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

Caracterização físico-química e purificação de enzimas amilolíticas de
mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. Zolhudinha

Cristina de Simone Carlos Iglesias Pascual

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

SÃO PAULO
2005

Cristina de Simone Carlos Iglesias Pascual

Caracterização físico-química e purificação de enzimas amilolíticas de
mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. Zolhudinha

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
Orientador/Presidente

Úrsula Maria Lanfer Marquez
1º. examinador

Antonia Miwa Iguti
2º. examinador

São Paulo, 05 de Agosto de 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Cristina de Simone Carlos Iglesias Pascual no Programa Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 5 dias do mês de agosto de 2005, no(a) Auditório realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Cristina de Simone Carlos Iglesias Pascual, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia, intitulada:

"Caracterização físico-química e purificação de enzimas amilolíticas de mandioca ('Manihot esculenta' Crantz) cv. Zolhudinha"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Flavio Finardi Filho	Presidente	FCF	Aprovada
Ursula Maria Lanfer Marquez	Titular	FCF	Aprovada
Antonia Miwa Iguti	Titular	Docente Externo	Aprovada
Resultado Final: <i>Aprovada</i>			
Parecer da Comissão Julgadora			

Eu, Monica Dealis Perussi, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 5 dias do mês de agosto de 2005.

Ursula M. Lanfer Marquez
Ursula Maria Lanfer Marquez

Antonia Miwa Iguti
Antonia Miwa Iguti

Flavio Finardi Filho
Flavio Finardi Filho
Orientador(a)

Obs. Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110. do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG. para homologação.

Impresso em: 05/08/2005

*“Quando você só consegue ver duas alternativas – a sua e a “errada” –
deve-se procurar uma terceira alternativa melhor para os envolvidos.”*

(Autor anônimo)

Dedico este trabalho

*Ao meu marido Jorge Luis Iglesias Pascual, pelo apoio incondicional,
amor e compreensão e principalmente pelo incentivo e motivação em toda
realização deste trabalho desde o início.*

*Aos meus pais, Celeste Carlos e Maria Aparecida de Simone Carlos, pela
dedicação, carinho e apoio total financeiro e nas minhas decisões.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Flavio Finardi Filho pela orientação, paciência, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos e financiamento da pesquisa.

Aos colegas de laboratório que além da colaboração e experiências divididas, me proporcionaram carinho e muitos momentos de alegria.

À Sra. Teresa Lasada Valle do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pelo fornecimento das amostras de raízes de mandioca Zolhudinha, utilizadas neste trabalho.

Aos Amigos da chácara Santana Francisco Luis Rodrigues, Luis Rodrigues e Pedro Doroteu, pelo fornecimento das raízes de mandioca comerciais também utilizadas no trabalho e pela ajuda no plantio e cultivo de algumas mudas da variedade Zolhudinha no local.

À Professora Dra. Úrsula Maria Lanfer Márquez, sua aluna de doutorado Renata Alexandra Neves e técnica Rosa Maria Cerdeira Barros, por várias sugestões e ajuda no processo de purificação deste trabalho e por disponibilizar o uso do coletor de frações.

Ao Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos, em especial à Professora Dra. Tullia Maria Clara Caterina Filisetti por também disponibilizar seu coletor de frações em alguns momentos do trabalho.

Ao Professor Dr. Jorge Mancini Filho e sua técnica Rosângela Pavan Torres por disponibilizar o aparelho “cozedor” para realização do teste de cocção.

À Professora Dra. Dulcinéia Paes Parra do Departamento de Análises Clínicas pela ajuda prestada com alguns reagentes e aparelhos no decorrer deste trabalho.

À Joana e Lurdinha, pela limpeza do nosso ambiente de trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, responsáveis pela manutenção e pelo funcionamento das instalações.

Ao pessoal administrativo do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Aos amigos Rubson Olivo, Juliane Schneider e Massami Shimokomaki pelo incentivo dado para ingressar na área científica.

Também com a mesma importância agradeço a todos amigos e parentes, que não mencionei acima e estiveram ao meu lado torcendo e se preocupando comigo.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 – MANDIOCA	4
2.2 – ESTRUTURA DO AMIDO.....	13
2.3 –UTILIZAÇÃO DO AMIDO.....	21
2.4 – AS ENZIMAS AMIOLÍTICAS	24
2.4.1 – α -amilases.....	25
2.4.2 – β -amilases.....	26
2.4.3 – α -D-glucosidases	26
2.4.4 – Pululanases	26
2.4.5 – Isoamilases.....	27
2.4.6 – Exo-(1,4)- α -D-glucanases	27
2.4.7 – Ciclomaltodextrina D-glucotransferases	27
2.4.8 – Glucoamilases.....	28
2.5 – PAPEL DAS AMILASES NOS PROCESSOS METABÓLICOS EM TUBÉRCULOS	31
2.6 – A MANDIOCA DA VARIEDADE ZOLHUDINHA (IM-158).....	32
3 – OBJETIVOS.....	34
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 – MATERIAIS.....	35

4.2 – REAGENTES	35
4.3 – MÉTODOS	36
4.3.1 – Preparação das raízes	36
4.3.2 – Teste de cocção	36
4.3.3 – Determinação do teor de amido	38
4.3.4 – Determinação do teor de Umidade	38
4.3.5 – Preparação do extrato enzimático	39
4.3.6 – Quantificação do teor de proteínas	40
4.3.7 – Determinação de atividade amilolítica do extrato enzimático.....	40
4.3.8 – Determinação do teor de açúcares redutores	41
4.3.9 – Etapas de purificação das enzimas amilolíticas.....	41
4.3.10 – Detecção das bandas protéicas com atividade amilolítica através da eletroforese nativa.....	42
4.3.11 – Eletroforese dissociante.....	43
4.3.12 – Determinação da atividade enzimática de α e β -amilase	43
4.3.13 – Determinação da massa molecular	44
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 – Teste de cocção	46
5.2 – Teores de umidade e amido	49
5.3 – Proteínas, atividade amilolítica e concentração de açúcares redutores	51
5.4 – Etapas de purificação	56
6 –CONCLUSÕES	65
7 – BIBLIOGRAFIA	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia da raiz de mandioca	9
Figura 2 – Níveis de deterioração fisiológica, após 7 dias da colheita	11
Figura 3 – Grânulos de amido visualizado em microscopia eletrônica.....	14
Figura 4 – Moléculas de glicose.....	15
Figura 5 – Estruturas de amilose e amilopectina.....	16
Figura 6 – Ilustração geral da organização das micelas de amido	19
Figura 7 – Utilização de enzimas amilolíticas no processamento do amido.....	23
Figura 8 – Hidrólise enzimática do amido	25
Figura 9 – Imagem da ação de uma α -amilase em amido de batata doce, visualizada em microscopia eletrônica eletrônica (ESEM).....	29
Figura 10 – Diferenças nas folhas, folíolos e hastes de uma planta de mandioca comercial e Zolhudinha	33
Figura 11 – Esquema do cozedor utilizado no teste de cocção	37
Figura 12 – Esquema das etapas de purificação enzimática	41
Figura 13 – Raiz de mandioca Zolhudinha 3º dia pós-colheita antes e após teste de cocção	48
Figura 14 – Variação de umidade das raízes de mandioca Zolhudinha no período pós-colheita com seus valores médios e amplitude de cada ensaio	49
Figura 15 – Variações da porcentagem de amido da mandioca Zolhudinha no período pós-colheita	50
Figura 16 – Concentração de proteínas e atividade amilolítica	52
Figura 17 – Atividade amilolítica e concentração de açúcares redutores	53
Figura 18 – Eletroforese nativa dos extratos enzimáticos brutos dos dias pós- colheita revelada com solução de iodo-potássio	54
Figura 19 – Gel de eletroforese nativa das raízes comerciais	55
Figura 20 – Perfil cromatográfico DEAE-celulose.....	58
Figura 21 – Eletroforese nativa dos 3 picos apresentados no perfil cromatográfico DEAE-celulose	59

Figura 22 – Perfil cromatográfico Sephacryl S-200.....	60
Figura 23 – Eletroforese SDS – revelação com nitrato de prata	61
Figura 24 – Determinação da massa molecular das isoformas da α -amilase em coluna Sephacryl S-200.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da mandioca crua por 100 g de parte comestível	8
Tabela 2 – Composições químicas de amidos de tuberosas tropicais	18
Tabela 3 – Faixas de temperatura de gelatinização de alguns amidos	20
Tabela 4 – Tempo de cocção das mandiocas comerciais da região de Ribeirão Pires de diferentes épocas de plantio.....	46
Tabela 5 – Tempo de cocção das mandiocas Zolhudinhas nos períodos pós-colheita	46
Tabela 6 – α e β -amilases presentes nas amostras das etapas de purificação ..	62
Tabela 7 – Tabela de purificação enzimática	64

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma raiz originária e cultivada na América do Sul, com alta perecibilidade no período pós-colheita. Seus principais processos de deterioração envolvem reações enzimáticas, oxidativas e microbiológicas. Neste trabalho foram estudadas raízes de mandioca da variedade Zolhudinha catalogada pela EMBRAPA como IM-158, provenientes da região amazônica, que se destacam pela alta atividade amilolítica. Foram analisadas as condições físico-químicas junto com o isolamento e purificação da α -amilase da raiz e a possível participação desta enzima no processo deteriorativo pós-colheita. Por ser uma variedade de mandioca não comercial, o tempo de cocção foi em média de 4,30 h, teor de umidade em torno de 64 % e porcentagem de amido de cerca de 30 %. A atividade amilásica decaiu em 1/3 de sua intensidade no quinto dia pós-colheita, em contraponto à formação de açúcares redutores, cuja concentração aumenta cinco vezes. A purificação foi obtida com duas etapas cromatográficas, com DEAE-celulose e Sephacryl S-200, revelando duas isoenzimas de α -amilase treze vezes mais purificadas, com recuperação protéica de 7,5 % e com pesos moleculares entre 14 e 19 kDa.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a root from a native plant, cultivated in South América, that is highly perish on the post-harvest time. The mechanisms of the root deterioration are due to enzymatic and oxidative reactions as well as the microbiological attack. In this work were studied roots of Zolhudinha variety, EMBRAPA – IM 158, cultivated in Amazonian area, which distinguishes from others varieties by its higher amylase activity. Physicochemical properties were analyzed during the post-harvest time, the purification of α -amylase were performed to establish a possible involvement on the deteriorative process. As a non-commercial variety, the cooking time of the roots was 4.30 hours on average, with 64 % of water content and 30 % of starch. The amylase activity during the post-harvest decrease 1/3 from the original at the day 5, that matches with the reducing sugar in roots by increase of five times. The purification was achieved by two chromatography steps on DEAE-cellulose and Sephacryl S-200, providing two isozymes of α -amylase, thirteen times more purified with a recovery of 7.5 % of the protein fraction, the estimated molecular weights were between 14 and 19 kDa.

1 – INTRODUÇÃO

A raiz de mandioca é amplamente cultivada nos trópicos e é considerada uma raiz muito resistente, pois suas exigências minerais são pequenas, e particularmente se adapta bem a solos pobres (MURTY, 1940). Além destas vantagens, apresenta grande capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo, facilidade de cultivo, grande rendimento e as mais variadas formas de preparo (CONCEIÇÃO, 1981).

Apesar de as mandiocas poderem ser conservadas no solo por anos, as raízes apresentam baixa capacidade de armazenamento, pois uma vez colhidas, devem ser processadas rapidamente para prevenir sua deterioração. Em vários cultivares a deterioração das raízes ocorre depois de 5 a 7 dias (PUONTI-KAERLAS, 1998).

Os principais tipos de deterioração em tubérculos são de origem fisiológica, destacando-se o escurecimento dos tecidos nos primeiros dias pós-colheita, a microbiológica, causadora de vários tipos de podridão que se iniciam de cinco a sete dias depois da colheita, e a enzimática que depende de vários fatores, dentre eles a quantidade de enzimas e substratos presentes no tubérculo (CAMPOS e CARVALHO, 1990).

O amido, que é o componente presente em maior concentração nas raízes de mandioca, é considerado essencialmente de reserva e pode ser degradado por atuação de enzimas amilolíticas. As enzimas de maior importância na hidrólise do amido em diversos vegetais são α amilase, β amilase, glucoamilase, isoamilase e pululanase, cujos produtos são glicose, maltose, dextrina limite, β maltose, β glicose, α maltotriose (BEZERRA e col., 2002).

A atividade amilásica de raízes de mandioca no período pós-colheita mostra um gradual aumento em função do tempo de armazenamento (AFOAKWA e SEFADDEH, 2002; PADMAJA e BALAGOPAL, 1985).

Estudos realizados neste seguimento detectaram flutuações da atividade amilásica em função da variedade das raízes que poderiam estar relacionadas à adaptação ao plantio e à conservação pós-colheita. MATOS DA VEIGA (2002) verificou que a variedade Zolhudinha, de origem amazônica, teve um comportamento diferenciado das raízes comerciais e não comerciais testadas, apresentando maior atividade amilolítica. A variedade é amarela e brava com escassa menção na literatura técnico científica, apesar de muito conhecida na região Norte, onde se originou.

Os principais resultados obtidos por MATOS DA VEIGA (2002) mostraram que no extrato enzimático bruto da variedade Zolhudinha a atividade amilolítica determinada apresentou boa resistência térmica com temperatura e pH máximos de 60 °C e 6,0 respectivamente e, segundo a análise estatística com a metodologia de superfície de resposta, quando as duas variáveis foram avaliadas ao mesmo tempo suas condições de temperatura e pH ótimos da enzima corresponderam a 55,7 °C e 6,2. Além disso, a enzima apresentou inativação em pHs menores que 5,0, inibição da atividade em presença de Cu^{2+} e EDTA, e aumento da atividade em função da adição de Ca^{2+} e Mg^{2+} , indicando com isso o comportamento de uma α -amilase.

Neste trabalho demos continuidade à caracterização bioquímica das enzimas amilolíticas da mandioca da variedade Zolhudinha, analisando a participação dessas enzimas envolvidas na hidrólise do amido da raiz, no período pós-colheita. Este

estudo visa aumentar a compreensão do papel das enzimas amilolíticas no processo degradativo através da caracterização e purificação das formas moleculares ativas.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – MANDIOCA

A mandioca é uma raiz amilásica que vem sendo cultivada na América do Sul por mais de 5000 anos e constitui um dos principais alimentos energéticos para cerca de 500 milhões de pessoas, sobretudo nos países em desenvolvimento. Foi introduzida na África e na Ásia pelos portugueses durante o século 16 e se alastrou por mais de 90 países (EL-SHARKAWY, 2003; CIAT, 2003).

Considerada um alimento básico de milhões de habitantes dos trópicos de todo o mundo, a mandioca é o sexto produto alimentício da humanidade em volume de produção, atrás do trigo, arroz, milho, batata e cevada. Nos trópicos, sua importância passa para o terceiro lugar. A produção mundial é de 140 milhões de toneladas (EL-SHARKAWY, 2003; MENDONÇA e col., 2003).

O Brasil já foi o maior produtor mundial de mandioca. Com produção de 23 milhões de toneladas por ano, continua entre os grandes produtores, mas longe das primeiras colocações. A Nigéria, por exemplo, colhe 32 milhões de toneladas. A Tailândia que levou a planta do Brasil, exporta 5 milhões de toneladas de fécula por ano (LORENZI, 2003, MENDONÇA e col., 2003).

Aproximadamente 70% das raízes de mandioca são utilizadas para consumo humano, diretamente após o cozimento, ou de formas processadas, e os 30% restantes são utilizadas como ração animal e outros produtos industriais como amido, glicose e álcool (EL-SHARKAWY, 2003). A fécula é um derivado da mandioca que além do uso alimentício, entra na produção de pães como um importante ingrediente industrial; na mineração, onde serve para separar o minério de ferro das impurezas; e

na indústria têxtil, dá resistência a fibras que, com essa mesma finalidade, tem larga aplicação na indústria de papel, sendo especialmente usada na fabricação de produtos para impressão. A fécula é utilizada também para lubrificar as brocas usadas na perfuração de poços de petróleo (LORENZI, 2003; CIAT, 2003).

A planta pertence à família botânica *Euphorbiaceae* e possui um vasto número de espécies, entretanto apenas duas do gênero *Manihot* são cultivadas, a mandioca brava (*Manihot esculenta*) e a mandioca mansa (*Manihot aipin*). Essa divisão se baseia na quantidade de cianetos que cada variedade contém (MARINHO e col., 1996).

A ação do cianeto depende, principalmente, do teor de glicosídeos cianogênicos (linamarina e lotaustralina) presentes nos tecidos da planta, que ao hidrolisar-se por via enzimática (linamarase), desdobra-se em ácido cianídrico (HCN) e glicona, sendo o ácido altamente tóxico para humanos e animais (BORGES e col., 2002, EMBRAPA, 1993).

Os compostos cianídricos e as respectivas enzimas estão distribuídos por toda planta, porém em concentrações variáveis. Estes compostos produzidos pela mandioca podem ser considerados como parte dos mecanismos de defesa desenvolvidos pela espécie, ao longo de sua evolução, contra pragas e doenças. Assim, a enzima (linamarase) e o substrato (linamarina) devem ser separados de alguma forma, possivelmente pela membrana celular, e só entram em contato, liberando o HCN, através da ruptura da mesma (LORENZI, 2003).

O grupo de variedades de mandioca mansa caracteriza-se, principalmente, por apresentar teores de cianetos abaixo de 100 mg/kg de polpa nas raízes frescas. Esses

componentes oscilam substancialmente em razão da variedade e, em menor escala, das condições de cultivo, época de colheita e condições ambientais. Estas raízes são de uso culinário, ou seja, podem ser consumidas após tratamento brando. Além disso, elas devem ser curtas, grossas, com casca facilmente removível, polpa branca ou amarelada, de odor agradável e cozimento rápido. As variedades com concentrações de cianeto na raiz fresca acima de 100 mg/kg de peso são denominadas bravas ou venenosas, ou seja, impróprias para consumo fresco, sendo, portanto, indicadas para a indústria, onde a toxidade da raiz é reduzida durante o processamento (BORGES e col., 2002). DJAZULI e BRADBURY, (1999), constataram que a cocção e a fritura reduzem o teor de cianeto das raízes a níveis seguros para o consumo, permitindo seu uso na alimentação. As mandiocas mansas não são utilizadas na fabricação de farinhas, pois, segundo CARVALHO e col., (1995), originam um sabor adocicado, de pouca aceitação no mercado. Outra curiosidade é que existem variedades de mandioca mansa cujas flores possuem alto teor de linamarina, às vezes maior que das mandiocas bravas, portanto deve-se tomar cuidados na utilização de folhas com presença das flores na alimentação animal (EMBRAPA, 1993).

A planta é um arbusto perene, com raízes tuberosas de formato variado e em número de 5 a 10 tubérculos podendo medir até 50 cm de comprimento, chegando a pesar diversos quilos. Cada raiz possui uma camada resistente de epiderme, rugosa, de cor marrom seguindo-lhe uma camada cortical, facilmente descascável. A parte carnosa é descrita como branca ou ligeiramente amarelada, riquíssima em amido (aproximadamente 37%), tendo no seu centro uma espécie de cordão fibroso. O caule (sem ramificações no período vegetativo) é ereto, de cor cinza ou prateada ou pardo-

amarelada; as folhas são simples, com 5 a 7 lóbulos, as flores unissexuadas masculinas ou femininas e o fruto é uma cápsula (tricoca) com 3 sementes e que se abre quando seco. A semente, parecida com a da mamona, contém óleo (ADETAN e col., 2003, EMBRAPA, 1993, BRAGA, 1985).

A composição da raiz é basicamente formada por carboidratos, mas também é rica em vitamina C, carotenóides, cálcio e potássio, e é pobre em proteínas e lipídios (CIAT, 2003). A tabela 1 ilustra valores da composição nutricional detalhada da mandioca crua retirada de duas fontes, onde notamos que existem pequenas variações. Uma das causas dessas variações quando compararmos resultados da literatura é a diversidade das metodologias usadas e a outra seria o uso de diferentes variedades, tamanhos e épocas de colheita. De qualquer forma, esses dados são considerados gerais. Na figura 2 (A), (B) e (C) temos o típico corpo e morfologia de uma raiz de mandioca.

Tabela 1 – Composição da mandioca crua por 100 g de parte comestível.

COMPOSIÇÃO		100 g mandioca	
	FONTE:	(1)	(2)
Umidade (%)		62,08	62,00
Energia (kcal)		133,00	151,00
Proteína (g)		1,30	1,00
Lipídios totais (g)		0,28	0,00
Carboidratos totais (g)		33,86	36,00
Fibra alimentar total(g)		2,44	1,90
Cinzas (g)		1,58	0,60
Cálcio (mg)		-*	15,00
Magnésio (mg)		-*	44,00
Manganês (mg)		-*	0,10
Fósforo (mg)		-*	29,00
Ferro (mg)		-*	0,30
Sódio (mg)		-*	2,00
Potássio (mg)		-*	208,00
Cobre (mg)		-*	0,07
Zinco (mg)		-*	0,02
Tiamina (mg)		-*	<0,02
Riboflavina (mg)		-*	<0,02
Piridoxina (mg)		-*	0,04
Niacina (mg)		-*	1,00
Vitamina C (mg)		-*	17,00
** Vitamina A		0,33 - 55,67	

FONTE – Modificado a partir de TABELA DE COMPOSIÇÃO DOS ALIMENTOS (-* - dados não disponíveis, (1) USP <http://www.fcf.usp.br/tabela>, (2) UNICAMP <http://www.unicamp.br/nepa/tapo/tabela/tabela1>) e FLORES e PENTEADO, 1992 (** Vitamina A – valores expressos em Equivalente de Retinol / 100 g).

Figura 1 – Morfologia da raiz de mandioca: (A) morfologia geral, (B) corte transversal e (C) esquema detalhado dos tecidos.

FONTE – Modificado a partir de ADETA e col., 2003.

A mandioca de mesa é colhida de 7 a 14 meses após o plantio, enquanto a industrial leva de 16 a 24 meses. A época propícia para o plantio é entre maio e

junho, desde que haja umidade para garantir o desenvolvimento das manivas (LORENZI, 2003). É considerada uma raiz muito resistente, pois suas exigências minerais são muito pequenas, e particularmente se adapta bem a solos pobres. Além dessas vantagens, apresenta grande capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo, facilidade de cultivo, grande rendimento e permite ser consorciada com inúmeras plantas alimentícias.

Apesar de serem raízes muito resistentes, podendo ser preservadas no solo por anos, apresentam baixa capacidade de armazenamento, sendo que uma vez colhidas, devem ser processadas rapidamente para prevenir sua deterioração (PUONTI-KAERLAS, 1998). A degradação da mandioca após a colheita é iniciada pela combinação de fatores fisiológicos enzimáticos e oxidativos seguidos por reações mediadas por microrganismos (BUSCHMANN e col., 2000).

A degradação classificada como primária, constitui na formação de coloração azul-negra ou amarronzada, de origem enzimática e oxidativa, geralmente mais intensa nas proximidades da periferia da raiz, sem que ocorra ação microbiana na região. Segue-se a deterioração secundária, que envolve a ação de microrganismos, que se iniciam de cinco a sete dias depois da colheita e às vezes surgem amolecimento e fermentação do tecido (PADMAJA e BALAGOPAL, 1985). Inúmeros são os fungos e bactérias envolvidos no processo e sabe-se que não agem isoladamente, porém o fungo *Phytophthora drechsleri* Toker é o principal responsável pela podridão radicular (BROCK, 1997). O início do processo fermentativo da mandioca é acompanhado por uma rápida queda na concentração do oxigênio dissolvido, ocasionada por bactérias amilolíticas aeróbicas, capazes de consumir oxigênio e produzir ácidos orgânicos, como o lático, butírico, acético, entre

outros (BEZZERRA e col., 2002). A figura 2 ilustra os níveis de deterioração fisiológica, após 7 dias da colheita.

Figura 2 – Níveis de deterioração fisiológica, após 7 dias da colheita.

FONTE – LORENZI, 2003.

Injúrias mecânicas também acontecem, pois as raízes possuem baixa resistência nos tecidos por apresentarem alta porcentagem de umidade, em torno de 50 a 70%, além da taxa de respiração que é muito alta alterando a textura, facilitando esse tipo de degradação (RAVI e col., 1996).

Já as reações de degradação enzimática dependem de vários fatores, dentre eles a quantidade de enzimas e substratos presentes no tubérculo (BOOTH, 1976, CAMPOS e col., 1990, RAVI e col., 1996, BEZERRA e col., 2002).

Quando o cultivo de mandioca é realizado em condições ótimas de umidade para a cultura, o conteúdo de amido esperado na raiz é de 25,9 % a 35,3 % aos 12 meses. O amido das raízes de mandioca é o seu principal componente, e pode ser

degradado por atuação de enzimas hidrolíticas, sendo as de maior significância a α -amilase, β -amilase, glucoamilase, isoamilase e pululanase (BEZERRA e col., 2002).

Para ajudar a sustentar a produção de mandioca, pesquisadores estão tendo um amplo desafio. O aumento nos estudos do desenvolvimento genético das raízes é um deles, que servirá para melhorar a resistência a pestes e doenças, junto com controles efetivos de estratégias biológicas. Diminuir a deterioração das raízes no período pós-colheita e satisfazer diversos paladares e preferências dos consumidores de mandioca também são pontos importantes. Essas melhoras atingirão principalmente países sub-desenvolvidos da África, por exemplo, onde o rápido crescimento populacional e solos fracos asseguram que a produção se tornará cada vez mais ampla e garantirá mais uma fonte de alimento. Na América Latina, apesar de bem desenvolvido o mercado industrial de mandioca, a produção continuará sendo uma fonte de alimento significativa. Outro desafio é tornar a mandioca mais competitiva com relação ao mercado de amido e ração animal já que possui baixos custos e maior eficiência nos processos (CIAT, 2003).

O amido da mandioca é muito usado na indústria porque possui ótima propriedade de espessante, é extraído de forma mais pura, tem um custo de extração baixo e possui maior capacidade de formação de géis claros, comparados a outras fontes de amido como o milho, e o inhame (ALVES e col., 1999). A estrutura e as propriedades físico-químicas das raízes têm sido muito pesquisadas para explorar e melhorar a produção de amido não só da mandioca, mais em diversos tubérculos (CHATAKANONDA e col., 2003, HOOVER, 2001).

2.2 – ESTRUTURA DO AMIDO

O amido está presente nos tecidos vegetais em unidades individuais pequenas denominadas de grânulos, que estão organizados na forma de micelas, divididos em zonas amorfas e cristalinas, de forma irregular e diâmetros que variam de 1 a 100 μm (figura 3) de acordo com a origem botânica. O exame da estrutura do grânulo de amido ao microscópio é uma forma de identificar a origem do amido. Todos os grânulos apresentam uma fissura, denominada de hílium, que é o ponto de nucleação em torno do qual o grânulo se desenvolve (MYERS e col., 2000).

É produzido em plantas e vegetais como resultado do processo de fotossíntese. Há dois tipos de amido, o transitório que se localiza no interior dos cloroplastos, encontrado nas folhas como fonte de armazenamento para respiração durante o período noturno, e o de reserva, que se forma nos amiloplastos, sendo estes plastídios (organelas) maduros peculiares às células vegetais, que estão quase totalmente preenchidos por amido na forma de grânulos, encontrado nos tubérculos e sementes.

Figura 3 – Grânulos de amido visualizado em microscopia eletrônica (ESEM).

FONTE – DONALD, 2004.

Sua estrutura é formada por biopolímeros de glicose ($C_6H_{10}O_5$)_n interligados entre si através de uma molécula de oxigênio, são as chamadas ligações glicosídicas (figura 4). Estas ligações glicosídicas são facilmente quebradas em meios pouco ácidos. No final da cadeia polimérica, existe um grupo aldeído de caráter redutor, mas por esta ter um comprimento muito longo torna a molécula fracamente redutora (VAN DER MAAREL et al, 2002).

Figura 4 – Moléculas de glicose: (A) Monômero de glicose; (B) Ligação glicosídica de dois monômeros de glicose.

FONTE – DONALD (2004).

Os dois maiores componentes do amido são amilose e amilopectina (figura 5 (A) e (B)) sendo ambas macromoléculas homopolissacarídeos de glicose.

Na amilose o monômero de glicose ($C_6H_{10}O_5$) se repete cerca de 6000 vezes, é principalmente um polissacarídeo linear formado de resíduos de D-glicose unidos por ligações α -1,4 e possui um peso molecular que varia de 10^5 a 10^6 Da. Por sua vez, a amilopectina se caracteriza como uma longa cadeia ramificada, sendo que a

cada 30 ligações α -1,4 existe uma ligação α -1,6. Seu peso molecular é da ordem de $(50 - 500) \times 10^6$ Da e o comprimento das ramificações é variável mas é comum apresentarem entre 20 e 30 unidades de glicose.

Figura 5 – Estruturas de amilose e amilopectina: (A) Estrutura da amilose - cadeia linear com ligações α -1,4; (B) Estrutura da amilopectina – cadeia ramificada com ligações α -1,4 e α -1,6.

FONTE – SURMELY e col., 2004.

Ambas na presença de iodo (I_3^-) formam complexos de adsorção (complexos de transferência de carga). No caso da amilose, que possui conformação helicoidal, gera um complexo de inclusão no qual as moléculas de iodo ocupam a cavidade central da hélice do polissacarídeo formando longas cadeias de poli-iodo (I_3^-), produzindo cor azulada, que quando analisada em espectrofotômetro possui uma absorção máxima a comprimentos de onda entre 620 e 680 nm. No caso da amilopectina, a interação com iodo resulta em absorção máxima na região entre 530 e 555 nm com coloração avermelhada, pois suas ramificações são muito curtas para formar cadeias longas de poli-iodo (I_3^-). Portanto o iodo é um importante elemento usado para estimar quantitativamente amilose e amilopectina em amido (Hoover, 2001; VAN DER MAAREL et al, 2002).

A grande maioria dos amidos contém 20 – 30 % de amilose e 70 – 80 % de amilopectina e essa razão varia conforme a fonte botânica. São vários os vegetais que o produzem, entre os quais os mais importantes são: milho, arroz, trigo, mandioca e batata.

Além dos componentes macromoleculares como o amido, na raiz de mandioca podem aparecer outros constituintes menores na sua composição, como lipídeos, proteínas, fibras e sais minerais. Na tabela 2 temos a caracterização da fração amilácea extraída de algumas raízes tuberosas.

Tabela 2 – Composições químicas de amidos de tuberosas tropicais.

Componentes	Mandioca	Mandioquinha salsa	Araruta		Cará-de-rama
% matéria seca	(4)	(2)	(1)	(2)	(3)
Proteína (n x 6,25)	0,90	0,10	0,98	0,27	0,16
Matéria graxa	0,78	0,12	0,46	0,12	0,15
Amido	98,2	89,10	96,47	94,5	99,02
Fibras	0,6	0,25	0,36	18,6	0,13
Cinzas	0,23	0,16	0,22	0,27	0,33
Outros carboidratos	-*	8,00	-*	-*	-*
% amilose	17,65	-*	20,09	18,60	22,57

-* - dados não disponíveis

FONTE – (1) comercial marca HIKARI; (2) dados não publicados do CERAT; (3) GIACOMETTO et al, 1986; (4) CEREDA et al, 1990; Apud SURMELY, 2004.

O grânulo de amido possui uma camada cristalina em forma de micelas, que é formada por duas hélices de amilopectina empacotadas em sentido paralelo, enquanto que os pontos de ramificações estão nas regiões amorfas. A localização exata das moléculas de amilose ainda é desconhecida, entretanto acredita-se que estejam dispersas entre as moléculas de amilopectina, em maior quantidade na região amorfa, e elas são mantidas juntas por pontes de hidrogênio. Sob luz polarizada, os grânulos são birrefringentes, que é um indicativo de arranjo cristalino (VAN DER MAAREL et al, 2002). A figura 6 ilustra e esquematiza todo esse fenômeno.

Figura 6 – Ilustração geral da organização das micelas de amido. (A): grânulos de amido visualizados em microscopia eletrônica; (B): uma fatia do grânulo de amido cortada ilustrando os anéis das zonas cristalinas e amorfas; (C): detalhes da região cristalina; (D): organização da molécula de amilopectina na representação em forma de árvore; (E): duas moléculas de glicose com uma ligação α -1,4.

FONTE – Adaptado a partir de VAN DER MAAREL e col., 2002.

A razão entre a amilose e amilopectina presente em uma estrutura amilásica pode variar com a fonte de amido, mas em geral, a proporção entre ambas é de 1:3 a 1:4. Este dado confirma a proporção em uma raiz de mandioca cujas cadeias de amilose correspondem a 15-30 % do amido da raiz (HOOVER, 2001; SRIBURI e col., 1999).

A umidade existente no amido é de cerca de 12 a 14 %. A água fria, no máximo 30 %, pode penetrar nas regiões amorfas do grânulo sem perturbar as micelas (zonas cristalinas). Se esse amido começa a ser aquecido na presença de

água, as moléculas de amido começam a vibrar mais intensamente, quebram-se as pontes de hidrogênio intermoleculares, expostas das moléculas de amilose e amilopectina, permitindo assim que a água penetre nas micelas e quanto mais a temperatura aumenta, mais água pode penetrar nas micelas. O aquecimento contínuo na presença de uma grande quantidade de água resulta em perda total das zonas cristalinas, o amido incha junto com a perda da sua birrefringência e se torna transparente. O ponto no qual a birrefringência desaparece é denominado de ponto de gelatinização ou temperatura de gelatinização. Como esse ponto não é bem definido, pois grânulos menores gelatinizam primeiro e maiores depois, usa-se normalmente o termo faixa de gelatinização. Os dados compilados na tabela 3 mostram a faixa de gelatinização de alguns amidos. Durante a gelatinização, o grão incha muito e a viscosidade da solução aumenta, formando uma pasta, até um valor máximo de viscosidade e a dureza do gel depende da concentração e do tipo de amido. A medida que o amido gelatiniza, aumenta sua susceptividade ao ataque enzimático (VAN DER MAAREL e col., 2002, SRIROTH e col 1999).

Tabela 3 – Faixas de temperatura de gelatinização de alguns amidos

Amido	Temperatura (°C)
Mandioca	59-70
Milho	61-72
Batata	62-68
Batata Doce	82-83
Trigo	53-64
Arroz	65-73

Com relação à qualidade do amido extraído para uso industrial, SRIROTH e col (1999) mostraram que a mandioca, durante o cultivo, é afetada por condições climáticas, com épocas secas e úmidas, em que são cultivadas. Como dito anteriormente, em geral a mandioca de mesa é colhida em até 14 meses, e a industrial até 24 meses. Após 16 meses de cultivo, SRIROTH e col (1999) demonstraram que a quantidade de amido aumenta enquanto a quantidade de água diminui, o que é uma vantagem para o uso industrial, porém também comprovaram que o conteúdo de fibras aumenta e torna a extração de amido mais difícil. O grânulo de amido de uma raiz velha também foi caracterizado e constatou-se que a concentração de amilose diminui e altera o tamanho e distribuição dos grânulos, mudando quantitativamente no período pós-colheita. As condições ambientais também podem alterar a capacidade de absorção de água do grânulo de amido e a sua formação de gel também é prejudicada, porém este fato foi ainda pouco estudado (PADONOU e col., 2005, NGEVE, 2003).

2.3 –UTILIZAÇÃO DO AMIDO

O amido é usado principalmente em indústrias de bebidas e alimentos. Nestas indústrias o polissacarídeo é empregado na produção de hidrolisados que funcionam como adoçante em refrigerantes e doces, assim como, espessantes em alimentos semi-sólidos. Os amidos podem ser hidrolisados por via química (ácido, calor e pressão) ou por via enzimática (SURMELY, 2004).

O maior uso do amido processado é para produção de glicose, o qual pode ser subsequente convertido por fermentação em etanol, gás hidrogênio e antibiótico; por isomerização em frutose, e por hidrogenação química em sorbitol.

Na indústria alimentícia o amido é hidrolisado a derivados de baixo peso molecular. Estes hidrolisados são classificados conforme seu equivalente em dextrose (D.E), que corresponde ao grau de hidrólise do amido a glicose, expresso em porcentagem. Uma amostra completamente hidrolisada apresenta um D.E. de 100.

A hidrólise industrial do amido é normalmente desenvolvida em dois passos principais, a gelatinização e a liquefação. Para que as enzimas hidrolisem o substrato, este necessita tornar-se solúvel, ou seja, passar pelo processo de gelatinização. O amido gelatinizado é altamente viscoso, causando deste modo sérios problemas para homogeneizar e bombear a solução. Para superar esse problema, a gelatinização é acoplada à liquefação. Esse processo é realizado pela ação de uma α -amilase termoestável normalmente obtida de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacies* e *Bacillus licheniformis*, que libera maltodextrinas com baixo D.E. como produto final (VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989).

Após o tratamento com a α -amilase, as maltodextrinas geradas são digeridas pela ação de outras enzimas amilolíticas, em um processo conhecido por sacarificação, levando a produção de oligossacarídeos e glicose (figura 7). Podemos observar nesta figura que as enzimas glucoamilase e α -amilase participam de forma efetiva na formação do xarope de glicose. Este ponto do processamento do amido é considerado o mais importante produto formado, pois ele pode ser transformado em

uma ampla gama de produtos com aplicação na indústria farmacêutica, de bebidas e confeitarias (SURMELY, 2004)

Figura 7 – Utilização de enzimas amilolíticas no processamento do amido.

D.E. = dextrose equivalente.

FONTE – modificado a partir de SURMELY, 2004.

2.4 – AS ENZIMAS AMIOLÍTICAS

As enzimas são proteínas simples ou conjugadas com outros grupamentos que catalisam reações químicas, que de outra maneira, ocorreriam apenas em velocidades extremamente baixas. Com base no local de ação elas são consideradas de dois tipos: enzimas intracelulares ou endógenas e enzimas extracelulares ou exógenas (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

O mecanismo de ação das enzimas amilolíticas (amilases) pode ser classificado em categorias como as endoamilases, que hidrolisam ligações no interior da molécula de amido, as exoamilases, que hidrolisam ligações a partir da extremidade não redutora da molécula do substrato e as enzimas desramificadoras, que em junção com outras amilases possuem sua atividade acelerada (NIRMALA e MURALIKRISHNA, 2003). A figura 8 mostra a ação das principais enzimas amilolíticas na molécula de amido.

Figura 8 – Hidrólise enzimática do amido.

FONTE – modificado a partir de SURMELY, 2004 e GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995.

2.4.1 – α -amilases

Tanto a amilopectina, quanto a amilose são rapidamente hidrolisadas pela α -amilase. A α -amilase (EC 3.2.1.1 1,4- α -D-glucano glucanohidrolase) é uma endoamilase que promove a hidrólise de ligações α -1,4 internas, gerando maltose, maltotriose e α -dextrina. Todas as α -amilases são metalo-enzimas cálcio-dependentes, tendo de 1 a 10 átomos de cálcio por molécula de enzima. A atividade enzimática e estabilidade conformacional destas enzimas são, deste modo, cálcio-dependentes (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995). No entanto esse íon promove a desnaturação das glucoamilases utilizadas no processo de sacarificação do amido. Este problema poderia ser resolvido pela seleção ou

produção, via engenharia genética, de α -amilases termoestáveis independentes de cálcio, ou de glucoamilases que não sejam sensíveis ao cálcio (SURMELY, 2004). As α -amilases estão presentes em uma grande variedade de microrganismos, plantas e animais (NIRMALA e MURALIKRISHNA, 2003).

2.4.2 – β -amilases

As β -amilases (EC 3.2.1.2 1,4- α -D-glucano maltohidrolase), são exohidrolases que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 da extremidade não-redutora da cadeia do substrato e ocorre em muitos tipos de plantas. Esta enzima não é capaz de hidrolisar ligações α -1,6 dos substratos ramificados (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

2.4.3 – α -D-glucosidases

Outra enzima da família das amilases é a α -D-glucosidase (EC 3.2.1.20 α -D-glucosídeo) ou maltase. São extensamente distribuídas entre microrganismos, incluindo bolores, leveduras e bactérias. Estas enzimas são exohidrolases que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e/ou α -1,6 de sacarídeos curtos (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

2.4.4 – Pululanases

As pululanases (EC 3.2.1.41 α -dextrina-6-glucanohidrolase) são endoamilases desramificadoras que hidrolisam as ligações α -1,6 do polissacarídeo pululano, convertendo-o quase que completamente a maltotriose. Esta enzima também é capaz

de hidrolisar ligações α -1,6 das moléculas de amido, amilopectina e dextrina limite (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

2.4.5 – Isoamilases

As isoamilases (EC 3.2.1.68 glicogênio-6-glucanohidrolase) são endoamilases desramificadoras de amido, as quais hidrolisam todas as ligações α -1,6 de amilopectina, glicogênio e oligossacarídeos. Esta enzima é similar a pululanase, porém requer pelo menos 3 unidades de glicose na cadeia ramificada para ser capaz de hidrolisá-la (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

2.4.6 – Exo-(1,4)- α -D-glucanases

Este é outro grupo de exoamilases que ao invés de liberar sucessivas unidades de maltose, como é o caso da β -amilase, liberam, por exemplo, maltotetraose e maltohexose como os maiores produtos da ação da enzima sobre o amido (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

2.4.7 – Ciclomaltodextrina D-glucotransferases

Estas enzimas são exoamilases (1,4- α -D-(1,4-D-glucano)) transferase ciclizadoras, capazes de hidrolisar amido por uma série de complexas reações, a oligossacarídeos cíclicos não redutores (ciclodextrina) (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

2.4.8 – Glucoamilases

As glucoamilases (EC 3.2.1.3 1,4- α -D-glucano glucohidrolase) são exoamilases que produzem β -D-glicose a partir da extremidade não-redutora da cadeia de amilose, amilopectina e glicogênio pela hidrólise de ligações glicosídicas do tipo α -1,4 por meio da remoção de sucessivas unidades de glicose. Glucoamilase hidrolisa também ligações do tipo α -1,6 e raramente ligações α -1,3, mas com uma velocidade muito menor (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995). Esta enzima é também chamada de enzima de sacarificação e é, portanto capaz de hidrolisar completamente amido se incubada por longos períodos. Ela é uma enzima termo-estável a qual reage sob condições ácidas (pH 4,5) por mais de 96 horas (JAMES e LEE, 1997).

A ação das enzimas nos grânulos de amido está sendo cada vez mais detalhada. Segundo FRANCO e CIACCO, 1992, a porcentagem de hidrólise nos grânulos aumenta quando incubados com α -amilase e amiloglicosidase, e estes grânulos são afetados em seus tamanhos e concentrações de produtos hidrolisados. Amidos com superfície porosa, como do milho, por exemplo, são degradados em maior velocidade e mais facilmente do que em superfícies lisas (como dos tubérculos). Além disso, ZHAND e OATES (1999), estudaram o ataque de α -amilases em batata doce e ressaltaram que a facilidade de ataque da enzima no grânulo de amido depende de vários fatores como, conteúdo de amilose e amilopectina, estrutura cristalina do amido, tamanho das partículas e presença de inibidores enzimáticos. A figura 9 ilustra o ataque do amido de batata doce por uma α -amilase pancreática.

Figura 9 – Imagem da ação de uma α -amilase em amido de batata doce, visualizada em microscopia eletrônica eletrônica (ESEM): (A) Amostra dos grânulos de amido de batata, (B) 52,2% dos grânulos quebrados enzimaticamente, (C) 63,2% dos grânulos quebrados enzimaticamente, (D) 61,1% dos grânulos quebrados enzimaticamente.

FONTE – (ZHANG e OATES, 1999).

As enzimas, em geral, são encontradas nos tecidos vegetais em misturas complexas. Geralmente as células apresentam centenas de enzimas diferentes que requerem purificação para um estudo aprofundado de uma delas. Em alguns casos é possível, através da aplicação de métodos específicos, utilizar enzimas de forma impura, mas na maioria dos casos, a presença de outras enzimas interfere na disponibilidade e na integridade de substratos desviando a avaliação de atividade específica (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002).

Antes de estas enzimas serem caracterizadas ou usadas em processos biológicos e industriais, diferentes técnicas foram desenvolvidas para o isolamento e purificação das proteínas baseando-se em suas propriedades como solubilidade, estabilidade em determinados valores de temperatura e pH, cargas elétricas em função do pH (para cromatografia de troca iônica e preparo de eletroforeses) e tamanho das moléculas (para cromatografia de peneira molecular) (BRENA e col., 1996, ZHOU e col., 2004).

Entre diversas técnicas encontradas na literatura para o isolamento e purificação de enzimas, algumas são consideradas clássicas para o isolamento de amilases encontradas em cereais, tubérculos e frutas, porém a principal dificuldade em purificá-las está na presença de múltiplas formas de isoenzimas em seus extratos. A cromatografia de troca iônica é um excelente instrumento para separação de proteínas com base em suas cargas, entre elas a matriz de DEAE-celulose tem sido muito usada na purificação de amilases em cereais. Outra técnica, que geralmente segue esta etapa é a utilização de gel de peneira molecular (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005).

NIRMALA e MURALIKRISHNA (2003) utilizaram DEAE-sephacel como matriz de troca iônica e Sephacryl-S200 como gel de filtração, e obtiveram uma excelente purificação de três α -amilases isoméricas α -1, α -2 e α -3 em extrato de malte, com recuperação de 6,5; 2,9; e 9,6 % e purificação final de 26, 17 e 31 vezes, respectivamente com relação ao extrato bruto.

A cromatografia de afinidade é outra ferramenta, talvez uma das melhores selecionada para purificação enzimática, porém possui um custo elevado. A matriz usada tem a função de ligar substâncias presentes como substratos, metais ligantes,

inibidores, anticorpos, resultando em um alto nível de purificação (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005).

WITT e SAUTER (1996) fizeram a purificação de α -amilase presentes na batata utilizando três métodos cromatográficos, o de afinidade, o de troca iônica e o gel de filtração e obtiveram um ótimo resultado final, 13 % de recuperação e uma purificação de 24,3 vezes com relação a amostra inicial.

2.5 – PAPEL DAS AMILASES NOS PROCESSOS METABÓLICOS EM TUBÉRCULOS

No quadro de enzimas amilolíticas que atuam nos amidos de raízes tuberosas, as enzimas endógenas são as mais exploradas em função da ação destas durante o armazenamento e nas etapas de processamento das raízes. Segundo POUTI-KAERLAS (1998), a mandioca possui um curto prazo de armazenamento, em geral de 5 a 7 dias, devido às mudanças metabólicas e fisiológicas derivadas de reações enzimáticas observadas durante o processo normal de degradação desta raiz. AFOAKWA e SEFA-DEDEH (2002), fizeram um estudo sobre a ação das enzimas amilolíticas (α e β -amilases) endógenas em tubérculos de inhame no período pós-colheita e constataram que a atividade da α -amilase aumenta no período de armazenamento à temperatura ambiente após a colheita. Nestas condições, foi quantificado um rápido aumento na concentração de maltose (2,28 mg/g.min para 6,68 mg/g.min) 36 horas pós-colheita. Porém, em condições de resfriamento da raiz (4 °C), a ação da α -amilase é minimizada e a concentração de maltose aumenta em menor velocidade (2,28 mg/g.min para 3,25 mg/g.min). Com relação a β -amilase, os

autores observaram comportamento similar ao da enzima α -amilase nas primeiras 24 h pós-colheita e a sua atividade também é reduzida com a diminuição da temperatura.

As amilases estão sendo purificadas de cereais e tubérculos a fim de se caracterizar vários parâmetros como pH e temperatura ótimos, estabilidade, efeitos de ativadores, estabilizadores e inibidores em suas atividades. Essas informações são muito importantes para conseguirmos explicar a ação destas no comportamento deteriorativo do vegetal e sua utilização como um ingrediente industrial.

Diversas dúvidas ainda permanecem sem resposta sobre o papel das enzimas amilolíticas no metabolismo do amido da mandioca. Tampouco são conhecidas as enzimas envolvidas diretamente na síntese e na degradação do amido. Os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório por MATOS DA VEIGA (2002), nos estimularam a continuar estudando os passos de purificação dessas enzimas bem como correlacionar sua possível atividade *in vivo* com a degradação das raízes. MATOS DA VEIGA (2002) verificou que a variedade Zolhudinha, de origem amazônica, apresentou comportamento diferenciado das raízes comerciais, com maior atividade amilolítica.

2.6 – A MANDIOCA DA VARIEDADE ZOLHUDINHA (IM-158)

A mandioca da variedade Zolhudinha é uma raiz brava com diversas vantagens agronômicas sendo ela um resultado do programa de melhoramento genético iniciado em 1981 pela Embrapa. Na época, identificou-se que a principal causa da baixa produtividade da mandioca em região de várzea era a podridão radicular, que

diminuía acentuadamente a produção de raízes. Então, o programa visava selecionar cultivares de mandioca com elevada produtividade nestes terrenos e resistência a pragas e doenças, cujo resultado foi a recomendação, para estas regiões, dos cultivares Mãe Joana (IM-175) e Zolhudinha (IM-158), ambos resistentes à podridão radicular.

Na figura 10 temos algumas diferenças nas folhas, folíolos e hastes da mandioca comercial e da variedade Zolhudinha plantadas na mesma época. É possível notar que na raiz comercial temos as folhas maiores com um conjunto de 5 folíolos e hastes róseas; na raiz Zolhudinha, as folhas são menores, com 7 folíolos e hastes verdes claras.

Figura 10 – Diferenças nas folhas, folíolos e hastes de uma planta de mandioca: (A) Ramo de mandioca comercial; (B) Ramo de mandioca Zolhudinha.

3 – OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram analisar as diferenças físico-químicas da raiz de mandioca da variedade Zolhudinha com relação a uma raiz comercial, acompanhar a ação das enzimas amilolíticas no período pós-colheita, estabelecer etapas de purificação da α -amilase e determinar o seu peso molecular.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – MATERIAIS

Durante a realização total do trabalho, foram utilizados 3 lotes (1 lote/ano) de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Zolhudinha), catalogadas como SRT 1309, que foram fornecidas pelo IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) através da estação experimental de Ubatuba entre os meses de maio e julho. Cada lote fornecido possuía uma planta com número de raízes que variava entre 9 e 12. Um lote com 3 plantas de mandioca comercial de mesa cultivadas na região de Ribeirão Pires, de diferentes épocas de plantio, foi utilizado nos testes físico-químicos para comparação com a variedade Zolhudinha.

4.2 – REAGENTES

Amido de batata, BSA (albumina sérica bovina), DNS (ácido dinitrosalicílico), DEAE – celulose e Sephacryl S-200 , kit para determinação massa molecular MW – GF – 200 foram todos adquiridos pela Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA.

Padrão de peso molecular para eletroforese SDS BenchMark, com peso molecular de 10 a 220 kDa código 10747-012, adquirido pela Invitrogen Life Technologies.

Substrato sintético de α e β amilase (CERALPHA e BETAMIL), adquirido pela Megazyme International Ireland, ICC Standard nº303, Irlanda.

Demais reagentes de uso comum em laboratório foram todos de grau analítico.

4.3 – MÉTODOS

4.3.1 – Preparação das raízes

Imediatamente após a colheita, 6 raízes da variedade Zolhudinha foram mantidas expostas em condições ambientes com temperatura média entre 20°C – 25°C. Nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 11 de armazenamento pós-colheita, amostras das raízes foram submetidas a teste de cocção, determinação da porcentagem de amido e teor de umidade; e a seguir foi feita a preparação do extrato enzimático e com ele a quantificação do teor de proteínas, atividade amilolítica e concentração de açúcares. Cada extrato enzimático, obtido no respectivo dia pós-colheita foi congelado a -18 °C para posteriormente ser utilizado nas etapas de purificação enzimática.

4.3.2 – Teste de cocção

As raízes de mandioca, descascadas, foram fatiadas transversalmente, com cortes de 1,5 cm de espessura e colocadas em um cozedor (figura 11) imersas completamente em água na cuba de banho fervente, com 5 hastes, de 90,0 g cada, sobre a superfície de cada fatia de mandioca, para determinação do tempo de cozimento, conforme modelo empregado por FENIMAN (2004). No total, foram empregadas 20 hastes distribuídas em quatro fatias de raiz por teste. O tempo de cozimento foi determinado quando metade do número de hastes mais uma tivessem perfurado as fatias de mandioca.

Figura 11 – Esquema do cozedor utilizado no teste de cocção.

FONTE – Adaptado a partir de FENIMAN, 2004.

4.3.3 – Determinação do teor de amido

Os teores de amido das raízes nos períodos pós-colheita foram determinados enzimaticamente pelo método descrito por AREAS E LAJOLO (1980). Aproximadamente 0,5 g das amostras em seus respectivos dias pós-colheita, foram homogeneizadas em um homogeneizador - *Potter* com 5,0 mL de NaOH 0,5 M e neutralizado com 5,0 mL ácido acético 0,5 M e o volume completado para 100 mL com água destilada. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 2,0 mL para tratamento com 8,0 mL de etanol para eliminação dos açúcares solúveis. Após centrifugação em 8000 g por 15 minutos e duas vezes tratados com etanol 80%, o precipitado estava livre de açúcares solúveis. O precipitado então foi hidrolisado com 2,0 mL de amiloglicosidase (14 U / mL) e amilase pancreática (0,4 U / mL) em tampão acetato 0,1 M pH (4,8) ficando incubado por 2 horas à 37 °C sob agitação constante. A reação foi interrompida com 200 µL de ácido perclórico 0,6 M e a glicose formada foi determinada pelo método do DNS descrito por BERNFELD (1955).

O teor de amido foi calculado como o conteúdo de glicose multiplicado pelo fator de conversão 0,9.

4.3.4 – Determinação do teor de Umidade

Foi determinado o teor de umidade das raízes em estufa 105°C durante o período pós-colheita, analisando-as em dias intercalados (1, 3, 5, 7, 9 e 11 dias). Para isso, foi pesada uma amostra de aproximadamente 5,0 g em cadinho de porcelana

previamente dessecado a 105 °C por 1 h, resfriado e de tara constante. As amostras permaneceram em estufa 105 °C por 5 h inicialmente e foram resfriadas e pesadas de uma em uma hora até peso constante.

4.3.5 – Preparação do extrato enzimático

O método de preparação do extrato enzimático foi baseado na extração feita por MATOS DA VEIGA (2000) com algumas modificações. Para cada dia pós-colheita, uma raiz foi cortada em cubos de cerca de 6 cm de aresta e triturada na proporção 1:1 (m/V) com tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0. A pasta resultante da trituração foi filtrada para separação entre extrato aquoso e resíduo sólido da raiz.

O extrato foi submetido à centrifugação refrigerada a 4 °C, 8000 g por 30 minutos, para decantação de resíduos de amido e outros sólidos remanescentes, como carboidratos insolúveis e restos celulares. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 5 mL para determinação do teor de açúcares e o restante foi submetido à diálise contra tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 por um período de 24 h, com trocas periódicas para as demais análises. Após isso o extrato foi armazenado a -18 °C até a sua utilização.

O extrato enzimático usado para as etapas de purificação, foi preparado da mesma forma, porém a diálise foi feita contra água destilada.

4.3.6 – Quantificação do teor de proteínas

Para o extrato enzimático bruto, as proteínas presentes foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976), tomando como padrão a albumina sérica bovina (BSA) de concentração 1 mg/mL em um intervalo de 0,05 a 0,70 mg / 100 µL de BSA. No extrato enzimático semipurificado, o teor de proteína foi estimado pela absorção de luz ultravioleta entre 260 – 280 nm segundo método de Warburg e Christian (1941), um método mais sensível, pois as amostras encontravam-se mais diluídas e de difícil detecção pelo método de Bradford. O cálculo da concentração de proteína foi determinado a partir da razão de A_{280} / A_{260} e pelo fator correspondente (WARBURG e CHRISTIAN Apud SCOPES, 1993).

4.3.7 – Determinação de atividade amilolítica do extrato enzimático

Para detecção da atividade amilolítica, foi empregado o complexo amido-iodo conforme descrito por STREET (1974) seguindo as modificações feitas por PIRES e col. (2002). Foram utilizados 100 µL de amostra (extrato enzimático) em 200 µL de solução de amido de batata 0,1 %, 500 µL de solução de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 na presença de Ca^{2+} 20 mM e 200 µL de HCl 0,01 M que ficaram incubados a 60 °C sob agitação constante por 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 400 µL de solução de iodo I_2 10 mM e KI, 14 mM. Em seguida o volume foi completado para 10 mL com água destilada e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 578 nm. Uma unidade amilásica (U) foi definida como a quantidade de amido (em microgramas) hidrolisada por minuto por mL de extrato enzimático, a 60 °C.

4.3.8 – Determinação do teor de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de DNS (ácido 3',5' – dinitrosalicílico) descrito por BERNFELD (1955). A curva padrão foi obtida usando solução de glicose em concentração entre 0,18 a 1,8 mg / mL.

4.3.9 – Etapas de purificação das enzimas amilolíticas

Para a purificação das principais enzimas amilolíticas foram aplicadas as seguintes etapas esquematizadas na figura 12 abaixo:

Figura 12 – Esquema das etapas de purificação enzimática.

Cromatografia em DEAE-celulose

Aproximadamente 30 mL do extrato dialisado, contendo cerca de 18 mg de proteína, foram liofilizados e re-suspendidos em 1 mL de Tris-HCl 0,05M, pH 8,0

que foi aplicado à matriz de troca iônica DEAE-celulose previamente tratada e tamponada a pH 8,0 em coluna de vidro de dimensões 1,5 X 40 cm. Esse volume aplicado teve cerca de 18 mg de proteína. Após a eluição das proteínas não adsorvidas à matriz, foi aplicado um gradiente linear de NaCl de 0-1 M à coluna para confirmação de toda eluição das proteínas com comportamento amilolítico. As frações com atividade amilolítica foram reunidas de acordo com os picos de separações apresentados. Cada pico reunido foi dialisado e liofilizado para a próxima etapa de purificação em coluna de Sephacryl S-200.

Cromatografia em SEPHACRYL S-200

As amostras liofilizadas foram re-suspendidas em 1 mL de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5 e aplicadas separadamente no gel de filtração SEPHACRYL S-200, em coluna de 1,5 X 60 cm, também equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5.

4.3.10 – Detecção das bandas protéicas com atividade amilolítica através da eletroforese nativa

A eletroforese nativa foi empregada em gel de poliacrilamida de concentração 7,5 % com amido, para detecção de bandas protéicas e comprovação de atividade amilolítica do extrato bruto e das amostras de cada etapa de purificação, adaptando ao método desenvolvido e empregado em nosso laboratório (PIRES e col., 2002).

A revelação de atividade enzimática foi realizada após a corrida eletroforética das amostras, sendo o gel inserido em solução de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 na presença de Ca^{2+} 20 mM, em banho-maria a 37 °C, durante 1 h. O gel foi então transferido para solução de iodo I_2 10 mM e KI 14 mM para coloração e revelação das bandas.

4.3.11 – Eletroforese dissociante

A eletroforese em SDS foi feita em gel de poliacrilamida 12,5 %, conforme o método adaptado por MAGALHÃES (2000), para identificação das bandas protéicas e visualização do isolamento das enzimas amilolíticas após cada etapa de purificação. Os géis foram revelados com nitrato de prata seguindo protocolos padronizados.

4.3.12 – Determinação da atividade enzimática de α e β -amilase

As atividades de α e β amilase do extrato bruto e das amostras de cada etapa de purificação, foram medidas utilizando os substratos sintéticos de α e β amilase (Ceralpha e Betamyl) da Megazyme International Ireland, Ltd. Foi feita a incubação de 50 μL de amostra a ser analisada com 50 μL do reagente Ceralpha para determinação de α , e 50 μL do Betamyl para determinação de β amilase, por 10 min. a 30 °C. A reação foi interrompida com a adição de 750 μL de Tris 1 % e foi feita a leitura das amostra em absorbância $\lambda = 410 \text{ nm}$. O substrato Ceralpha contém p-nitrofenol- α -D-maltoheptanose e α -glicosidase que em contato com a α -amilase da

amostra libera fragmentos de glicose e p-nitrofenol. No reagente Betamyl, p-nitrofenol- α -D-maltopentaose e α -glicosidase que em contato com a β -amilase da amostra libera fragmentos de maltose e p-nitrofenol. Portanto, para quantificar as concentrações de α e β amilases, foi feita uma curva padrão de p-nitrofenol na concentração de 0,14 mg/mL em um intervalo de 1,4 a 7,0 mg.

4.3.13 – Determinação da massa molecular

A determinação da massa molecular da amilase purificada foi realizada por eletroforese SDS e em gel de filtração Sephacryl –S200.

No gel de poliacrilamida 12,5 %, foi aplicado 0,5 μ L de um conjunto de padrões de peso molecular de massas entre 10 e 220 kDa. A revelação do gel foi feita com nitrato de prata.

A massa molecular da amilase foi estimada através da construção de um gráfico contendo na ordenada o log da massa molecular dos padrões e na abscissa o coeficiente de relação da migração (R_f) de cada banda protéica.

Na determinação da massa molecular da amilase pelo gel de filtração foi realizada na coluna de Sephacryl S-200 (de 1,5 X 60 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5. O fluxo da coluna foi de 12 mL/h e foram coletadas frações de 1 mL. O volume de exclusão da coluna foi estimado por filtração de Blue Dextran 2000.

Para calibração da coluna foram utilizados os seguintes padrões de massa molecular: álcool desidrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), anidrase carbônica (29

kDa) e citocromo (12,4 kDa). As amostras foram previamente dissolvidas em 1,0 mL do tampão de eluição contendo 5 % de glicerol e filtradas separadamente na coluna.

A massa foi estimada através da construção de um gráfico contendo na ordenada o log da massa molecular dos padrões e na abscissa a razão V_e/V_o (V_e = volume de eluição da coluna; V_o = volume de exclusão da coluna). O valor de V_e de cada amostra foi considerado como sendo a somatória dos volumes das frações coletadas desde a aplicação da amostra até a fração onde registra-se a maior leitura a 280 nm (no caso dos padrões) e maior atividade amilolítica (no caso das amilases).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Teste de cocção

As tabelas 4 e 5 mostram o tempo de cozimento das raízes comerciais e das Zolhudinhas, nas condições descritas anteriormente.

Tabela 4 – Tempo de cocção das mandiocas comerciais da região de Ribeirão Pires de diferentes épocas de plantio.

Tempo de Plantio	Tempo de Cocção
1 ano	5'32''
2 anos	21'13''
3 anos	1h 11'12''

Tabela 5 – Tempo de cocção das mandiocas Zolhudinhas nos períodos pós-colheita.

Dias Pós-Colheita	Tempo de Cocção
1	3h 08'
3	6h 15'
5	3h 50'
7	4h 57'
9	2h 01'
11	6h 58'

Podemos notar, que na tabela 4, com as raízes comerciais, o tempo de cozimento é maior quanto mais tempo a raiz permanece no solo. Este fato reforça informações anteriores, onde ressaltamos que o tempo de cocção é um importante parâmetro de qualidade na seleção de mandioca de mesa, que deve apresentar cozimento rápido.

Na tabela 5 temos as raízes de mandioca Zolhudinha, que foi colhida após 12 meses de plantio, onde o tempo de cocção foi em média de 4,30 h. Notou-se que são raízes duras, fibrosas e não viáveis para comercialização, pois possuem um tempo de cozimento muito grande fato que comprova a classificação de mandioca brava. Os valores do tempo de cocção não foram lineares apesar de serem raízes da mesma planta, variando em função da raiz testada. Isso ocorreu, pois as raízes apresentavam diferentes tamanhos, o que evidencia desenvolvimento em épocas diferentes na mesma planta e também uma possível presença de amido resistente em certos pontos da raiz. Fica evidente que o processo de deterioração, no entanto, não altera a dureza desta variedade submetida à cocção. A figura 13 mostra aspectos da mandioca Zolhudinha, antes e após o teste de cocção. Notamos o cozimento irregular das raízes, apresentando alguns pontos brancos de amido não gelatinizados no interior das fatias submetidas à cocção.

Figura 13 – Raiz de mandioca Zolhudinha 3º dia pós-colheita antes e após teste de cocção.

5.2 – Teores de umidade e amido

O teor de umidade dessas raízes (Zolhudinha), feito em quadruplicata, no período pós-colheita, apresentou o seguinte comportamento (figura 14).

Figura 14 – Variação de umidade das raízes de mandioca Zolhudinha no período pós-colheita com seus valores médios e amplitude de cada ensaio.

O teor de umidade foi em média 63,6 %, de acordo com a literatura (TABELA DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL USP e UNICAMP, 2005). Essa determinação foi realizada em quadruplicata, onde apesar de algumas diferenças entre os valores obtidos (principalmente no 3º dia pós-colheita) observamos que o comportamento e tendência dos dados foram muito semelhantes. Houve um sutil aumento da umidade no 5º dia e um pouco mais acentuado no 11º dia pós-colheita por uma possível absorção de água da atmosfera, visto que as raízes permaneceram expostas em

condições não controladas de temperatura e umidade relativa; e também pelas análises terem sido feitas em raízes com diferentes tamanhos e períodos de desenvolvimento de uma mesma planta.

A figura 15 mostra a variação da porcentagem de amido de acordo com os dias pós-colheita, onde os valores foram calculados em base úmida e seca.

Figura 15 – Variações da porcentagem de amido da mandioca Zolhudinha no período pós-colheita.

O teor de amido calculado mostra um aumento na sua concentração até o sétimo dia pós-colheita e depois uma queda até o décimo primeiro dia. A elevação de amido ocorrida até o sétimo dia pós-colheita, pode ser explicada por diversos fatores, como a facilidade de extração do amido neste período, pois as fibras vão se

rompendo com o passar do tempo o que torna a extração de amido mais fácil; a utilização de raízes de diferentes tamanhos em uma mesma planta também pode acarretar uma variação na concentração de amido. Já a queda ocorrida a partir do sétimo dia pós-colheita pode representar a degradação do amido neste período e ou dificuldade de extração pela presença de amido resistente.

Estes dados apresentados mostram apenas a tendência da concentração de amido no período pós-colheita de mandioca da variedade Zolhudinha, não podemos fazer uma análise estatística, pois avaliamos raízes de uma mesma planta com desenvolvimento heterogêneo. Somente um estudo de campo com diversas plantas amostradas, poder-se-ia reafirmar essas evidências.

5.3 – Proteínas, atividade amilolítica e concentração de açúcares redutores

Nos extratos enzimáticos das raízes da mandioca Zolhudinha nestes períodos intercalados pós-colheita, foram determinadas atividade amilásica, concentração de açúcares redutores e de proteínas, para melhor entendimento da ação enzimática. Os gráficos apresentados abaixo mostram as variações entre o teor de proteína com a atividade amilolítica total (figura 16 A) e específica (figura 16 B), e a concentração de açúcares redutores com a atividade amilolítica total (figura 17A) e específica (figura 17 B), para análise e comparação.

Figura 16 – Concentração de proteínas e atividade amilolítica: (A) atividade amilolítica total e (B) atividade amilolítica específica.

Figura 17 – Atividade amilolítica e concentração de açúcares redutores: (A) atividade amilolítica total e (B) atividade amilolítica específica.

Foi possível notar uma proporcionalidade na relação entre a concentração de proteínas e atividade amilolítica no período pós-colheita, sendo quanto maior a atividade amilolítica, menor a concentração de proteína. Esse resultado parece indicar que a amilase é mais facilmente extraída do que as demais proteínas da raiz.

Desse modo, o aumento da extração corresponde à diminuição da atividade específica da enzima.

Quanto à relação entre a atividade amilolítica e concentração de açúcares redutores foi possível analisarmos na sobreposição dos gráficos que a atividade amilásica abaixa cerca de 2 unidades no 5º dia pós-colheita, que corresponde a queda de 1/3 da atividade inicial, junto com um pico de formação de açúcares redutores que aumenta cinco vezes a sua concentração.

Na figura 18, temos o gel de eletroforese nativa que mostra bandas nítidas de comportamento de amilases. A atividade enzimática da banda principal tem a tendência de aumentar ao longo do período pós-colheita, assim como relatos de AFOAKWA e SEFA-DEDEH (2002) para raízes de inhame.

Figura 18 – Eletroforese nativa dos extratos enzimáticos brutos dos dias pós-colheita revelada com solução de iodo-potássio

Comparativamente fizemos outro gel de eletroforese nativa e aplicamos extratos das mesmas raízes comerciais utilizadas no teste de cocção dos períodos 1 ano, 2 anos e 3 anos de plantio, e em paralelo aplicamos extratos destas raízes expostas em condições ambientes durante uma semana após a colheita. Usamos também uma raiz comercial sem procedência definida como controle do ensaio.

A figura 19 ilustra o resultado obtido onde podemos observar o comportamento de mais de uma enzima amilolítica, a atividade é maior nas raízes mais novas (1 ano e 2 anos plantadas) e possui perfil semelhante a da raiz comercial sem procedência definida. Notou-se também que após uma semana de colheita, a atividade amilásica de todas as amostras diminui significativamente e que a banda secundária (inferior) sofre maior deslocamento nesta eletroforese contendo amido em meio à polimerização da acrilamida.

Figura 19: Gel de eletroforese nativa das raízes comerciais: A) 1 ano plantada, 1 dia pós colheita; B) 1 ano plantada, 1 semana pós-colheita; C) 2 anos plantada, 1 dia pós colheita; D) 2 anos plantada, 1 semana pós-colheita, E) 3 anos plantada, 1 dia pós colheita; F) 3 anos plantada, 1 semana pós-colheita; G) raiz comercial controle, sem procedência definida.

Os ensaios de atividade amilolítica dos extratos nos dias pós-colheita (figura 16 e 17) associados à eletroforese nativa (figura 18) não permitem concluir que haja

tendência de queda ou aumento acentuado de atividade enzimática ao longo do armazenamento. Apesar de ter havido no 11º dia pós-colheita um aumento de atividade amilolítica, não é possível afirmar que tal comportamento seja característico da variedade estudada, tampouco das condições de armazenamento por se tratar de um ensaio com número limitado de provas e de amostras de raízes.

5.4 – Etapas de purificação

Visando a purificação das enzimas α -amilase endógenas das raízes de mandioca da variedade Zolhudinha, diferentes métodos cromatográficos foram aplicados ao extrato bruto. Colunas de troca iônica e peneira molecular foram utilizadas resultando purificações inédita de duas bandas isômeras de α -amilase.

A princípio, tomamos o cuidado de fazer as primeiras separações enzimáticas dos extratos de mandioca a cada dia pós-colheita, porém visto que os perfis cromatográficos não divergiam entre si, apenas o rendimento era oscilante, sem demonstrar tendências de aumento ou diminuição de concentração e atividade enzimática. Em vista desses resultados preliminares, não nos preocupamos em pesquisar em detalhes estas condições e limitamos as purificações às raízes com até 5 dias após a colheita para evitar que possíveis contaminações microbiológicas pudessem interferir nos resultados.

Na figura 20, temos a primeira etapa de purificação em coluna de DEAE-celulose onde observamos a formação de 3 picos com atividade amilolítica presentes entre as frações coletadas de 10 a 28. O primeiro pico coletado mostrou-se nas frações de 10 a 17, no pico 2 de 18 a 22 e por fim um terceiro pico foi determinado

como sendo o intervalo das frações 23 até a 28. Estas frações mostram que as enzimas amilolíticas não interagiram com a resina visto que, foram todas eluídas antes da aplicação do gradiente linear de NaCl, na concentração 1,0 M, que foi aplicado a partir da fração 40.

As frações centrais de cada conjunto, correspondentes aos picos com atividade amilásica foram reunidas e liofilizadas para posterior separação em Sephacryl S-200. Assim, para o pico 1, frações 11 a 14, pico 2, frações 18 e 19 e pico 3 frações 23 a 18. Nesta etapa foram testadas algumas variáveis, como pH, sais tamponantes e concentração salina, para tentar uma separação mais efetiva de purificação nesta primeira etapa, retendo enzimas de interesse. No entanto, o uso de DEAE-celulose nas condições apresentadas permitiu a retenção de outras proteínas, eliminando assim uma parte dos contaminantes do extrato bruto.

Figura 20 – Perfil cromatográfico DEAE-celulose.

Alíquotas de amostras dos três picos apresentados foram aplicados em um gel de eletroforese nativa revelado com solução de iodo, para verificar se havia bandas amilolíticas distintas entre elas. A figura 21 mostra que não há diferença entre as bandas, apenas a intensidade da atividade amilolítica é maior no primeiro pico. Como esse sistema não permite a revelação das demais bandas protéicas da eletroforese, podemos apenas deduzir que a presença da mesma banda dupla de atividade nos três conjuntos de pico pode ter ocorrido por separação “grosseira” que o método permite obter. Na mesma figura pode-se notar que quanto maior a atividade amilásica da fração submetida à eletroforese na presença de amido, menor é seu deslocamento no gel. A tendência aqui registrada foi diversas vezes detectada em extratos brutos de uma única amostra de mandioca com diluições diferentes.

Portanto, dadas as características das bandas duplas, podemos afirmar que os três picos obtidos referem-se às mesmas enzimas.

Após a concentração dos picos, estes foram re-suspendidos em 1 mL e aplicados a coluna de Sephacryl S-200. Dos três picos aplicados, o primeiro apresentou a melhor separação quando aplicado a coluna de peneira molecular. A figura 22 mostra esta separação onde observamos a formação de um único pico de atividade amilolítica equivalente as frações de 20 à 26, sendo a fração 22 a de maior intensidade. Analisando o gráfico notamos uma boa separação das proteínas quando sobrepomos os dois perfis, protéico e de atividade, pois a medida que a concentração de proteínas cai, a atividade amilolítica aumenta.

O critério de pureza de constatação da purificação adotado foi a análise eletroforética da enzima purificada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes comparando com o extrato bruto (figura 23).

Figura 22 – Perfil cromatográfico Sephacryl S-200.

Com a eletroforese da figura 23 (D) e 23 (E), vimos que temos a amostra purificada. Embora apresente duas bandas amilolíticas, estas são amilases isoméricas com cargas muito próximas de difícil separação.

Figura 23 – Eletroforese SDS – revelação com nitrato de prata. (A) Padrão de peso molecular, (B) Extrato bruto, (C) Fração com maior atividade amilolítica, após coluna DEAE, contida no pico 1 (D) Fração 22 da coluna Sephacryl S-200, (E) Fração 23 da coluna de Sephacryl S-200.

Utilizando os substratos sintéticos para avaliação das atividades de α e β -amilases do kit Ceralpha e Betamyl, determinamos se havia a presença destas duas enzimas no extrato bruto e nas amostras das etapas de purificação. Constatamos a presença de α -amilase em todas as amostras e a β -amilase só foi detectada no extrato bruto. Esta última, citada em raízes de mandioca por PADMAJA e BALAGOPAL (1983), não foi até o presente momento caracterizada. Em trabalho anterior, Matos da Veiga (2002) detectou a atividade de duas bandas protéicas em eletroforese nativa com amido, uma com $R_f = 0,43$ e outra com $R_f = 0,59$, do mesmo modo que aqui

demonstrado na figura 19. Esta segunda banda, porém, foi perdida nas etapas de purificação realizadas, podendo ser a β -amilase.

A tabela 6 mostra a quantificação destas enzimas detectadas por cada substrato sintético.

Tabela 6 – α e β -amilases presentes nas amostras das etapas de purificação. U = μ g p-nitrofenol / mL

Amostras	α -amilase (U)	β -amilase (U)
Extrato Bruto	127,4	63,0
DEAE-celulose	78,5	0,0
Sephacryl S-200	56,9	0,0

Nesta tabela 6 podemos observar que na última etapa de purificação confirmamos a presença de α -amilase, logo as bandas detectadas nas formas purificadas, são de α -amilase, podendo corresponder a isoenzimas..

Na figura 23 (A), temos a representação gráfica da massa molecular aplicada no gel de eletroforese onde o peso molecular da α -amilase purificada foi estimado em 14 kDa. Também foi feita a determinação da massa molecular através da aplicação de proteínas padrões na coluna Sephacryl S-200 para confirmação do resultado em eletroforese. Esta massa foi determinada pela construção do gráfico mostrado na figura 24 onde o peso molecular médio das isoformas da α -amilase foi estimado em 19 kDa.

Figura 24 – Determinação da massa molecular das isoformas da α -amilase em coluna Sephacryl S-200. Marcadores de peso molecular: álcool desidrogenase, BSA, anidrase carbônica e citocromo C.

Comparando os dois métodos de determinação de peso molecular, a massa da α -amilase ficou estimada entre 14 e 19 kDa. .

Na tabela 7 temos o resultado da recuperação e purificação enzimática em relação ao extrato bruto.

Tabela 7 – Tabela de purificação enzimática (U) = μg amido / min.mL amostra.

Etapas	Vol. (ml)	Proteína (mg/mL)	P total (mg)	Atv (U)	Atv. Total (UT)	Aesp. (UT/mg)	Purificação	Recuperação
Extrato Dialisado	30,00	0,535	16,05	172	5160	321,45	1,00	100,00
DEAE	18,00	0,666	11,99	94	1692	141,12	1,34	74,64
Sephacryl	21,00	0,058	1,22	53	1113	920,14	13,27	7,54

A tabela 7 mostra o resultado de todas as etapas de purificação onde conseguimos um rendimento de 7,5 % e que a enzima encontra-se treze vezes mais purificada que em seu estado inicial.

6 – CONCLUSÕES

Considerando os resultados apresentados e discutidos a respeito da raiz de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. Zolhudinha pode-se concluir que:

1. Os teores de umidade e amido são condizentes com a literatura e semelhantes com raízes de outras variedades;
2. O processo de deterioração da variedade Zolhudinha não altera a dureza da raiz submetida à cocção;
3. A alta atividade amilolítica decai 1/3 de sua intensidade no quinto dia pós-colheita, em contraponto à formação de açúcares redutores, cuja concentração aumenta cinco vezes;
4. Obteve-se a purificação da enzima α -amilase, através de cromatografia em DEAE-celulose e Sephacryl S-200, treze vezes mais purificada em relação ao extrato bruto e com recuperação protéica de 7,5 %, com duas bandas protéicas representadas em eletroforese SDS, fato que indica presença de α -amilase isomérica;
5. A enzima purificada apresentou atividade α -amilásica de 56,9 U (μ g p-nitrofenol / mL) usando como substrato sintético p-nitrofenol- α -D-maltoheptano do kit Ceralpha;
6. O peso molecular da α -amilase foi estimado entre 14 e 19 kDA.

7 – BIBLIOGRAFIA

- ADETAN, D.A., ADEKOYA, L.O., ALUKO, O.B., Characterisation of some properties of cassava root tubers, **Journal of Food Engineering**, v.59, n. 4, p. 349 – 353, 2003.
- AFOAKWA, E.O., SEFA-DEDEH, S., Changes in rheological properties and amylase activities of trifoliate yam, *Dioscorea dumetorum*, starch after harvest, **Food Chemistry**, v. 77, p. 285 – 291, 2002.
- ALMEIDA, M.S., KURTENBACH, E., Como Purificar Proteínas?, **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº24, Janeiro/Fevereiro, 2002.
- ALVES, R.M.L., GROSSMANN, M.V.E., SILVA, R.S.S.F., Gelling properties of extruded yam (*Dioscorea alata*) starch, **Food Chemistry**, v. 67, p. 123 – 127, 1999.
- AREAS, J.A.G., LAJOLO, F.M., Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas, **Anais de Farmácia e Química**, São Paulo, 20, (1/2), 307-318, 1980.
- BERNFELD, P., Amylase α and β , **Methods of Enzymology**, New York, n. 1, p. 149 – 54, 1955.
- BEZERRA, V.S., PEREIRA, R.G.F.A., CARVALHO, V.D. de, VILELA, E.R., Raízes de mandioca minimamente processadas: efeito do branqueamento na qualidade e na conservação, **Ciência Agropecuária**, Lavras, v.26, n. 3, p.564 – 575, maio/julho, 2002.

- BOOTH, R.H. Storage of fresh cassava (*Manihot esculenta* Crantz) I: post-harvest deterioration and its control, **Experimental Agriculture**, Cambridge, Inglaterra, v. 12, p. 103 – 111, 1976.
- BORGES, M. de F., FUKUDA, W.M.G., ROSSETTI, A.G., Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1559 – 1565, novembro, 2002.
- BRADFORD, M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, R., **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**, 4º edição, Natal: Editora Universitária da UFRN, p. 343-346, 1985
- BRENA, B.M., PAZOS, C., FRANCO-FRAGUAS, L., BATISTA-VIERA, F., Chromatographic methods for amylases, **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Uruguai, v. 684, p. 217-237, 1996.
- BUSCHMANN, H., RODRIGUEZ, M.X., TOHMES, J., BEECHING, J.R., Accumulation of Hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), **Annals of Botany**, Colombia, v. 86, p. 1153 – 1160, 2000.
- CAMPOS, A.D., CARVALHO, V.D., Deterioração pós-colheita de mandioca. I – Modificações no grau de deterioração fisiológica, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 5, p. 773 – 781, 1990.
- CARVALHO, P.C.L. de, FUKUDA, W.M.G., CRUZ, P.J., COSTA, J.A., Avaliação agronômica e tecnológica de cultivares de mandioca para o consumo “*in natura*”. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1/2, p. 7 – 15, 1995.

- CHATAKANONDA, P., CHINACHOTI, P., SRIROTH, K., PIYACHOMKWAN, K., CHOTINEERANAT, S., TANG, H., HILLS, B., The influence of time and conditions of harvest on the functional behavior of cassava starch – a proton NMR relaxation study, **Carbohydrate Polymers**, USA, v. 53, p. 233 – 240, 2003.
- CIAT, Folheto: Cassava: A crop for hard times and modern times, **CIAT in focus**, crop commitments, 2003.
- CONCEIÇÃO, A. J., A mandioca, São Paulo, Nobel, 3ª edição, 1981.
- DJAZULI, M., BRADBURY, J.H., Cyanogen content of cassava roots and flour in Indonésia. **Food Chemistry**, New York, v. 65, p. 523 – 525, 1999.
- DONALD, A, What is starch?, disponível em: <http://www.poco.phy.cam.ac.uk/research/starch/whatis.htm> Acesso em outubro de 2004.
- EL-SHARKAWY, M.A., Cassava biology and physiology, **Plant Molecular Biology**, Colombia, n. 53, p. 621 – 641, 2003.
- EMBRAPA, Instruções práticas para o cultivo da mandioca, **Circular Técnica n. 19**, Cruz das Almas, Bahia, maio de 1993.
- FENIMAN, C.M., 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, **Dissertação de Mestrado**, Luiz de Queiroz, USP/Piracicaba, 2004.
- FLORES, C.I.O., PENTEADO, M.D.V.C., Carotenóides com atividade pró-vitamina A em cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do estado de

- São Paulo, **Revista de Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n.1, p. 51-60, 1992.
- FRANCO, C.M.L., CIACCO, F., Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules – Effect of the size of the granules, **Starch**, v. 44, p. 422 – 426, 1992.
- GUZMÁN-MALDONADO, H., PAREDES-LÓPEZ, O., Amylolytic Encimes and products derived from starch: a review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 5, p. 373 – 403, 1995.
- HOOVER, R, Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review, **Carbohydrate Polymers**, Canada, v. 45, p. 253 – 267, 2001.
- JAMES, J.A., LEE, B.H., Glucoamylase: microbial sources industrial applications and molecular biology – a review, **Journal of Food Biochemistry**, v. 21, p. 1 – 52, 1997.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M., Princípios de Bioquímica, São Paulo: Sarvier, p. 839, 1995.
- LORENZI, J. O., Mandioca, **CATI - Coletim Técnico**, Campinas, n. 245, Agosto 2003.
- MAGALHÃES, C.P., XAVIER FILHO, J., CAMPOS, F.A.P., Biochemical basis of the toxicity of manipueira (liquid extract of cassava roots) to nematodes and insects, **Phytochemical Analysis**, n.11, v.1, p.57-60, 2000.

- MARINHO, H., XAVIER, J., MIRANDA, R., CASTRO, J., Estudos sobre carotenóides com atividade de pró-vitamina “A” em cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em ecossistema de terra firme de Manaus, Amazonas, Brasil, **Acta Amazônica**, Manaus, v. 26, n. 3, p 127-136, 1996.
- MATOS DA VEIGA, E., Caracterização e purificação parcial de α -amilase de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Dissertação de Mestrado**, FCF/USP, 2002.
- MENDONÇA, H.A., MOURA, G.M., CUNHA, E.T., Avaliação de genótipos de mandioca em diferentes épocas de colheita no estado do Acre, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 761 – 769, junho 2003.
- MURALIKRISHNA, G., NIRMALA, M., Cereal α -amylase – an overview, **Carbohydrate Polymers**, India, v. 60, p. 163-173, 2005.
- MURTY, K. S. The amylase activity of sweet cassava (*Manihot palmata*), **Journal of Indian Chemistry Society**, London, v.17, p.578-80, 1940.
- MYERS, A.M., MORELL, M.K., JAMES, M.G., BALL, S.G., Recent progress towards understading biosynthesis of the amylopectin crystal, **Plant Physiology**, v. 122, p. 989 – 997, 2000.
- NIRMALA, M., MURALIKRISHNA, G., Three α -amilases from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15) – purification and partial characterization, **Phytochemistry**, v. 62, p. 21 – 30, 2003.
- NGEVE, J.M., Cassava root yields and culinary qualities as affected by harvest age and test environment, **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 83, p. 249 – 257, 2003.

- PADMAJA, G., BALAGOPAL, C., Cellular and extracellular enzymes associated with the post harvest deterioration of cassava tubers, **Journal of Food Science and Technology**, India, v.22, p.82 – 87, 1985.
- PADONOU, W., MESTRES, C., NAGO, M.C., The quality of boiled cassava roots: instrumental characterization and relationship with physicochemical properties and sensorial properties, **Food Chemistry**, v. 89, p. 261 – 270, 2005.
- PIRES, T. C. R.; MATOS DA VEIGA, E.; FINARDI FILHO, F., Enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa (*Arracacia Xanthorrhiza* Bancroft). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.22, p.278-284, 2002.
- PUONTI-KAERLAS, J., Cassava Biotechnology, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Hampshire, v. 15, n. 4, p. 329 – 335, 1998.
- RAVI, V., AKED, J., BALAGOPALAN, C., Review on tropical root and tuber crops I. Storage methods and quality changes, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton. v. 36, n. 7, p. 661 – 709, 1996.
- SRIBURI, P., HILL, S.E., BARCLAY, F., Depolymerisation of cassava starch, **Carbohydrate polymers**, v. 38, p. 211 – 218, 1999.
- SRIROTH, K., SANTISOPASRI, V., PETCHALANUWAT, C., KUROTJANAWONG, K., PIYACHOMKWAN, K., OATES, C.G., Cassava starch granule structure-function properties: influence of time and conditions of harvest on four cultivars of cassava starch, **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 161 – 170, 1999.

STREET, H.V. Glycoside hydrolyses – amylases: measurement of starch-iodine complex. In: BERGMEYER, H. **Methods of Enzyme Analyses**, v.2, 2^o edition, Academic Press, New York, 1974.

SURMELY, R., ALVAREZ, H., CEREDA, M.P., VILPOUX, O.F., Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, cap. 6, p. 116. Disponível em: <http://www.raizes-ong.org.br/livros/cap.3/cap%2015A.pdf> Acesso em outubro de 2004.

TABELA DE COMPOSIÇÃO DOS ALIMENTOS – UNICAMP. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/tapo/tabela/tabela1>. Acesso em abril 2005.

TABELA DE COMPOSIÇÃO DOS ALIMENTOS – USP. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em abril 2005.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J. C. M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L., Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137 – 155, 2002.

VIHINEN, M., MÄNTSÄLÄ, P., Microbial amylolytic enzymes – The Review, **Critical Reviews of Mol. Biol.**, v. 24, p. 329 – 419, 1989.

WARBURG and CHRISTIAN Apud: Scopes, R. K., Methods for Protein Estimation, **Protein Purification: Principles and Practice**, 3^o edition, p. 541-542, 1993.

WITT, W., SAUTER, J.J., Purification and properties of a starch granule-degrading α -amylase from potato tubers, **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 304, p. 1789-1795, 1996.

ZHANG, T., OATES, C.G., Relationship between α -amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches, **Food Chemistry**, v. 65, p. 157 –163, 1999.