado com uma solução contendo amiloglicosidase e α -amilase pancreática (14,0 e 0,4 U/mL, respectivamente, Sigma) em tampão acetato 0,2 M (pH 4,8), por um período de 2 h de incubação a 37° C. A reação foi interrompida pela adição de ácido perclórico 0,6 M e a glicose liberada foi quantificada segundo o método da Antrona (0,1% de antrona em ácido sulfúrico 76%), descrito por Viles et al., (1946), utilizando glicose como padrão. A concentração de glicose liberada foi

medida pela leitura de absorbância a 620 nm. O teor de amido foi calculado através da quantidade de glicose determinada x 0,9.

4.2.4.3 Morfologia dos grânulos de amido

A morfologia dos grânulos de amido foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A amostra foi colocada sobre o porta-amostras (“stub”) do microscópio, colou-se uma fita dupla-fase em forma de discos ($\phi \cong 50$ mm), cujas bordas foram “pintadas” com tinta condutora de prata. O amido foi disperso sobre o disco e posteriormente, metalizado com ouro pelo processo de “sputtering”, através do metalizador Edwards Sputter Coater 150B. Após a metalização, foram observadas no microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol JSM 840.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para a composição das raízes de maca da variedade amarela, após 30-45 dias (aproximadamente) pós-colheita. Estes dados representam as condições nas quais se encontravam as raízes durante a elaboração deste trabalho. Estes valores são similares aos reportados na literatura (Tabela 1). Embora, o teor de carboidratos calculado (43%) tenha sido menor do que os valores da literatura (52 – 76%), este resultado poderia ser influenciado pelo alto teor de umidade das raízes, que foi de 41% (Tabela 4), sendo que os valores reportados na literatura foram calculados em base seca, mas, convertendo estes dados para base seca, observa-se, que estes valores encontram-se na faixa dos valores calculados (Tabela 1).

A Tabela 5 apresenta valores da composição centesimal de outras fontes de vegetais. Observa-se que a batata-doce, a mandioca, a mandioquinha, o cará e o inhame apresentam menores valores em todos os nutrientes, quando comparados com a maca. Isto pode ser explicado pelos teores de umidade nestas fontes (base úmida), porém, nas raízes de maca foram calculados após a metade da perda de água, sendo que apresenta 80 % de umidade em base úmida, mesmo assim a maca pode ser comparada com farinhas de trigo e aveia quanto a sua composição centesimal.

Tabela 4 - Composição centesimal das raízes de maca, após 30 a 45 dias pós-colheita.

Componente	Maca amarela (base úmida)	Maca amarela (base seca)
	mg/100mg	mg/100mg
Umidade	40,94 ± 1,79	-----
Proteína	10,45 ± 1,32	17,69 ± 1,96
Lipídeos	2,13 ± 0,05	3,61 ± 0,04
Carboidratos	42,99 ± 0,80	72,78 ± 0,2
Fibra solúvel	5,02 ± 0,22	8,50 ± 0,32
Fibra insolúvel	13,73 ± 0,06	23,24 ± 0,07
Cinzas	3,50 ± 0,06	5,93 ± 0,18

Tabela 5 - Composição centesimal (mg/100g) de algumas fontes de vegetais citados na literatura.

Fonte	Umidade	Proteína	Carboidrato	Cinzas	Lipídeos
Farinha de aveia	9,80	14,90	67,00	1,30	7,00
Batata doce	66,78	1,53	30,01	1,40	0,28
Cará	77,80	1,32	23,75	0,71	0,42
Inhame	81,45	1,21	16,49	0,75	0,10
Mandioca	71,30	0,51	27,74	0,37	0,08
Mandioquinha	79,64	0,60	19,16	0,64	0,06
Farinha de trigo	10,52	11,66	75,96	0,51	2,82

Fonte: Tabela de composição dos alimentos-Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP

5.2 Atividade amilolítica total, amido total e açúcares redutores.

O extrato bruto de maca apresentou atividade amilolítica total (346 U/mg prot) praticamente idêntica à atividade β -amilásica (348 U/mg prot) e a α -amilásica (20 U/mg prot) cerca de 1/15 destas, o teor de açúcares redutores foi de 548 mg/100g e o teor de amido total foi de 23,17%, mostrados na Tabela 6.

Apesar das diferenças existentes entre as metodologias de avaliação, nota-se, portanto que nessa fase de conservação dos hipocótilos de maca a

atividade amilásica preponderante é a da β -amilase. Como não houve avaliação dessas enzimas em estágios anteriores de desenvolvimento e maturação, não é possível inferir o papel desse grupo de enzimas ao longo do processo de secagem para a preservação e a comercialização das raízes, pois os ensaios foram feitos após 30 a 45 dias pós-colheita. No entanto, é provável que a β -amilase seja responsável pelo acúmulo de açúcares redutores detectados (Tabela 6), que conferiria o sabor adocicado das raízes secas.

Tabela 6 - Atividade amilolítica, açúcares redutores e amido total em raízes de maca.

Parâmetros	Valores	unidades
<u>Atividade enzimática</u>		
Amilolítica total*	345,76	U/mg prot
α -amilásica*	20,36	U/mg prot
β -amilásica*	347,56	U/mg prot
<u>Carboidratos</u>		
Amido total**	23,17	% (base úmida)
Açúcares redutores***	548,94	mg/%

*Ensaio em extrato bruto; **raízes úmidas; ***Ensaio em extrato bruto sem dialisar.

Estes resultados são semelhantes a outras raízes e tubérculos já estudados. A atividade amilolítica em raízes de mandioca, de uma variedade que expressa α -amilase, é de 321,45 U/mg prot, com um aumento na concentração de açúcares redutores até o quinto dia pós-colheita, assim como incremento no teor de amido até o sétimo dia, com posterior queda até o décimo primeiro dia (Matos, 2002; Pascoal, 2005). Pires (2005) determinou a atividade enzimática no extrato bruto de mandioquinha de 254 U/mg prot, com aumento da concentração do amido após o terceiro dia pós-colheita e posterior

decréscimo, quando armazenados a diferentes temperaturas. Nielsen *et al.*, (1997) encontrou atividades de α -amilase de 16,7U e β -amilase de 54,5U por mg de proteína, numa variedade de batata.

5.3 Purificação da enzima amilolítica

A purificação de amilases já foi relatada em diversos vegetais. No entanto, foram adotados diversos métodos de purificação, geralmente todos eles baseados na precipitação com sais e em processos cromatográficos, como cromatografia de troca iônica, por afinidade e de filtração em gel, além de métodos eletroforéticos.

Os processos de purificação do presente trabalho basearam-se em estudos de diferentes métodos citados na literatura, para diferentes frutos e vegetais. Como as condições de purificação variam muito entre os trabalhos e nenhum estudo havia sido realizado anteriormente com as enzimas provenientes de maca, foi necessário ter como referência todos os métodos possíveis para a purificação destas enzimas.

5.3.1. Fracionamento com sulfato de amônio

O primeiro passo de purificação foi o fracionamento com sulfato de amônio do extrato bruto em diferentes concentrações (Figura 7). Os dados da literatura mostraram que a faixa de saturação com sulfato de amônio compreendido entre 30% e 60% é suficiente para a precipitação de grande parte de proteínas de interesse, apresentando maior atividade enzimática.

Para os resultados por precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, observa-se que a atividade amilolítica total e β -amilásica no extrato bruto são semelhantes (Figura 7), sendo a atividade α -amilásica muito baixa, a qual não aparece mais nas demais etapas de precipitação fracionada. Na fração entre 0-20%, o precipitado apresentou baixa atividade total, assim como a atividade β -amilásica e não foi possível determinar a concentração de proteínas bem como contribuiu na eliminação de alguns contaminantes. Na fração 20-40% de saturação, ainda apresentou-se baixa a atividade amilolítica. As frações entre 40-60% e 60-80% foram as que apresentaram maior precipitação da proteína desejada, com maior atividade amilolítica e maior atividade β -amilásica. Também foi observada atividade na fração 80-100%, com menor intensidade, não aparecendo mais no sobrenadante.

De acordo com estes resultados, procurou-se selecionar a fração com maior atividade. Sendo assim, optou-se por uma precipitação de 40-80% de saturação com sulfato de amônio, na qual foi observada a maior atividade amilolítica e atividade para β -amilase.

Rashad *et al.* (1996) também utilizaram a precipitação de amilases como forma de purificação em raízes de rabanete (*Raphanus sativus*), com concentrações de sulfato de amônio entre 30-100% saturação, enquanto Shaha *et al.* (2004) utilizaram uma concentração de sulfato de amônio entre 41-80% de saturação, para precipitar β -amilase em lentilha (*Lens esculenta L.*). Em extratos de folhas de batata (*Solanum tuberosum*), a maior parte de enzimas amilolíticas precipitou sob concentrações de sulfato de amônio entre 25-50% de saturação (Nielsen *et al.*, 1997).

Figura 7 - Distribuição da atividade amilolítica total, α - e β -amilásica nas deferentes frações precipitadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5.3.2 Purificação de β -amilase

No início do processo de purificação em DEAE-celulose, houve certa dificuldade com as frações coletadas, pois apresentavam turbidez, superestimando a concentração de proteína eluída, no momento do controle da absorbância a 280 nm. Suspeitou-se da precipitação do tampão fosfato com algumas pectinas presentes ou outros interferentes, já que o extrato enzimático não estava sendo fracionado. Decidiu-se, então, precipitar as proteínas com sulfato de amônio para reduzir os interferentes e o tampão fosfato foi substituído por tampão Tris-HCl 0,05M (pH 7,5) com o objetivo de melhorar a solubilidade da proteína e o perfil cromatográfico.

Com base nesta experiência, passou-se a utilizar o extrato enzimático fracionado com sulfato de amônio, entre 40-80% de saturação. Nestas condições, foi realizada a cromatografia de troca iônica (DEAE – Celulose), utilizando tampão Tris-HCl 0,05M (pH 7,5), aplicando um gradiente de 0 a

0,5M de NaCl preparado em tampão de eluição, o qual gerou quatro picos de proteína (I, II, III e IV) (Figura 8).

Analisando o perfil de atividade amilolítica das frações na Figura 8, observam-se dois picos que, em conjunto, têm perfis semelhantes ao das proteínas eluídas verificadas a 280 nm. Os picos referentes à Figura 8 com atividade amilolítica foram denominados de pico 1 (frações 10-16) e pico 2 (17-24). Estes foram eluídos com um gradiente de concentração 0,05 M a 0,1 M de NaCl, sendo cada fração analisada individualmente para atividade amilolítica e por eletroforese.

Figura 8 - Perfil de eluição da fração 40-80% de sulfato de amônio, empregando a cromatografia de troca aniônica (DEAE-Celulose) com gradiente 0,1 – 0,5 M de NaCl.

Os valores encontrados foram semelhantes tanto na determinação de atividade total quanto na eletroforese SDS-PAGE, mostrando a homogeneidade entre as frações analisadas. Após essas análises, foram reunidas as frações do 1º e 2º pico num único pico denominado DEAE. Os resultados de purificação

parcial referente a essa etapa de purificação são mostrados na Tabela 7, na qual se observa que o fator de purificação é de 2,73, com um rendimento de 71,3 %, porém, não apresentando boa separação quando comparado ao extrato bruto.

Tabela 7 - purificação parcial de amilases em extratos de maca, após cromatografia de troca iônica com gradiente de NaCl de 0,05 a 0,5 M.

Amostra	Proteína (mg/mL)	Atividade total (U)	Atividade específica (U*mg ⁻¹)	Rendimento %	Fatores de purificação	
					P	AE*
E.B.	0,623	12,04	345,77	100	1	
40-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	0,332	9,14	498,24	75,95	1,88	1,44
DEAE	0,077	8,59	946,47	71,33	8,09	2,73
CMC	0,017	7,74	1502,89	64,33	36,65	4,35

* Fatores de purificação: P = em relação às proteínas; AE = em relação à atividade específica; E.B. = extrato bruto.

Analisando ainda a Tabela 7, observa-se que não houve uma boa separação das enzimas amilolíticas com DEAE, porém, esta etapa permitiu a eliminação de proteínas contaminantes em 4 vezes em relação à etapa anterior. O pool de DEAE foi liofilizado e submetido a uma nova cromatografia em CMC, sendo eluído com tampão Tris-ácido maleico 0,05M (pH 6,0) em gradiente de NaCl de 0 a 0,5M. Foram gerados picos de proteínas, eluídos de 0,35 a 0,5 M de NaCl (Figura 9). Nessa etapa de purificação, foi verificada a atividade enzimática em cada uma das frações utilizando substratos específicos para α - e β -amilases, (Figura 9b).

O perfil de atividade enzimática, empregando-se amido como substrato (Figura 9a), apresenta um pico principal de atividade nas frações 39 a 44, este

pico se subdivide em dois pequenos picos (1 e 2), nas frações 39 a 41 e 42 a 44, respectivamente.

Figura 9 - Perfil de eluição das proteínas concentradas, do pool de DEAE-celulose, aplicadas em cromatografia de troca catiônica (CMC), com gradiente de 0 a 1,0 M de NaCl: A) perfil para atividade amilolítica total usando como substrato o amido e B) perfil para a atividade β -amilásica, utilizando como substrato PNPG5, reagente específico para β -amilase.

Analisando cada fração da figura 9a quanto à atividade amilolítica e por eletroforese SDS, para conferir a homogeneidade e reunir as frações correspondentes a cada pico, os resultados mostraram que o pico 1 apresentou as mesmas bandas protéicas que as frações do pico 2. Sendo assim, as frações foram reunidas e dialisadas para posteriores análises. Os resultados desse processo de purificação são mostrados na Tabela 7, onde se pode observar que o fator de purificação de 4,35, correspondente a CMC, teve uma melhoria em relação aos outros processos utilizados.

Como pode ser observado na Figura 9a, o perfil de atividade amilolítica total, coincide com o perfil para atividade β -amilásica. Então, foram reunidas as frações correspondentes a este pico (frações 39 a 44) num único pool, representando as proteínas eluídas com um gradiente de concentração na faixa de 0,3 a 0,5 M de NaCl, as quais apresentaram atividade β -amilásica.

A Tabela 8 mostra os resultados para cada processo de purificação de β -amilase. Pode-se concluir que a cromatografia de troca catiônica CMC pode servir como uma importante ferramenta na purificação de β -amilases de maca, resultando num fator de purificação de 154,80 e uma recuperação de 23 % de atividade em relação ao extrato bruto. A atividade α -amilásica não foi detectada em nenhuma das frações de purificação, sendo que no extrato bruto, apresentou atividade α -amilásica muito baixa, como foi mostrado na Figura 7 (Fracionamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Tabela 8 - Purificação parcial de β -amilase em extratos de maca, após cromatografia de troca iônica CMC (1º e 2º Pools de DEAE-celulose), com gradiente de NaCl de 0,3 a 0,5 M.

Amostra	Proteína (mg/mL)	Atividade total (U) de β - amilase	Atividade específica de β - amilase(U*mg ⁻¹)	Rendimento %	Fator de purificação
E.B	0,624	17,43	27,62	100	1,00
Fração 40-80%	0,332	14,09	538,70	80,89	19,50
DEAE	0,043	8,55	1643,85	49,05	59,51
CMC	0,017	3,82	4276,34	21,94	154,81

E.B = Extrato bruto

Na literatura, Roy e Hedge (1985) aplicaram um método cromatográfico rápido e simples para a purificação de β -amylase de batata doce (*Ipomea batata*): após o fracionamento do extrato bruto com sulfato de amônio a 40-60% de saturação, os autores realizaram a cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50, em tampão fosfato 25 mM (pH 8,0) contendo 2 mM 2-mercaptoetanol. A eluição foi feita através de um gradiente de NaCl de 0-0,5M. Para uma melhor purificação, a amostra obtida foi recromatografada na mesma coluna regenerada. Esse procedimento permitiu a obtenção de uma β -amilase pura em gel de eletroforese, sem contaminação de α -amilase, α -glicosidase, amiloglicosidase nem fosfatase, enzimas normalmente presentes nestes extratos.

MacGregor *et al.*, (1971) descrevem métodos de separação de formas ativas de amilases, presentes no malte de cevada, através de cromatografia de troca iônica em carboximetil celulose (CMC), empregando gradiente de eluição. As enzimas α - e β -amilase foram separadas entre si e cada enzima apareceu em

duas formas diferentes, duas para α -amilase e duas para β -amilase. Essa separação depende do gradiente salino aplicado, sendo que uma das α -amilases elui em alta concentração de NaCl.

No caso da maca, o emprego da cromatografia de troca iônica permitiu um avanço significativo na purificação de β -amilase, porém essas etapas parecem não terem sido suficientes, como discutido a seguir.

5.3.3 Homogeneidade das etapas de purificação.

Os resultados referentes às etapas de purificação foram aplicados em gel de eletroforese (Figura 10) em condições não-dissociantes e dissociantes. Após as corridas (Figuras A – C), dois géis contendo amido foram revelados com Coomassie (Figura 10B) e com iodo (Figura 10C). Nota-se que a banda com maior intensidade (a) que foi revelada com Coomassie (10B) não corresponde àquela de atividade β -amilásica (b) quando corada com iodo (10C), assim torna-se arriscado afirmar que as proteínas observadas na Figura 10A sejam as formadoras da molécula de β -amilase.

Nota-se também que há atividade de outras enzimas amilolíticas (c) (10C) nos primeiros passos de purificação com a descoloração completa da porção do amido inicialmente presente no gel. A ação de β -amilásica, por sua vez, é mais discreta (b) devido ao mecanismo dessa exoenzima, resultando dextrinas limites.

A estimativa da massa molecular da β -amilase de maca foi obtida por cromatografia de filtração em gel (Sephacryl HR-100) de $57,4 \pm 4,52$ kDa (Figura 11). Esse peso molecular é similar aos de β -amilases monoméricas de

ervilha (55 a 58 kDa) (Lizotte *et al.*, 1990), ginseng (63 kDa) (Yamasaki *et al.*, 1989), alfafa (61 kDa) (Kohno *et al.*, 1989) e lentilha (58 kDa) (Shaha *et al.*, 2004). Na purificação de β -amilase em batata doce, Chang *et al.* (1996) mostraram duas subunidades de proteínas com pesos moleculares de 12 e 60 kDa; entretanto, um pico simétrico foi observado quando este utilizou cromatografia em gel de filtração, apresentando atividade para β -amilase com um peso molecular de 72 kDa, este resultado sugere que a enzima é uma proteína dimerica constituída de duas sub-unidades.

Figura 10 - A) Gel de eletroforese em condições dissociantes SDS-PAGE (15% de acrilamida), corado com prata; B - C géis de eletroforese (7,5% de acrilamida) em condições não-dissociantes, corado com iodo para atividade enzimática e prata para proteína, respectivamente.

Linhas: 1 - Extrato Bruto; 2 - fração 40 – 80 % sulfato de amônia; 3 – DEAE; 4 pool de CMC; P – padrões de peso molecular.

Figura 11: Curva de calibração da cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S100-HR), para determinar o peso molecular nativo da β-amilase.

5.3.4 Metodologia de superfície e resposta (MSR) para a otimização dos valores ótimos de pH e temperatura para atividade β-amilásica

O procedimento de caracterização para as condições ótimas de pH e temperatura para atividade β-amilásica, basearam-se no estudo de diferentes valores de pH e temperatura, encontrados na literatura, de diferentes fontes de frutos e vegetais (Tabela 9). Neste estudo o emprego da MSR, foi bastante útil e necessário.

Os resultados dos 14 experimentos estão apresentados nas Tabelas 10 e 11 e na Figura 12. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente por regressão linear múltipla, empregando-se o delineamento central composto rotacional, após experimentos preliminares, tendo como variáveis independentes X_1 , X_2 (pH e temperatura) em cinco níveis, incluindo o ponto central e duas variações positivas e negativas de 1 e $\sqrt{2}$. O modelo matemático, expresso em escala de variáveis, foi:

$$Y_{\text{cal}} (U_{\beta-A}) = 520,48 - 67,56x_1 + 123,28x_2 - 16,15x_1x_1 + 21,10x_2x_2 - 42,85x_1x_2$$

Tabela 9 - Condições de ensaios de pH e temperatura de atividade β -amilásica de diferentes fontes, encontrados na literatura.

Material	pH	T (°C)	pH	T (°C)
	AM	AM	β -amilase	β -amilase
Lentilha (Shaha et al., 2004)	--	--	6,1	40
Mandioca (Matos da Veiga, 2002)	6,0	60	--	--
Mandioquinha (Pires, 2002)	6,0	50	--	--
<i>Gladiolus klatianus</i> (Dicko et al., 2000)	--	--	5,5	55
Batata (Nielsen et al., 1997)	--	--	6,5	40
Batata doce (Hagenimana et al., 1994)	--	--	5.1-5.8	53
Rabanete (Rashad et al., 1994)	--	--	4,5-5,5	33-45
Ichoimo (Arai et al., 1991)	6,0	55	--	--
Inhame (Takase, Ogata & Ito, 1990)	5,0	60	--	--

AM: atividade amilolítica total

Tabela 10 - Valores da atividade β -amilásica a diferentes pHs e temperaturas nos extratos de maca, usando o amido como substrato.

Experimento	Valores em escala		Atividade enzimática
	X ₁	X ₂	U _{AM}
1	-1	-1	441,52
2	-1	1	815,85
3	1	-1	375,70
4	1	1	578,64
5	0	0	526,53
6	0	0	526,53
7	0	0	521,05
8	-1,414	0	544,36
9	1,414	0	377,07
10	0	-1,414	390,79
11	0	1,414	678,73
12	0	0	514,19
13	0	0	522,42
14	0	0	512,82

Tabela 11 - Valores significativos (ANOVA) para a atividade β -amilásica em função do pH (x_1) e temperatura (x_2), usando como substrato o amido.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F	Valor-P
pH	36410,0	1	36410,0	28,13753	0,000724
pH x pH	1908,7	1	1908,7	1,47507	0,259178
T	121213,5	1	121213,5	93,67336	0,000011
t x t	3258,0	1	3258,0	2,51775	0,151232
pH x t	7344,3	1	7344,3	5,67561	0,044382
Erro	10352,0	8	1294,0	-	-
Total SS	180885,7	13	-	-	-

* $p < 0,05$

A atividade β -amilásica é significativamente influenciada pela temperatura (x_2) e pelo pH (x_1) ($p < 0,05$, Tabela 11). O modelo apresentou um valor R significativo ($R_{\beta-A}^2 = 0,94$ e $R_{PE}^2_{adj} = 0,90$).

Através do gráfico de MSR (Figura 12), pode-se observar que a atividade enzimática máxima encontra-se no pico da superfície. As melhores condições para atividade β -amilásica, de acordo com modelo, ocorrem a pH 5,1 e 40,7°C. A máxima atividade β -amilásica prevista pelo modelo foi de 362,29 U. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por 200 μ g de amido hidrolisado por minuto por mg proteína⁻¹ nas condições de pH e temperatura.

As temperaturas ótimas para atividade β -amilásica para outras fontes estão na faixa de 33 a 55°C, e os valores de pH ótimos estão na faixa de 4,5 a 6,5 (Tabela 9) Porém, a maioria deles apresenta um valor de pH ótimo de 5,0 ou 5,5. Outros autores encontraram pHs ótimos para atividade β -amilásica em batata doce (Rashad *et al.*, 1993), mostarda branca (*Sinapsis alba* cotilédones) (Subbaramaiah *et al.*, 1990), e em beterraba e folhas de nabo nas faixas entre 4,5 a 5,6. (Ei-Sayed *et al.*, 1994)

O ajuste do modelo pode ser representado pela curva de respostas obtidas experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo (Figura 13), que devem ser o mais semelhante possível da reta diagonal, em vermelho.

Figura 12 - Modelo de superfície de resposta para atividade β -amilásica (U) em função do pH e temperatura. As condições experimentais do ponto central (0,0) foram pH = 5,5 e temperatura = 30° C (ver Tabelas 2 e 11).

Figura 13 - Respostas da MSR valores observados versus valores previstos para otimização de pH e temperatura.

5.4 Extração e caracterização parcial de enzimas pectinolíticas.

5.4.1. Extração e detecção de atividade PE e PG

Os ensaios para a extração PG e PE, basearam-se no método descrito por Pires & Finardi Filho, (2005) e outros dados citados na literatura. Resultados de maçã e laranja indicam que as enzimas pectinolíticas podem estar mais fortemente ligadas às estruturas de parede celular, dificultando assim sua solubilização durante a extração (Castaldo *et al.*, 1989; Hou *et al.*, 1997). Dessa forma é recomendado manter os extratos sob agitação para aumentar a solubilização, dessas enzimas. No presente trabalho não houve variação de atividade PE e PG em função do tempo de agitação, resultados semelhantes foram encontrados em mandioquinha Pires e Finardi, 2005.

Os resultados referentes à melhor extração de PG e PE de raízes de maca a diferentes pHs estão mostrados na Figura 14. De acordo com este gráfico, observa-se que o melhor valor de pH para extração de PG foi 8,5, a uma concentração de NaCl a 1,0 M durante 4 h a 4°C. Abu-Goukh *et al.*, (2003) extraíram PG de goiaba a pH de 8,2, entretanto, Yoshida *et al.* (1984) extraíram PG de tomate a um pH 9,0 sendo a valor mais alto encontrado na literatura.

O melhor valor para a extração de PE foi a pH 6,0 (Figura 15), quando foi extraído com NaCl a uma concentração de 1,0 M. Alonso *et al.* (1995) extraíram PE de cereja neste mesmo pH. Labib *et al.* (1997) extraíram PE de manga a pH 6,5, assim como D’Innocenzo *et al.*, 2001, que extraíram PE de papaia a pH 5,5.

Figura 14 - pH de extração para poligalacturonase (PG) e pectinesterase (PE) de raízes de maca, extratos preparados sobre as mesmas condições de concentração de NaCl (1,0M), tempo de extração (4 h) e temperatura (4°C).

5.4.2 Metodologia de superfície de resposta e otimização dos valores ótimos de temperatura e pH para atividade enzimática.

O procedimento de caracterização para as condições ótimas de pH e temperatura para atividade PG e PE, basearam-se no estudo de diferentes valores de pH e temperatura, encontrados na literatura, para diferentes fontes de frutos e vegetais (Tabelas 12 e 13). Como as condições de temperatura e pH variam entre os alimentos estudados, e nenhum estudo foi realizado anteriormente com a finalidade de estudar estas enzimas em raízes de maca.

Tabela 12 - Valores de temperatura e pH ótimas para atividade PG, citados na literatura.

Material	pH	Temperatura (°C)
Banana (Lohani&Trivedi, 2004)	4,5	37
Banana (Pathak et al., 2000)	3,3-4,3	37
Morango (Nogata et al., 1993)	5,5	37
Pêra (Nagel et al., 1967)	4,7	30
Sapote mamey (Ocampo et al., 2003)	4,0	^b
Tomate (Ma & Barret, 2001)	4,5	37
Tomate (Yoshida et al., 1984)	4,5	37

^bTemperatura para atividade PG não foi citado no artigo.

Tabela 13 - Valores de pH e temperaturas ótimas para atividade PE de diferentes frutas e vegetais, citados na literatura.

Material	pH	Temperatura (°C)
Acerola (Asis et al., 2002)	9,0	90
Batata (Tijskens et al., 1997)	7,5	55
Banana (Lohani&Trivedi, 2004)	7,5	b
Banana (Ly-Nguyen et al., 2002a, 2002b)	7,0	64
Cenoura (Ly-Nguyen et al., 2002a, 2002b)	^c	25
Cenoura (Tijskens et al., 1997)	7,4	48,5
Ervilhas (Laats et al., 1997)	7,5	25
Kiwi (Wegrzyn et al., 1992)	7,5	b
Laranja (Hou et al., 1997)	7,5	60
Laranja (Korner et al., 1980)	7,0	30
Manga (Labib et al., 1997)	7,0	30
Maçã (Castaldo et al., 1989)	6,5	25
Pomelo (Seymour et al., 1991a, 1991b)	7,0	25
Pêssego (Javeri & Wicker, 1991)	6,5-7,4	30
Sapote mamey (Ocampo et al., 2003)	7,5	25

^bA temperatura para atividade PE não foi citada no artigo.

^c O pH para atividade PE não foi citado no artigo

5.4.3 Valores ótimos de pH e temperatura para atividade PG

Os resultados dos 14 experimentos realizados para caracterizar a atividade PG estão apresentados nas Tabelas 14 e 15 e na Figura 15. Os resultados foram avaliados estatisticamente por regressão linear múltipla, o modelo matemático, expresso em escala de variáveis, foi:

$$y_{\text{calc}}(U_{\text{PG}}) = 160,94 + 5,10x_1 + 4,91x_2 - 19,73x_1x_1 - 8,95x_2x_2 \\ + 20,84 x_1x_2$$

Os termos lineares de pH (x_1) e temperatura (x_2) não foram significativos (ver Tabela 15). Entretanto, os termos quadráticos de pH (x_1x_1) e temperatura ($x_2 x_2$), assim como a interação entre o pH e temperatura (x_1x_2), foram significativos ($p < 0,05$, Tabela 15) e influenciam na atividade PG. O modelo apresentou um valor R significativo ($R_{\text{PG}}^2 = 0,91$ e $R_{\text{PG}}^2 = 0,85$). Geralmente o modelo é considerado excelente se R^2 é maior que 0,9. Assim esse modelo pode ser considerado estatisticamente significativo.

Através do gráfico de MSR (Figura 15) pode-se observar que a atividade enzimática máxima encontra-se no pico da superfície. As melhores condições para atividade PG, de acordo com modelo, ocorrem a pH 5,4 e 46 °C. A máxima atividade PG prevista pelo modelo foi de 165,46 U_{PG} . Uma unidade de atividade enzimática (U) foi expressa por 1,0 μg de ácido galacturônico produzido $\times \text{mg de proteína}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

O pH ótimo para atividade de PG foi de 5,4. Este valor se encontra na faixa dos valores obtidos na literatura para outros vegetais (Tabela 12), os quais variam entre 3,3 a 5,5. Entretanto, a temperatura para atividade de PG é mais

alta em comparação aos resultados mostrados na literatura (Tabela 12), que estão na faixa de 30 e 37° C.

A Figura 16 representa o ajuste do modelo pela curva de respostas, que foram obtidas experimentalmente, *versus* os valores previstos pelo modelo, onde devem estar os mais próximos possíveis da reta diagonal, em vermelho.

Tabela 14 - Valores atividade enzimática de PG e PE em extratos de maca.

Experimento	Valores em escala		Atividade Enzimática	
	X ₁	X ₂	U _{PG}	U _{PE}
1	-1	-1	135,10	15,75
2	-1	1	112,42	13,96
3	1	-1	116,24	20,75
4	1	1	176,60	18,54
5	0	0	161,72	34,41
6	0	0	160,80	34,99
7	0	0	161,83	34,66
8	1,414	0	117,01	20,50
9	-1,414	0	120,45	14,48
10	0	1,414	140,97	28,18
11	0	-1,414	139,58	31,31
12	0	0	160,98	37,25
13	0	0	159,74	35,52
14	0	0	160,57	34,87

Para atividade PG: $x_1 = (\text{pH} - 5.0)/0.5$, onde a faixa de pH varia de 4,3 a 5,7; $x_2 = (T - 35)/10$, onde T varia de 21 a 49°C; para a atividade PE, $x_1 = (\text{pH} - 6.5)/1.0$, numa faixa de pH de 5,1 a 7,9, e $x_2 = (T - 50)/5$, onde T varia entre 43 a 57° C.

Tabela 15 - Valores significativos (ANOVA) para atividade PG, em função do pH (x_1) e temperatura (x_2), do extrato enzimático de maca.

Variavel	Desviação estándar	Grado de liberdade	Desviacao media	Valor-F	Valor-P
pH	207,661	1	207,661	3,08067	0,117304
pH x pH	2873,415	1	2873,415	42,62740	0,000182
T	193,537	1	193,537	2,87115	0,128629
t x t	591,850	1	591,850	8,78016	0,018060
pH x t	1736,389	1	1736,389	25,75950	0,000959
Erro	539,262	8	67,408	-	-
Total SS	5961,236	13	-	-	-

* $p < 0,05$

Figura 15 - Modelo de superfície de resposta para atividade PG (U) em função do pH e temperatura. As condições experimentais do ponto central (0,0) foram pH = 5,0 e temperatura = 35° C (ver Tabelas 3 e 17).

Figura 16 - Respostas de MSR medidas *versus* valores previstos para a melhor atividade PG em extratos de maca.

5.4.4 Valores ótimos de pH e temperatura para atividade PE

Os resultados dos experimentos para avaliar os pontos ótimos de pH e temperatura para a determinação de atividade PE estão apresentados nas Tabela 14 e 16 e na Figura 17. Os resultados foram analisados estatisticamente por regressão linear múltipla, através do modelo matemático, expresso em escala de variáveis, foi:

$$y_{\text{calc}} (U_{\text{PE}}) = 35,28 + 2,26 x_1 - 1,05 x_2 - 10,49 x_1 x_1 - 4,36 x_2 x_2 - 0,11 x_1 x_2$$

A atividade PE é significativamente influenciada pelos termos quadráticos de pH ($x_1 x_1$) e temperatura ($x_2 x_2$) ($p < 0,05$, Tabela 16). O modelo apresentou um valor R significativo ($R_{\text{PE}}^2 = 0,92$ e $R_{\text{PE}}^2_{\text{adj}} = 0,85$).

Através do gráfico de MSR (Figura 17) pode-se observar que a atividade enzimática máxima encontra-se no pico da superfície. As melhores condições para atividade PE, de acordo com modelo, ocorrem a pH 6,6 e 49,4°C. A máxima atividade PE prevista pelo modelo foi de 35,47 U_{PE} . Uma unidade de

atividade enzimática (U) foi expressa por $1,0 \mu\text{M}$ de MeOH x mg proteína⁻¹ x min^{-1} .

As temperaturas para atividade enzimática de PE de outras fontes estão na faixa de 25 a 90°C. Entretanto, a maioria dos trabalhos não inclui condições de otimização de pH e temperatura para atividade de PE. Quando o processo de otimização é incluído, a temperatura ótima encontrada pode ser alta, como em acerola, banana, laranja e cenoura, as quais são de 90, 64, 60 e 48,5 °C, respectivamente (Tabela 13). Os valores de pH ótimo nos vegetais estudados para atividade PE estão na faixa de 6,5 a 9,0 (Tabela 13). Porém, a maioria deles apresenta um valor de pH ótimo de 7,0 ou 7,5. O pH ótimo para atividade em extrato de maca foi similar a outras fontes, como maçã, pêra e mandioquinha, os quais foram a 6,5.

O ajuste do modelo pode ser representado pela curva de respostas obtidas experimentalmente versus os valores previstos pelo modelo (Figura 18)

Tabela 16 - Valores significativos (ANOVA) para atividade PE, em função do pH (x_1) e temperatura (x_2), do extrato enzimático de maca.

Variavel	Desviação estándar	Grado de liberdade	Desviacao media	Valor-F	Valor-P
pH	40,923	1	40,923	3,78595	0,087565
pH x pH	812,423	1	812,423	75,16135	0,000024
T	8,876	1	8,876	0,82113	0,391325
t x t	140,432	1	140,432	12,99211	0,006937
t x pH	0,044	1	0,044	0,00408	0,950638
Erro	86,472	8	10,8091	-	-
Total SS	1042,649	13	-	-	-

* $p < 0,05$

Figura 17 - Modelo de superfície de resposta para atividade PE (U) em função do pH e temperatura. As condições experimentais do ponto central (0,0) foram pH = 6,5 e temperatura = 50° C (ver tabelas 3 e 9).

Figura 18 - Respostas de MSR medidas *versus* valores previstos para a melhor atividade PE

5.5 Extração do amido

O rendimento do amido extraído foi entre 8,23 e 9,62% com uma média de 8,92 % e com um teor de amido total de 88 %. No momento da extração a maca apresentou alto teor de fibras e baixo teor de água, os quais dificultaram a extração do amido. As etapas de homogeneização e filtração foram de suma importância para a separação do amido da parte fibrosa, pois após a centrifugação, percebeu-se a formação de uma camada superior de cor amarela-laranja, sendo necessário o uso de uma espátula para eliminá-la e, conseqüentemente, houve uma provável queda no rendimento do amido.

Dados da literatura mostraram que o rendimento de mandioca é de 25,9 a 35,3% com um teor de amido total de 98,2% (Abera *et al.*, 2003; Feniman, 2004), enquanto o rendimento de batata doce varia de 20,4 a 31,8% e da e mandioquinha 14,3 a 17,5% (Noda *et al.*, 2001; Pires, 2005).

Entretanto o teor de amido total do amido extraído em mandioquinha foi de 87,8% Pires, 2005. Hoover (2001) determinou os rendimentos de amido de batata e inhame de 32% e 86,5 % respectivamente.

5.5.1 Morfologia do grânulo de amido

A distribuição do tamanho dos grânulos de amido medida por microscopia eletrônica de varredura está mostrada na Figura 19. O grânulo de amido apresentou uma morfologia oval (forma de cápsula) com uma distribuição dominante em média de 11,93 μm de comprimento e 4,18 μm de diâmetro, o tamanho maior do grânulo de amido foi 14,9 μm de comprimento

entre 9,3 μm de diâmetro, e grânulos pequenos com 7,37 de comprimento e 5,30 μm de diâmetro (Tabela 17).

Figura 19 - Morfologia dos grânulos de amido de maca observados por microscopia eletrônica de varredura.

Tabela 17 - Distribuição do tamanho dos grânulos de amido de maca.

Amido	Comprimento	Diâmetro
Grãos dominantes	$11,93 \pm 0,75$	$4,18 \pm 0,22$
Grãos maiores	$14,9 \pm 0,82$	$9,33 \pm 1,13$
Grãos menores	$7,37 \pm 0,72$	$5,30 \pm 0,38$

Estes grânulos de amido de maca são comparados com a morfologia de outras fontes de amido (Figura 20 e Tabela 18), e observa-se que o amido de maca tem uma semelhança com a morfologia oval de birí (*Canna edulis*) e oca (*Oxalis tuberosa*), os quais apresentam tamanhos entre 35 a 101 e 22 a 55 μm ,

respectivamente (Santacruz *et al.*, 2002), entretanto, os grânulos de amido de batata apresentam tamanhos entre 10 a 100 μm (Snyder *et al.*, 1984).

Figura 20 - Comparação da morfologia dos grânulos de amido da maca com os da literatura (Santacruz *et al.*, 2002, Sarikaja *et al.*, 2000).

Tabela 18 - Comparação das propriedades físico químicas dos grânulos de amido da maca com outras fontes. (Huover *et al.*, 2001; Santacruz *et al.*, 2002; Sarikaja *et al.*, 2000).

Fonte	Tamanho	Morfologia
Batata	15 a 110	Oval e redondo
Batata doce	2 a 42	Redondo oval e poligonal
Mandioca	5 a 40	Redondo
Inhame	1 a 100	Redondo e oval
Mandioquinha	7 a 23	Irregular
Birí	35 a 101	Oval
Oca	22 a 55	Oval
Maca	4 a 12	Oval

Comparando o tamanho do grânulo de amido da maca com estas fontes, observa-se que este possui dimensões menores. Este resultado pode ser explicado devido às baixas temperaturas ambientais durante o cultivo dessa raiz. Entretanto, Noda *et al.* (2001) observou diferenças no tamanho dos grânulos amidos e mudanças nas propriedades físico-químicas, em amidos de batata doce, quando foram cultivadas a diferentes temperaturas (15, 21, 27 e 33 °C). Lu *et al.* (1996) e Shi *et al.* (1994) estudaram os efeitos da temperatura do meio ambiente, no tamanho dos grãos de amido de trigo e milho, em ambos os casos observaram a diminuição do tamanho dos grânulos, quando cultivadas a baixas temperaturas.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no trabalho descrito sobre o estudo de raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walpers), pode-se concluir que:

1. As raízes de maca apresentam elevada atividade amilolítica *in vitro*, após 30 a 45 dias aproximadamente pós-colheita,
2. Obteve-se a purificação parcial de uma β -amilase, através da cromatografia com CMC, com peso molecular de $57 \pm 4,75$ kDa, pH ótimo de 5,1 e temperatura ótima de 40,7 °C,
3. As melhores condições para atividade PE ocorrem a pH 6,6 e à temperatura de 49,4 °C, quando a enzima é extraída a pH 6,0;
4. Os parâmetros ótimos para atividade PG são a pH = 5,4 e T = 46° C, quando a enzima é extraída a pH 8,5.
5. O teor de amido foi em media de 8,92% com um rendimento 88% após a extração do amido;
6. Os grânulos de amido apresentaram dimensões reduzidas (4 a 12 μ m) com morfologia oval em forma de cápsula.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABERA, S., RAKSHIT, S. T. Comparison of physiochemical and functional properties of cassava starch extracted from fresh root and chips. *Starch-Starke*, v.55, p. 287 – 296, 2003.
- ABU-GOUKH, A-B. A., BASHIR, H. A., Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. *Food Chemistry*, v. 83, p.213-218, 2003.
- ALONSO, J., RODRÍGUEZ, M.T., CANET, W. Detection of pectinesterase in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.16, p.39-42, 1995.
- AMASAKI, K., YOKOYAMA, H., MIYANO, K., NUNOURA, Y., HIGASHIHARA, M., KITAHATA, S., YONEDA, K., UMEZAWA, C. Purification and characterization of β -amylase from ginseng. *Chemical Pharmacology*, v. 37, p. 973 – 978, 1989.
- ARÊAS, J.A.G., LAJOLO, F.M. Starch transformation during banana ripening: I-the phosforilase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. *Journal of Food Biochemistry*, v.5, p.19-37, 1981.
- ARAI, T., KAWABATA, A., TANAGUCHI, H. Purification and some properties of ichoimo β -amylase. *Agriculture and Biological Chemistry*, v.55 (2), p.399-405, 1991.
- ASSIS, S.A.; MARTINS, A.B.G.; GUAGLIANONI, D.G.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Partial purification and characterization of pectin

- methylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). Journal Agriculture and Food Chemistry, v.50, p.4103-4107, 2002.
- ASSIS, S.A, FERREIRA, B.S, FERNANDES, P., TREVISAN, H.C., CABRAL, J.M.S., OLIVEIRA, O.M.M.F. Gelatin immobilized pectinmethylesterase for production of low methoxyl pectin. Food Chemical, v. 86, p. 333 – 337, 2004.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the AOAC. 15^a, Arlinton, USA, v. 2, p. 1095 – 1098, 1998.
- AWAZUHARA, M., NAKAGAWA, A., YAMAGUCHI, J., FUJIWARA, T., HAYASHI, H., HATAE, K., CHINO, M., SHIMADA, A. Distribution and characterization of enzymes causing starch degradation in rice (*Oryza sativa* Cv. Koshihikari). Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 48, p. 245-252, 2000.
- BEMMILLER, J.N., WHISTLER, R.L. CARBOHYDRATES. In. Fennema, O.R. Food Chemistry, 3a ed., Marcel Dekker, New York, USA, 1996, 1069p.
- BERNFELD, P. Enzymes of starch degradation and synthesis. Advances in Enzymology. New York, v. 12, p. 379-428, 1951.

- BERRY, D., PATERSON, A. Enzymes in the food industry In: SUCKLING, C. Enzyme Chemistry, impact and applications – 2nd edition, London: Chapman and Hall, p. 306-317, 1990.
- BLANCO, P., SIERO, C., VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. FEMS Microbiology. Lett., v.175, p.1-9, 1999.
- BRADFORD, M. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CANALES M., AGUILAR J., PRADA A., MARCELO A., HUAMAN C., CARBAJAL L. Nutritional evaluation of *Lepidium meyenii* (Maca) in albino mice and their descendant. Archivos Latinoamericanos De Nutrition, v. 50, p. 126 -133, 2000
- CARDENAS A. R. Guia para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la maca (*Lepidium meyenii* Walpers). Santafé de Bogotá: Convenio Andres Bello, Serie Ciencia y Tecnología N° 82, 1998.
- CASTALDO, D.; QUAGLIUOLO, L.; SERVILLO, L.; BALESTRIERI, C.; GIOVANE, A. Isolation and characterization of pectin methylesterase from apple fruit. J Food Science, v.54 (3), p.653-655, 673, 1989.
- CHANG, C.T., LIOU, H.Y., TANG, H.L., SUNG, H.Y. Activation, purification and properties of β -amylase from sweet potatoes *Ipomea batatas*. Biotechnology Appl. Biochemistry, v. 24, p. 13 – 18, 1996.

- CÍCERO, A. F. G., BANDIERI, E., ARLETTI, R. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behavior in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 75, p. 225-229, 2001.
- COMAS, M.; MIQUEL, X.; ARIAS, G.; DE LA TORRE, M.C. Estudio bromatológico de la maca o paca (*Lepidium meyenii*). *Alimentaria*, v.286 (35), p.85-90, 1997.
- D'INNOCENZO, M., LAJOLO, F. M. Effect of gamma irradiation on softening changes and enzyme activity during ripening of papaya fruit. *Journal and Food Biochemistry*, v.25, n.5, p. 425-438, 2001.
- DAS, G., SEN-MANDI, S. Scutellar amylase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. *Annals of Botany*. v.69, p.497–501, 1992.
- DAUSSANT, J., ZBASZYNIAK, B., SADOWSKI, J., WIATROSZAK, I. Cereal β -amylase: immunochemical study on two enzyme-deficient inbred lines of rye. *Planta* v.151, p.176–179, 1981.
- DAWSON, C. M. R, ELLIOTT, C. D., ELLIOTT, H. W., JONES, M. K. *Data For Biochemical Research*. Third Edition. Oxford Science Publication. 1989, 580p.

DICKO, H. M., LEEUWEN, S. F. J. M., HILHORST, R., TRAORE, S.A.

Extraction, partial purification and characterization of β -amylase from bulbs of *G. klattianus*. *Bioresourse Technology*, v. 73, p. 183 – 185, 2000.

DINI, A., MIGLIUOLO, G., RASTRELLI, L. SATURNINO, P.,

STCHETTINO, O. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry*, v.49, p.347 – 349, 1994.

DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A. Glucosinolates from maca (*Lepidium*

meyenii). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.30, p.1087-1090, 2002.

DRIER, W., SCHNARRENBARGER, C., BORNER, T. Light and stress-

dependent enhancement of amylolytic activities in white and green barley leaves: β -amylases are stress-induced proteins. *Journal of Plant Physiology*, v.145, p.342-348, 1995.

EI-SHAYEB, A. M. A. Purification and some properties of β -amylase

enzymes from beetroot and turnip leaf tissues. *Bull Fac. Pharmacia, Cairo University. Egyptian*, v. 32, n 2, 1994.

FENIMAN M. C. Caracterização de raízes de mandioca (*Manihot esculenta*

Crantz) do cultivar IAC 576-70 quanto à cocção composição química e propriedades do amido em duas épocas de colheita. São Paulo, 83p.(Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP).

- GAINVORS, A., FREZIER, V., LEMARESQUIER, H., LEQUART, C., AIGLE, M., BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, v. 10, p. 1311 – 1319, 1994.
- GANNA, J.A., KALENGAMALIRO, N.E., CUNNINGHAM, S.M., VOLENEC, J.J. Expression of β -amylase from alfalfa taproots. Plant Physiology, v.118, p. 1495-1505, 1998.
- GANGHOFNER, D., KELLERMANN, J., STAUDENBAUER, W., BRONNENMEIER, K. Purification and properties of an Amylopullulanase, a glucoamylase, and an α -glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* – Bioscience Biotechnology Biochemistry, Tokyo, v. 62, n. 2, p. 302-308, 1998
- GODFREY, T., WEST, S. Industrial enzymology 2nd edition, London: Macmillan Press Ltd, p. 341-351, 1996.
- GONZALES G.F., CORDOVA A., GONZALES C., CHUNG A., VEGA K., VILLENA A. Lepidium meyenii (Maca) improved semen parameters in adult men. Asian Journal of Andrology, v. 3, p. 301 – 303, 2001a
- GONZALES G.F., RUIZ A., GONZALES C., VILLEGAS L. CORDOVA A. Effect of Lepidium meyenii (maca) roots on spermatogenesis of male rats. Asian Journal of Andrology, v. 3, p. 231 – 233, 2001b

GREENWOOD, C. T., MACGREGOR, A. W. Journal of Institute of Brewing, v.71, p.105–117, 1965.

GROSS, K.C. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. HortScience, v.17(6), p.933-934, 1982.

HAGENIMANA, V., VÉZINA, L., SIMARD, R. Sweet potato α - and β -amylases: characterization and kinetic studies with endogenous inhibitors - Journal of Food Science, Chicago, v. 59, n. 2, p. 373-377, 1994.

HAMES, B.D. One dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. In: HAMES, B.D.; RICKWOOD, D., eds. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 2.ed. Oxford University,. p 1-147, 1990

HILL, R. D., MCGREGOR, A. W. IN Y. Pomeranz, Advances in cereal science and technology , v.9, p.217–261, 1988.

HONDA, S.; NISHIMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; CHIBA, H.; KAKEHI, K. A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. Anal Biochem, v.119, p.194-199, 1982.

- HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 45, p. 253-267, 2001.
- HOU, W.N., JEONG, Y., WALKER, B.L., WEI, C-I., MARSHALL, M.R. Isolation and characterization of pectinesterase from valencia orange. *Journal of Food Biochemistry*, v.21, p.309-333, 1997.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3ª. São Paulo, v.1, 1985, 533p.
- JACKMAN, R.L.; GIBSON, H.J.; STANLEY, D.W. Tomato polygalacturonase extractability. *Journal Food Biochem*, v.19, p.139-152, 1995.
- JAYANI, S. R, SAXENA, S., GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 2005
- JAVERI, H.; WICKER, L. Partial purification and characterization of peach pectinesterase. *J Food Biochem*, v.15, p.241-252, 1991.
- KARRER, E., LITTS, J., RODRIGUEZ, R. Differential expression of alpha-amylase genes in germinating rice and barley seeds - *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 16, n. 5, p. 797-805, 1991.
- KLAVONS, J.A.; BENNETT, R.D. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *J Agric Food Chem*, v.34, p.597-599, 1986.

- KOHNO, A., NANMORI, T, SHINKE, R. Purification of β -amylase from alfafa (*Medicago sativa* L.) seeds .Journal of Biochemistry, Tokyo, v. 105, n. 2, p. 231-233, 1989.
- KÖRNER, B.; ZIMMERMANN, G.; BERK, Z. Orange pectinesterase: purification, properties, and effect on cloud stability. Journal Food Science, v.45, p.1203-1206, 1980.
- KYEONG-JUN LEE¹, KONRAD DABROWSKI¹, JACQUES RINCHARD¹, CARLOS GOMEZ², LESZEK GUZ³, CARLOS VILCHEZ ². Supplementation of maca (*Lepidium meyenii*) tuber meal in diets improves growth rate and survival of rainbowtrout *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum) alevins and juveniles. Aquaculture Research, v. 35, p. 215 – 223, 2004
- LAATS, M.M., GROSDENIS, F., RECOURT, K., VORAGEN, A.G.J., WICHERS, H.J. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from green beans (*Phaseolus vulgaris* L). Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.45, p.572-577, 1997.
- LABIB, A.A.S.; EL-ASHWAH, F.A.; OMRAN, H.T.; ASKAR, A. Heat-inactivation of mango pectinesterase and polygalacturonase. Food Chemistry, v.53, p.137-142, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. Nature, v.227, n. 1, p. 680-685, 1970.

- LEON T. The 'Maca' (*Lepidium meyenii*): a little known food plant of Peru. *Economic Botany*, v. 18, p.122-127, 1964.
- LI, G., AMMERMAN U., QUIROS C.F. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium Peruvianum* Chacon) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* v.55, p. 225 - 262, 2001.
- LIZOTTE, P.A., HENSON, C.A., DUKE, S.H. Purification and characterization of pea epicotyl β -amylase. *Plant Physiology*, v.92, p. 615 – 621, 1990.
- LOHANI, S., TRIVEDI, P. K., NATH. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and technology*, v.31, p.119-126, 2004.
- LU, T. J., JANE, J. KEELING, P. L., SINGLETARY, G. W., Maize starch fine structures effected by ear developmental temperature. *Carbohydrate Research*, v. 282, p. 157 – 170, 1996.
- LY-NGUYEN, B.; LOEY, A.V.; FACHIN, D.; VERLENT, I.; HENDRICKX, M.E. Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv Cavendish). *Biotechnology and Bioengineering*, v.78 (6), p.683-691, 2002a.

LY-NGUYEN, B.; LOEY, A.V.; FACHIN, D.; VERLENT, I.; HENDRICKX, M.E. Partial purification, characterization, and thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from carrots (*Daucus carrota* L.). J Agric Food Chem, v.50, p.5437-5444, 2002b.

MA, W.H., BARRET, D.M. Effects of raw materials and process variables on the heat penetration times, firmness and pectic enzyme activity of diced tomatoes (Halley bos 3155 CV). Journal of Food Process and Preservation, v.25, p.123-136, 2001.

MACGREGOR, A. W., LABERGE, D. E., MEREDITH, W. O. S. Separation of α -amylase and β -amylase enzymes from barley malt by ion-exchange chromatography. Cereal Chemistry, v. 48, p.490 - 498, 1971.

MAMO, G., GESSESSE, A. Purification and charaterization of two raw starch-digesting thermostable alpha-amylase from thermophilic *Bacillus*. Enzyme and microbial technology, Surrey, v. 25, p. 433-438, 1999.

MATOS DA VEIGA, E. Caracterização e purificação parcial de α -amilase de mandioca (*Manihot* *suculenta* Crantz). Faculdade de Ciências farmacêuticas da Universidae de São Paulo, 2002. 88p. Dissertação de Mestrado

MATOS DA VEIGA, E., PICANÇO MAGALHAES, C., FINARDI, F. F.

Isolamento e caracterização inicial de amilases em raízes de mandioca (*Manihot suculenta* Crantz). In: XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos 2000, v.2, Resumo p.5.89.

MCCLEARY, B. V., CODD, R. Measurement of β -amylase in cereal flours and commercial enzyme preparation. *Journal of Cereal Science*, v.9, p.17-33, 1989.

MCCLEARY, B. V., SHEEHAN, H. Measurement of α -amylase: A new assay procedure. *Journal of Cereal Science*, v. 6, p. 237-251, 1987.

McCleary, V., Prosky, L. *Advanced Dietary Fibre Technology*. Blackwell Science, London, cap.33, p. 379-398, 2001.

MUHAMMAD, I., ZHAO, J., DUNBAR, CH. D., KHAN, A. I. Constituents of *Lepidium meyenii* “maca”. *Phytochemistry*, v. 59, p. 105-110, 2002.

MURALIKRISHNA, G. NIRMALA, M. Cereal α -amylase-an overview. *Carbohydrate polymers*, p.1-11, 2005.

NAGEL, C.W.; PATTERSON, M.E. Pectic enzymes and development of the pear (*Pyrus communis*). *Journal Food Science*, v.32, p.294-297, 1967.

NIELSEN, V. A., CHRISTENSEN, E. I.M. T., BOIJO, M., MARCUSSEN J. Purification and characterization of β -amylase from leaves of potato

- (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, v. 99, p. 190-196, 1997.
- NIRMALA, M., MURALIKRISHNA, G. Three α -amylases from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15)—purification and partial characterization *Phytochemistry*, v.62, p. 21–30, 2003
- NODA, T., KOBAYASHI, T, SUDA, I. Effect of soil temperature on starch properties of sweet potatoes. *Carbohydrate Polimers*, v. 44, p. 239-246, 2001.
- NOGATA, Y.; OHTA, H.; VORAGEN, A. G. J. Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry*, v. 34 (3), p. 617-620, 1993.
- OCAMPO, A.M.L., LOZANO, S., ERRASQUIN, A.R.; APARICIO, J. A.; ORTÍZ, D.G. Softening and biochemical changes of sapote mamey fruit (*Pouteria sapota*) at different development and ripening stages. *Journal and Food Biochemistry*, v.27, p.91-107, 2003.
- OSHIMA, M., GU, Y., TSUKADA S. Effects of *Lepidium meyenii* Walp and *Jatropha macrantha* on blood levels of estradiol-17 β , progesterone, testosterone and the ratr of embryo implantation in mice. *Journal of Veterinary and Medicine Science*, v. 65, n. 10, p. 1145-1146, 2003.
- PADMAJA, G., BALAGOPAL, C. Cellular and extracellular enzymes associated with the post harvest deterioration of cassava tubers

Journal of Food Science and Technology, San Diego, v. 22, p. 82-87, 1985.

PATHAK, N., MISHRA, S., SANWAL, G.G. Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*, v.54, p.147-152, 2000.

PIACENTE, S., CARBONE, V., PLAZA, A., ZAMPELLI, A., PIZZA, C. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Journal Agriculture and Food Chemistry*, v. 50, p. 5621-5625, 2002.

PIRES, T. C. R. identificação e caracterização de enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). São Paulo, 2002, 74p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

PIRES, T.C.R.; FINARDI-FILHO, F. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) *Food Chemistry*, v.89, p.85-92, 2005.

PURI, A.; SOLOMOS, T.; KRAMER, A. Partial purification and characterization of potato pectinesterase. *Food Chemistry*, v. 8, p.203-213. 1982.

QUIROS C.F., EPPERSON A., HU J.H., HOLLE M. Physiological studies and determination of chromosome number in Maca, *Lepidium meyenii* (Brassicaceae). *Economic Botany*, v. 50, p. 216 - 223, 1996.

QUIRÓS, C.F.; CÁRDENAS, R.A. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). In: HERMANN, M., HELLER, J. Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca, yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. <http://www.cipotato.org/market/ars/ar2002/abstracts/bherm.htm>, acesso em 8 Oct. 2004.

RASHAD, M. M., JWANNY, W. E., EI-SAYED, T. S., MANHMOUND, E. A. Glycosidases in tissues of some Brassicaceae. Radish-root β -amylase: extraction, purification and characterization. *Bioresource Technology*, v.51, p. 183 – 186, 1995.

RAVI, V., AKED, J., BALAGOPALAN, C. Review on tropical root and tubers crops I. Storage methods and quality changes *Critical Review in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v. 36, n. 7, p. 661-709, 1996.

ROY, F., HEGDE, V. Rapid procedure for purification of β -amylase from *Ipomea batata*. *Journal of Chromatography*, v. 324, p. 489 - 494, 198.

SANDERS, L., CHILD, R., ULVSKOK, P., ALBRECHSTEN, M., BORKHARDT. Analysis of dehiscence zone endo-polygalacturonase in oilseed rape (*Brassica napus*) and *Arabidopsis thaliana*: evidence

for roles in cell separation in dehiscence and abscission zones, and stylar tissues during pollen tube growth. *Plant Molec. Biol.*, v.46, p.469-479, 2001.

SANDOVAL, M., OKUHAMA, N. N., ANGELES, M. F., MELCHOR, V. V., CONDEZO, A. L. antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*, v.79, p.207 – 213, 2002.

SANTACRUZ, S., KOCH, K., SVENSSON, E., RUALES, J., ELIASSON, C. A. Three underutilised of starch from the Andean region in Ecuador Part I. Physico-chemical characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, p. 63-70 , 2002.

SARIKAYA, E., HIGASA, T., ADACHI, M., MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*, v.35, p. 711–715, 2000.

SEYMOUR, T.A.; PRESTON, J.F.; WICKER, L.; LINDSAY, J.A.; MARSHALL, M.R. Purification and properties of pectinesterases of marsh white grapefruit pulp. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, v.39, p.1080-1085, 1991.

SHAHA, K. R., SANA, K. N., KARIM, R. M. Characterization of β -amylase from Lentil (*Lenis esculenta L.*) Cotyledons. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.6, p. 1050-1056, 2004.

- SHI, Y. C., SEIB, P. A., BERNARDIN, J. E. Effects of temperature during grain-filling on starches from six wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, v. 71, p.369 – 383, 1994.
- SNYDER, E. M. Industrial microscopy of starches in R. L. Whistler, J. N. BeMiller, Paschall, E. *Starch Chemistry and Technology*, London, Academic Press, 1984.
- STREET, H. V. Glycoside hydrolases - amylases: measurement of starchiodine complex. In: Bergmeyer, H. *Methods of Enzyme Analyses*, v.2, second edition, Academic Press, New York, 1974.
- SUBBARAMAIAH, K., SHARMA, R. Characterization of β -amylase from *Sinapsis alba* Cotyledons, *Phytochemistry*, v. 29, p.1417, 1990.
- TABELA DE CONPOSICAO DOS ALIMENTOS-UNICAMP, disponivel em: <http://www.unicamp.br/nepa/tapo/tabela/tabela1>. Acesso em novembro de 2005.
- TAKASE, H., OGATA, F., ITO, A. Purification and characterization of (α -amylases from tubers of taro *Colocasia antiquorum*. *Agriculture and Biological Chemistry*, v.54 (10), p.2741-2742, 1990.
- TELLEZ, M.R.; KHAN, I.A. KOBASISY, M.; SHRADER, K.K.; DAYAN, F.E.; OSBRINK, W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). *Phytochemistry*, v.61(2), p.149-155, 2002

- TELLO, J., HERMANN, M., CALDERÓN, A. La Maca (*Lepidium meyenii* Walpers): cultivo alimenticio potencial para las zonas altoandinas. Boletín de Lima v.81, p.59-66, 1992.
- THOMA, J., SPRADLIN, J., DYGERT, S. Plant and animal amylases In: Boyer, P. - The enzymes – v. 5, 3rd edition, New York: Ed Academic Press, p. 115-182. 1971
- TIJSEKENS, L.M.M.; WALDRON, K.W.; NG, A.; INGHAM, L.; DIJK, C.V. The kinetics of pectin methyl esterase in potatoes and carrots during blanching. J. Food Eng, v.34, p.371-385, 1997.
- VIKSO-NIELSEN, A., CHRISTENSEN, T.M.I.E.; BOJKO, M.; MARCUSSEN, J. Purification and characterization of β -amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). Physiologia Plantarum, v.99, p.190-196, 1997.
- VILCHES, O. L. Maca: Planta Medicinal y Nutritiva del Perú. Instituto de Fitoterapia Americano, Lima, Peru, 182 pp. 1998.
- VILES, F. J., SILVERMAN, L. Determination of starch and cellulose with anthrone. Analytical Chemistry, v.21(8), p.950-953, 1949.
- VORAGEN, F., BELDMAN, G., SCHOLS, H. Chemistry and enzymology of pectins. In: McCLEARY, V., PROSKY, L. Advanced Dietary Fibre Technology. Blackwell Science, London, cap. 33, p. 379 - 398. 2001.

- WĘGRZY T.F.; MACRAE E.A. Pectinesterase, polygalacturonase and β -galactosidase during softening of ethylene-treated kiwifruit. *HortScience*, v.27 (8), p. 900-902, 1992.
- WHITAKER, J.R. Principles of enzymology for the food sciences. Second edition, Ed Marcel Dekker, New York, 1996, 636p.
- WITT, W., SAUTER, J. Purification and properties of a starch granule-degrading α -amylase from potato tubers. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 47(304), p. 1789-1795, 1996.
- YAMASAKI,Y., KONNO, H.,MASIMA, H. Purification and properties of α -glucosidase from millet seeds. *Phytochemistry* v.41, p.703–705, 1996.
- YOSHIDA, O.; NAKAGAWA, H.; OGURA, N.; SATO, T. Effect of heat treatment on the development of polygalacturonase activity in tomato fruit during ripening. *Plant and Cell Physiology*, v. 25 (3), p.505-509, 1984.
- ZHANG, T., OATES, G. C. Relationship between α -amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches. *Food Chemistry*, v.65, p.157-163, 1999.
- ZIEGLER P. Cereal β -amylases. *Journal of Cereal Science*, v.39, p.195-204, 1999.

ZHENG B.L., HE K., KIM C.H., ROGERS L., SHAOY., HUANG Z.Y., LU, Y., YAN S.J., QIEN L.C., ZHENG Q.Y. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*, v. 55, p. 598 – 602, 2000.