

**UNIVERSIDADE CAMILO CASTELO BRANCO
CURSO DE QUÍMICA
DESCALVADO – SP**

**AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE CHIANG E JOHNSON
(1977) PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE GELATINIZAÇÃO
DO AMIDO**

LAYNARA MURIELE TOMAIOLLO

**DESCALVADO – SP
2012**

**UNIVERSIDADE CAMILO CASTELO BRANCO
CURSO DE QUÍMICA
DESCALVADO – SP**

**AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE CHIANG E JOHNSON
(1977) PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE GELATINIZAÇÃO
DO AMIDO**

Laynara Muriele Tomaiolo

Orientador: Prof. Alfredo Di Vito Neto

Coorientador: Nelson Ruiz Junior

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como exigência para
obtenção do título de Bacharel em
Química à Universidade Camilo
Castelo Branco - Unicastelo

**DESCALVADO – SP
2012**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha Mãe, por todo o amor e dedicação comigo, por ter sido a peça fundamental para que eu tenha me tornado a pessoa que hoje sou. A minha família pelo carinho e apoio em todos os momentos que precisei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

A minha Mãe Sonia, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, tenho maior orgulho de chamar de mãe, meu eterno agradecimento pelos momentos em que esteve ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível, pessoa que sigo como exemplo, mãe dedicada, amiga, batalhadora.

Agradeço ao meu Pai Adilson por absolutamente tudo. Cada um de seus atos foi uma oportunidade que eu tive para crescer e me tornar o que sou. À minha irmã Laura, por estar sempre presente, na minha vida, pelo amor incondicional.

A minha tia Silvana, por me dar sempre os conselhos certos e estar sempre torcendo e rezando para que meus objetivos sejam alcançados. A minha tia Edna por sempre acreditar na minha capacidade. A minha avó Efigênia por todo o amor que me dedicou meu eterno amor e agradecimento. A minha avó Nadir (*in memorian*), coração bondoso que dedicou toda sua vida a família.

Aos meus amigos Robson e Camila que ao longo desses meus quatro anos, eu posso considerar como verdadeiros amigos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Ana, Amanda, Mariana, Karina, Luciana, Mara, Milton, Juliana Botaro, Juliana Belarmino, Thaís, Gisele, Pamela, Julio, Guilherme, e especialmente meu amigo Klaus que está sempre presente, e a futura e mais nova companheira de laboratório Fernanda.

Às minhas novas amizades concebidas na faculdade. Que elas durem tanto quanto foram intensas. Agradeço em especialmente a Jaqueline que está a seis anos me acompanhando nessa jornada. A Priscila e Juliana a oportunidade de ter compartilhado com elas esses quatro anos.

Aos meus orientadores, Prof. Alfredo e Nelson Junior, pelo ensinamento e dedicação, estando sempre presente, esclarecendo minhas dúvidas, tendo muita paciência, competência, confiança, conhecimentos e principalmente a amizade.

Ao laboratório IN VIVO LABS e ao grupo Eviialis, especialmente ao Cedric, que me deu a oportunidade para a realização das análises desse trabalho.

Por fim, meu mais sincero agradecimento aos meus amigos e familiares pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado meu eterno agradecimento.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | iv |
| LISTA DE TABELAS..... | v |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | vi |
| RESUMO..... | vii |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVO..... | 3 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 3.1. Carboidratos..... | 4 |
| 3.2. Amido..... | 6 |
| 3.3. Estrutura do Amido..... | 8 |
| 3.4. Síntese do amido..... | 9 |
| 3.5. Gelatinização do Amido..... | 9 |
| 3.6. Importância da gelatinização do amido na nutrição animal..... | 11 |
| 3.7. Quebra enzimática da Glucoamilase..... | 13 |
| 3.8. Métodos para a gelatinização do amido..... | 13 |
| 3.9. Princípio da metodologia de Chiang e Johnson..... | 14 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 16 |
| 4.1. Materiais..... | 16 |
| 4.2. Métodos..... | 17 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 21 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 22 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 23 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. A amilose e amilopectina, os dois polissacarídios do amido | 7 |
| Figura 2. A Estrutura do amido (amilose) | 8 |
| Figura 3. A Gelatinização do amido | 11 |
| Figura 4. Imagem da estrutura estendida da glucoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> | 13 |
| Figura 5. Banho-maria 95-100º com amostras <i>An+</i> | 18 |
| Figura 6. Balões <i>An+</i> e <i>An-</i> | 18 |
| Figura 7. Balões com reagente O-toluidina e o líquido decantado antes da ebulação 95-100°C; | 19 |
| Figura 8. Balões com reagente O-toluidina e o líquido decantado depois da ebulação 95-100°C | 19 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Comparação do Método Polarímetro e Método Enzimático para medição do amido. | 15 |
| Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos reagentes. | 16 |
| Tabela 3. Peso das amostras (g). | 17 |
| Tabela 4. Leitura em absorbância a 630nm. | 20 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP Difosfato de adenosina

ATP Trifosfato de adenosina

PPi Íon pirofosfato

TG Taxa de Gelatinização

RESUMO

A taxa de gelatinização do amido tem se tornado um dado valioso para as indústrias de alimentação animal. Esse processo pode trazer transformação benéfica nos grânulos de amido. O amido é o carboidrato de reserva energética mais importante das plantas, constitui uma fonte de carbono para muitos seres vivos. O tratamento térmico do amido aumenta a digestibilidade, pois os grânulos são expostos a uma maior ação enzimática quando são desfeitos pelo calor, com esse aumento de digestibilidade resulta em maiores valores de energia metabolizável. Os alimentos extrusados contém uma taxa de gelatinização alta, consequentemente temos melhor expansão dos grânulos, melhor aspecto no produto final, e melhor digestibilidade. Existem vários métodos para medir a gelatinização do amido, eles são baseados em birrefringência, absorção de corantes, solubilidade, enzimático, entre outros. Nesse trabalho foi usado o método enzimático desenvolvido por Chiang e Johnson em 1977, baseia-se no princípio que o amido é facilmente digerido pela enzima gluamilase para formar glicose. A vantagem desse método são simplicidade básica e economia.

Palavras-chave: Amido; digestibilidade; glucoamilase; extrusão.

1. INTRODUÇÃO

Amidos são polissacarídeos (moléculas de glicose). O número de moléculas de glicose unidas em uma única molécula varia dependendo do tipo de amido. O amido é uma forma de armazenamento de energia para as plantas. A planta dirige as moléculas de amido para os amiloplastos, onde são depositados para formar grânulos.

O amido consiste de dois tipos de moléculas:

- Amilose (cadeia linear)
- Amilopectina (cadeia ramificada)

Em um grânulo de amido, a amilose e a amilopectina se organizam em volta de um ponto central denominado hilo. Pontes de hidrogênio entre os filamentos dá a forma dos grânulos. A proporção da amilose e amilopectina é diferente dependendo do grânulo de amido. Quando o amido é aquecido ocorre um processo chamado "gelatinização do amido" onde rompe as ligações intermoleculares das moléculas de amido na presença de água e calor, permitindo a entrada de água nas pontes de hidrogênio. Este processo é irreversível e dissolve os grânulos de amido. A penetração da água aumenta na estrutura do grânulo geral e diminui o número e tamanho das regiões cristalinas. Regiões cristalinas não permitem a entrada de água. O calor faz com que as regiões se difundam, de modo que as cadeias começam a separar-se em uma forma amorfa. Sob o microscópio em luz polarizada o amido perde sua birrefringência. A birrefringência é a formação de dupla refração apresentada por certos cristais intimamente ligada com a velocidade e direção de propagação da luz, é dada numericamente como sendo a diferença entre o seu maior e o seu menor índice de refração.

A temperatura de gelatinização do amido depende do tipo de planta e da quantidade de água presente, e dos tipos de concentrações de sal e açúcar. Alguns tipos de amido começam inchaço a 55°C, outros tipos a 85°C. A temperatura de gelatinização também depende do grau de reticulação da amilopectina, e pode ser modificado por manipulação genética de síntese do amido gene. Durante a gelatinização, a água atua como um plastificante, entra fortemente ligada nas regiões amorfas de duplas estruturas helicoidais para

inchar amilopectina, causando assim estruturas cristalinas para derreter e se libertar.

A temperatura de gelatinização depende também da quantidade de grânulos de amido danificados, estes incharão mais rápido. Amido danificado pode ser produzido, por exemplo, durante o processo de moagem de trigo, ou na secagem da planta de amido. A gelatinização aumenta a disponibilidade de amido para a hidrólise de amilase.

Existem vários métodos para medir a gelatinização do amido. Eles são baseados em birrefringência, absorção de corantes, inchaço, solubilidade, entre outros. Entre esses métodos os mais utilizados é a perda birrefringência e susceptibilidade enzimática. Chiang e Johnson (1977), propuseram um método para determinar o conteúdo de amido total de cereais e grau de gelatinização do amido, usando a digestão da enzima glucoamilase em uma reação de cor, com o reagente o-toluidina para determinar a glicose produzida.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é avaliar a metodologia de Chiang e Johnson (1977) para determinação da taxa de gelatinização do amido na digestão da enzima glucoamilase para produzir D-glucose, medido pelo reagente o-toluidina. A importância da taxa de gelatinização do amido para indústria de nutrição animal, entre outras áreas alimentícias, é ampla. Os alimentos extrusados contem uma taxa de gelatinização alta, logo temos melhor expansão dos grânulos, consequentemente melhor aspecto no produto final e melhor digestibilidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Carboidratos

Quando surgiu a palavra “carboidrato”, referia-se aos compostos com fórmula geral $C_n(H_2O)_n$. Obviamente essa fórmula contribuiu para que esse grupo de compostos pudesse ser representado como “hidratos de carbono”. Somente os açúcares simples, ou monossacarídeos, encaixam-se exatamente nessa fórmula. Os outros tipos de carboidratos, oligossacarídeos e polissacarídeos, baseiam-se em unidades de monossacarídeos e apresentam fórmulas gerais suavemente diferentes. A reação que acrescenta unidades de monossacarídeos a uma molécula de carboidrato em desenvolvimento envolve a perda de uma molécula de água (H_2O) para cada nova ligação formada, justificando a diferença na fórmula geral. (CAMPBELL et al., 2008)

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza. Cada ano, a fotossíntese converte toneladas de gás carbônico (CO_2) e água (H_2O) em celulose e outros produtos vegetais. Certos carboidratos (açúcar comum e amido) são à base da dieta na maior parte do mundo e a oxidação dos carboidratos é a principal via metabólica fornecedora de energia na maioria das células não fotossintéticas. Polímeros insolúveis de carboidratos funcionam tanto como elementos estruturais quanto de proteção nas paredes celulares bacterianas e vegetais e nos tecidos conjuntivos de animais. Outros polímeros de carboidratos agem como lubrificantes das articulações esqueléticas e participam do reconhecimento e coesão entre as células. Polímeros mais complexos de carboidratos, ligados covalentemente a proteínas ou lipídios, agem como sinais que determinam a localização intracelular ou o destino metabólico destas moléculas híbridas, denominadas glicoconjugados. (LEHNINGER, 2006)

De acordo com seu tamanho os carboidratos são divididos em três classes principais: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (a palavra “sacarídeo” é derivada do grego *sakcharon* e significa “açúcar”). Os monossacarídeos consistem de uma única unidade de poliidroxialdeído ou

cetona. Os monossacarídeos mais abundantes na natureza é o açúcar com seis átomos de carbono na molécula, a D-glicose, também conhecida como dextrose. Os oligossacarídeos são compostos por cadeias curtas de unidades monossacarídeos, unidos entre si por ligações características, chamadas ligações glicosídicas. Os oligossacarídeos podem ser encontrados de 2 até 10 monossacarídeos unidos, o único oligossacarídeo possível de ser encontrado livre em uma célula são os dissacarídeos, todos os demais oligossacarídeos só serão ou encontrados como cadeia lateral de polissacarídeos. Os dissacarídeos são mais abundantes, formados por duas unidades de monossacarídeos. Um exemplo conhecido desta classe é a sacarose conhecido também por açúcar de cana. Ela é composta de dois monossacarídeos, cada um com seis átomos de carbono, D-glicose e D-frutose. (LEHNINGER, 2006)

Os polissacarídeos são cadeias muito compridas, polímeros de monossacarídeos e podem ter sua estrutura linear ou ramificada. São polímeros que contêm mais de 20 unidades de monossacarídeos e podem ter cadeias contendo centenas ou milhares de unidades monossacarídicas. Se forem constituídos de um único tipo de monossacarídeos, o polissacarídeo será um homopolissacarídeo, se for encontrados no polímero dois ou mais tipos de monossacarídeo, este é chamado de heteropolissacarídeo. Os polissacarídeos geralmente são compostos sem sabor, de alto peso molecular e insolúveis. (CONN et al., 1980)

A maioria dos carboidratos normalmente encontrados são polissacarídeos, incluindo o glicogênio, que é encontrado em animais, e o amido e a celulose, que ocorrem nos vegetais. Os carboidratos desempenham diversos papéis importantes na bioquímica, um dos principais é a fonte de energia. Em seguida, os oligossacarídeos desempenham um papel fundamental nos processos que ocorrem nas superfícies das células, especialmente nas interações célula-célula e no reconhecimento imune. Além disso, os polissacarídeos são componentes estruturais essenciais de várias classes de organismos. A celulose é o principal componente da parede celular das plantas. (CAMPBELL et al., 2008)

O amido encontrado nas células vegetais e o glicogênio nas células animais são polissacarídeos de armazenamento mais importantes. Estes dois

polissacarídeos ocorrem intracelularmente como grandes agregados ou grânulos. As moléculas de amido e glicogênio são altamente hidratadas porque elas têm muitos grupos de hidroxila expostos e capazes de formar pontes de hidrogênio com a água. A maioria das células vegetais tem a capacidade de sintetizar o amido, porém, ele é especialmente abundante nos tubérculos, como as batatas, e nas sementes, como grão de milho. (CAMPBELL et al., 2008)

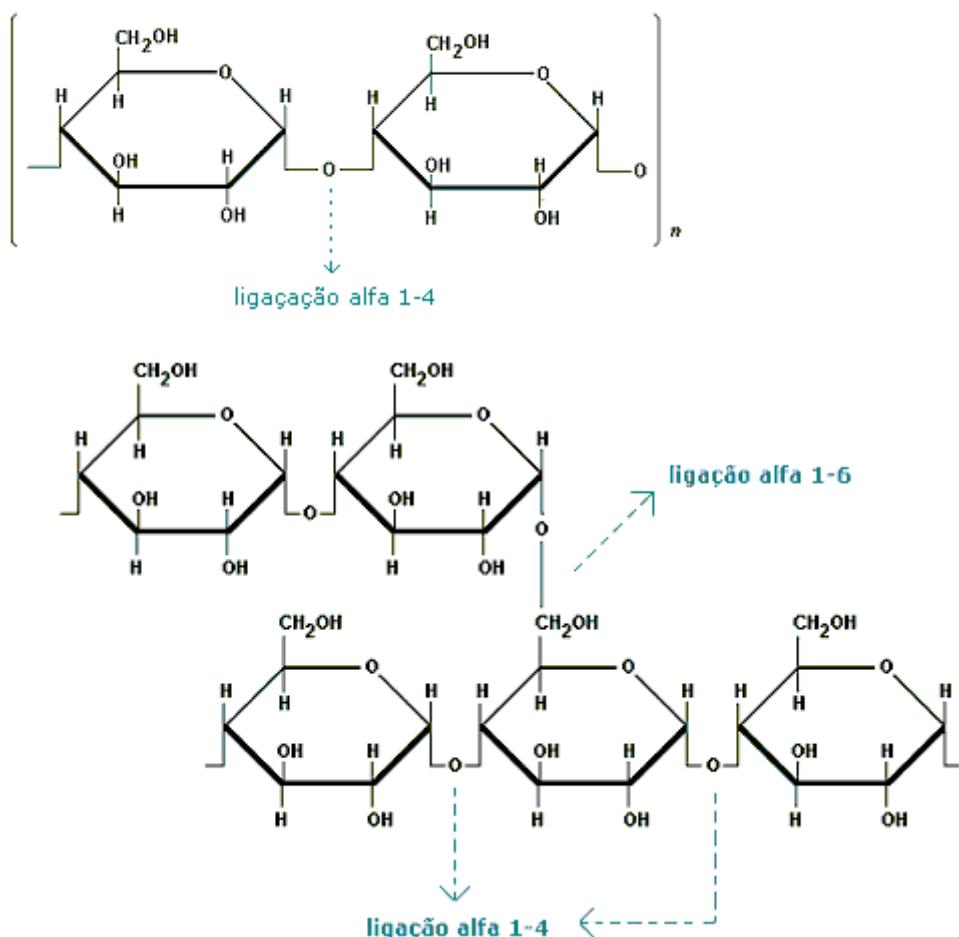
3.2. Amido

O amido é o carboidrato de reserva energética mais importante das plantas, e o principal produto da sua hidrólise, a maltose, constitui uma fonte de carbono para muitos seres vivos. São fontes de amido: milho, arroz, batata, mandioca, feijão, trigo e outras. Os amidos são utilizados na indústria de alimentos com diferentes propósitos, como: nutricional, tecnológico, funcional, sensorial e estético. O amido é constituído por dois tipos de polímeros da glicose, a amilose e a amilopectina (Fig. 1), são formados pela síntese por desidratação (a cada ligação de duas glicoses, há liberação de uma molécula de água) e em proporções que variam com a espécie e o grau de maturação. A maioria dos amidos apresenta de 20 a 25% de amilose, contudo há exceções, como na ervilha onde o amido contém 60% de amilose, além das variedades de milho e outros cereais denominados cerosos, que possuem pouca ou nenhuma amilose.

A amilose, solúvel em água, encontra-se no interior dos grãos de amido e consiste de cadeias longas, não-ramificadas, de unidades de D-glicose unidades por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$). Tais cadeias variam em massa molecular de uns poucos milhares até mais de um milhão. A amilopectina, insolúvel em água, situa-se no invólucro e também tem uma alta massa molecular (até 100 milhões), porém, ao contrário de amilose, é muito ramificada. As ligações glicosídicas encontradas entre unidades sucessivas de glicose nas cadeias da amilopectina são ($\alpha 1 \rightarrow 4$), mas os pontos de ramificação (uma a cada 24 a 30 unidades) são ($\alpha 1 \rightarrow 6$). (LEHNINGER, 2006)

Figura 1. A amilose e amilopectina, os dois polissacarídios do amido.

Amilose: fórmula estrutural



Fonte: Agência Unesp

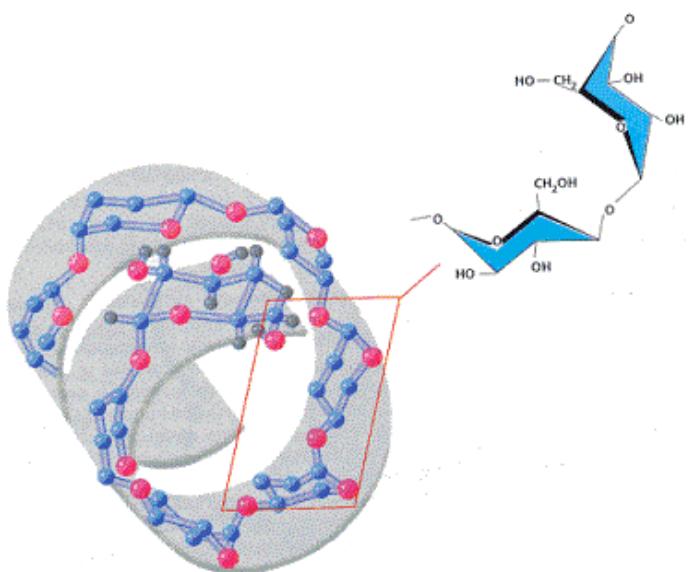
Quando o organismo precisa de energia deve haver um metabolismo para a liberação de glicose de amido, já que os amidos são moléculas de armazenamento. Tanto os vegetais como os animais contêm enzimas que hidrolisam o amido. Duas dessas enzimas, conhecidas como α - e β -amilase atacam ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. A β -amilase é encontrada em plantas, ataca a extremidade não redutora, é uma exoglicosidase, que cliva a partir do final não-redutor do polímero. A maltose é o produto da reação. A outra enzima, a α -amilase, é encontrada no trato digestivo dos animais (saliva e suco

pancreático), é uma endoglicosidase, que hidrolisa a ligação glicosídica em qualquer local na cadeia para produzir glicose e maltose. A amilose pode ser completamente degradada em glicose e maltose pelas duas amilases, mas a amilopectina não é completamente degradada porque as ligações das ramificações não foram atacadas. No entanto, enzimas desramificadoras ocorrem em vegetais e animais; elas degradam as ligações $\alpha(1 \rightarrow 6)$. Quando essas enzimas são combinadas com as amilases, contribuem para a degradação completa das duas formas de amido. (CAMPBELL et al., 2008)

3.3. Estrutura do amido

A estrutura tridimensional mais estável para o amido é a de uma hélice estreitamente espiralada (Fig. 2), estabilizada por pontes de hidrogênio intracadeia. A amilose que não possui ramificações é uma estrutura suficientemente regular para permitir a formação de cristais e consequentemente determinação da estrutura por difração de raios X. Ao longo da cadeia da amilose, cada resíduo forma um ângulo de 60° com resíduo precedente e, assim, a estrutura helicoidal tem seis resíduos por volta. Na amilose, a porção central da hélice tem as dimensões precisas para acomodar o iodo na forma I^{3-} ou I^{5-} (íon iodeto) e esta interação entre ambos é um teste qualitativo para a amilose empregado com frequência. (LEHNINGER, 2006)

Figura 2. A Estrutura do amido (amilose)



Fonte: LEHNINGER, 2006

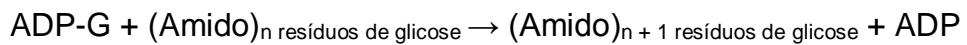
3.4. Síntese do amido

O polímero de glicose utilizado como reserva de energia nos vegetais é o amido. O amido é composto de α -amilose, uma cadeia linear de resíduos de glicose unidos por ligações α -1,4, e de amilopectina, de cadeia principal idêntica à amilose, mas contendo ramificações formadas, por ligações α -1,6. Na amilopectina estas ramificações ocorrem a cada 20 ou 30 resíduos de glicose, enquanto, no glicogênio, a frequência é, em média, de uma ramificação a cada 10 resíduos. A síntese do amido é muito semelhante à do glicogênio, com a substituição da forma ativada da glicose de UDP-glicose ADP-glicose (ADP-G). (MARZZOCO et al., 1999)

As reações que se processam são as seguintes:



A reação é catalisada pela ADP-glicose sintase. ADP-G é substrato de *amido sintase*, a enzima que, efetivamente, catalisa a incorporação de glicose ao polímero:



3.5. Gelatinização do Amido

O grânulo de amido quando entra em contato com a água fria incham ligeiramente de 10 a 20% devido à difusão e absorção de água nas regiões amorfas, grânulos de amido não danificados são praticamente insolúveis em água fria, esse processo é reversível pela secagem. Porém, quando os grânulos de amido são aquecidos em água, eles incham irreversivelmente. Em altas temperaturas, as ligações entre as cadeias de amilose e amilopectina são rompidas e os grãos de amido começam a intumescer e formar soluções consideravelmente viscosas. A temperatura na qual o grânulo de amido sofre estas modificações é denominado ponto de gelatinização ou temperatura de gelatinização (Fig. 3).

Na temperatura de gelatinização onde ocorre perda da organização estrutural (perda da birrefringência), com fusão dos cristais. A gelatinização tem início no hilo e se expande rapidamente para a periferia, ocorrendo inicialmente

nas regiões amorfas devido à fragilidade das ligações de hidrogênio nessas áreas, ao contrário do que ocorre nas regiões cristalinas. À medida que os grânulos continuam se expandindo, ocorre a lixiviação da amilose da fase intergranular para a fase aquosa, resultando no aumento substancial das propriedades reológicas do sistema. O conjunto de mudanças que envolvem a ruptura da estrutura granular, o inchamento, a hidratação e a solubilização das moléculas de amido são definidos como o fim da gelatinização. (THARANATHAN, 2002)

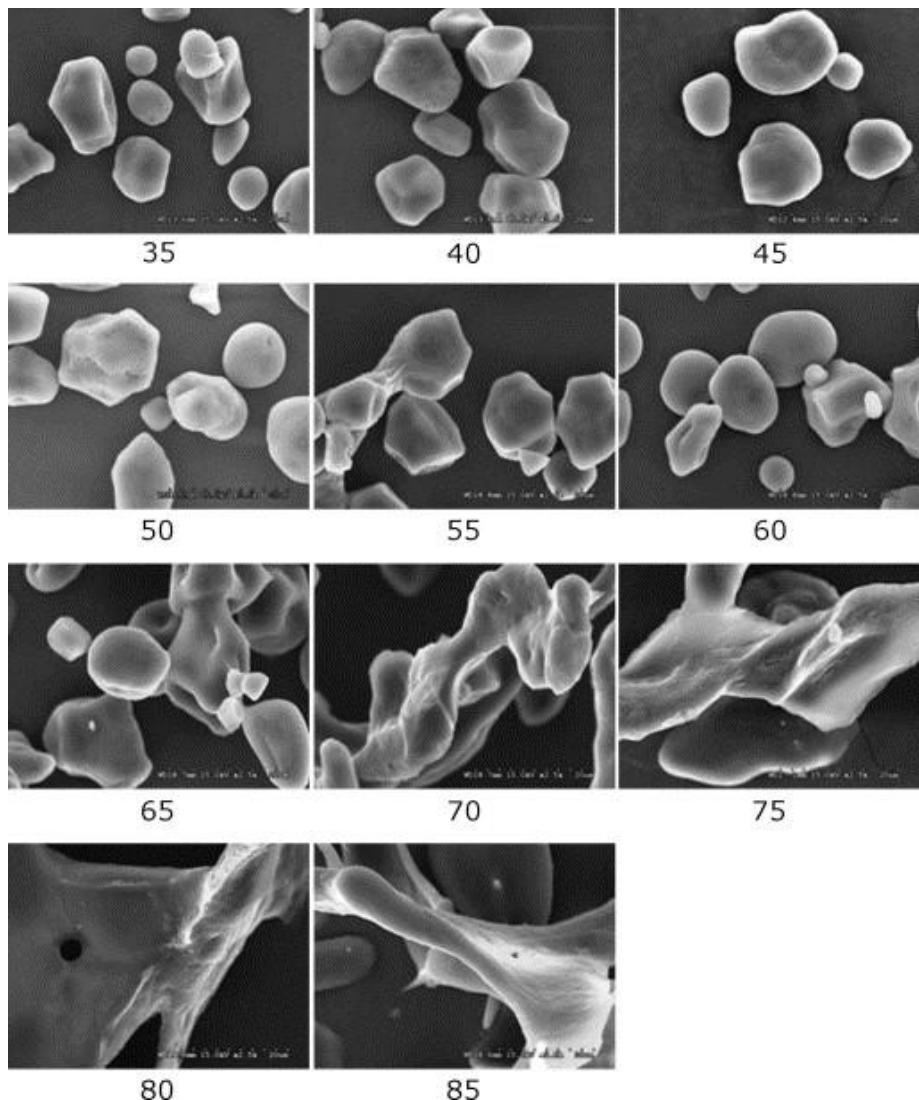
A estrutura cristalina do amido é rompida quando as moléculas de amido são aquecidas em excesso de água, e as moléculas de água formam pontes de hidrogênio entre a amilose e amilopectina, expondo seus grupos hidroxila, o que causa um aumento no inchamento e na solubilidade do grânulo. Esse poder de inchamento e solubilidade varia de acordo com a fonte do amido, fornecendo evidências da interação entre as cadeias de amido dentro dos domínios amorfos e cristalinos. A extensão destas interações é influenciada pela proporção amilose:amilopectina e pelas características dessas moléculas (distribuição e peso molecular, grau e comprimento de ramificações e conformação). A gelatinização geralmente ocorre numa ampla faixa de temperatura característica para cada fonte de amido. Existem muitos fatores que afetam essa temperatura de gelatinização, sendo o principal deles a presença de água. Isso ocorre porque a água atua como agente plastificante nos cristais de amido, além de exercer efeito na condução de energia. (BJORCK et al 1994)

A gelatinização e suas propriedades de inchamento são controladas, em parte, pela estrutura molecular da amilopectina (comprimento de cadeia, extensão de ramificação, peso molecular), composição do amido (proporção de amilose:amilopectina e teor de fósforo) e arquitetura granular (proporção de regiões cristalinas e amorfas). Altas temperaturas de transição são associadas a altos graus de cristalinidade, e fornecem a estabilidade estrutural deixando os grânulos mais resistentes à gelatinização. (SINGH et al., 2003)

Com a gelatinização o amido torna-se mais facilmente acessível à ação das enzimas digestivas, aumentando a suscetibilidade à digestão pelas amilases do trato gastrointestinal. A gelatinização refere-se à formação de uma pasta visco-elástica turbinada ou, em concentrações suficientemente altas, de um

gel elástico opaco. Além disso, os grânulos inchados da pasta também podem ser facilmente quebrados ou desintegrados nos processos de moagem ou agitação intensa. (LOBO et al., 2003)

Figura 3. Temperatura de gelatinização do amido (°C)



Fonte: ROONEY et al. 1986

3.6. Importância da gelatinização do amido na nutrição animal

O amido constitui a principal fonte de energia para os animais monogástricos. O uso de dietas concentradas, com a função de se obter melhorias nas performances produtivas, envolve a formulação de rações com altos teores de amido, em detrimento dos componentes fibrosos, o que leva ao aumento na incidência de distúrbios digestivos, devido o excesso de amido no

intestino, provocando mudanças no padrão de fermentação e desestabilizando a microflora cecal. (REMOIS et al., 1996)

Existem poucos estudos sendo feito com objetivo de avaliar as mudanças de variações das enzimas ao longo do trato digestivo, sendo estas as enzimas as responsáveis pela digestão do amido. Os processamentos tecnológicos podem trazer transformações físicas benéficas nos grânulos de amido e logo, aumentaria sua digestibilidade. (OTUTUMI et al., 2005)

A extrusão de dietas ricas em amido melhora a solubilidade *in vitro* do amido, mas não tem efeito em diminuir as perdas fecais. (MAERTENS et al. 1995) Porém a extrusão acarretou aumento na digestibilidade *in vitro* tanto da proteína quanto do amido. (ALONSO et al. 2000)

Os grãos de cereais utilizados nas rações podem interferir na capacidade de utilização dos nutrientes desses alimentos nos primeiros dias de vida dos animais, o maior potencial de gelatinização do amido presente nos grãos de cereais é uma característica desejável, pois se espera que melhore a digestibilidade dos grãos. (FREITAS et al., 2005)

O tratamento térmico aumenta a digestibilidade dos carboidratos, pois a amilose e a amilopectina estão organizadas inicialmente em grânulos e são expostas a uma maior ação enzimática quando os grânulos são desfeitos pelo calor. Processos que utilizam temperatura e pressão com potencial para a gelatinização do amido aumentam a digestibilidade que resulta em maiores valores de energia metabolizável. Também, melhoram a digestibilidade dos lipídios presentes nos grãos, pelo rompimento das estruturas celulares que os protegem. (FREITAS et al., 2005)

Animais que comem grandes quantidades de amido, embora esses carboidratos contem valor nutricional, não pode ser digerido ou absorvido sem ajuda das enzimas.

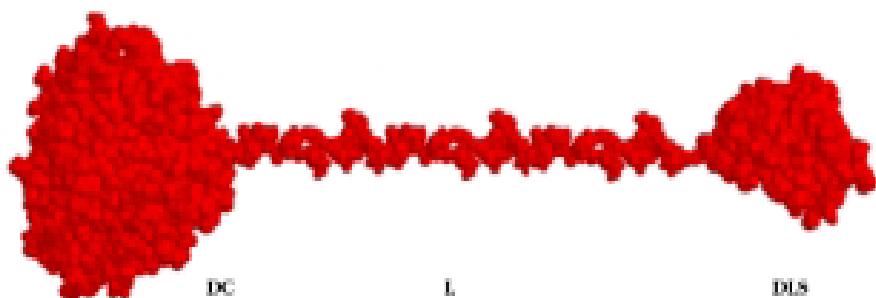
3.7. Quebra enzimática da Glucoamilase

A Glucoamilase (Fig. 4) também conhecida como amiloglucosidase, é uma enzima produzida por vários microrganismos, sendo os fungos mais importantes *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* e *Rhizopus oryzae*.

A Glucoamilase catalisa a decomposição do amido em açúcares, quebrando as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 do amido. No primeiro caso, atuam na extremidade final das cadeias não redutoras do amido e polissacarídeos relacionados liberando β -D-glucose. No segundo caso, atuam nas ramificações mas com apenas 0,2% da velocidade de atuação no segmento linear do amido. Sugere-se, portanto, que a ação da enzima ocorra através de um mecanismo multisseriado degradando aleatoriamente toda a molécula do substrato. (LEMOS et al., 2003)

A glucoamilase na sua forma nativa apresenta-se na forma de alteres, no qual dois domínios volumosos, o domínio catalítico (DC) e o domínio de ligação ao amido/substrato (DLS), estão ligados por um filamento fino (Linker) como mostra na figura 4. (LEMOS et al., 2003)

Figura 4. Imagem da estrutura estendida da glucoamilase de *Aspergillus awamori*.



Domínio catalítico (DC); Domínio de ligação ao amido/substrato (DLS); Linker (L).

Fonte: LEMOS, 2003.

A glucoamilase é conhecida como o tipo de enzima que pode facilmente quebrar amido em glicose, o que mais tarde se torna utilizável e absorvível. Assim, problemas de estômago são reduzidos, bem como outros problemas digestivos como: inchaço, fezes moles, peso, letargia.

3.8. Métodos para medir a gelatinização do amido

Os métodos para medir a gelatinização do amido são vários. Eles são baseados em perda birrefringência, a absorção de corantes, inchaço, solubilidade, viscosidade, clareza colar, os padrões de raios-X, difração, prótons por ressonância magnética, calometria diferencial exploração, e

susceptibilidade enzimática. Entre os métodos, perda de birrefringência e susceptibilidade enzimática são mais sensíveis e mais amplamente utilizado. Geralmente, a perda de birrefringência é bom para determinar a gelatinização do amido, mas a determinação quantitativa de gelatinização do amido com base em birrefringência é trabalhoso e sujeito a erros de amostragem. (CHIANG et al. 1977)

O método de birrefringência mesmo nas mãos de um experiente em microscopia, este método está sujeito a uma grande quantidade de variabilidade. O método de susceptibilidade enzimática relata que o amido gelatinizado é rapidamente hidrolisado por enzimas. Assim, o grau de gelatinização é diretamente relacionado com a quantidade de açúcar produzido quando a amostra é incubadas com glucoamilase para um determinado período de tempo em condições prescritas. A enzima comercial dá mais reproduzibilidade em testes de rotina de susceptibilidade enzimática. Alterações na viscosidade do amido pode também ser usado como a base para um método de rotina para medir gelatinização em alimentos. (ROONEY et al. 1986)

Chiang e Johnson (1977), propuseram um método para determinar o grau de gelatinização do amido usando a digestão glucoamilase com uma reação de cor para determinar a glicose produzida. O reagente O-toluidina reage seletivamente com a glicose em solução de ácido acético e produz uma cor estável, que segue a lei de Lambert-Beer em uma ampla faixa de concentrações. Suas vantagens são a simplicidade básica, especificidade relativa, e economia.

3.9. Princípio da metodologia de Chiang e Johnson

Um método para determinar a cor foi medido com um amido gelatinizado usando um espectrofotômetro a 630 nm. Baseia-se no princípio que o amido intacto na amostra são digeridos pela enzima glucoamilase para formar glicose. A partir destes, a glicose reage com o-toluidina para dar a leitura, que resultará em um cromógeno verde em ácido acético glacial. A taxa de gelatinização pode ser calculada. O método enzimático desenvolvido por Chiang et al. 1977, foram comparados com o método polarímetro (Tab. 1) e contém vantagem de rapidez e precisão.

Tabela 1. Comparação do Método Polarímetro e Método Enzimático para medição do amido

| Amostras | Método Polarímetro (%) | Método Enzimático (%) |
|--------------------------|------------------------|-----------------------|
| Amido de trigo | 96.3 | 94.2 |
| Farinha de sorgo | 86.5 | 84.2 |
| Farinha de mandioca | 78.5 | 76.4 |
| Farinha de cevada | 66.0 | 66.5 |
| Farinha de arroz | 85.2 | 82.2 |
| Milho | 81.4 | 80.8 |
| Farinha de trigo (suave) | 80.6 | 78.3 |
| Farinha de trigo (suave) | 81.2 | 80.4 |
| Farinha de trigo (dura) | 77.8 | 75.7 |
| Farinha de Trigo (dura) | 78.4 | 76.8 |

Fonte: CHIANG et al. 1977

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Foram utilizadas amostras de rações extrusadas, fornecidas pela Empresa Eialis Nutrição Animal Ltda, assim como as análises foram realizadas no laboratório IN VIVO LABS unidade de negócios do grupo Eialis, ambos localizados na cidade de Descalvado, estado de São Paulo.

Como reagentes, foram utilizados orto-toluidina, ácido acético, ácido tricloroacético, acetato de sódio $3\text{H}_2\text{O}$, tiuréia todos da marca Qhemis ou Vetec (Tab. 2).

Os equipamentos utilizados foram um Banho-maria sem agitação a 100°C para a gelatinização e reação do reagente o-toluidina, e um Banho-maria do tipo Dubnoff a 50°C para ação enzimática. Para a medição da glicose, foram utilizados o aparelho espectrofotômetro a 630 nm, fabricado pela empresa FEMTO Indústria e Comércio de Instrumentos.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos reagentes

| Reagentes | Densidade | Ponto de Fusão | Ponto de Ebulação |
|------------------|--|----------------|-------------------|
| O-toluidina | 1.00 g/cm ³ | -23 °C | 199–200 °C |
| Acido Acético | 1.049 g/cm ³ (l) 1.266 g/cm ³ (s) | 16.5 °C | 118.1°C |
| Acetato de Sódio | 1.52 g.cm ⁻³ | 324 °C | >400 °C |
| Tricloroacético | 1,63 g/cm ³ | 57°C | 196°C |
| Tiuréia | 1,405 g/mL | 182º C | Decompõe-se |

Fonte: Vetec Química Fina Ltda

4.2. Métodos

Um dos métodos para realização da taxa de gelatinização do amido é o método enzimático. Baseia-se no princípio de que o amido é facilmente digerido pela enzima glucoamilase para formar glicose, reagindo com o

reagente o-toluidina e com ácido acético glacial, onde o orto-toluidina reage seletivamente com a glicose, obtendo uma coloração verde, a qual pode ser medida no espectrofotômetro em absorbância 630 nm. (CHIANG et al. 1977)

A gelatinização pode ser calculada:

$$\% \text{ TG} = \frac{\text{Peso } An+ \times \text{Abs } An-}{\text{Peso } An- \times \text{Abs } An+} \times 100$$

Onde:

An+: Amostras cozidas.

An-: Amostras cruas.

TG: Taxa de Gelatinização.

4.1.1. Preparo das amostras

As amostras foram devidamente homogeneizadas, e trituradas em moinho de facas, utilizando uma peneira de abertura de 0,5mm. Após a moagem das amostras foram pesados em duplicata e em balança de precisão (resolução 0,0001g) 1 g das amostras de aveia e ração controle e 0,2500 g de arroz cru e arroz cozido em balões volumétricos de 100 mL. A tabela 3 mostra as massas das amostras em gramas.

Tabela 3. Peso das amostras (g)

| Amostras | Peso (g) <i>An+</i> | Peso (g) <i>An-</i> |
|------------------|---------------------|---------------------|
| Arroz Cozido | 0,2553 | 0,2510 |
| Arroz Cru | 0,2508 | 0,2526 |
| Aveia | 1,0030 | 1,0024 |
| Ração Controle 1 | 1,0057 | 1,0061 |
| Ração Controle 2 | 1,0089 | 1,0093 |
| Ração Controle 3 | 1,0020 | 1,0004 |
| Ração Controle 4 | 1,0066 | 1,0002 |

4.1.2. Método para digestão da Glucoamilase

Após pesadas, todas as amostras foram diluídas com solução tampão acetato de sódio 0,05%, pH 4,6. As amostras *An+* foram colocadas em Banho-maria a 95-100°C (Fig.5) e as amostras *An-* foram mantidas em temperatura ambiente.

Figura 5. Banho-maria 95-100º com amostras *An+*.



Posteriormente as amostras *An+* e *An-* foram colocadas em Banho-maria com agitação e a temperatura de 50°C, após a estabilização da temperatura adicionou-se a enzima glucoamilase em cada balão, e as amostras permaneceram em Banho-maria por 1 hora. Ainda com os balões no Banho-maria, adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) a 25%, para inativar enzimas e precipitar proteínas. Os balões foram avolumados com água e homogeneizados. Deixou-se decantar por aproximadamente 10 minutos. (Fig. 6).

Figura 6. Balões *An+* e *An-*



4.1.3. Método de dosagem de glicose por O-toluidina

Em um balão de 50 mL foram adicionados 20 mL de solução de orto-toluidina e 2 mL do líquido em processo de decantação (Fig.7). Em seguida os balões foram colocados em Banho-maria 95-100°C por 15 minutos e resfriado rapidamente em banho com água e gelo, e obtiveram uma coloração verde escura (Fig. 8). Os volumes foram completados e as amostras colocadas em cubetas para leitura no espectrofotômetro em absorbância a 630 nm.

Figura 7. Balões com reagente O-toluidina e o líquido decantado antes da ebulação
95- 100°C.



Figura 8. Balões com reagente O-toluidina e o líquido decantado depois da ebulação
95-100°C



5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A taxa de gelatinização (TG) determinada pelo método Chiang e Johnson, correspondem à expectativa esperada para esse tipo de experimento como mostrado na tabela 4.

Tabela 4. Leitura em absorbância a 630nm

| Amostras | Leitura An+ | Leitura An- | TG % |
|----------------|-------------|-------------|------|
| Arroz Cozido | 1,036 | 0,907 | 87% |
| Arroz Cru | 0,902 | 0,247 | 27% |
| Aveia | 0,892 | 0,276 | 30% |
| Ração Controle | 1,149 | 0,924 | 80% |
| Ração Controle | 1,143 | 0,928 | 81% |
| Ração Controle | 1,114 | 0,889 | 79% |
| Ração Controle | 1,081 | 0,857 | 79% |

A taxa de gelatinização (TG) que obtivemos foram de 87% para o arroz cozido, o mesmo antes passou por um processo de cozimento do amido e já foi gelatinizado antes, logo teríamos uma taxa de gelatinização (TG) alta em comparação à quantidade de amido encontrada no arroz. Já o arroz cru e a aveia não passaram por nenhum processo de cozimento antes, o amido não foi gelatinizado, logo teríamos uma taxa de gelatinização (TG) baixa de 27% e 30% respectivamente.

De acordo com os resultados da amostra controle (ração para cão), obtivemos os resultados, variando de 79% a 81%, com uma média de 79,75%.

Para o fabricante de rações, deve-se apresentar um valor de porcentagem alto, pois um produto corretamente processado pelo calor, a digestibilidade e de seus nutrientes é melhorada, principalmente a da energia. O alto teor de gelatinização tem melhor expansão dos grânulos e logo o produto final terá melhor aspecto e melhor digestibilidade. Processos que utilizam temperatura e pressão com potencial para a gelatinização do amido aumentam a digestibilidade que resulta em maiores valores de energia metabolizável.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a extrusão, processo que utilizam temperatura e pressão com alto potencial é necessário para tal aumento de gelatinização do amido, melhora a digestibilidade em animais e, assim, o alto teor de gelatinização tem melhor expansão dos grânulos, logo, o produto final terá melhor aspecto e melhor digestibilidade, como esperado e sem dúvidas, em maiores valores de energia metabolizável e a colocação de um produto melhor no mercado comercial.

Portanto, com a realização deste trabalho, conclui-se que a metodologia descrita por Chiang e Johnson (1977) se revela adequada para as quantificações de gelatinização do amido.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, R.; AGUIRRE, A.; MARZO, F. **Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans.** Food Chemistry, v.68, p.159-165, 2000.
- BJORCK, I; GRANFELDT Y.; LILJEBERG H.; TOVAR J.; ASP N. G.; et al. **Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates.** American Journal of Clinical Nutrition, v. 59, p.699-705, 1994.
- CAMBELL K. M.; SHAWN O. FARRELL; **Bioquímica Metabólica:** carboidratos. v.3 p. 536-565.
- CONN E. E.; STUMPF K. P.; **Introdução à Bioquímica**, 1980, 4^a ed. São Paulo: Blucher, p. 41-42.
- DENARDIN C. C.; SILVA P. L.; **Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas.** Ciência Rural, Santa Maria, 2009, v.39 nº 3, p. 945-954.
- FREITAS E. R.; SAKOMURA N.K.; NEME R.; BARBOSA N. A. A.; **Valor nutricional do milho termicamente processado, usado na ração pré-inicial para frangos de corte.** Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, 2005, v. 57 nº 4.
- LOBO R. L.; SILVA L. M. G.; **Amido resistente e suas propriedades físico-químicas**, Revista Nutrição. v. 16 nº 2, 2003, p. 1-10.
- MAERTENS, L.; LUZI, E. **The effect of extrusion in diets with different starch levels on the performance and digestibility of young rabbits.** In: simposium on housing and diseases of rabbits, furbearing animals and pet animals, 1995, p.131-138.
- LEMOS C.; FUCHS E.; GOMES E.; SILVA R.; **Glucoamilase estrutura e termoestabilização.** Revista Biotecnologia Ciência e desenvolvimento. ed. 31, 2003.
- MARZZOCO A.; TORRES B. B.; **Bioquímica Básica:** Metabolismo de carboidratos, amido, sacarose e lactose. Segunda Edição, p. 169.

- NELSON D. L.; COX, LEHNINGER M. M. **Princípios de Bioquímica. Carboidratos e Glicobiologia.** Quarta Edição, 2006, p. 245-252.
- OTUTUMI K. L.; FRULAN C. A.; SCAPINELLO C., MARTINS N. E.; PERALTA M. R.; SOUZA D. L.; SATOLIM R. L. M.; **Digestibilidade e atividade enzimática intestinal de coelhos em crescimento.** Alimentos com diferentes fontes de amido processados ou não por extrusão, Revista Brasileira e Zootecnia, v. 34 nº 2, 2005, p. 557-577.
- REMOIS, G.; LAFARGUE-HAURET, P.; ROUILLERE, H. **Effect of amylases supplementation in rabbit feed on growth performance.** Proceedings, Toulouse, v.1, 1996. p.289-292.
- ROONEY L. W.; PFLUGFELDER R. L; **Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn,** Journal of animal science, 1986, p.1607-1623.
- SINGH, N.; SINGH A.; KAUR L.; SODHI N. S.; GILL B. S. **Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources.** Food Chemistry, 2003, v. 81, p. 219-231.
- THARANATHAN, R.N. **Food-derived carbohydrates structural complexity and functional diversity.** Critical Reviews in Biotechnology, v.22, p.65-84, 2002.