

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE FRUTOSE A PARTIR DE HIDROLISADO
ENZIMÁTICO DE AMIDO DE MANDIOCA**

VANESSA CASSONI CERQUEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU-SP
Julho – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO DE FRUTOSE A PARTIR DE HIDROLISADO
ENZIMÁTICO DE AMIDO DE MANDIOCA**

VANESSA CASSONI CERQUEIRA

Orientador: Prof.Dr. Cláudio Cabello

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU-SP
Julho – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO -
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C416p Cerqueira, Vanessa Cassoni, 1980-
Produção de frutose a partir de hidrolisado enzimático de amido de
mandioca / Vanessa Cassoni. - Botucatu : [s.n.], 2012
viii, 76 f. : il. color., gráfs. color., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2012
Orientador: Cláudio Cabello
Inclui bibliografia

1. Amido. 2. Carbono ativado. 3. Diatomito. 4. Glicose. 5. Isomerização. I.
Cabello, Cláudio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "PRODUÇÃO DE FRUTOSE A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO
DE AMIDO DE MANDIOCA"

ALUNA: VANESSA CASSONI

ORIENTADOR: PROF. DR. CLÁUDIO CABELLO

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. CLÁUDIO CABELLO



PROF. DR. FERNANDO BROETTO



PROFA. DRA. MAGALI LEONEL



PROFA. DRA. ANA PAULA CERINO COUTINHO



PROFA. DRA. MARIANA SCHMIDT RECHSTEINER

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que, de alguma forma, colaboram com a realização deste trabalho, e em especial:

- À Deus;
- À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado;
- Aos funcionários do Centro de Raízes e Amidos Tropicais – Cerat / Unesp,
- Ao Prof. Dr. Cláudio Cabello pela orientação desta pesquisa;
- À Profa Dra Magali Leonel pelos ensinamentos e pela amizade;
- Ao Prof. Dr. Fernando Broetto pelos ensinamentos e amizade;
- À Profa. Dra. Marta Mischan pela realização das análises estatísticas;
- Aos funcionários da biblioteca da FCA - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu , que sempre me atenderam com muito carinho e respeito, minha total admiração;
- Às funcionárias da Pós Graduação. Muito obrigada pela constante eficiência, gentileza e amizade;
- À minha irmã Natália e minha mãe, minhas cúmplices, minhas melhores amigas, obrigada;
- Ao meu Pai Vagner e Estela, pelo carinho, amizade e total confiança em minhas decisões.
- Ao meu marido Fábio Eduardo pelo companheirismo em tempo integral;
- Aos meus amigos e amigas Juliana, Viviane, Priscila Suman, Priscila Cardim, Tathiana, Isabela, Ileana, Sérgio, Maíra, Vanessa, Kelly, Luana, meus sinceros agradecimentos, vocês com toda certeza colaboraram de muitas formas para a realização deste trabalho;

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO.....	01
SUMMARY.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07
2.1 Edulcorantes.....	07
2.1.1 Produção de edulcorantes.....	10
2.1.2 Xarope de frutose.....	11
2.1.2.1 Vantagens e desvantagens do xarope de frutose de milho.....	13
2.2 Mandioca como Matéria Prima para obtenção de açúcar.....	15
2.2.1 Amido.....	18
2.2.1.1 Constituintes menores do amido.....	21
2.2.1.2 Utilização do amido.....	22
2.2.1.3 Hidrólise do amido.....	24
2.2.1.3.1 Enzimas responsáveis pela hidrólise.....	25
2.3 Purificação do hidrolisado.....	30
2.4 Isomerização.....	33
2.4.1 Glicose isomerase.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Matéria prima.....	36
3.1.1 Caracterização da matéria prima.....	36
3.1.1.1 Umidade.....	37
3.1.1.2 Cinzas.....	37
3.1.1.3 Proteína.....	38
3.1.1.4 Matéria graxa.....	39

3.1.1.5 Fibras.....	39
3.1.1.6 pH.....	40
3.1.1.7 Açúcares totais.....	40
3.1.1.8 Amido – Método enzimático.....	41
3.1.1.9 Teor de Amilose.....	42
3.2 Enzimas.....	42
3.3 Produção do hidrolisado.....	42
3.3.1 Etapa de hidrólise e dextrinização.....	44
3.3.2 Etapa de sacarificação.....	44
3.3.3 Análises do hidrolisado.....	46
3.3.3.1 Teor de glicose.....	46
3.3.3.2 Dextrose equivalente.....	47
3.3.3.3 Rendimento da hidrólise.....	47
3.4 Purificação do hidrolisado.....	48
3.5 Isomerização.....	51
3.5.1 Cálculo do xarope de frutose.....	54
3.6 Análise estatística.....	54
3.6.1 Processo de purificação do hidrolisado.....	54
3.6.2 Processo de isomerização.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1 Caracterização da matéria prima.....	58
4.2 Hidrólise.....	59
4.3 Purificação do hidrolisado.....	60
4.4 Resultados do processo de isomerização.....	62
5. CONCLUSÃO.....	69
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Classificação dos produtos à base de frutose.....	08
Tabela 2. Doçura relativa das soluções de açúcar (5%) e outros adoçantes. A doçura é medida em relação a sacarose como o açúcar de referência, com um índice de doçura de 1,0.....	11
Tabela 3. Valores nutricionais calculados por 100g de xarope de milho com alta concentração de frutose HFCS. As porcentagens estão relacionadas às recomendações para adultos nos EUA. Dados obtidos no banco de nutrientes (USDA).....	14
Tabela 4. Tipos de enzimas envolvidas no processo de hidrólise do amido.....	25
Tabela 5. Recomendações de utilização da enzima glicose isomerase imobilizada Gensweet GII Max segundo o fabricante.....	35
Tabela 6. Cálculo do tempo de residência.....	54
Tabela 7. Variáveis independentes e dependentes utilizadas no planejamento experimental.....	56
Tabela 8. Níveis de variáveis no planejamento experimental de isomerização.....	56
Tabela 9. Planejamento experimental completo com pontos centrais e axiais.....	57
Tabela 10. Caracterização físico-química de mandioca.....	58
Tabela 11. Valores médios das análises do hidrolisado.....	59
Tabela 12. Valores médios das estimativas do parâmetro (l) conforme a combinação temperatura x concentração.....	61
Tabela 13. Análise de variância da regressão linear para o tratamento 1 do ensaio de purificação do hidrolisado.....	61
Tabela 14. Análise de variância para o tratamento 2 do ensaio de purificação do hidrolisado.....	62
Tabela 15. Resultados dos ensaios da concentração de glicose após tratamentos em reator enzimático de conversão a frutose.....	63
Tabela 16. Resultados das análises de porcentagens de conversão, utilizando a enzima	

glicose isomerase.....	64
Tabela 17. Resultados dos ensaios das análises de glicose obtidas após o processo de isomerização em reator enzimático.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tendência de consumo de edulcorante nos EUA.....	08
Figura 2. Produção Agrícola Municipal de 2009.....	17
Figura 3. Produção mundial de mandioca.....	18
Figura 4. Fórmulas estruturais do amido, amilose e amilopectina.	20
Figura 5. Modelo de ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.....	28
Figura 6. Fluxograma do processo de isomerização.....	34
Figura 7. Foto do reator utilizado para o processo de hidrólise.....	43
Figura 8. Filtro à vácuo.....	45
Figura 9. Fluxograma hidrólise do amido.....	46
Figura 10. Fluxograma do processo de purificação do hidrolisado.....	50
Figura 11. Esquema do processo de isomerização.....	52
Figura 12. Foto da coluna utilizada no processo de isomerização.....	53
Figura 13. Gráfico do comportamento da concentração de glicose em relação ao tempo de residência.....	66

RESUMO

Os produtos das hidrólises de amido são glicose, maltose e uma série de oligossacarídeos e polissacarídeos que encontram utilização principalmente na indústria de alimentos. Neste grupo enquadram-se os adoçantes que aditam sabores a produtos que são demandados por consumidores específicos. Atualmente o açúcar mais utilizado no Brasil é a sacarose, produto extraído da cana-de-açúcar, e o mais utilizado mundialmente é a frutose obtida a partir da hidrólise do milho e posterior isomerização da glicose para frutose. A frutose apresenta capacidade edulcorante 30% maior que a sacarose, 2,5 vezes maior que a glicose e 2 vezes mais solúvel que a glicose, com isso, pode ser utilizada em menor quantidade, diminuindo o poder calórico do alimento e viabilizando sua utilização no tratamento da obesidade. Levando em consideração a importância dos adoçantes para o mercado de alimentos, o presente trabalho teve como objetivo realizar estudos sobre o processo de obtenção da frutose a partir de amido de mandioca. Para a execução dos ensaios utilizou-se fontes comerciais de α -amilase e amiloglicosidase, Liquozyme Supra 2.2X e Saczyme 750 AGUg-1, respectivamente, aplicadas em substrato de amido de mandioca em reator agitado com temperatura controlada. Após o processo de hidrólise enzimática, o hidrolisado passou por um processo de purificação utilizando terra diatomácea e carvão ativado em quatro temperaturas (30, 40, 50 e 60°C), com a finalidade de remoção de contaminantes originários da matéria prima, que levam a odor, cor e sabores indesejáveis. Após o tratamento com carvão ativo e terra diatomácea foram realizados ensaios para estabelecer os melhores parâmetros para a realização do processo de isomerização, buscando a conversão de parte da glicose à frutose, utilizando a enzima isomerase. O processo selecionado para os estudos foi em sistema

contínuo onde o xarope de glicose, previamente purificado, foi continuamente bombeado para um reator enzimático de leito fixo em coluna de vidro contendo jaqueta de circulação de água aquecida a 60°C fornecida por um banho termostatizado. Foram desenvolvidos ensaios com 6 diferentes tempos de residência no reator e 3 diferentes concentrações mássicas de xarope de glicose, num total de 18 ensaios, mantendo fixa a temperatura na coluna. O resultado médio obtido de 89,39% de rendimento da hidrólise caracterizou um bom processo de sacarificação. As melhores combinações obtidas nos ensaios de purificação foram temperatura de 50°C e concentração de 5g, ou temperatura de 40°C e concentração de 10g. A atividade enzimática da glicose - isomerase foi determinada através da quantificação da glicose convertida durante a reação enzimática. No tempo de residência 80 e concentração de 30% de glicose inicial, o valor de frutose obtido foi de 42,9% e 57% de glicose. Esta categoria tem uma ligeira doçura e não mascara o sabor natural dos alimentos. Assim, é amplamente utilizada em frutas em conserva, molhos, sopas, condimentos, produtos de panificação, e muitos outros alimentos processados. Também é muito usado pelas indústrias de laticínios como iogurte, gemada, leites aromatizados, sorvetes e outras sobremesas congeladas. O tempo de residência 80, aliado a concentração inicial de amido de 24%, foi considerado o melhor resultado para o processo de isomerização.

Palavras-chaves: amido, glicose, terra diatomácea, carvão ativado, isomerização.

PRODUCTION OF FRUCTOSE FROM ENZYMATIC HYDROLYZED OF CASSAVA STARCH. Botucatu, 2012. 76p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Energy in Agriculture) – School of Agronomical Sciences, São Paulo State University.

Author: VANESSA CASSONI

Advisor: CLAUDIO CABELLO

ABSTRACT

The products of starch hydrolyses are glucose, maltose and a series of oligosaccharides and polysaccharides which have their main utilization in food industry. This group comprises sweeteners that add flavor to products demanded by specific consumers. Currently the most used sugar in Brazil is sucrose, a product extracted from sugarcane, while the most used sugar worldwide is fructose obtained from maize hydrolysis and subsequent glucose isomerization to fructose. The sweetening capacity of fructose is 30% higher than that of sucrose and 2.5-fold higher than that of glucose; in addition, fructose is 2-fold more soluble than glucose and thus can be used in smaller quantities, decreasing the food's caloric potential and making its use viable in obesity treatment. Considering the importance of sweeteners for the food market, the present study aimed to investigate the process of fructose production from cassava starch. The assays were performed by using commercial sources of α -amylase and amyloglucosidase, Liquozyme Supra 2.2X and Saczyme 750 AGUg-1, respectively, applied to cassava starch substrate in an agitated reactor at controlled temperature. Following the process of enzymatic hydrolysis, the hydrolysate underwent a purification process using diatomaceous earth and activated charcoal at four temperatures (30, 40, 50 and 60°C), in order to remove contaminants originated from the raw material, which lead to undesirable smell, color and flavor. After the treatment with activated charcoal and diatomaceous earth, assays were carried out to establish the best parameters for the isomerization process, aiming at the conversion of part of glucose into fructose, using the enzyme isomerase. The process selected for the studies was in a continuous system where the glucose syrup, previously purified, was continuously pumped into a fixed-bed enzyme reactor in glass column containing jacket for the circulation of water heated at 60°C and supplied by a thermostatic bath. Assays were developed with 3 different residence times in the reactor and 3 different mass concentrations of glucose syrup, in a total

of 9 assays, maintaining the same temperature in the column. The mean result of 89.39% hydrolysis yield characterized a good saccharification process. The best combinations obtained in the purification assays were temperature of 50°C and concentration of 5g, or temperature of 40°C and concentration of 10g. The enzymatic activity of glucose - isomerase was determined by quantifying the glucose converted during the enzymatic reaction. For residence time 80 and concentration of 30% initial glucose, the obtained value of fructose was 42.9% and 57% glucose. This category has slight sweetness and does not mask the natural flavor of foods. Thus, it is widely used in canned fruits, sauces, soups, spice, bakery products, and a large number of other processed foods. It is also largely used by dairy industries in products such as yogurt, eggnog, flavored milk, ice-cream and other frozen desserts. The residence time 80, associated with the initial starch concentration of 24%, was considered the best result for the isomerization process.

Keywords: starch, glucose, diatomaceous earth, activated charcoal, isomerization.

1. INTRODUÇÃO

Com o passar dos anos foi surgindo a necessidade de se obter pesquisas destinadas à obtenção de edulcorantes para serem utilizados em substituição à sacarose. A utilização de edulcorantes oriundos de processos enzimáticos do amido de mandioca é pouco utilizada no Brasil, o qual utiliza geralmente produtos originados da cana de açúcar. Enquanto nos EUA, por exemplo, bebidas refrigerantes são adoçadas com hidrolisados de amido de milho.

Inicialmente as indústrias de xarope de frutose obtiveram rápido crescimento devido ao alto poder edulcorante apresentado pela frutose. Com o passar do tempo foram observadas algumas vantagens funcionais em relação à sacarose. Estas incluem barateamento relativo de produção, maior doçura, melhor solubilidade e capacidade de permanecer em solução sem cristalizar como acontece com a sacarose sob certas condições. E por ser apresentado na forma líquida, torna-se mais fácil de ser transportado e utilizado em refrigerantes, por exemplo. Além disso, o uso da frutose na alimentação humana, em comparação à glicose e sacarose, resulta em efeito glicêmico reduzido, podendo ser usada como adoçante em dietas de pacientes com hipoglicemia.

Nas indústrias, os amidos tem sido utilizados como ingredientes para melhorar as propriedades funcionais dos alimentos. Com isso, as modificações enzimáticas tem contribuído para melhorar as características funcionais dos amidos aumentando a sua faixa de aplicação. Os produtos das hidrólises de amido de mandioca são glicose, maltose e uma série de oligossacarídeos e polissacarídeos que encontram utilização em alimentos.

O hidrolisado de fécula de mandioca tem as mesmas propriedades dos hidrolisados de milho, com a vantagem competitiva de serem elaborados por processo mais simples e com menor investimento, em razão dos amidos apresentarem menor temperatura de gelificação e menores teores de proteínas e lipídios, caracterizando a mandioca como uma matéria-prima potencial para a produção de xaropes de frutose.

Os objetivos deste trabalho foram: desenvolver um hidrolisado de amido de mandioca com alta concentração de glicose, estudar o processo de purificação do xarope de glicose através de adsorventes como carvão ativo e terra diatomácea com a finalidade de definir alguns parâmetros como tempo de reação e concentração de cada adsorvente. Avaliar e definir os melhores parâmetros necessários para a atividade da enzima glicose oxidase no processo de conversão de glicose à frutose, estudando o melhor tempo de residência em relação a concentração de glicose inicial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Edulcorantes

Com o passar dos séculos e o desenvolvimento da tecnologia na área de alimentos, o açúcar (sacarose), obtido da beterraba ou da cana-de-açúcar, perdeu sistematicamente a sua participação no mercado para outros adoçantes derivados do amido de milho e fontes glicosídicas.

Os anos 70 e 80 foram marcados por um movimento de substituição da sacarose pelos edulcorantes extraídos do milho (isoglicose, frutose e glicose). Nessa nova fase de descoberta, a diminuição dos preços e a consistência líquida encontrada nesse tipo de edulcorante proporcionaram vantagens a esse tipo de matéria prima.

A produção mundial do edulcorante oriundo da hidrólise do amido de milho aumentou em 374% de 1975 a 1985, passando de 3,26 a 13,2 milhões de toneladas, respectivamente; destas, 7 milhões foram produzidas pelos EUA e 1,9 milhão, pela CEE (SOLAGRAL, 1988).

Observando a distribuição do consumo dos edulcorantes, no ano de 1988, nos países economicamente mais desenvolvidos, onde se consome a quase totalidade dos edulcorantes concorrentes do açúcar, verifica-se que é nos EUA que a substituição da sacarose deu-se com maior intensidade (45,6% para os edulcorantes de milho), ultrapassando a porção de mercado do açúcar (40,9%).

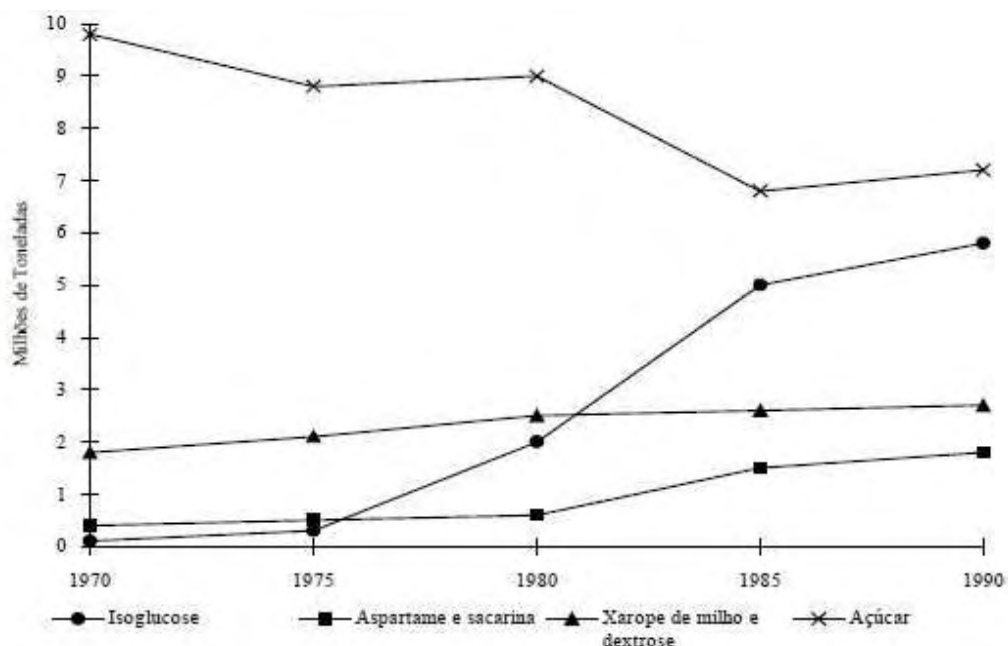


Figura 1. Tendência de consumo de edulcorante nos EUA. Fonte: Pelaez, (1993)

O consumo de açúcar, de um pico de 9,9 milhões de toneladas em 1973, caiu rapidamente para cerca de 6,7 milhões de toneladas em 1986, quando então volta a crescer ligeiramente (TIPTON e TIPTON, 1991). É assim que a taxa de crescimento do consumo anual de isoglicose passa de 40%, no período 1975-79, a 21%, em 1980-84, e a 3%, de 1985 a 1989 (FIRS 1993). Esta tendência de desaceleração da substituição do açúcar pelos edulcorantes originados do milho é considerada como um sintoma de saturação do mercado destes últimos (PELAEZ, 1995).

As quatro culturas que mais se destacam como parte da alimentação dos americanos são: milho, arroz, soja e trigo, dentre as quatro, a cultura predominante é o milho. O milho passou por várias modificações genéticas e, com isso, conseguiu aumentar o rendimento e a produtividade dos agricultores, tornando-se a principal fonte de matéria prima para a produção de xarope de frutose. O xarope de milho com alto teor de frutose é conhecido como HFCS (High Fructose Corn Syrup).

O xarope de frutose de milho é obtido através da hidrólise química e enzimática do amido de milho e posterior isomerização da glicose em frutose (PARKER, SALAS E NWOSU, 2010).

São produzidos três categorias de xarope de frutose para fins industriais. O primeiro é o xarope HFCS-90 (90% de frutose e 10% glicose), essa categoria é destinada à indústria de alimento e serve principalmente como mistura para obtenção da segunda categoria, a HFCS-42 (42% frutose e glicose 58%) esta categoria tem uma ligeira doçura e não mascara o sabor natural dos alimentos. Assim, é amplamente utilizado em frutas em conserva, molhos, sopas, condimentos, produtos de panificação, e muitos outros alimentos processados. Também é muito usado pelas indústrias de laticínios como iogurte, gemada, leites aromatizados, sorvetes e outras sobremesas congeladas. A terceira categoria é a HFCS-55 (55% de frutose e 45% de glicose), devido à sua maior teor de frutose, HFCS-55 é mais doce que sacarose e, portanto, amplamente utilizado como adoçante em refrigerantes, sumos e gasosas. O xarope de frutose foi apresentado a indústrias de alimentos e bebidas no final dos anos 60. A HFCS-42 em 1967 e a HFCS-55 em 1977 (PARKER, SALAS E NWOSU, 2010).

Tabela 1 – Classificação dos produtos à base de frutose

Propriedades	Estado Físico	Descrição Química	% Frutose	% Água	Poder Edulcorante
Frutose cristalina	Cristalino	Cetohexose	99,5	0,2	130-180
HFCS 42%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	29,8	29	90-95
HFCS 55%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	42,4	23	95-100
HFCS 90%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	69,3	23	100-106
Frutose líquida	Líquido	Frutose e água	77	23	110-120

Fonte: LORENÇO, 2004.

Nos EUA, quatro empresas controlam 85% dos 2,6 bilhões de dólares gerados pelos xaropes. Archer Daniels Midland, a Cargill, Staley Manufacturing Co, CPC Internacional.

O uso do xarope de frutose tem aumentado desde a sua introdução como um edulcorante. Embora sua utilização tenha atingido seu grau máximo de utilização em 1999, até os dias de hoje, o xarope de frutose se mantém como o principal rival da sacarose na indústria de alimentos processados. Os EUA são os maiores consumidores de xarope de frutose no mundo, mas ele é produzido e utilizado em muitos países ao redor do mundo.

No Brasil o edulcorante mais conhecido e utilizado pelas indústrias de alimentos e de bebidas, é originário da cana-de-açúcar, a sacarose (glicose-frutose). A sacarose, além de apresentar um poder edulcorante maior do que o da glicose, também apresenta outras características positivas como contribuir para a produção de aromas e cores características, valor nutricional adequado e fácil obtenção. Contudo, outros fatores, levam à necessidade de se estudar o desenvolvimento de novos edulcorantes, assim como a necessidade de se buscar novas matérias primas para a obtenção dos mesmos (ROMÁN, 2008).

As necessidades de novos produtos geraram pesquisas com diferentes matérias primas, como obter edulcorantes a partir do amido mandioca, sendo assim, pesquisar o poder edulcorante maior ou até menor ao da sacarose, equiparando seu poder nutricional.

2.1.1 Produção de edulcorante

Em 1811, Kirchoff, citado por Román (2008), aqueceu uma mescla de amido e H_2SO_4 , considerando a primeira tentativa de se obter em escala industrial um hidrolisado de amido como edulcorante, com a finalidade de se obter glicose de maior pureza.

No século XX, os caramelos obtidos usando xarope de glicose por serem menos doces aos obtidos com a sacarose, permitiram um paladar apreciado, com isso houve o início da industrialização de xarope de glicose a partir de amidos hidrolisados nos EUA e na Alemanha (ROMÁN, 2008).

Após o aperfeiçoamento do processo de hidrólise para obtenção da glicose, foi aperfeiçoado o processo de isomerização da glicose em frutose. Sendo assim, essa descoberta levou à novos estudos, possibilitando o desenvolvimento de novos mercados.

O desenvolvimento relativamente barato dos xaropes tornou-se uma alternativa viável à sacarose e outros açúcares naturais em curto espaço de tempo. Além disso,

a sacarose contém frutose e glicose em quantidades iguais ligadas por uma ligação glicosídica. Para ser metabolizada no organismo, as moléculas de glicose e frutose precisam ser quebradas. Nos xaropes de frutose, a frutose está em maior quantidade e disponível.

A frutose faz parte do grupo dos carboidratos conhecidos como açúcares simples ou monossacarídeos. É o açúcar mais doce encontrado na natureza, e pode ser encontrado em frutas, mel e até em vegetais. O poder de doçura é medido usando a sacarose como o açúcar de base com um índice de doçura de 1,0.

Tabela 2 – Doçura relativa das soluções de açúcar (5%) e outros adoçantes. A doçura é medida em relação a sacarose como o açúcar de referência, com um índice de doçura de 1,0.

AÇÚCAR OU ADOÇANTE	DOÇURA RELATIVA
Sacarose	1,0
Açúcar invertido	0,85 – 1,0
Frutose	1,3
Glicose	0,56
Galactose	0,4 – 0,6
Maltose	0,3 – 0,5
Lactose	0,2 – 0,3
Xilitol	1,01
Ciclamato	30-80
Acesulfame K (Sunnette®)	200
Aspartame (Equal®, Nutrasweet®)	100 – 200
Sacarina (The Pink Stuff)	200 – 300
Stevia	300
Sucralose (Splenda®)	600
Thaumatococcus (Talin®)	2000 – 3000

Fonte: (PARKER, SALAS E NWOSU, 2010)

O uso da frutose na alimentação humana, em comparação à glicose e sacarose, resulta em efeito glicêmico reduzido, podendo ser usada como adoçante em dietas de pacientes com hipoglicemia. A frutose também é apontada por Thresher et al. (2000) como nutriente mediador da resistência à insulina induzida por sacarose e tolerância à glicose.

A obtenção de frutose é feita através de processos que envolvem hidrólise de sacarose, de amido de milho ou mandioca, com posterior inversão com glicose

isomerase e separação da frutose e glicose, que também é produzida na reação, ou através da hidrólise da inulina, em que a frutose é produto principal.

2.1.2 Xarope de frutose

Até o presente estudo o milho é considerado a principal fonte de matéria prima para obtenção de xarope de frutose nos EUA.

Para a obtenção do amido de milho, o grão de milho passa pelo processo de maceração, em seguida passa pela moagem úmida e física para separação do amido, do farelo, da proteína e do óleo. O amido de milho é composto por moléculas de glicose de cadeia longa. Essa cadeia é composta por moléculas de amilose e amilopectina (PARKER, SALAS e NWOSU, 2010).

Para a obtenção do xarope de frutose de milho, a primeira etapa consiste na adição de soda cáustica e/ou ácido clorídrico, além de alta temperatura e a utilização da primeira enzima, a α -amilase, para obtenção de dextrinas e oligossacarídeos. Posteriormente é adicionado ao meio a segunda enzima do processo, a enzima amiloglicosidase, esta enzima hidrolisa as dextrinas e oligossacarídeos em glicose. O produto destas duas enzimas é o xarope de milho também chamado de xarope de glicose. A terceira enzima a ser utilizada para finalizar o processo de obtenção de frutose é a enzima glicose-isomerase. Essa enzima é relativamente cara, converte glicose em frutose Após a obtenção do xarope de glicose e frutose, a separação da frutose é realizada em colunas cromatográficas, produzindo-se xaropes com 42 até 90% de frutose, denominados como “high fructose corn syrup (HFCS)” (PARKER et al., 2010).

O processo de hidrólise ácida utilizado na produção do xarope de frutose de milho provoca propriedades indesejáveis no xarope obtido, como sabores e odores residuais, coloração escura, devido à caramelização de açúcares, e reação de Maillard com proteínas. A utilização de minerais ácidos e subsequente neutralização dos mesmos interferem nas etapas posteriores de purificação do produto final (VERACHTERT & DE MOT, 1990). Faz-se necessário, então, que as empresas processadoras de amido busquem novos produtos capazes de atender tanto as novas exigências dos consumidores quanto às necessidades das indústrias de alimentos, encontrando amidos naturais de fontes alternativas, com propriedades

funcionais específicas que possam ser utilizados nos mais diferentes processamentos de alimentos.

Outro processo para a produção de xaropes com alto teor de frutose foi desenvolvido, utilizando a inulina como matéria-prima. A conversão deste polímero ocorre a partir de uma única etapa, empregando-se a enzima inulinase, apresentando um rendimento superior a 95% na produção de frutose. A hidrólise realizada pela inulinase tornou-se uma boa alternativa, considerando-se a qualidade do produto obtido. Contudo, a falta de produção em larga escala de inulina acaba por limitar a produção de xaropes com alto teor de frutose a partir deste polímero. A mais promissora fonte de inulina é a Alcachofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosus*) e, apesar das técnicas de plantio e colheita bem definidas, a escala de produção é muito baixa em comparação a outras fontes de açúcar, como a cana-de-açúcar e o milho (VICENTE, 2000).

Ao contrário da Alcachofra de Jerusalém, a cana-de-açúcar é produzida em larga escala, podendo ser utilizada como fonte de sacarose (frutose e Glicose) e posteriormente a separação desse polímero, visando à obtenção de frutose.

A obtenção de açúcar invertido (glicose e frutose) a partir da sacarose pode ser efetuada através da inversão química por ácidos ou pela inversão biológica, utilizando inulinases ou invertases. Industrialmente, a inversão química torna-se um processo mais simples, porém, a conversões biológicas a partir da ação enzimática resultam em produtos de maior qualidade (VANDAMME E DERYCKE, 1983).

2.1.2.1 Vantagens, desvantagens sobre o xarope de frutose de milho

O xarope de frutose apresenta algumas vantagens funcionais em relação à sacarose. Estas incluem barateamento relativo de produção, maior doçura, melhor solubilidade e capacidade de permanecer em solução sem cristalizar como acontece com a sacarose sob certas condições. Além disso, o xarope de frutose é líquido e assim é mais fácil de ser transportado e utilizado em refrigerantes por exemplo. Outro fator positivo é a acidez do meio, portanto, tem capacidade conservante o que reduz o uso de outros conservantes. Contudo, o xarope de frutose tem pouco ou nenhum valor nutricional, além calorias do açúcar (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores nutricionais calculados por 100g de xarope de milho com alta concentração de frutose HFCS. As porcentagens estão relacionadas às recomendações para adultos nos EUA. Dados obtidos no banco de nutrientes (USDA).

NUTRIENTES	VALORES
Energia	1,176 kJ (281 kcal)
Carboidratos	76 g
Fibra dietética	0g
Gordura	0g
Proteína	0g
Água	24g
Riboflavina	0,019mg (1%)
Niacina	0 mg (0%)
Ácido Pantotênico	0,011mg (0%)
Vitamina B6	0,024mg (2%)
Ácido fólico	0 microg (0%)
Vitamina C	0 mg (0%)
Cálcio	6 mg (1%)
Ferro	0,42 mg (3%)
Magnésio	2 mg (1%)
Fósforo	4 mg (1%)
Potássio	0 mg (0%)
Sódio	2 mg (0%)
Zinco	0,22 mg (2%)

Fonte: (PARKER, SALAS E NWOSU, 2010)

Os pesquisadores Parker, Salas e Nwosu, (2010), realizaram um estudo sobre a utilização do xarope de frutose pelas indústrias de alimentos dos EUA e o consumo desses alimentos a longo prazo. O estudo demonstrava as vantagens e desvantagens da utilização do xarope de frutose em relação à obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. Muitos autores correlacionam o aumento da obesidade ao crescente consumo de alimentos industriais contendo xarope de frutose. Contudo, outros autores como White e Foreyt (2006) descrevem benefícios no metabolismo fisiológico do ser humano que utilizam a frutose, como por exemplo o fato da frutose aumentar a absorção de ferro no organismo, ao formar um complexo ferro-frutose que é melhor absorvido que ferro inorgânico.

White e Foreyt (2006) publicaram dez mitos associados aos xaropes de frutose e a epidemia de obesidade nos EUA. Os autores descrevem que não foi feita uma

reavaliação da ingestão calórica global do aumento na utilização de edulcorantes por várias organizações científicas, tais como da Associação Médica Americana (AMA), o Associação Dietética Americano (ADA) e do Instituto Internacional de Vida e Ciências (ILSI) e com isso, nada se pode afirmar.

Outros estudos tem sido publicados sobre o papel do xarope de frutose na obesidade, diabetes e outras síndromes metabólicas. As principais conclusões desses estudos implicam síndromes metabólicas que incluem o consumo calórico, ganho de peso e obesidade (GROSS et al., 2004).

Melanson et al. (2007) estudou trinta mulheres magras onde os participantes receberam bebidas adoçadas com 30% de sacarose ou com 30% xarope de frutose em uma dieta isocalórica. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre os dois adoçantes nos testes de glicemia em jejum, insulina, leptina e grelina e concluiu que quando a frutose é consumida na forma de xarope de frutose, as respostas metabólicas não diferem da sacarose. No entanto, novas pesquisas estão sendo desenvolvidas para verificar se as mesmas conclusões são válidas para indivíduos obesos do sexo masculino, e em longo prazo.

Stanhope et al. (2008) analisou cuidadosamente o papel do xarope de frutose nos distúrbios metabólicos. Os resultados encontrados nos estudos mostraram que o consumo de bebidas adoçadas com frutose gerou um substancial aumento dos níveis de triglicérides em comparação com bebidas adoçadas com glicose. Os autores também relataram aumentos nos níveis de apolipoproteína B nos estudos de longa duração. Os resultados obtidos através de pesquisas desenvolvidas nos EUA geram a necessidade do contínuos estudos nesta área, não apenas em xarope de frutose, mas em outros açúcares e suas contribuições para a ingestão calórica elevadas, que levam ao ganho de peso, obesidade e síndromes metabólicas associadas.

2.2 Mandioca com matéria-prima para obtenção de açúcares

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é uma raiz com alto teor de amido, apresentando mais de trezentas variedades e é originária da América do Sul (EMBRAPA, 2011). No Brasil a mandioca é conhecida como aipim, macaxeira, dependendo da região.

O cultivo da mandioca está associado ao Brasil desde o seu descobrimento. Planta-se mandioca em todos os estados brasileiros, seu cultivo é de grande relevância econômica como principal fonte de carboidratos para milhões de pessoas, assim como para a alimentação animal, além de ser utilizado como matéria prima em inúmeros processos industriais (PANDEY et al., 2000).

A mandioca destaca-se entre as culturas de mais fácil cultivo. Cresce em solos poucos férteis e de pouca tecnologia. A mandioca apresenta um grande diferencial, a capacidade de usar eficientemente a água e ter grande adaptação a solos de baixa fertilidade, além de possibilitar que as raízes sejam armazenadas no próprio solo, por um período razoável, sem perdas significativas de qualidade e rendimento, permitindo que estas sejam colhidas com diferentes idades (CARDOSO, 2003).

É uma raiz amilácea, onde o amido se encontra juntamente com os outros carboidratos de diferentes pesos moleculares, incluindo desde açúcares simples até glicosídeos e material celulósico. A mandioca é uma matéria-prima adequada para obtenção de diversos produtos por hidrólise, por apresentar elevado teor de amido e baixos teores de gorduras, proteínas e cinzas (SAITO, 2005).

A produção nacional da cultura da mandioca, na safra 2009 foi estimada em mais de 24 milhões de toneladas, com rendimento médio de 13,86 toneladas de raízes por hectare. A produção brasileira de mandioca por região fisiográfica ficou com o Nordeste em 31,51%, o Norte com 29,29%, o Sul com 22,49%, o Sudeste 9,16% e Centro-Oeste com 5,55% (EMBRAPA, 2011).



Figura 2. - Produção Agrícola Municipal, 2009. Fonte: EMBRAPA, 2011.

As regiões Norte e Nordeste destacam-se como principais consumidoras, sendo a produção essencialmente utilizada na dieta humana, na forma de farinha. Nas regiões Sul e Sudeste, em que os rendimentos médios são de 17,71 t/ha e 18,71 t/ha, respectivamente, a maior parte da produção é orientada para a indústria, principalmente nos estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul.

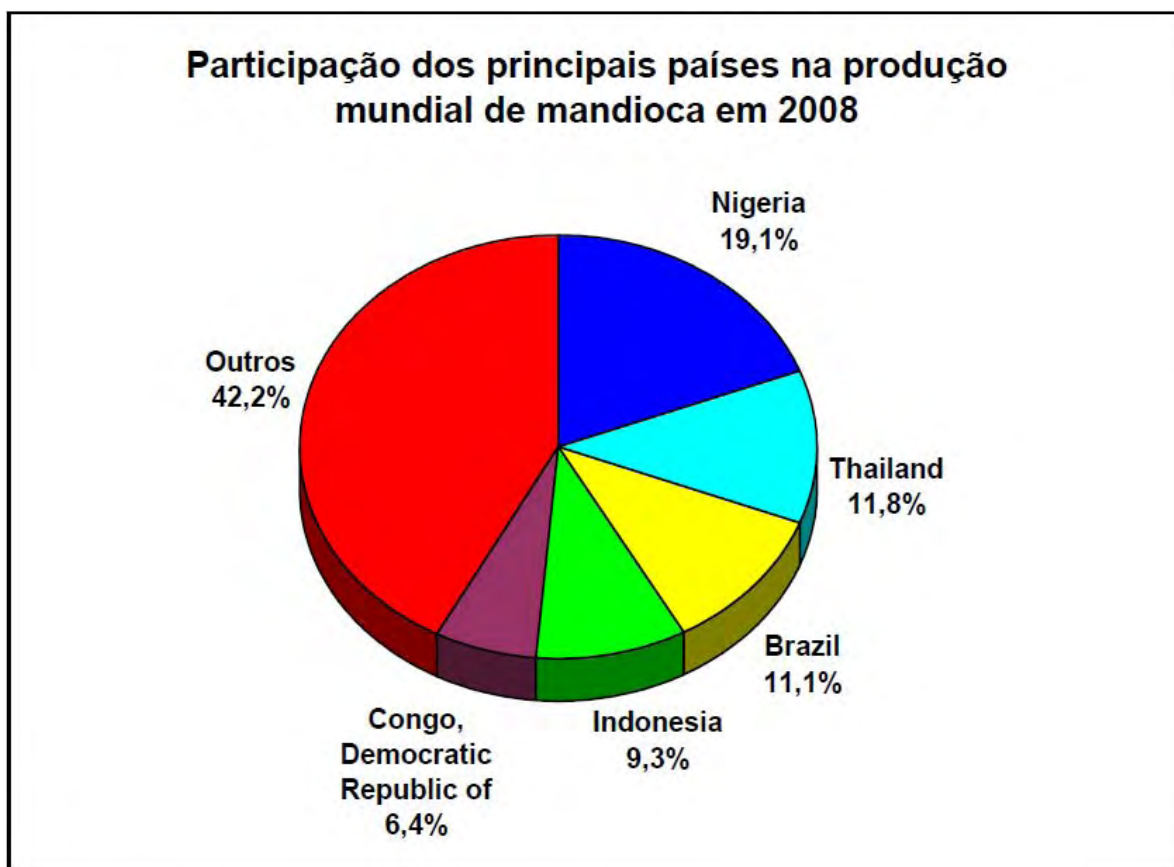


Figura 3 –.Produção mundial de mandioca. Fonte: EMBRAPA, 2011

O cultivo desta raiz é feito principalmente em países tropicais, sendo o Brasil, o terceiro maior produtor mundial. Parte desta produção é transformada em farinha ou usada diretamente na alimentação e outra parte é processada para obtenção de fécula.

2.2.1 Amido

De todos os polissacarídeos o amido é o único produzido em pequenos agregados individuais, denominados grânulos que são insolúveis em água em temperaturas inferiores a 50°C. São sintetizados nas células de cada planta, adquirem tamanhos e formas prescritos pelo sistema biossintético das plantas e pela condição física imposta pelo contorno do tecido. As formas dos grânulos do amido são arredondadas, cupuliformes, convexas, bicôncavas, sacciformes, entre outras (GONÇALVES, 2006). É considerado a principal substância de reserva das plantas superiores e fornece de 70 a 80% das calorias consumidas

pelo homem. Depois dos açúcares mais simples (sacarose, glicose, frutose, maltose), é o principal carboidrato que os vegetais superiores sintetizam a partir da fotossíntese (CEREDA, 2001).

As fontes mais importantes de amido são os grãos de cereais, representando cerca de 40 a 90% de seu peso seco, de leguminosas, entre 30 e 70%, e os tubérculos, de 65 a 85%, em base seca. O consumo de amido representa cerca de 70 - 80% das calorias consumidas nas dietas humanas em geral. Seu uso, nos últimos anos vem crescendo o interesse em amidos naturais que possam ser utilizados pela indústria alimentícia (LEONEL et al., 2002).

O amido é acumulado nos vegetais na forma de grânulos insolúveis, os quais são formados por dois componentes separáveis por precipitação seletiva, denominados amilose e amilopectina, que aparecem na proporção média de 25 e 75%, respectivamente. A amilose é um polissacarídeo formado de cadeias lineares helicoidais de resíduos de glicose unidos entre si por ligações glicosídicas α -1,4. Cada volta da espiral pode ser formada por cerca de seis unidades de glicose. A amilopectina constitui a fração altamente ramificada do amido. É formada por várias cadeias de resíduos de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas α -1,4 das quais partem ramificações com ligações α -1,6 a cada série de 25 a 30 resíduos de glicose (GONÇALVES, 2006).

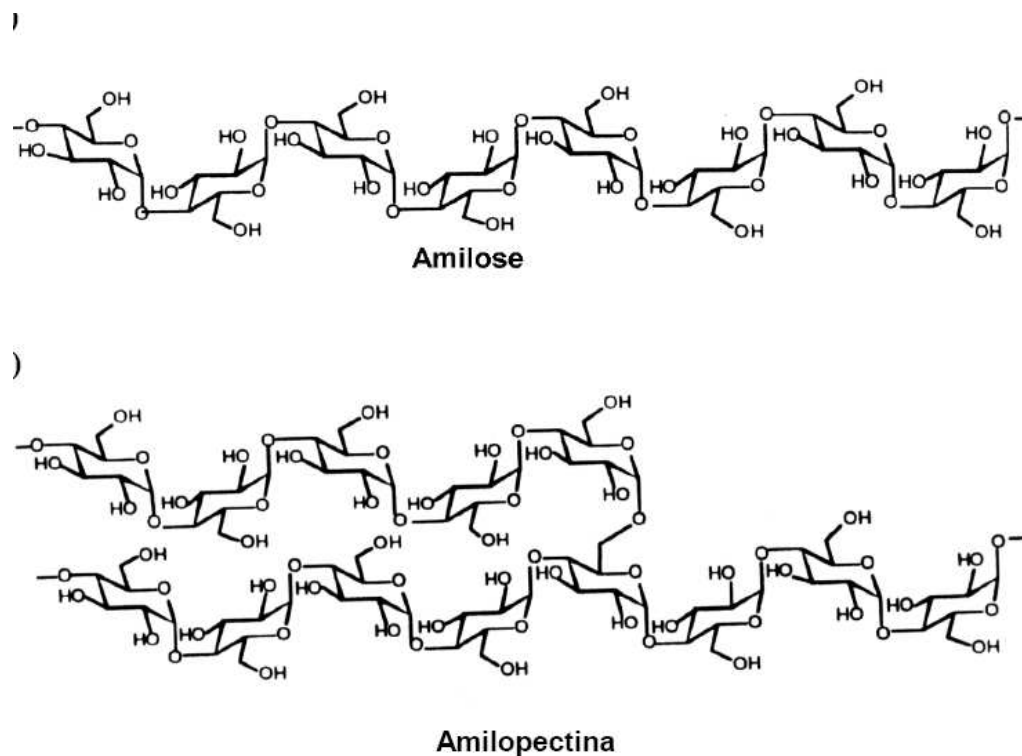


Figura 4. Fórmulas estruturais do amido, amilose e amilopectina. Fonte: Robyt, 1998.

Estudos têm mostrado a existência de um terceiro componente denominado material intermediário. A quantidade e a estrutura deste material diferem de acordo com o tipo e grau de maturação do grânulo de amido (WANG et al., 1993).

Este material intermediário consiste de cadeias lineares com grau de polimerização (DP) variando de 50 a 200 e moléculas levemente ramificadas, de baixo peso molecular (< 106) e com comprimento de cadeia maior que o comprimento da amilopectina normal (BILIADERIS, 1991).

Os grânulos de amido são estruturas semi-cristalinas formadas pelo arranjo na direção radial das macromoléculas lineares (amilose) e ramificadas (amilopectina). Essas moléculas formam pontes de hidrogênio, pois estão associadas paralelamente, o que resulta no aparecimento de regiões cristalinas ou micelares. Assim, os grânulos são birrefringentes mostrando uma cruz de polarização (Cruz de Malta) se observados sob luz polarizada (FRANCO et al., 2001).

As regiões cristalinas consistem de duplas hélices fortemente empacotadas formadas pelas ramificações da amilopectina, enquanto os pontos de ramificação ficam nas áreas amorfas (JACOBS et al., 1998).

As moléculas de amilose e amilopectina estão arranjadas no grânulo formando uma estrutura de camadas que se superpõem ao redor de um ponto denominado hilo, que pode estar no centro do grânulo ou deslocadas lateralmente. As camadas que circundam o hilo são resultantes da deposição de amido de diferentes graus de hidratação, resultantes da presença de amilose ou amilopectina. Devido a isto, têm regiões alternadas de alto e baixo índice de refração, densidade, cristalinidade e resistência ao ácido e a enzimas (FRANCO et al., 2001).

2.2.1.1 Constituintes menores do amido

Os grânulos de amido apresentam outros constituintes além da amilose e da amilopectina. Esses componentes são chamados de constituintes menores e são principalmente, os lipídeos, o fósforo, as proteínas e as cinzas, pertencentes a compostos principalmente de fragmentos da parede celular, componentes superficiais, removíveis por procedimentos de extração, e componentes internos (HOOVER, 2001).

A fração de lipídeos, quando elevada, pode alterar características como a fixação de cor, o desenvolvimento de aromas e formação de complexos. Entretanto, para os amidos de tuberosas esse fator não é tão importante, devido ao baixo percentual deste componente nos mesmos (BULÉON et al., 1998).

A presença de lipídeos no amido pode causar um efeito redutor no inchamento dos grânulos individualmente (SINGH et al., 2003). Complexos de amilose com gorduras podem alterar as temperaturas de gelatinização do amido, alterando a textura e o perfil da viscosidade da pasta resultante e limitando a retrogradação (THOMAS; ATWEEL, 1999).

Segundo Hoover (2001), as proteínas e cinzas aparecem em pequena quantidade em amidos de tubérculos e não chegam a alterar suas propriedades funcionais. Normalmente, os amidos apresentam pequenas quantidades de minerais, como cálcio,

magnésio, fósforo, potássio e sódio, dentre os quais apenas o fósforo apresenta significância funcional (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

O fósforo pode ser encontrado nos grânulos de amido nas formas de monoéster fosfato, fosfolipídeos e fosfato inorgânico e sua presença modifica as propriedades funcionais (LIM; KASEMSUWAN; JANE, 1994).

Segundo Noda et al. (2005), o fósforo, nas diversas formas que pode ocorrer, aparece ligado covalentemente aos grânulos nativos, alterando algumas propriedades reológicas como pastas muito claras, aumento na viscosidade e na consistência. Viera (2004), afirma que a presença de moléculas esterificadas com fósforo forma uma barreira impedindo que enzimas atinjam os sítios de ação. Comparado com outros amidos, o amido de batata possui um alto teor de fósforo, o que promove propriedades de viscosidade únicas (NODA et al., 2005).

Há relatos de que o grupo fosfato está ligado a unidades de cadeias longas com DP >20 da amilopectina (TAKEDA; HIZUKURI, 1982).

Fosforil-oligossacarídeos são produzidos na digestão de amido de batata por amilase e têm recebido muita atenção a respeito de suas propriedades funcionais. Grânulos pequenos de amido de batata possuem alto teor de fósforo e segundo a autor, aumentar o teor de fósforo do amido é desejável para a produção de fosforil-oligossacarídeos (NODA et al., 2005).

2.2.1.2 Utilização do amido

O amido possui as mais variadas aplicações, sendo utilizado na indústria têxtil com a finalidade de gomar as linhas para facilitar a tecelagem e na indústria de papéis, visto que a gomagem das fibras produz papéis com diferentes resistências e alta qualidade de impressão. No entanto, a maior utilização do amido está na indústria de alimentos e bebidas, onde é utilizado como espessante, estabilizante e agente geleificante.

A partir do processamento do amido pode-se ainda obter os xaropes de glicose, xaropes de maltose, as maltodextrinas e as ciclodextrinas, utilizados em confeitarias, cervejarias e na indústria farmacêutica (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LÓPEZ, 1995).

O amido pode ainda, ser usado como principal substrato para a produção de enzimas e biomassa microbianas. Além disso, o açúcar produzido a partir da hidrólise do amido pode ser fermentado para a produção de etanol (NIGAM; SINGH, 1995; ROY; GUPTA, 2004).

A glicose de amido é ainda amplamente usada na manufatura de ácidos orgânicos como o cítrico, ácido glutâmico, ácido lático, glucitol, aminoácidos 3 como lisina ou comercializado como glicose cristalina (AQUINO et al., 2001).

Um importante mercado para o amido está no setor de papel e papelão, com um potencial de 170 mil toneladas. Isso significa uma demanda de matéria prima equivalente de 700 mil toneladas de raízes, supondo que a fécula atenderia todo esse mercado, abrindo espaço para a fécula de mandioca, que tem vantagens em algumas etapas do processo.

Uma das grandes áreas de uso do amido, na fabricação do papel, tem sido a parte úmida (*wet end*) do processo de produção. Estima-se que o tamanho de tal mercado, no âmbito mundial, deva ser de 230 a 250 milhões de dólares ou 253 mil toneladas, e uma expectativa de crescimento anual de pelo menos 10%. A razão para esse crescimento, é o novo processo de fabricação, ou seja, a técnica de fabricação alcalina em uso na Europa há mais de 30 anos e recentemente adotada na grande maioria das indústrias no mundo, inclusive no Brasil. O aumento na demanda de amido na indústria papelreira tem sido também estimulado pelo crescente uso da matéria-prima reciclada (CEREDA, 2001). No mercado de colas e adesivos, em geral, a fécula é preferida por gerar produtos mais viscosos e fáceis de manipular. É fluida, estável e de pH neutro e pode ser facilmente preparada e combinada com diversas resinas e emulsões sintéticas.

A produção de álcool, principalmente para fins alimentícios (bebidas), farmacológicos e laboratoriais, também se apresenta como uma alternativa de mercado para a mandioca. (FONSECA, 1996)

A crescente valorização das características funcionais existentes nos amidos nativos reflete o interesse da sociedade mundial por produtos mais naturais e com processo de produção que cause o mínimo impacto ambiental, uma vez que se reduz o uso de produtos químicos. Dificilmente novos reagentes químicos ou derivados serão aprovados, principalmente para uso alimentar e também que os níveis de tratamento nos amidos existentes vão permanecer estacionários. Na Europa, o uso de amidos modificados é limitado a 5% do

peso seco do alimento elaborado. Esses amidos são considerados aditivos alimentares e devem ser declarados nos rótulos, ao contrário dos amidos nativos, para os quais não há limites de uso, e que permitem identificar os alimentos como naturais. (CEREDA, 2001)

Esta preferência pela fécula se dá pelas suas propriedades físicoquímicas, pois a baixa temperatura de gomificação a faz ideal para uso como agente ligante em embutidos de carne. É ideal para o preparo de recheios de tortas, de alimentos infantis e congelados, para produção de “*wafers*”, de copos de sorvetes, de sorvetes, etc. As características da fécula de mandioca são, em parte, reproduzidas pelos amidos de cereais geneticamente modificados. Portanto, em mercados onde haja restrição ao consumo de produtos oriundos de organismos geneticamente modificados, a fécula pode se tornar uma alternativa viável. Isso também é válido para os nichos de mercado em que são estabelecidas as regras diferenciadas para a importação de amido nativo e de amido modificado (HENRY, 1999).

2.2.1.3. Hidrólise do amido

O amido pode ser hidrolisado por duas vias diferentes, hidrólise ácida e hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática permite maior controle da distribuição final de oligossacarídeos e é responsável pela obtenção dos mais importantes amidos modificados comerciais, enquanto a hidrólise ácida é inespecífica (GONÇALVES, 2006).

Os produtos resultantes da hidrólise são a glicose, maltose, e uma série de oligossacarídeos e polissacarídeos. Essa ampla faixa de hidrolisados, produzidos a partir de diferentes graus de hidrólise, é classificada em valores de “dextrose equivalente” (DE), o qual mede a quantidade de açúcar redutor presente no produto e é expresso em peso seco (CHRONAKIS, 1998).

O número de extremidades redutoras indica a polimerização da molécula de amido. Por convenção, considera-se que o valor redutor da glicose é de 100%. Ao medir as extremidades redutoras do amido e seus produtos de hidrólise, os resultados são expressos em glicose equivalente ou Dextrose Equivalente (DE). Quanto maior o valor de DE, maior o efeito de hidrólise ou despolimerização do amido. Entretanto, dois hidrolisados

preparados em condições diferentes, podem apresentar o mesmo DE e um perfil de açúcar completamente diferente, sendo as propriedades dos hidrolisados também diferentes.

Na hidrólise do amido são utilizados, basicamente, quatro grupos de enzimas. As endo e exoamilases que agem primeiramente nas ligações $\alpha(1-4)$; as desramificantes que agem exclusivamente nas ligações $\alpha(1-6)$ e as transferases que quebram ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ e as transferem para um receptor glicosídico, formando uma nova cadeia glicosídica (COUTINHO, 2007).

2.2.1.3.1 Enzimas responsáveis pela hidrólise

Várias enzimas são conhecidas por hidrolisar a molécula de amido com liberação de diferentes produtos e são genericamente denominadas de amilases. Uma ação combinada dessas enzimas é requerida para hidrolisar completamente o amido em glicose (GUPTA et al., 2003).

A Tabela 4 descreve as enzimas responsáveis pela hidrólise do amido, sua origem e local de atuação.

Tabela 4- Tipos de enzimas envolvidas no processo de hidrólise do amido.

Enzima	Origem	Ação
α -amilase	Bacteriano/Fúngico	Atuam aleatoriamente sobre ligações α -1,4 gerando dextrina como a maltose e oligossacarídeos
α -amilase sacarificante	Bacteriano	Atuam sobre ligações α -1,4 gerando dextrina, maltose, oligossacarídeos e até 50% de glicose
β -amilase	Cevada	Atuam sobre ligações α -1,4 nas extremidades redutoras gerando dextrina e β -maltose
Glucoamilase	Fúngico	Atuam sobre as ligações α -1,4 e α -1,6 nas extremidades redutoras gerando β -glicose
Pululanase	Bacteriano	Atuam sobre ligações α -1,6 para gerar maltodextrinas de cadeia linear

Fonte: ROMÁN, 2008.

As amilases são amplamente distribuídas na natureza sendo sintetizadas em vários tecidos animais, plantas superiores, bem como por fungos, leveduras e bactérias. No entanto, aquelas produzidas por microrganismos termofílicos e termotolerantes são especialmente interessantes por serem normalmente termoestáveis e poderem ser usadas nos processos de sacarificação que ocorrem em altas temperaturas (GÚZMAN; PAREDES, 1995; GOTO et al., 1998; PEIXOTO et al., 2003).

Com base no local de ação, as amilases podem ser divididas em duas categorias: as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso, no interior da molécula de amido liberando oligossacarídeos, enquanto as exoamilases hidrolisam as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula liberando glicose ou maltose (GUZMÁN e PAREDES, 1995).

As α -amilase (EC 3.2.1.1 1,4 α -D glicano glicanohidrolase) correspondem as endoamilases, que atuam ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando malto-oligossacarídeos (dextrinas). Também chamadas de enzimas dextrinizantes, estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato: α -amilases sacarificantes que hidrolisam 50 a 60% do substrato e as liqueficientes, que quebram cerca de 30 a 40% do substrato. Os principais produtos de hidrólise do amido pela ação das α -amilases são maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltose e glicose (NAJAFI et al., 2005; EZEJI; BAHL, 2006).

As β -amilases (E.C.3.2.1.2 1,4- α -D-glucano maltohidrolase) são exoamilases que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir de extremidade não redutora da molécula (amilose, amilopectina e glicogênio) liberando maltose. Além da hidrólise, há uma inversão da configuração anomérica da maltose, que é liberada na configuração β . São encontradas em várias plantas como cevada, trigo, batata doce e feijão, e raramente em microrganismos. Esta enzima não é capaz de hidrolisar ligações α -1,6 dos substratos ramificados. O uso da β -amilase na produção de xarope de alto teor de maltose está restrito pela sua disponibilidade limitada. Na indústria de alimentos e bebida, esta enzima é empregada para converter solução de amido em solução de maltose.

As glucoamilases (E.C 3.2.1.3 1,4- α -D-glucano glucohidrolase), também conhecidas como amiloglucosidases, são produzidas principalmente por fungos. São exoamilases que catalisam a quebra das ligações glicosídicas α -1,4 a partir de uma

extremidade não redutora da molécula de amido. Ela pode atuar tanto nas moléculas de amilose ou amilopectina do grânulo de amido como em oligossacarídeos relacionados, liberando D-glucose na configuração β . Em uma velocidade menor, as glucoamilases também atuam hidrolisando as ligações α -1,6 e algumas α -1,3. Sugere-se, portanto, que a ação da glucoamilase ocorra por meio de um mecanismo multisseriado no qual a enzima atua aleatoriamente em toda a molécula de substrato.

As pululanases (E.C. 3.2.1.41 α -dextrina-6-glucohidrolase) são endoamilases desramificantes que quebram as ligações α -1,6 do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -1,6 e que não pode ser degradado por α - ou β -amilase. O produto dessa hidrólise corresponde às maltotrioses. Estas enzimas também são capazes de agir nas ligações α -1,6 das moléculas de amido, amilopectina e dextrina limite, originando um produto de reação sem ponto de ramificação. Dentro dessa categoria estão também as isopululanases (E.C. 3.2.1.57 pullulan 4- glucohydrolase) que são enzimas que quebram as ligações glicosídicas α -1,4 do pululano, mas que não têm nenhuma atividade sobre o amido. O produto da ação dessas enzimas é a isopanoose.

As isoamilases (E.C. 3.2.1.68 glicogênio-6-glucohidrolase) são endoamilases desramificantes que hidrolisam as ligações α -1,6 de amilopectina, glicogênio, várias dextrinas ramificadas e oligossacarídeos, mas não hidrolisa a ligação α -1,6 do pululano. Estas enzimas são similares as pululanases, porém requerem pelo menos três unidades de glicose na cadeia ramificada para serem capazes de hidrolisá-la. As isoamilases têm sido encontradas em poucas linhagens de microrganismos e são usadas para desramificarem a molécula de amido na produção de glicose e maltose.

As α -D-glicosidases (EC 3.2.1.20 α -D-glicosídeo glucohidrolase) ou maltases, são exoamilases que hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 de sacarídeos curtos liberando α -D-glucose a partir da extremidade não redutora. Um outro tipo, as oligo-1,6- α -D-glicosidase (EC 3.2.1.10) hidrolisam ligações α -1,6 de oligossacarídeos. Elas encontram-se amplamente distribuídas entre os microrganismos, incluindo os fungos, leveduras e bactérias.

As exo-1,4- α -D-Glucanases (EC 3.2.1.60 e 3.2.1.98 α -D-glucohidrolase) são enzimas similares as α -amilases, porém, liberam grande quantidade de maltotetraose (EC 3.2.1.60) e maltohexaose (EC 3.2.1.98) como principais produtos de sua

ação sobre o amido. Essas amilases são capazes de digerir ainda a maltohexaose para maltotetraose e maltose.

Ciclomaltodextrina Glucanotransferase (ciclodextrina glicosiltransferase; 1,4- α -D-(1,4-D-Glucano EC 2.4.1.19) é uma exoamilase que hidrolisa o amido, amilose e outros polissacarídeos, por uma série de reações complexas, formando oligossacarídeos cíclicos não redutores, conhecidos como ciclodextrinas.

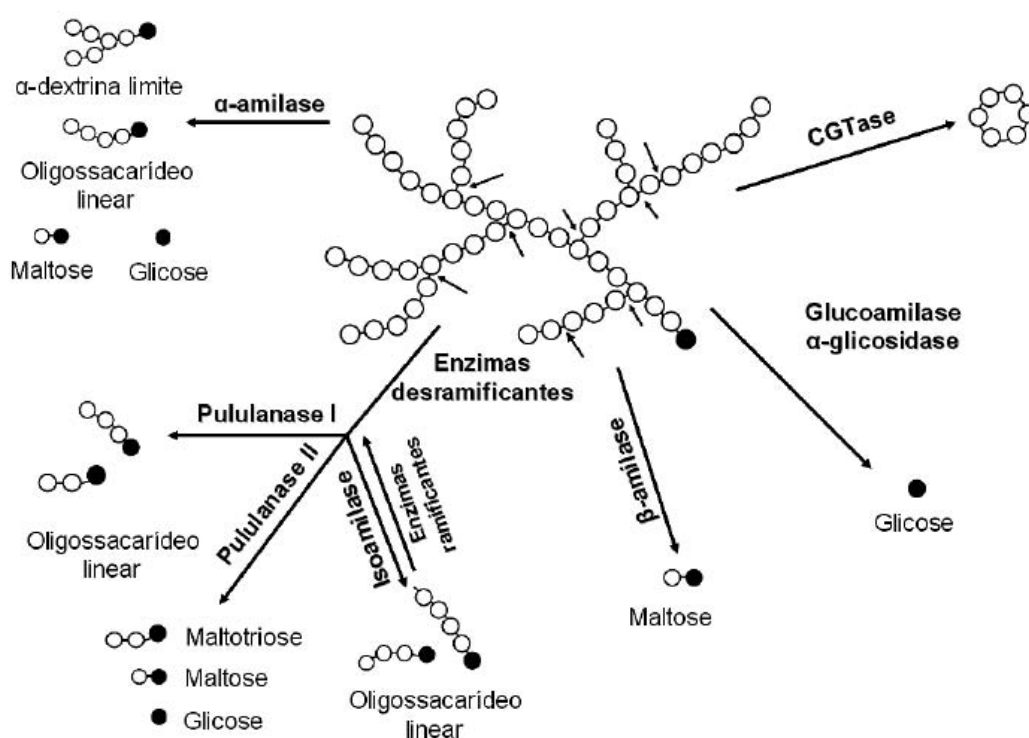


Figura 5. Modelo de ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) extremidade redutora; (o) extremidade não redutora; (→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido. Fonte modificada: VAN DER VEEN et al, 2000; HORVÁTHOVÁ et al, 2000; BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002.

As α -amilases são divididas em duas categorias de acordo com o grau de hidrólise do substrato: as α -amilases sacarificantes, que hidrolisam 50 a 60% do substrato e as liqueficientes, que quebram cerca de 30 a 40% do amido. As propriedades das α -amilases fúngicas são muito similares às das enzimas bacterianas. No entanto, elas são normalmente

menos termoestáveis, mas têm uma faixa de estabilidade ao pH mais ampla. As aplicações industriais são inúmeras e, provavelmente, a maior aplicação desta enzima é no processo de liquefação do amido nas indústrias de açúcar, álcool e bebidas fermentadas, para converter 30 a 40% do amido em dextrinas solúveis, com diferentes graus de polimerização, diminuindo a viscosidade da solução de amido (LÉVÊQUE et al., 2000; GOMES et al., 2003).

Elas são utilizadas também, na indústria de panificação, na produção de adesivos, fármacos e detergente, em tratamento de efluentes de esgoto e em ração animal (GOTO et al., 1998).

A glucoamilase é uma das enzimas industriais mais importantes, tendo como sua principal atuação a degradação do amido, para a produção de xaropes com alto teor de glicose (96 - 98% de glicose) e de xaropes com alto teor de frutose (55% de frutose). Este último tem grande aplicação na indústria panificadora e na fermentação de cervejas de baixa caloria (JAMES; LEE, 1997).

No processo de panificação, as glucoamilases aumentam os níveis de açúcares fermentáveis na massa. A glicose liberada pela ação dessa enzima apresenta um nível perceptível de doçura superior ao produzido pela ação da β -amilase. Assim, as glucoamilases são algumas vezes utilizadas com o objetivo de reduzir a quantidade de açúcar a ser adicionada à massa, dependendo da viabilidade econômica destes ingredientes (KNIGHT; MAZZIEIRO, 2000).

Em altas concentrações de glicose, a glucoamilase pode repolimerizar moléculas de glicose, por meio de uma reação chamada 'reversão', onde é formado maltose e isomaltose. Porém, este fenômeno é mais pronunciado em altas concentrações de substrato e enzima. As glucoamilases também são usadas nas indústrias japonesas de fermentação para a fabricação de produtos como, por exemplo, o sake, o shoyu e o miso (HATA et al., 1997).

As enzimas disponíveis comercialmente são, na sua maior parte, produzidas por linhagens dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus*. Dentre estas, a Glucoamilase de *Aspergillus* é a mais termoestável, apresentando a máxima atividade em torno do pH 4,5, em temperaturas próximas de 50 a 55°C, sendo rapidamente inativada em temperaturas próximas a 60°C. Esta termoestabilidade limitada afeta seu uso em processos industriais, nos quais a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária (LEMOS et al, 2003).

As α -amilases e glucoamilases têm sido obtidas a partir de diversos microrganismos como as bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* (MORGAN; PRIEST, 1981), *Bacillus* sp ANT-6 (BURHAN et al., 2003), *Bacillus subtilis* JS- 2004 (ASGHAR et al., 2006), *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 (EZEJI; BAHL, 2006), e os fungos *Aspergillus niger* UO-1 (HERNÁNDEZ et al., 2006), *Aspergillus tamarisii* (MOREIRA et al., 2004), *Aspergillus awamori* (ANINDYAWATI et al., 1998), *Talaromyces emersonii* (BUNNI et al., 1989), *Scytalidium* sp. (ODIBO et al., 1992) e *Scytalidium thermophilum* (AQUINO et al., 2003), *Rhizomucor pusillus* A 13.36 (SILVA et al., 2005).

2.3 Purificação do hidrolisado de amido

O carvão ativado e a terra diatomácea são produtos que podem ser utilizados para a purificação do hidrolisado de amido (SURMELY et al., 2003). O mecanismo de remoção das impurezas consiste - se na sua adsorção física pelo carvão ativo, ou seja, as moléculas das impurezas são atraídas pela porosidade existentes no carvão ativado, e lá retidas por forças de interação com a superfície. Assim, após o tratamento os produtos encontram - se purificados e isentos de impurezas que causam odor e cor (MUSSATTO e ROBERTO, 2004).

Os carvões microporosos pertencem a uma classe de materiais importante, conhecido como carvão ativado (C.A) sendo de larga aplicações através de sua reconhecida produção mundial de aproximadamente 400.000 ton/ano (MUSSATTO e ROBERTO, 2004; PARASKEVA et al., 2008). O carvão ativado é utilizado como adsorvente catalisador ou suporte de catalisador. Na área de tratamento de efluentes é usado na adsorção em fase líquida, por exemplo, na adsorção de moléculas orgânicas que causam sabor, odor e toxicidade. Os carvões ativados são materiais carbonosos porosos que apresentam uma forma microcristalina, não grafítica, que sofreram um processamento para aumentar a porosidade interna. Uma vez ativado o carvão apresenta uma porosidade interna comparável a uma rede de túneis que se bifurcam em canais menores e assim sucessivamente. Esta porosidade diferenciada é classificada segundo o tamanho em macro, meso e microporosidades (PARASKEVA et al., 2008).

A característica incomparável do carvão é a larga superfície interna localizada dentro da rede de poros estreitos, onde a maior parte do processo de adsorção

tomará lugar e cujo tamanho e forma dos poros também influenciam na seletividade da adsorção através do efeito de peneira molecular (PARASKEVA et al., 2008).

A princípio, qualquer material com alto teor de carbono, denominado de agente precursor (A.P) pode ser transformado em C.A, por exemplo, cascas de coco, carvões minerais (antracita, betuminosos, linhito), turfas, madeiras, resíduos de petróleo. Atualmente são utilizados como agentes precursores, os caroços e cascas de oliva, cereja, damasco, pêssego, azeitonas e ossos de animais. Em torno de 1/3 da produção mundial de C.A. é de origem vegetal, sendo esta proporção muito maior nos Estados Unidos da América e na Europa (PARASKEVA et al., 2008).

No Brasil, predominantemente, empregam-se madeira, carvão betuminoso e sub-betuminoso, osso e casca de coco. Uma vez preparada a granulometria desejada, a produção envolve, basicamente, a carbonização e ativação (ou oxidação) para desenvolvimento dos vazios internos. A carbonização ou pirólise é usualmente feita na ausência de ar, em temperaturas compreendidas entre 500 – 800°C, enquanto a ativação é realizada com gases oxidantes em temperaturas de 800 a 900°C (PARASKEVA et al., 2008). Os carvões ativados podem ser preparados, ou manufaturados por uma variedade de métodos. Estes poderiam ou não envolver ácidos sintéticos, bases e outras substâncias num fluxo de gases ativantes tais como vapor (H₂O), nitrogênio (N₂) ou dióxido de carbono (CO₂). Seu rendimento e qualidade podem ser melhorados pela remoção da umidade. Microondas podem ser usadas para a pirolise da fonte de carvão. Por exemplo, o lignito e turfa são processados através de uma carbonização a baixas temperaturas, seguida do tratamento com vapor ou hidróxido de potássio. O carvão pode ser convertido em resinas de troca catiônicas por sulfonação, ou por nitratação e redução. Alguns processos tratam materiais carbonosos com ácido fosfórico e/ou cloreto de zinco, resultando numa mistura carbonácea a elevada temperatura, seguida pela remoção dos agentes ativantes através da lavagem com água (MUSSATO e ROBERTO, 2004).

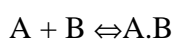
Terra diatomácea é um sedimento amorfo, originado a partir de frústulas ou carapaças de organismos unicelulares vegetais tais como algas microscópicas aquáticas, marinhas e lacustres, normalmente denominada diatomita. Por apresentarem natureza silicosa, as frústulas desenvolvem-se indefinidamente nas camadas geológicas da crosta terrestre. Segundo Souza et al., (2003) a terra diatomácea é um material leve e de baixa massa específica

aparente, cuja coloração varia do branco ao cinza escuro. O autor realizou a caracterização dos componentes da terra diatomácea e descreveu como material constituído principalmente por sílica opalina (58 até 91%) e impurezas tais como argilominerais, matéria orgânica, hidróxidos, areia quartzosa e carbonatos de cálcio e de magnésio. A maioria das diatomáceas apresenta tamanho entre 4 e 500 μm , bem como existem em mais de 12.000 espécies diferentes.

No Sudeste do Brasil (Campos dos Goytacazes-RJ) existe um importante depósito de material diatomáceo. Entretanto, este depósito tem sido pouco caracterizado a despeito da importância industrial deste material. As propriedades deste material permitem sua aplicação em distintas áreas como auxiliar de filtração, isolante térmico e acústico, como carga ou enchimento, absorvente, entre outras (SOUZA, et al., 2003).

A adsorção é um fenômeno físico-químico onde o componente em uma fase gasosa ou líquida é transferido para a superfície de uma fase sólida. Os componentes que se unem à superfície são chamados adsorvatos, enquanto que a fase sólida que retém o adsorvato é chamada adsorvente. A remoção das moléculas a partir da superfície é chamada dessorção (CARVALHO, 2005). A migração destes componentes de uma fase para outra tem como força motriz a diferença de concentrações entre o seio do fluido e a superfície do adsorvente. Usualmente o adsorvente é composto de partículas que são empacotadas em um leito fixo por onde passa a fase fluida continuamente até que não haja mais transferência de massa. Como o adsorvato concentra-se na superfície do adsorvente, quanto maior for esta superfície, maior será a eficiência da adsorção. Por isso geralmente os adsorventes são sólidos com partículas porosas (CARVALHO, 2005).

Segundo Carvalho (2005), a adsorção de moléculas pode ser representada como uma reação química:



onde A é o adsorvato, B é o adsorvente e A.B é o composto adsorvido.

Os compostos permanecem adsorvidos na superfície do adsorvente pela ação de diversos tipos de forças químicas como:

- Ligações de Hidrogênio
- Interações Dipolo-Dipolo
- Forças de London ou Van der Waals

Quando as moléculas de adsorvato presentes na fase fluída atingem a superfície do adsorvente, a força residual, resultante do desequilíbrio das forças de Van der Waals que agem na superfície da fase sólida, criam um campo de forças que atrai e aprisiona a molécula. O tempo que a molécula de adsorvato fica ligada à superfície do adsorvente depende diretamente da energia com que a molécula é segura, ou seja, é uma relação entre as forças exercidas pela superfície sobre essas moléculas e as forças de campo das outras moléculas vizinhas (CARVALHO, 2005).

2.4 Isomerização

Isomerização é a última etapa do processamento do amido, quando se deseja obter um xarope contendo frutose. A isomerização é um processo contínuo no qual se emprega a enzima glicose isomerase imobilizada para a conversão da glicose em frutose.

A frutose, uma cetohexose, é considerada o açúcar mais doce encontrado na natureza, estando presente na forma livre em frutas e mel, e polimerizada no polissacarídeo inulina, encontrada na alcachofra de Jerusalém, chicória e dente de leão (DE PAULA, 2007)

O uso da frutose na alimentação humana, em comparação à glicose e sacarose, resulta em efeito reduzido, podendo ser usada como adoçante em dietas de pacientes com hipoglicemia. Sua ingestão causa menor variação nos níveis de glicose, insulina, glucagon e hormônios. Pelo seu sabor mais doce, podendo adoçar 70% mais que a mesma quantidade de sacarose, a frutose é empregada com vantagem em alimentos com teor calórico reduzido, com redução de até 33% (DE PAULA, 2007).

A produção de xaropes contendo frutose teve início nos anos 70, permitindo aos países não produtores de sacarose a partir da cana-de-açúcar ou beterraba,

dispõem de um adoçante comparável ao açúcar invertido e, proveniente, em última análise, de materiais amiláceos.

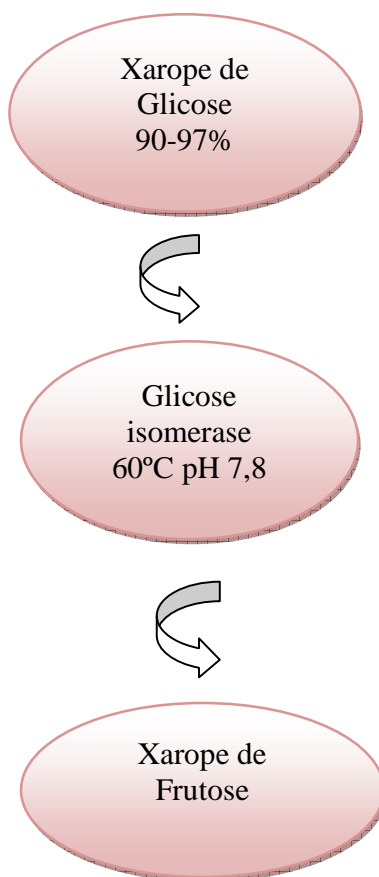


Figura 6. Fluxograma do processo de isomerização

2.4.1 Glicose isomerase

A origem microbiológica de glicose isomerase exerce influência sobre a atividade enzimática desta. PARK et al.,(1977) obtiveram glicose isomerase a partir de diferentes microrganismos. Essa enzima apresentou atividades ótimas diversas compreendidas em faixas de temperatura e de pH variando de 40 a 80°C e 5,6 a 9,0. Taka-sweet é glicose

isomerase produzida por *Microbacterium arborescens* e catalisa a isomerização de D-glicose a D-frutose. Apresenta atividade ótima a pH entre 7,2 a 7,6 e é inativada a 45°C.

Lloyd e Khaleeluddin, (1977) empregaram glicose-isomerase em solução 2M de glicose e frutose, tamponada com 20 mM de bissulfito de sódio e 5mM de sulfato de magnésio, a pH 7,3. Obtiveram, para as temperaturas de 30, 45, 60 e 70°C, ao equilíbrio, porcentagens de frutose de 46,5, 48,2, 49,9 e 52,4. Assim, concluíram que o equilíbrio estabeleceu-se acima do limite prático no qual glicose pode ser convertida em frutose, consistindo num importante resultado para produtores de xaropes contendo frutose por isomerização. Segundo esses autores a conversão de glicose em frutose foi levemente endotérmica e o calor de reação (ΔH) foi de 1080 cal/mol. D-frutose.

Outro fabricante da enzima glicose-isomerase é a Genencor. Essa empresa produz a GENSWEET GII MAX que é uma enzima imobilizada de glicose isomerase (CE 5.3.1.5. ketolisomerase D-xilose). A Gensweet apresenta a única função de produzir o xarope de frutose. A enzima é produzida a partir de uma variedade geneticamente modificada da cepa de *Streptomyces rubiginosus* que catalisa a isomerização de D-glucose a D-frutose (GENENCOR, 2011).

Apresenta coloração castanha e o tamanho das partículas são predominantemente de 300 - 1200 μ , antes de hidratação.

A adição de metabissulfito de sódio ou dióxido de enxofre ajuda a minimizar a oxidação da enzima (tabela 5). Além disso, a enzima glicose isomerase reage negativamente a presença de íons no substrato, a concentração de íons cálcio deve ser inferior a 2 ppm (GENENCOR, 2011).

A tabela 5 descreve as condições ideais para a utilização da enzima.

Tabela 5 – Recomendações de utilização da enzima Gensweet GII Max segundo o fabricante.

Substrato	Xarope de glicose 93%
Temperatura	54-60°C
pH	7,5-8.0
Ativadores	36 ppm Mg ²⁺ e 110 ppm SO ₃ ²⁻

Fonte: Genencor, 2011

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios do Centro de Raízes e Amidos Tropicais – Cerat – Unesp – Campus de Botucatu/SP. Na primeira etapa foram realizados os estudos para estabelecer o processo de hidrólise do amido de mandioca com a finalidade de se obter um xarope com alto teor de glicose. Em seguida, as pesquisas buscaram estabelecer e otimizar o processo de purificação utilizando carvão ativado e terra diatomácea como adsorventes. A segunda etapa do trabalho buscou estabelecer e definir um protocolo para utilização da enzima isomerase fixada em suporte insolúvel visando a conversão de glicose em frutose.

3.1 Matéria-Prima

Para o desenvolvimento desta pesquisa utilizou-se fécula de mandioca fornecida pela Amidos Pasquini – J.A. Pasquini & Cia Ltda/Nova Esperança-PR.

3.1.1 Caracterização da matéria prima

Foram realizadas análises físico-químicas nas amostras de fécula fornecida pela indústria.

3.1.1.1 Umidade

Os cadinhos de porcelana foram secos em temperatura de 104°C durante no mínimo 1 hora, Após o tempo percorrido, foram retirados da estufa e deixados em dessecador para esfriar durante no mínimo ½ hora. Os cadinhos vazios foram pesados e o peso anotado; em cada cadinho pesou-se aproximadamente 3g de amostra e anotou-se o peso exato do conjunto. Os cadinhos foram levados à estufa a 104°C durante 8 horas, retirou-se da estufa e deixou-se esfriar durante o mínimo ½ hora. Após o tempo percorrido, pesou-se e anotou-se o peso de cada cadinho com amostra seca e, em seguida, os cadinhos retornaram à estufa por mais 1 hora, retirou-se e foram deixados esfriar em dessecador, pesou-se novamente. A operação foi repetida até obter dois pesos constantes. Calculou-se a porcentagem de umidade através das equações 1 e 2. (AOAC, 2007).

Cálculo: *E.S.T* (Extrato Seco Total)

$$E.S.T = \frac{\text{Peso cadinho amostra seca} - \text{Peso cadinho vazio} * 100}{\text{Alíquota}} \quad \text{eq(1)}$$

$$\% \text{ umidade} = 100 - E.S.T \quad \text{eq (2)}$$

3.1.1.2 Cinzas

Os cadinhos de porcelana limpos e vazios foram calcinados, em mufla sob temperatura de 500°C durante mínimo uma hora. A temperatura foi ajustada para 200°C, para que os cadinhos pudessem ser retirados da mufla. Os cadinhos foram retirados da mufla e levados para o dessecador, em seguida anotou-se o peso de cada cadinho. Em cada cadinho pesou-se 3 g de amostra e anotou-se o peso exato do conjunto. Os cadinhos foram transferidos para a mufla ajustada para 100°C em seguida a mufla foi aquecida de 100 em 100°C até atingir 400°C mantendo a porta semi-aberta para a saída dos gases. Após o aquecimento atingir 400°C, a porta da mufla foi fechada e a temperatura elevada para 550°C, durante 2 horas. Após esse período, desligou-se a mufla, deixou-se a porta entreaberta até o resfriamento a 200°C, Retirou-se os cadinhos da mufla e foram resfriados em dessecador. Após o resfriamento os cadinhos foram pesados e seus valores anotados. Calculou-se a quantidade de cinzas através da equação 3 a seguir (AOAC, 2007).

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{Peso do cadinho} + \text{cinzas} - \text{peso cadinho vazio}}{\text{Alíquota}} * 100 \quad \text{eq(3)}$$

3.1.1.3 Proteínas

Amostras entre 0,2 e 0,3 g foram pesadas em balão de Kjeldahl ou tubo digestor de proteínas, anotando a massa exata, adicionou-se 5g de mistura digestora de proteínas, adicionou-se 4ml de ácido sulfúrico concentrado. Fez-se uma prova em branco, usando a mesma quantidade de mistura digestora de proteína e ácido sulfúrico concentrado, exceto a amostra. Colocaram-se os tubos nas cavidades do bloco digestor e ligou-se, ligou-se em seguida, a exaustão de gases da capela e aumentou-se gradativamente a temperatura do bloco digestor, deixou-se digerir em bloco digestor dentro da capela com o sistema de exaustão ligado até que o líquido estivesse límpido (azul claro ou incolor). Desligou-se o aquecimento do bloco digestor e aguardou-se até parar o desprendimento de gases, desligou-se o exaustor de gases. (repetir esta operação). O produto da digestão foi transferido para o tubo destilador, com auxílio de água destilada (material tem q estar frio), pipetou-se 10 ml da solução receptora para proteínas e transferiu-se para um erlenmeyer de 125 ml, adaptou-se o erlenmeyer à saída do condensador do aparelho de destilação de maneira que sua extremidade ficou mergulhada na solução de ácido bórico, transferiu-se para o reservatório do aparelho de destilação de micro-Kjendhal aproximadamente 30 ml de hidróxido de sódio, ajustou-se o nível de água e destilou-se 75 ml e titulou-se até a viragem da cor verde para a cor rosa, anotou-se o volume gasto. O cálculo de proteína foi calculado através das equações 4 e 5 (AACC, 2000).

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{(V - A) * 0,00014 * 100}{P} \quad \text{eq(4)}$$

$$\text{Proteína Bruta} = \% \text{ Nitrogênio} * 6,25 \quad \text{eq(5)}$$

onde:

A = Volume gasto na titulação da prova em branco

V = Volume gasto na titulação da amostra

P = Peso inicial da amostra.

3.1.1.4 Matéria graxa

Balões de fundo chato foram secos em temperatura de 104°C no mínimo por 2 horas, esfriou-se os balões em dessecador por mínimo ½ hora, pesou-se e anotou-se os pesos. Pesou-se aproximadamente 3 g de amostra (anotando a massa exata) em cartucho feito com papel de filtro comum dobrado (fechou-se a abertura do cartucho com chumaço de algodão), colocou-se o cartucho dentro de um conjunto extrator de Soxhlet e acoplou-se os balões de tara conhecida, adicionou-se sobre os cartuchos cerca de 200 ml de éter de petróleo ou o suficiente para preencher toda a parte superior do sifão e escorrer para o balão, ligou-se o aquecedor do extrator e deixou-se em refluxo durante 6 a 8 horas. Retirou-se os balões do extrator e levou-se à estufa de secagem com circulação de ar a 10°C por 2 horas, para evaporar todo o éter, retirou-se e esfriou-se em dessecador por no mínimo ½ hora e em seguida pesou-se e anotou-se os pesos. A quantidade de matéria graxa foi calculada de acordo com a equação (6) abaixo (AOAC, 2007).

$$\% \text{ Matéria Graxa} = \frac{(\text{peso balão com resíduo} - \text{peso balão}) * 100}{\text{Peso da amostra}} \quad \text{eq(6)}$$

3.1.1.5 Fibras

Foram pesadas de 2 a 5 g de amostra, anotando a massa exata, transferiu-se para o tubo digestor de fibras, acrescentou-se 200 ml de solução de H₂SO₄ a 1,25% medidos em proveta de 250 ml. Levou-se a ebulição branda por 30 minutos, retirou-se do bloco de aquecimento e filtrar em papel filtro qualitativo simples, lavou-se o material que ficou retido no papel com cerca de 500 ml de água destilada quente, transferiu-se o material retido e lavado para o mesmo tubo de digestão usado anteriormente, com ajuda de 200 ml de solução de NaOH 1,25%, medidos em uma proveta de 250ml, levou-se a ebulição branda por

30 minutos, retirou-se do bloco de aquecimento e filtrou-se em papel filtro qualitativo simples previamente seco em estufa a 105°C por pelo menos uma hora, retirado em dessecador pelo menos por 2 horas para esfriar e tarado, lavou-se o material que ficou retido no papel com cerca de 500 ml de água destilada quente. Dobrou-se o papel mais os resíduos da amostra cuidadosamente, colocou-se dentro de uma placa de petri ou vidro relógio e levou-se a estufa a 105°C até secagem completa (mínimo 8 horas), retirou-se da estufa, colocou-se em dessecador por mínimo ½ hora, pesou-se o papel com o resíduo seco e anotou-se o peso, para posterior cálculo (eq. 7) (AOAC, 2007).

$$\% \text{ Fibra Bruta} = \frac{\text{papel com resíduo seco (g)} - \text{peso do papel}}{\text{massa amostra}} * 100 \quad \text{eq(7)}$$

3.1.1.6 pH

Em um Becker de 250 ml foram pesadas 2,5 gramas de amostra, adicionou-se 100 ml de água destilada, agitou-se em agitador magnético durante 30 minutos, deixou-se em repouso por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi decantado para um frasco seco e imediatamente foi determinado o pH inserindo o eletrodo do pH-metro na amostra e girando o botão SBT na posição pH e esperando estabilizar o *displa* (AOAC, 2007).

3.1.1.7 Açúcares totais

Pesou-se próximo de 1g de amostra em um erlenmeyer anotando sua massa exata, preparou-se uma prova em branco em outro erlenmeyer com todos os reagentes exceto a amostra, adicionou-se 50 ml de água destilada, levou-se a banho de aquecimento a 65°C durante 30 minutos com agitação constante; após o tempo determinado, retirou-se do banho e resfriou-se até temperatura ambiente, transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml, completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se. Filtrou-se em papel de filtro simples, recebendo o filtrado em Becker, determinou-se o teor de açúcares redutores expressos como % de glicose, segundo o método de Somogy e Nelson da seguinte maneira: Pipetou-se 1 ml da solução da amostra diluída e transferiu-se para um tubo

de ensaio, acrescentou-se 1ml do reativo de Somogy, tampou-se com bolinhas de vidro e levou-se ao banho Maria com água em ebulição por 10 minutos, em seguida retirou-se do banho e esfriou-se ate atingir a temperatura ambiente, acrescentou-se 1 ml do reativo de Nelson e 7 ml de água destilada; homogeneizou-se em agitador de tubos Vortex, fazei-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro a 535 nm, zerando com 1ml de água destilada. O teor de açúcares totais foi determinado (eq. 8) pelo método de Somogy, adaptado por Nelson (1944).

$$\% \text{ Açúcares Totais} = \frac{A * K * 100}{\mu\text{g}} \quad \text{eq(8)}$$

onde:

A = absorbância 535 nm.;

K = Constante curva padrão de glicose

μg = massa da amostra, em microgramas presente na alíquota da reação.

3.1.1.8 Amido - Método enzimático

Pesou-se 200 mg de amostra peneirada em um erlenmeyer anotando sua massa exata, preparou-se uma prova em branco em outro erlenmeyer com todos os reagentes exceto a amostra, acrescentou-se 42 mL de água destilada e 1 mL de solução comercial de alfaamilase (Termamyl 120L) a 50% (v/v). Após estes procedimentos os erlenmeyers foram levados para o banho-maria, com agitação suave a 90°C, durante 15 a 20 minutos. Nas amostras dextrinizadas, acrescentou-se 2,5 mL de solução tampão acetato 4M, de pH 4,8 e 5 mL de solução recém preparada e filtrada de Amiloglucosidase. Levou-se os erlenmeyers com as amostras mais a prova em branco ao banho-maria com agitação contínua a 55°C por 120 minutos. Retirou-se a amostra hidrolisada e resfriada até a temperatura ambiente transferindo-a para um balão volumétrico de 250 mL, neutralizou-se com solução de NaOH a 2N, até pH entre 7 e 9 e completar o volume com água destilada. Transferiu-se 5 mL desta diluição para um balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com água destilada, filtrou-se a

solução em papel simples e dosou-se no material filtrado o teor de açúcares redutores pelo método de Somogy, adaptado por Nelson (1944), sendo feita a conversão para amido pela multiplicação da porcentagem de açúcar obtida pelo fator 0,9.

$$\% \text{ amido} = (\% \text{ A.R.T.}) * 0,9. \quad \text{Eq (9)}$$

3.1.1.9 Teor de Amilose

O teor de amilose foi quantificado utilizando-se a metodologia ISO-6647 (1987). As amostras de amido foram colocadas em frasco erlenmeyer e diluídas em 1 ml de etanol a 95% e 9 ml de NaOH 1M; a seguir os frascos foram para banho-maria por 10 minutos, resfriados e transferidos para balão volumétrico de 100 ml completando com água destilada; alíquotas de 18 ml foram colocadas em tubos de ensaio que continha 2 ml de NaOH 0,09 N e agitados; alíquotas de 5 ml foram colocadas em balão volumétrico de 100 ml que continha 50 ml de água e 1 ml de ácido acético 1M e agitado; nestes balões foram adicionados 2 ml de solução de iodo a 0,0157 N e completado com água. Os frascos foram estocados por 20 minutos em local escuro e foram realizadas leituras em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620 nm. A leitura da absorbância das amostras foram valoradas em curva padrão com os resultados expressos em porcentagem de amilose.

3.2 Enzimas

As enzimas amilolíticas α -amilase e amiluglicosidase, Liquozyme Supra 2.2x e Saczyme, respectivamente, ambas produzidas pela indústria Novozyme, foram utilizadas para hidrólise do amido e a enzima glicose isomerase imobilizada, Gensweet IGI Max, provida pela Genencor, foi utilizada no processo de obtenção do xarope de frutose.

3.3 Produção do hidrolisado

Foram utilizados 30 litros de uma solução contendo amido em suspensão aquosa a 25% (p/p). A suspensão foi tratada com enzimas amilolíticas visando à

hidrólise dos grânulos de amido para obtenção de uma solução com alta concentração de glicose como descreve os itens 3.3.1 e 3.3.2. A hidrólise foi realizada em reator de aço inox com capacidade total para 72 litros, equipado com sistema de agitação, controle de temperatura e aquecimento realizado pela jaqueta a vapor com pressão de 6 kg/cm² (Figura 7). O sistema de produção de vapor consistia de uma caldeira aquecida à gás e capacidade de 150 kg/vapor de água a 10 kg/cm².



Figura 7. Foto do reator utilizado para o processo de hidrólise.

3.3.1 Etapa de hidrólise e dextrinização

Para a hidrólise dos amidos foi utilizado a enzima α -amilase Liquozyme Supra 2.2X, encontrada na forma líquida, com densidade de $1,26\text{g mL}^{-1}$ e atividade padronizada de 300 KNU g^{-1} de enzima. Onde KNU Unidade Kilo Novo de alfa-amilase é a quantidade de enzima que decompõe $5,26\text{g}$ de amido por hora, pelo método padrão da Novozymes, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (NOVOZYME, 2008).

Esta enzima é uma endoamilase que hidrolisa ligações $\alpha(1-4)$ em amilose e amilopectina em oligossacarídeos e maltodextrinas. Para a hidrólise, a temperatura foi de $80-90^{\circ}\text{C}$ e o tempo de reação foi de 2 horas com o pH ajustado entre 5,5 a 7,0. Foram acrescentados 5 ppm de CaCl_2 como estabilizador enzimático.

3.3.2 Etapa da sacarificação

Para a sacarificação das dextrinas originária da 1ª etapa, foi utilizada a enzima Saczyme. A Saczyme é composta pela enzima amiloglucosidase, encontra-se no estado líquido, com densidade de $1,15\text{g mL}^{-1}$ e atividade padronizada de 750AGUg^{-1} de enzima. É uma exoamilase que catalisa a quebra das ligações glicosídicas $\alpha-1,4$ a partir de uma extremidade não redutora da molécula de amido.

Para a sacarificação, a temperatura utilizada foi de $30 - 45^{\circ}\text{C}$, o tempo de reação foi de aproximadamente 20 horas e o pH foi ajustado para 3,5-5,0 com HCl a 50%. A quantidade de enzima utilizada foi 750AGU/g .

Após a sacarificação, o xarope de glicose passou pelo processo de filtração a vácuo em filtro a vácuo de aço inoxidável.



Figura 8. Filtro à vácuo.

O processo de hidrólise pode ser observado no diagrama da figura 9 onde as diferentes etapas indicam a sequência de adição de enzimas.

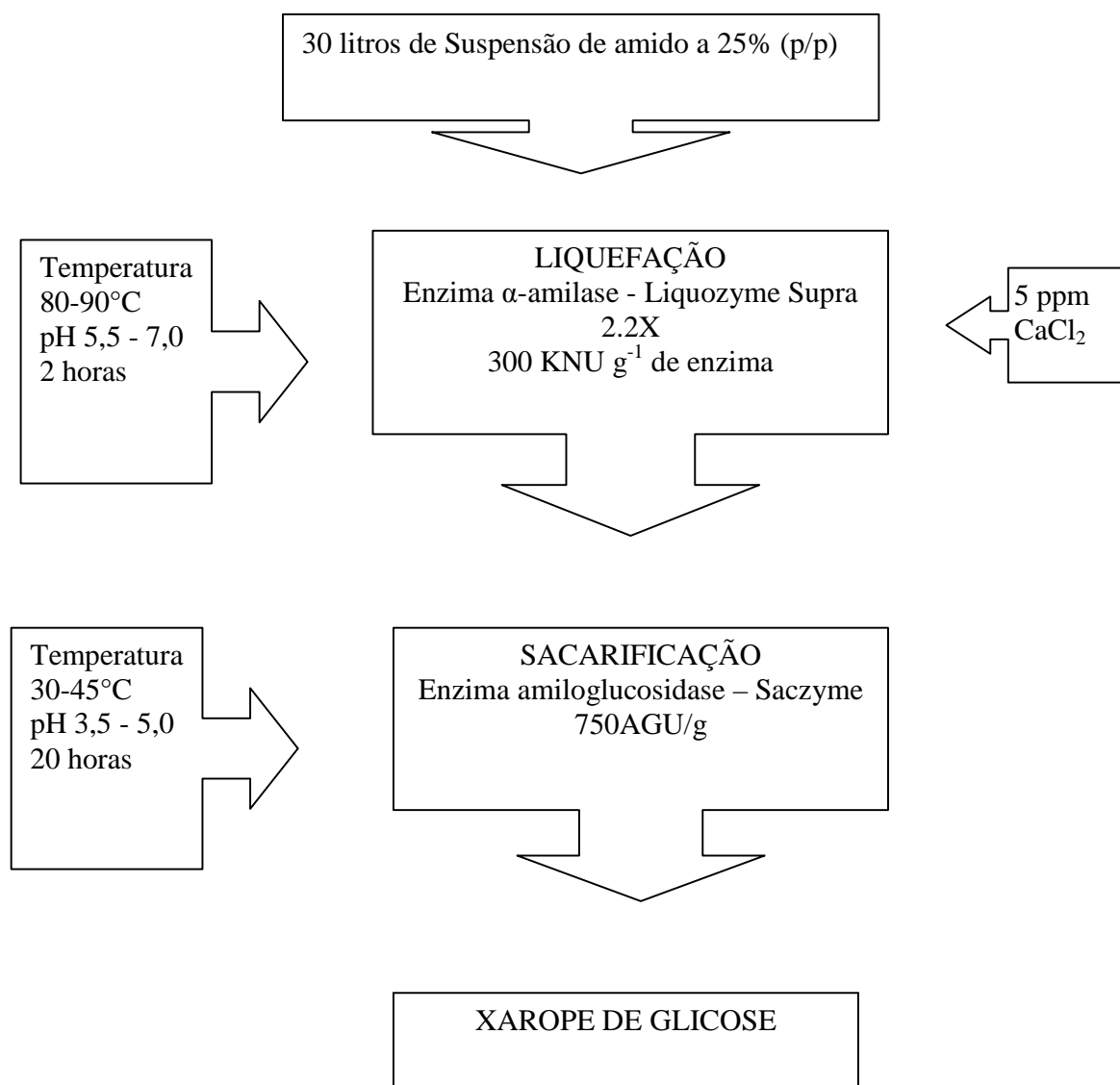


Figura 9 – Fluxograma hidrólise do amido

3.3.3 Análises do hidrolisado

Após a obtenção do hidrolisado foram realizadas as análises do material obtido, como teor de glicose, dextrose equivalente e rendimento da hidrólise.

3.3.3.1 Teor de Glicose (GOD)

A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático, pela ação da glicose oxidase. As amostras foram diluídas a concentração de 10%. Pipetou-se 20 μL da amostra em tubo de ensaio e acrescentou 20 μL do reativo de trabalho e 2 mL de água destilada. Os tubos de ensaio foram colocados em banho à 37°C por 10 minutos. Em seguida, foram feitas leituras em espectrofotômetro a 505 nm e o teor de glicose foi determinado pela equação:

$$\text{Glicose} = \text{Abs.} \times F \times \text{diluição (mg/dL)}$$

onde, Abs = leitura da absorbância a 505nm;

F = Fator de correção (100/padrão) mg/dL

3.3.3.2 Dextrose Equivalente

Para definir os valores de amido que se transformaria em glicose, foi assumida a seguinte conversão:

Quando se hidrolisa uma ligação glicosídica, ocorre à incorporação do grupo hidroxílico e do cátion hidrogênio. Estequiometricamente, cada mol de glicose produzida incorpora um mol de água.

- Considerando que:

1mol de glicose = 1mol de H_2O + massa de amido, então:

180,16g de glicose = 18g de água + 162,16g de amido ou

100g de amido teoricamente produz 111,1g de glicose.

Segundo Lloyd e Nelson (1984), um hidrolisado com alto teor de glicose apresenta concentração de glicose de 94% em peso e dextrose equivalente de 96,28%, pode-se então calcular a concentração máxima de conversão a partir do amido.

3.3.3.3 Rendimento da hidrólise

O rendimento do processo de hidrólise foi definido como a porcentagem de amido que foi removido da mandioca e transformado em glicose. Considerando a utilização

de um fator de conversão de 100%, assumir-se-á que “100,0 g de amido produzem 110,0 g de glicose”. A equação (10) ficará definida como:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{concentração de glicose produzida} \times 100}{\text{concentração de glicose teórica}} \quad \text{eq(10)}$$

3.4 Purificação do hidrolisado

O procedimento visou remover substâncias contaminantes que provocam a depreciação no produto, como também a ação catalítica da enzima glicose isomerase.

Para o experimento de purificação do hidrolisado foi utilizado terra diatomácea da marca Ciemail, do tipo CA / 500.e o carvão ativado da marca Carbomafra, do tipo 119 / 8x30.

Foram avaliadas três concentrações de terra diatomácea e carvão ativado como material para purificação do hidrolisado de amido de mandioca. As massas utilizadas foram 5, 10 e 25 g de cada material, sendo que a quantidade de hidrolisado foi de 500 ml. As alíquotas de hidrolisado foram adicionadas a erlenmeyer de 1000 ml de capacidade e adicionados carvão ativado e terra diatomácea, totalizando três erlenmeyers. Outra variável independente foi a temperatura em que os ensaios foram realizados, sendo avaliadas as temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C. Cada batelada de ensaio foi composta de três erlenmeyer com 500 ml de hidrolisado em cada, e com as variações de 5, 10 e 25 g, mantidas as quatro temperaturas indicadas.

De cada erlenmeyer, em cada tratamento, foram retiradas 50 ml de amostras nos tempos de: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 minutos decorridos em cada temperatura avaliada. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, depois foram filtradas em papel filtro qualitativo para as análises de cor em espectrofotômetro da marca Micronal modelo.B442. Como a centrifugação não foi capaz de remover todo o carvão dos substratos, foi necessária uma operação final de polimento, realizada com filtração em papel filtro especializado, com micro filtro de fibra de vidro, da marca Scheleicher e Schuell,

modelo GF50 - A, com diâmetro de 15+/- 0,15 , buscando separar o máximo possível de carvão do meio.

A leitura da cor para cada amostra retirada em cada tempo decorrido foi avaliada em espectrofotômetro a 720 nm. O aparelho foi rezado a cada leitura de uma nova amostra, utilizando água destilada. A absorbância de cada leitura foi adicionada à formula abaixo:

$$\text{Cor} = \frac{(\text{leitura da absorbância inicial} - \text{leitura da absorbância final}) \times 100}{\text{Leitura da absorbância inicial}}$$

Os resultados foram avaliados pelas análises estatísticas descritas no item 3.6.

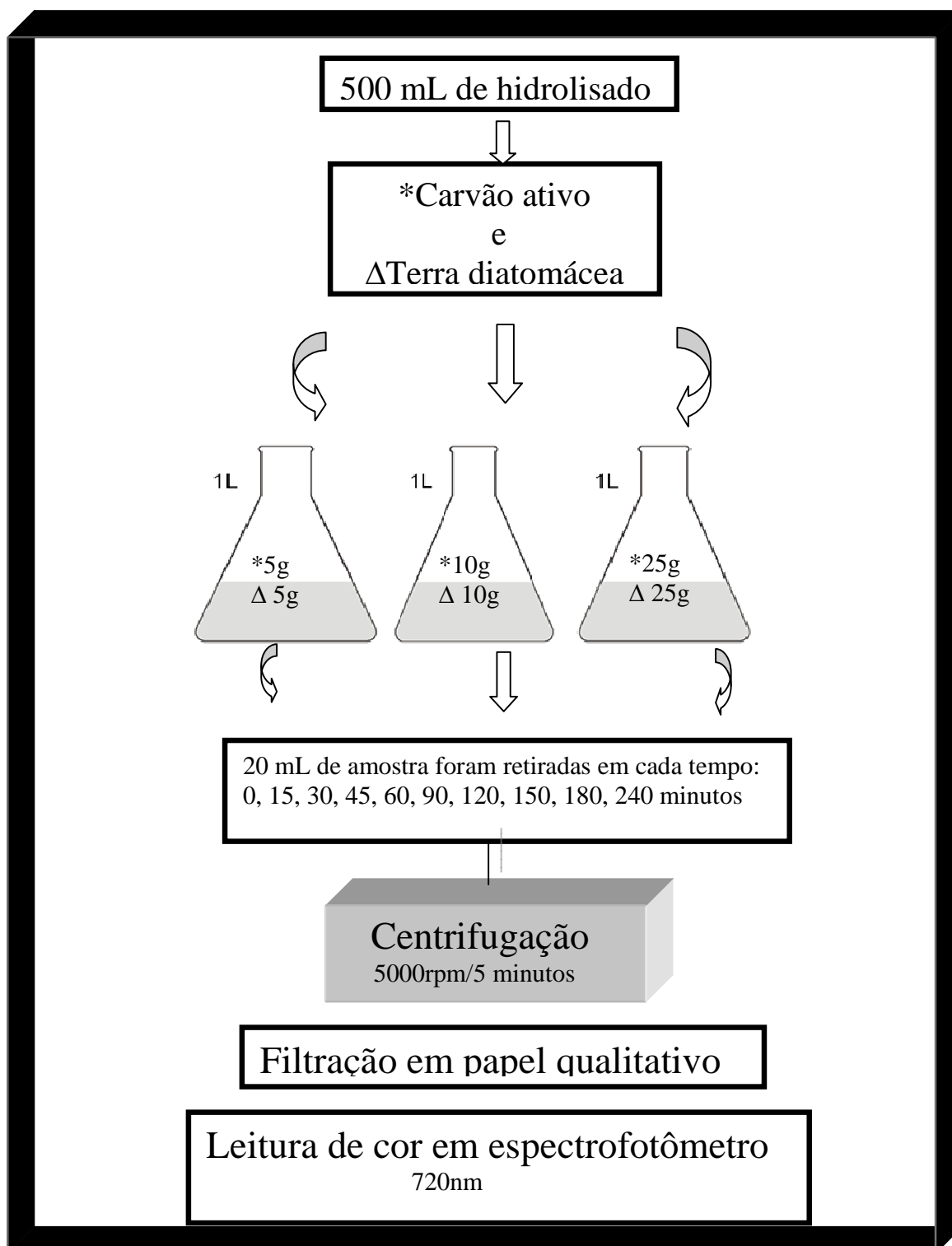


Figura 10. Fluxograma do processo de purificação do hidrolisado para as temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C e 60°C.

3.5 Isomerização

Na segunda etapa do trabalho foram realizados os ensaios para estabelecer os melhores parâmetros para a realização do processo de isomerização, buscando a conversão de parte da glicose à frutose, utilizando a enzima isomerase.

O processo selecionado para os estudos foi em sistema contínuo onde o xarope de glicose previamente purificado foi continuamente bombeado para um reator enzimático de leito empacotado em coluna de vidro com diametro de 10mm e altura de trabalho de 300 mm. Foram pesadas amostras de 10 g de enzima isomerase imobilizada em suporte inerte denominada Genswet IGI Max (CE 5.3.1.5. ketolisomerase D-xilose) que foi colocada na coluna produzindo uma altura de 150 mm. A coluna de vidro possuía uma parede de contato denominada jaqueta por onde circulava água aquecida a 60°C fornecida por um banho termostatizado de circulação modelo 12101-15, marca Cole Marmer – Polystat. Variando a velocidade de bombeamento modificava-se o tempo de residência e de contato do xarope de glicose com a enzima imobilizada o que permitiu a realização de ensaio para determinação dos parâmetros operacionais otimizados. A bomba peristáltica utilizada foi a Masterflex modelo 7518-12 (figura 11).

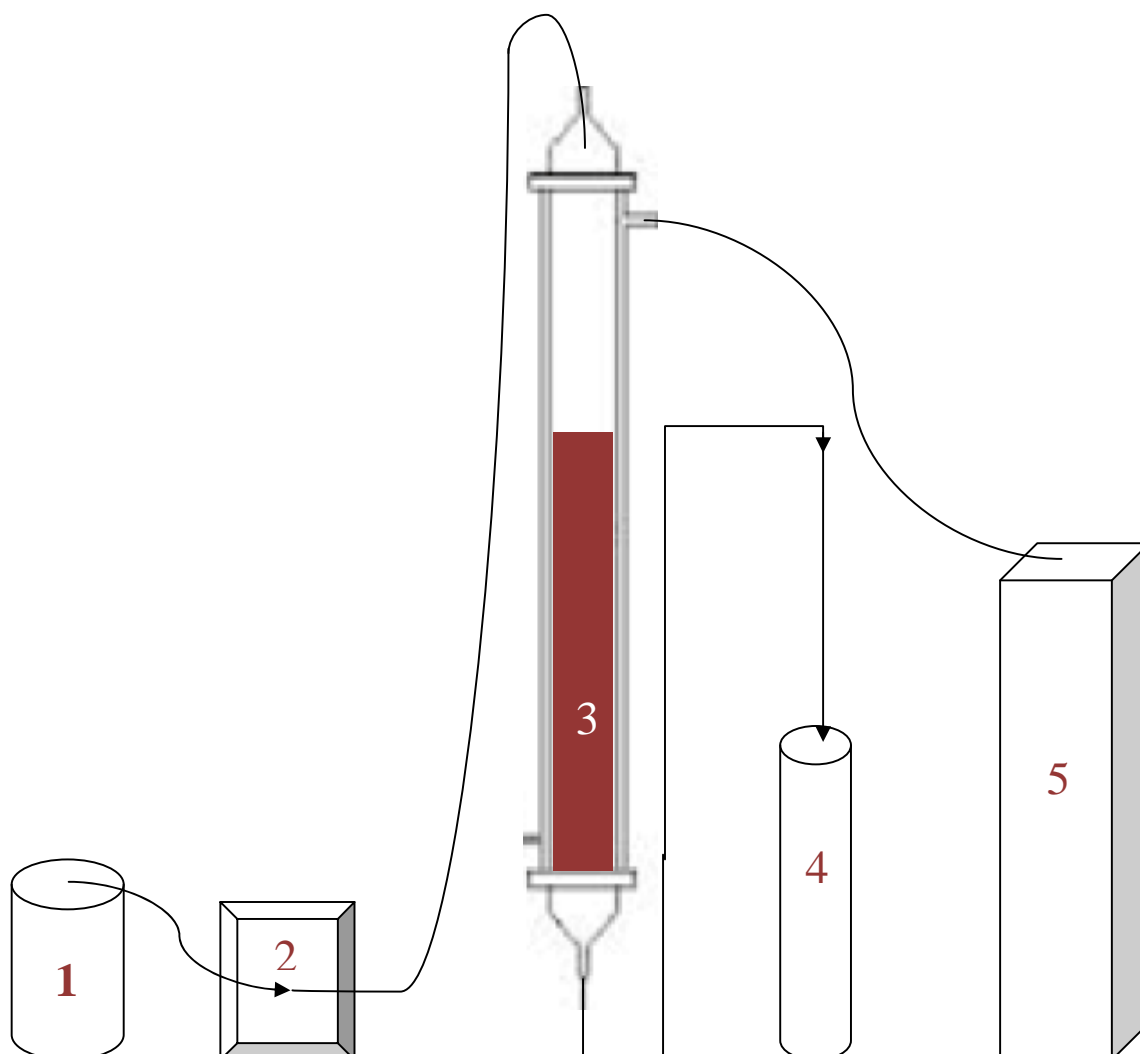


Figura 11. Esquema do processo de isomerização. 1 = reservatório de xarope de glicose; 2 = bomba peristáltica; 3 = Coluna de vidro com a enzima glicose isomerase; 4 = coletor; 5 = banho com recirculação a 60°C.

Através da figura 12 pode-se observar como foi montada a coluna para o processo de isomerização.



Figura 12. Foto da coluna utilizada no processo de isomerização

Foi escolhida uma altura do leito de permeação do xarope de glicose em 10 mL preenchidos com a enzima isomerase imobilizada. Esta altura corresponderia a um volume de 40 mL de enzima denominada “bed volum” que permitiu calcular o tempo de residência do xarope. O cálculo do “bed volum” foi obtido multiplicando a quantidade de enzima por sua densidade (10g x 0,4).

$$\text{TR (tempo de residência)} = \frac{\text{Volume de hidrolisado}}{\text{Velocidade de vazão}} = \text{minutos} \quad \text{eq(11)}$$

A Tabela 6 expõe o procedimento utilizado para se obter os tempos de residências avaliados.

Tabela 6 – Cálculo do tempo de residência

Tempo de residência em minutos	Volume da coluna/vazão	4 Tempos de Residências em minutos	Tempo total em minutos
TR20	40/8,0	5,00	20,00
TR30	40/5,5	7,30	29,20
TR50	40/3,0	13,30	53,20
TR60	40/2,6	15,38	61,52
TR80	40/2,0	20,00	80,00
TR100	40/1,6	25,00	100,00

Antes de enchimento da coluna, a enzima imobilizada foi condicionada através de um processo de hidratação:

Foram pesados 10g de enzima juntamente com os ativadores Mg^{2+} (36 ppm) e SO_3^{2-} (110 ppm), o pH foi ajustado para 7,8 com HCl e transferidos para um béquer de 500 mL contendo 80 mL de xarope de glicose purificado e mantido sob agitação com agitador de pás da marca Marconi – Banho Metabólico Dubnoff / MA-095. O béquer foi mantido em banho à temperatura de 60°C pelo tempo de 4 horas. Em seguida a enzima foi transferida para a coluna. O xarope de glicose utilizado no processo de hidratação foi descartado para inicializar o processo de isomerização com um novo xarope de glicose.

3.5.1 Cálculo do xarope de frutose obtido

A quantidade de frutose obtida após o processo de isomerização foi realizada pela diferença entre os resultados de glicose – oxidase inicial e final ($GOD_I - GOD_F$). A metodologia da análise de glicose-oxidase foi descrita no item 3.3.3.1.

3.6 Análise estatística

3.6.1 Processo de purificação do hidrolisado

Determinação de um parâmetro para representar a tendência máxima de Z (onde Z = % de cor), como mostra a Figura 12.

$$Z = ((\text{leitura da absorb\^ancia inicial} - \text{leitura da absorb\^ancia final}) / \text{leitura da absorb\^ancia inicial}) \times 100 \quad \text{eq (12)}$$

O m\^etodo da regress\^ao segmentada (Portz et al, 2000) foi utilizado para determina\^cao da reta horizontal de quadrados m\^inimos ajustada aos dados superiores (z %). A estimativa do par\^ametro (l) foi determinada para cada repeti\^cao de cada tratamento em combina\^cao dos fatores temperatura e concentra\^cao, utilizando-se 10 pontos no tempo. Foram realizadas as an\^alises 1 e 2.

An\^alise 1: Estabelecimento de uma superf\^icie de resposta para verificar a influ\^encia das vari\^aveis temperatura e concentra\^cao nas estimativas do par\^ametro horizontal (l) das medidas z. Foi utilizado o "proc rsreg" do SAS. O objetivo foi verificar qual a combina\^cao da temperatura versus concentra\^cao que leva a valores de z m\^aximo.

An\^alise 2: An\^alise de vari\^ancia e teste Tukey para compara\^cao de m\^edias das estimativas do par\^ametro (l) conforme os tratamentos. Valores de z. Foi utilizado o "proc glm" do SAS. O objetivo foi verificar qual a combina\^cao da temperatura versus a concentra\^cao menor poss\^ivel. Embora as superf\^icies de resposta mostrem os valores extremos (z m\^aximo) pode haver combina\^coes com outros valores que n\^ao difiram significativamente dos extremos.

3.6.2 Processo de isomeriza\^cao

Para identificar os melhores par\^ametros operacionais visando a obten\^cao de xarope de glicose rico em frutose, foram realizados ensaios com 6 diferentes tempos de resid\^encia no reator com 3 diferentes concentra\^oes m\^assicas de xarope de glicose, num total de 18 ensaios mantendo fixa a temperatura na coluna em 60°C. Foram avaliados os tempos de resid\^encia (TR) variando-os de 20, 30, 50, 60, 80 e 100 minutos e as concentra\^oes m\^axima de xarope de glicose de 18%, 24% e 30%.

Tabela 7 – Variáveis independentes e dependentes utilizadas no planejamento experimental.

<i>Variáveis Independentes</i>	<i>Variáveis dependentes</i>
Concentração de xarope de glicose purificado Tempo de residência do reator de coluna	Concentração de frutose

Tabela 8 – Níveis de variáveis no planejamento experimental de isomerização

<i>Variável independente</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Unidade</i>	A		
			<i>Níveis</i>		
			-1	0	+1
conc. xarope glicose purificado	C	%	18	24	30
Tempo de residência no reator	TR	Minutos	20	30	50
Tempo de residência no reator	TR	Minutos	60	80	100

A determinação dos parâmetros operacionais para obtenção de frutose foi definida mediante modelo estatístico, que simulou o processo de isomerização em coluna, utilizando um delineamento central composto rotacional (DCCR) 18, mais 3 ensaios axiais e 6 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 9. Os pontos centrais (0) servem para estimar o erro experimental e determinar a precisão da equação polinomial. Os pontos axiais ($\pm\alpha$) são utilizados para a ampliação do modelo linear, tornando-o um modelo quadrático (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003).

Tabela 9 – Planejamento experimental completo com pontos centrais e axiais

Ensaio	<i>Variáveis codificadas</i>		<i>Variáveis reais</i>	
	X_1	X_2	Concentração Xarope	Tempo Residência
1	-1	-1	18	20
2	-1	0	18	30
3	-1	1	18	50
4	-1	-1	18	60
5	-1	0	18	80
6	-1	1	18	100
7	0	-1	24	20
8	0	0	24	30
9	0	1	24	50
10	0	-1	24	60
11	0	0	24	80
12	0	1	24	100
13	1	-1	30	20
14	1	0	30	30
15	1	1	30	50
16	1	-1	30	60
17	1	0	30	80
18	1	1	30	100

Através do presente estudo foi possível obter modelos estatísticos capazes de prever o comportamento das variáveis dependentes (respostas) em função das variáveis independentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da matéria-prima

As análises de caracterização do amido utilizado estão expostas na Tabela 10.

Tabela 10 – Caracterização físico-química da fécula de mandioca

Análises (%)	Amido em estudo
Umidade	13,84
Amido	97,15
Amilose	18,74
Matéria graxa	0,17
Proteína	0,15
Fibras %	0,35
Açúcares solúveis totais	0,9
Cinzas	0,11
Acidez	1,30
pH	5,90

Legenda: -* - sem informação

De acordo com a Tabela 10, observa-se que os teores encontrados na fécula de mandioca podem ser comparados com resultados obtidos por Coutinho (2007) que

obteve umidade de 9,61%, matéria graxa de 0,13%, proteína de 0,16%, amido de 96,44 %, amilose de 18,61%, fibras de 0,14%, açúcares solúveis totais de 0,11%, cinzas de 0,09% e pH de 5,91. Como se pode observar, a composição do amido de mandioca é excelente matéria-prima para hidrólise e conseqüente aproveitamento na indústria de alimentos.

Segundo a ABAM (Associação Brasileira dos produtores de Amido de Mandioca), e a Instrução Normativa nº 23 de 14 de dezembro de 2005, o amido pode ter o máximo de 14% de umidade, pH de 4,5-6,5, e cinzas de 0,12%. O valor de umidade encontrado no amido em estudo (13,84%) é justificado pela embalagem de 50 Kg em que o amido foi armazenado. O manuseio da embalagem pode ter provocado o aumento da umidade. O valor do pH encontrado no amido em estudo, de 5,9, esteve de acordo com o padrão da ABAM, assim como o valor de pH 5,91 encontrado por Coutinho (2007).

Os valores de cinza (0,11%) estão equivalentes aos valores encontrados pela ABAM e por Coutinho (2007), 0,12% e 0,09%, respectivamente.

O teor de amilose no amido é conhecido por afetar suas propriedades funcionais como a gelatinização, retrogradação, empastamento, inchamento e susceptibilidade enzimática e seu teor é diferente em determinada época de colheita da planta. O teor de amilose encontrado foi de 17,36, muito próximo ao valor encontrado por Coutinho (2007).

4.2 Hidrólise

Os resultados obtidos nas seis repetições de hidrólises, em média, estão descritos na Tabela 11. As hidrólises de amido foram desenvolvidas com 25% de matéria seca, que indica a concentração de 24,93% de amido.

Tabela 11 – Valores médios das análises do hidrolisado

(%)	Hidrolisado
Glicose Oxidase (GOD)	24,93
Rendimento	89,39

Considerando o valor teórico da glicose de 27,77% (onde 100g de amido teoricamente produz 111,1g de glicose), foram calculados os valores de rendimento do processo de conversão do amido para glicose.

Através dos resultados obtidos no processo de hidrólise pode-se constatar que a concentração de glicose está coerente com concentrações teóricas obtidas através de cálculos de rendimento teórico de glicose a partir da quantidade de amido analisada. Lembrando que o fracionamento do amido em cadeias menores é acompanhado pela adição de uma molécula de água em cada ligação rompida, o que acarreta aumento do peso de amido fracionado e, conseqüentemente, um aumento do rendimento, mais 2,1g de açúcares presentes na mandioca, o que representa um rendimento teórico de 27,7% açúcares disponíveis para isomerização. Portanto, com o resultado médio obtido de 24,93%, o rendimento alcançou o valor de 89,39%, o que caracteriza um bom processo de sacarificação.

A formação de dextrinas se dá a partir da quebra das ligações α -1,4 da molécula de amido, aleatoriamente, pelas enzimas denominadas α -amilases. Essas enzimas atuam ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando malto-oligossacarídeos (dextrinas). Os principais produtos de hidrólise do amido pela ação das α -amilases são maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltose e glicose. Após a atuação da α -amilase, o meio de reação demonstrou-se menos viscoso devido ao rompimento dessas estruturas que compõem o amido.

Segundo Parker, Salas e Nwosu (2010), a concentração limite para produção de xarope de frutose está em torno de 40 a 50% de matéria seca, sendo que, a eficiência da hidrólise diminui com o aumento da matéria seca. Com isso, utilizou-se a concentração de 25% e, posteriormente, o xarope de glicose obtido passou pelo processo de concentração por vaporização. Romàn (2008) descreve o processo de obtenção de xarope de frutose partindo de uma concentração de 25%, concentrando o xarope a 40-50% para obter o mínimo de 42% de conversão. O autor descreve que o xarope ideal é o de 55% de frutose, onde o poder edulcorante é igual ao da sacarose. Esse valor é obtido por separação dos açúcares em cromatografia.

4.3 Purificação do hidrolisado

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos através do experimento de purificação do hidrolisado de amido de mandioca, utilizando carvão ativo e terra diatomácea como adsorventes.

Foi averiguada qual a combinação de temperatura e concentração de substrato que levava a valores de z máximo, maior porcentagem de cor . Com isso, foram obtidos os resultados para temperatura = 60,61 e concentração = 18,69, obteve-se z máximo = 96,5874.

Tabela 12. Valores médios das estimativas do parâmetro (l) conforme a combinação temperatura x concentração.

Médias z Temp\Conc	conc 5	conc 10	conc 25
30	73,4137 bB	76,8497 bAB	80,0294 bA
40	76,5590 bB	86,2057 aA	88,8403 aA
50	90,3334 aA	93,0465 aA	92,2189 aA
60	89,0869 aA	91,8048 aA	95,9561 aA

Letras minúsculas comparam médias de temperatura e maiúsculas, de concentração.

CV = 3,84 %

Os resultados das análises mostraram que para z, as melhores combinações foram temperatura de 50°C e concentração de 5g, ou temperatura de 40°C e concentração de 10g. Através dos resultados obtidos foram realizadas as análises descritas nas tabelas 13 e 14.

Tabela – 13. Análise de variância da regressão linear para o tratamento 1 do ensaio de purificação do hidrolisado.

	GL	SQ	QM	F Valor	Pr >F
Regressão Linear	1	6000,14	6000,14	332,23	<0,0001
Resíduo	25	451,49	18,05		
Total	26	6451.64			

Onde: GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio.

De acordo com a Tabela 13 observa-se que o modelo de regressão linear adotado foi significativo. O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,93.

Tratamento 1 $y = 37,76 + 0.25298520 x$

Onde o y = Valores de z (%)

x=tempo (minutos)

Tabela – 14. Análise de variância para o tratamento 2 do ensaio de purificação do hidrolisado.

	GL	SQ	QM	F Valor	Pr >F
Regressão Linear	1	7005.31	7005.31	703.88	0,0001
Resíduo	25	248.81	9.95		
Total	26	7254.12			

Onde: GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio.

Coefficiente de Correlação $R^2 = 0,96$

Equação de regressão

Tratamento 2 – $y = 43,87 + 0,2733 x$

Pesquisas envolvendo a avaliação de métodos alternativos como o processo de adsorção de cor em diversos tipos de adsorventes vêm sendo desenvolvidas. O carvão ativado é comumente usado como adsorvente devido à alta eficiência e o baixo custo.

Maldonado (2006) utilizou a técnica de clarificação escolhida por Treichel (2004), que consistiu em misturar o substrato, água de maceração de milho, a ser clarificado com carvão ativo. O autor avaliou a mistura com 8,0% de carvão ativo e a amostra foi submetida a tratamento a 65°C e 150 rpm por 1 hora. Em seguida, a mistura foi submetida à filtração o vácuo.

A maioria das pesquisas realizadas com carvão ativo e terra diatomácea são feitas para avaliar a remoção de cor de efluentes indústrias têxtil visando à necessidade de preservar os recursos naturais. Os resultados para esse tipo de análise sempre são satisfatório, comprovando as pesquisas. Os adsorventes avaliados neste experimento obtiveram sucesso na remoção de cor do xarope de glicose. Os resultados obtidos mostraram alta capacidade de adsorção de materiais complexos colorantes, como ocorre em xaropes de açúcar.

4.4 Resultados do processo de isomerização

Foram realizados ensaios para identificar os melhores parâmetros operacionais visando à obtenção de xarope de glicose rico em frutose.

Os resultados obtidos nos ensaios estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados dos ensaios da concentração de glicose expressos em porcentagem, após tratamentos em reator enzimático de conversão a frutose.

Concentração de glicose (%)	Tempo de Residência(minuto)					
	20	30	50	60	80	100
18	15,8	12,7	12,5	13,0	9,3	13,8
24	18,9	17,2	15,5	16,3	12,9	18,0
30	21,9	21,0	18,1	22,9	16,6	21,0

Os resultados das concentrações de glicose evidenciados na Tabela 15 demonstram que quanto maior o tempo de residência avaliado neste experimento, menor a porcentagem de glicose, indicando que a ação enzimática necessita de maior tempo de contato com a glicose.

Dentre as concentrações de glicose inicial, a concentração de 30% destacou-se pela maior porcentagem de redução de glicose no tempo de residência 50, reduziu de 29% para 18,1%. Contudo, os resultados obtidos, não foram suficientes para avaliar o desempenho da enzima glicose isomerase.

Romàn (2008) descreve que a melhor concentração para a isomerização está entre 40-50% de matéria seca, porém, nessa concentração, a maior densidade do xarope provavelmente interfere no desempenho da isomerização, pois há um acúmulo de dextrinas remanescente na coluna de isomerização, dificultando o acesso do xarope de glicose à enzima glicose - isomerase.

A concentração de 18% de glicose inicial não obteve boas taxas de redução de glicose. Provavelmente a baixa concentração de glicose não estimula a atividade da enzima glicose isomerase, gerando baixa conversão de glicose para frutose. A concentração de 24% de glicose inicial mostrou-se semelhante à concentração de 30%, onde obteve maior destaque em relação às três concentrações em estudo.

Salcedo, Pontes e Pajaro (2009) obtiveram 45,33 gramas de frutose por litro de xarope de frutose obtido pelo processo de isomerização enzimática quando utilizou 10% de amido inicial e em um tempo de residência de 20 minutos. A porcentagem de

conversão encontrada pelo autor foi cerca de 40%, a menor obtida durando o estudo que avaliou concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50% de amido inicial.

Tabela 16 – Resultados das análises de porcentagens de conversão, utilizando a enzima glicose isomerase e obtidos pelo cálculo de diferença entre a análise de glicose oxidase inicial e final.

Concentração de glicose como 100%	Tempo de residência(minutos)					
	20		30		50	
	<i>Glicose</i>	<i>Frutose</i>	<i>Glicose</i>	<i>Frutose</i>	<i>Glicose</i>	<i>Frutose</i>
18	92,9	7,1	74,7	25,3	73,5	26,5
24	75,9	24,0	69,1	30,9	62,2	37,7
30	75,2	24,7	72,2	27,8	62,2	37,8

A atividade enzimática da enzima glicose - isomerase foi determinada através da quantificação da glicose convertida durante a reação enzimática.

Foram adotados os resultados das análises de glicose oxidase (GOD) das concentrações dos xaropes (18, 24 e 30), como 100% de conversão, em seguida foram realizados os cálculos para obtenção de frutose pela diferença. Estes dados estão dispostos na Figura 15.

Segundo Parker, Salas e Nwosu (2010), o ideal para a indústria é a obtenção de 44% de frutose e esse valor não foi alcançado em nenhum tempo de residência avaliado.

No tempo de residência de 30 minutos, as três concentrações de glicose apresentaram comportamentos semelhantes. Apresentaram baixos valores de conversão de glicose a frutose. Com isso, pode-se observar que houve a necessidade de estudar maiores tempos de residências. O tempo de residência de 50 minutos não foi suficiente para avaliar as três concentrações de glicose em relação a atividade enzimática da enzima glicose isomerase.

Comercialmente as indústrias estabeleceram três categorias de xarope de frutose para ofertar às indústrias de alimentos. São HFCS 42%, HFCS 90% e HFCS-55% (PARKER, SALAS E NWOSU, 2010)

Em nenhum ensaio realizado nos tempos de residência 20, 30 e 50 minutos foram encontrados valores semelhantes aos estabelecidos pelas indústrias de

alimentos, porém nota-se que os valores que mais se aproximaram das três categorias de xarope de frutose, foram realizados com os maiores tempos de residências.

Na Tabela 17, encontram-se os resultados das porcentagens de conversão de glicose a frutose.

Tabela 17 – Resultados das análises de porcentagens de conversão, utilizando a enzima glicose isomerase.

Concentração de glicose como 100%	Tempo de residência (minutos)					
	60		80		100	
	Glicose	Frutose	Glicose	Frutose	Glicose	Frutose
18	76,47	23,53	54,70	45,30	55,42	44,57
24	65,46	34,53	51,80	48,20	72,28	27,71
30	78,96	21,04	57,24	42,75	72,41	27,58

No tempo de residência 80 e a 30% de glicose inicial, o valor de frutose obtido, 42,9% e 57% de glicose, aproximaram-se do xarope de frutose comercial que é conhecido por HFCS-42 (42% frutose e glicose 58%). Esta é a categoria apresenta ligeira doce e não mascaca o sabor natural dos alimentos, sendo utilizada em frutas em conserva, molhos, sopas, produtos de panificação e também pela indústria de laticínios (PARKER, SALAS E NWOSU, 2010).

Díaz, Márquez e Salcedo (2007) estudaram a produção do xarope de frutose obtido através do processo de hidrólise de amido de inhame em cinco concentrações, 10, 20, 30, 40 e 50 % (p/v), e posterior conversão de glicose para frutose utilizando a enzima glicose-isomerase. Os melhores resultados foram para as concentrações de 20 e 30% de amido p/v, corroborando aos resultados demonstrados na Tabela 18. A porcentagem de conversão encontrada pelos autores foi de 64,04% e 74,93% para 20 e 30% de amido inicial, respectivamente.

As conversões obtidas para as variedades de mandioca estudadas por Salcedo, Pontes e Pajaro (2009) no ensaio de 50% de amido inicial mostram valores acima de 46% de conversão, estas porcentagens são maiores que as obtidos por Blanco (2002) que obteve uma porcentagem de conversão de 46,5% em 12h de reação e a 45,5% a 48horas.

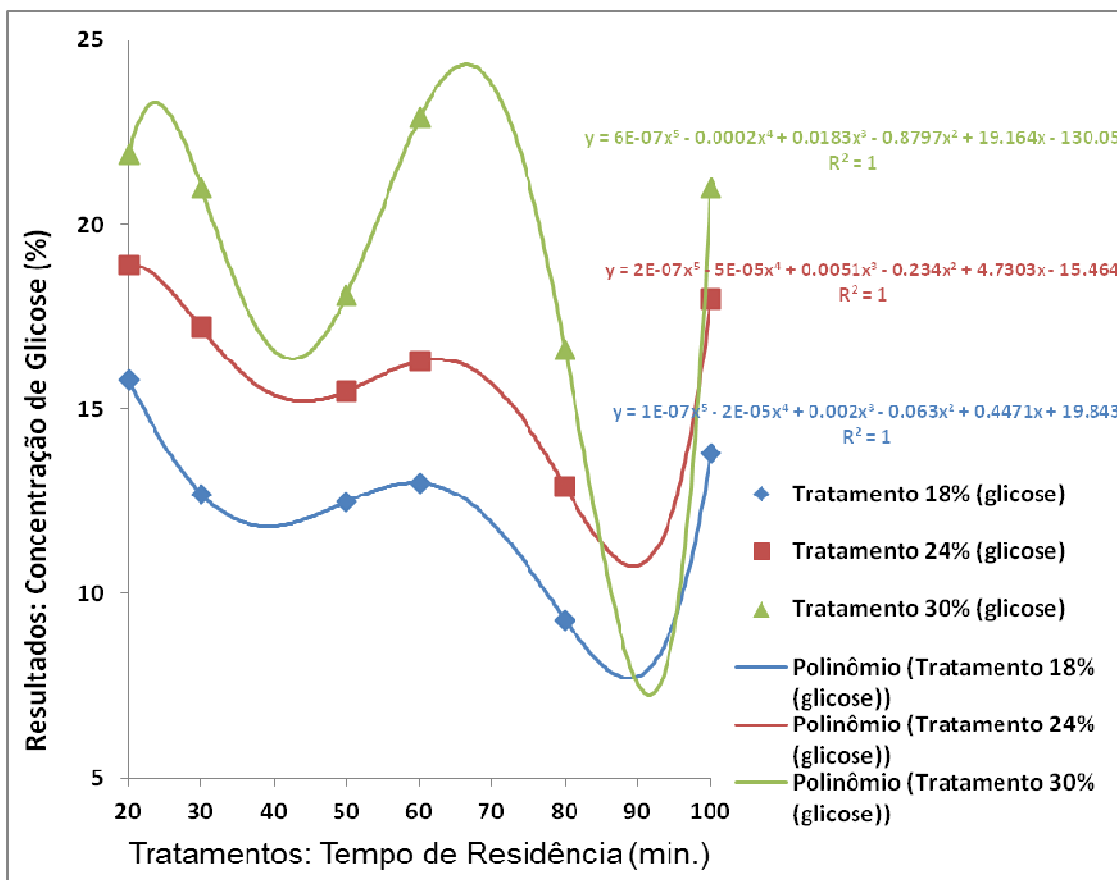


Figura 13 – Gráfico dos comportamentos da concentração de glicose em relação ao tempo de residência.

Através do Gráfico 13 observa-se que a melhor produção de frutose foi obtida quando utilizado o tempo de residência de 80 minutos na concentração de 24% de glicose inicial. Os valores de frutose obtidos nos tempos de residência 60 e 100 minutos foram menores que o valor obtido no TR 80, proporcionalmente.

As três concentrações de glicose inicial desenvolveram os mesmos comportamentos em relação aos tempos de residências.

No tempo de residência de 60 minutos, a concentração de 24% mostrou a maior redução de glicose, já nos tempos de residência 80 e 100 minutos, a concentração de 30% foi a que mostrou maior redução, sendo assim, maior conversão de glicose à frutose. Segundo Salcedo, Pontes e Pajaro (2009), a concentração de 30% de amido p/v é a mais

indicada para a obtenção de frutose por isomerização. Contudo, Uribe et. al.,(2008) obteve 41,3% de conversão utilizando 20% de amido de plátano (*Musa paradisiaca* L) p/v.

Salcedo, Pontes e Pajaro (2009) desenvolveram um estudo para avaliar a melhor concentração de amido inicial para a produção do xarope de frutose de amido de mandioca, através da conversão pela enzima glicose isomerase. As concentrações estudadas foram de 10, 20, 30, 40 e 50% de amido p/v, e manteve fixa a temperatura em 58-60°C, pH ajustado para 7,5, velocidade de fluxo de 2ml por minuto (TR80), tempo de avaliação foi de 15 horas, e amostras foram retirada a cada uma hora. Ao final do experimento, os autores obtiveram os melhores resultados de conversão quando avaliado a concentração de 30% de amido inicial, alcançando o valor de 212,33 gramas de frutose por litro de xarope, ou seja, segundo o autor, 72% da glicose foi convertida à frutose através do processo de isomerização nas condições estudadas.

No tempo de residência 60, a velocidade estava em 2,6 minutos por ml, podendo ser mais rápido que o necessário para a enzima, já no TR100, a velocidade de fluxo foi de 1,6, mostrando resultados de um fluxo mais lento que o necessário. Contudo, através dos resultados obtidos, o fluxo em 2ml (TR80) por minuto mostrou-se sendo o mais indicado nas condições de trabalho estudadas. Esse resultado foi confirmado por Salcedo, Pontes e Pajaro (2009) que fixaram a velocidade do fluxo em 2ml por minuto e estudou a variação de concentração de amido inicial para duas variedades de mandioca obtidas encontradas na Colômbia, alcançando valores de 72,00 e 74,93% de conversão de glicose à frutose nas duas variedades de mandioca estudada.

5. CONCLUSÃO

Dentro das combinações experimentais trabalhadas, os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Através dos resultados obtidos no processo de hidrólise pode-se constatar que a concentração de glicose está coerente com concentrações teóricas obtidas através de cálculos de rendimento teórico de glicose a partir da quantidade de amido analisada. Com o resultado médio obtido de 24,93%, o rendimento alcançou o valor de 89,39%, o que caracteriza um bom processo de sacarificação.
- Para a melhor purificação do hidrolisado de amido de mandioca são necessários 500 mL de hidrolisado com 5 gramas de carvão atido, 5 gramas de terra diatomácea, à temperatura de 50°C pelo tempo de 102,5 minutos
- Para obtenção da maior conversão de glicose à frutose pela enzima glicose isomerase, em xarope de glicose oriundo da hidrólise do amido de mandioca, são necessários 24 % de glicose inicial e um tempo de residência de 80 minutos.

6. REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTRY. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemistry**. 10. ed. St. Paul, 2000. v. 1.

ANINDYAWATI, T.; ANN, Y. G.; ITO, K.; IZZUKA, M.; MINAMIURA, N. Two kinds of novel α -glucosidases from *Aspergillus awamori* KT-11: their purifications, properties and specificities. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 85, n. 5, p. 465-469, 1998.

AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Studies on a thermostable α - amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Ribeirão Preto, v. 61, p. 323–328, 2003.

AQUINO, A. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. Thermostable lucose-tolerant glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Folia Microbiologica**, Ribeirão Preto, v. 46, n 1, p. 6-11, 2001.

ASGHER, M.; ASAD, M. J.; REHMAN, S.; LEGGE, R. L. A thermostable α - amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. **Journal of Food Engineering**, Faisalabad, v. 79, n. 3, p. 950-955, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA. Características físico-químicas do amido de mandioca. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/includes/index.php?menu=2&item=6>>. Acesso em: 17 maio 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA. Segmentação do mercado de amido de mandioca - Ano 2009. Disponível em: <http://www.abam.com.br/includes/index.php?link_include=menu2/mercado_2009.php&menu=2&item=3>. Acesso em: 17 maio 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTRY. **Official methods of**

analysis. 18. ed. Washington, DC, 2007. chap. 32, p. 66.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2003. 299 p.

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Biocatalysis and Biotransformation**, Hamburg, v. 6, p. 151-160, 2002.

BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food constituents. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, Winnipeg, v. 69, n. 1, p. 60-78, Jan. 1991.

BRASIL. Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. Aprova normas técnicas especiais à produção de alimentos e bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção 1.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis: mini review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 23, p. 85-112, Aug. 1998.

BUNNI, L.; McHALE, L.; McHALE, A. P. Production, isolation and partial characterization of an amylase system produced by *Talaromyces emersonii* CBS 814.70. **Enzyme and Microbial Technology**, Dublin, v. 11, p. 370-375, 1989.

BURHAN, A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. **Process Biochemistry**, Adana, v. 38, p. 1397-1403, 2003.

CARVALHO, G. B. M. **Utilização de carvão ativo, resinas e terra diatomáceas para o tratamento do hidrolisado de eucalipto na produção de biotecnologia de xilol**. 2005. 110f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)-Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo: Fundação Cargill, 1, 2001. p. 221. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, n. 1).

CHRONAKIS, I. S. On the molecular characteristics, composition properties, and structural – functional mechanisms of maltodextrins: a review. **Critical Reviews in Food Science**, Lund, v. 38, n. 7, p. 599-637, 1998.

CIACCO, C. F.; CRUZ, R. **Fabricação de amido e sua utilização**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1981. v. 7.

COUTINHO, A. P. C. **Produção e caracterização de maltodextrinas a partir de amidos de mandioca e batata-doce**. 2007. 137 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

DE PAULA, F. C. **Imobilização da inulinase de *kluveromyces marxianus var. ulgaricus* atcc 16045**: caracterização e produção de açúcar invertido em biorreator. 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

EMBRAPA. Cultivo da mandioca. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/>>. Acesso em: 23 jun. 2011.

EMBRAPA. Cultivo da mandioca para o Estado do Amapá: importância econômica. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_amapa/importancia.htm>. Acesso em: 23 jun. 2011.

EZEJI, T. C.; BAHL, H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate: resistant α - amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. **Journal of Biotechnology**, Rostock, v. 125, n. 1, p. 27-38, 2006.

FRANCO, C. M. L. et al. Propriedades do amido. In: **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, 2001. v. 1.

GENENCOR DIVISION. Fichas técnicas dos produtos. Disponível em: <<http://www.genencor.com>>. Acesso em: 14 jan. 2011.

GOMES, I.; GOMES, J.; STEINER, W. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. **Bioresource Technology**, Dhaka, v. 90, p. 207-214, 2003.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termófilo *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas**. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

GOTO, C. E.; BARBOSA, E. P.; KISTNER, L. C. L. ; GANDRA, R. F. ; ARRIAS, V. L.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus fumigatus*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 99-103, 1998.

GROSS LS, L. I. L, FORD, E. S.; SIMIN, L. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 5, p. 774-779, 2004.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α - amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, New Delhi, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

- GUZMÁN, M. H.; PAREDES, L. O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Celaya, v. 36, n. 5, p. 373-403, 1995.
- HATA, Y.; ISHIDA, H.; KOJIMA, Y.; ICHIKAWA, E.; KAWATO, A.; SUGINAMI, K.; IMAYASU, S. Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-satate culture (Koji) and in submerged culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Kyoto, v. 84, n. 6, p. 532-537, 1997.
- HENRY, G. Cassava starch: case study: Europe. In: IDRC/IFAD. **Global cassava market study: business opportunities for the use of cassava**. Ontario, 1999. p. 184.
- HERNÁNDEZ, M. S.; RODRÍGUEZ, M. R.; GERRA, N. P.; ROSÉS, R. P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 73, p. 93-100, 2006.
- HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a Review. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 45, n. 3, p. 253- 267, jul. 2001.
- HORVÁTHOVÁ, V.; JANECEK, S. E.; STURDÍK, E. Amilolytic enzymes: their specificities, origins and properties. **Biologia/Bratislava**, Zaragoza, v. 55, n. 6, p. 605- 615, 2000.
- JACOBS, H.; DELCOUR, J. A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 8, p. 2895-2904, Aug. 1998.
- JAMES, J. A.; LEE, B. H. Glucoamylase: microbial sources, industrial applications and molecular biology: a review. **Journal Food Biochemistry**, Westport, v. 21, p. 1-52, 1997.
- KNIGHT, I. M.; MAZZIEIRO, G. Aplicação das enzimas amilolíticas em panificação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 72, p. 35-46, 2000.
- LEMOS, C. M.; FUCHS, E.; GOMES, E.; SILVA, R. Glucoamilase: estrutura e termoestabilização. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Rio Claro, v. 31, p. 86-94, 2003.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Physicochemical characterization of some starchy tubers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, jan./abr. 2002.
- LÉVÊQUE, E.; JANECEK, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 3-14, 2000.

- LLOYD, N. E.; KHALEELUDDIN, K. A kinetic comparison of *Streptomyces* glucose isomerase in free solution and adsorbed on DEAECellulose. **Cereal Chemistry**, Orlando, v. 58, n. 2, p. 230-282, 1974.
- LOURENÇO, M. C. **Desenvolvimento de processo contínuo de obtenção de frutose a partir de sacarose**. 2004. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- MALDONADO, R. R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. 2006. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.
- MELANSON, K. J.; ZUKLEY, L.; LOWNDES, J.; NGUYEN, V.; ANGELOPOULOS, T. J.; RIPPE, J. M. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose consumption on circulating glucose, insulin, leptin, and ghrelin and on appetite in normal-weight women. **Nutrition**, Kingston, v. 3, n. 2, p. 103-112, 2007.
- MORO, A. L. **Obtenção de massa de mandioca com adição de maltodextrina de amido de milho waxy**. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.
- MOREIRA, F. G.; LIMA, F. A.; PEDRINHO, S. R. F.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 157-162, 2004.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 1, n. 24, p. 94-100 jan./mar. 2004.
- NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Purification and characterization of an extracellular α - amylase from *Bacillus subtilis* AX20. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 41, p. 349-354, 2005.
- NAJAFPOUR, G. D.; SHAN, C. P. Enzymatic hydrolysis of molasses. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 86, p. 91-94, 2003.
- NODA, T. et al. Physicochemical properties and amylopectin structure of large, small and extremely small potato starch granules. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 60, p. 245-251, Mar. 2005.
- NOVO NOVOZYME®. Fichas técnicas dos produtos. Disponível em: <<http://www.novozyme.com>>. Acesso em: 20 mar.2012.
- ODIBO, F. J. C.; OKAFOR, N.; OKAFOR, B. U. Purification and immobilization of *Scytalidium* sp. alpha-amylase and its general properties. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 38, p. 1-11, 1992.

- OSBERGER, T. F. Crystalline fructose. In: NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. **Alternative sweeteners**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 219-246.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocess and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PARASKEVA, P.; KALDERIS, D.; DIAMADOPOULOS, E. Review production of activated carbon from agricultural by-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, West Sussex, v. 83, p. 581–592, 2008.
- PARK, Y. K. Studies on formation, purification and properties of glucose isomerase from *Streptococcus bikiniensis*. **Zeits Zuckerind**, Bohmen, v. 27, n. 6, p. 272-374, 1977.
- PARKER, K.; SALAS, M.; NWOSU, V. C. High fructose corn syrup: production, uses and public health concerns. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Durham, v. 5, p. 71-78, Dec. 2010.
- PAZUR, J. H.; LIU, B.; MISKIEL, F. J. Comparison of the properties of glucoamylases from *Rhizopus niveus* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, London, v. 12, p. 63–78, 1990.
- PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, Ribeirão Preto, v. 6, p. 269–273, 2003.
- PELAEZ, V. A dinâmica econômica da inovação no campo dos edulcorantes sintéticos. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, DF, v. 10, n. 1/3, p. 93-117, 1993.
- PORTZ, L.; DIAS, C. T. S.; CYRINO, J. E. P. Regressão segmentada como modelo na determinação de exigências nutricionais de peixes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 601-607, 2000.
- ROBYT, J. F. Cyclodextrins. In: **Essentials of carbohydrate chemistry**. New York: Springer, 1998. cap. 8, p. 245-250.
- ROMÁN, M. G. Transformación de almidones: tecnología de los cereales. **Ciencia y Tecnología de los Alimentos**. Curso 2007/2008. Granada. España, 2008. Disponível em: <<http://www.ugr.es/local/mgroman>>. Acesso em: 01 nov. 2008.
- SAITO, I. M. **Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduos da industrialização da mandioca submetido à pré-tratamento hidrotérmico**. 2005. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

SAS INSTITUTE. SAS STAT System. Release 9.1. Cary, 2004.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 81, p. 219-231, Sept. 2003.

SILVA, T. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; CARVALHO, A. F. A.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Production of Saccharogenic and Dextrinogenic Amylases by *Rhizomucor pusillus* A13.36. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 43, n. 6, p.561-568, 2005.

SOLAGRAL Formation. **La guerre des sucres**: canne, betterave et les autres. Paris, 1988.

SOMOGY, M. Determination of blood sugar. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, n. 160, p. 69-73, 1944.

SOUZA, G. P. et al. Caracterização de material compósito diatomáceo natural. **Cerâmica**, Campos dos Goytacazes, v. 39, p. 40-43, 2003. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0366-69132003000100009&script=sci_arttext>.
Acesso em: 26 mar. 2011.

STANHOPE, K. L.; GRIFFEN, S. C.; BAIR, B. R.; SWARBRICK, M. M.; KEIM, N. L.; HAVEL, P. J. Twenty-four hour endocrine and metabolic profiles following consumption of high fructose corn syrup-, sucrose-, fructose-, and glucose-sweetened beverages with meals. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 87, n. 5, p. 1194-1203, 2008.

SURMELY, R. et al. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. Paranavaí: Fundação Cargill, 2003. 3 v. Disponível em:
<<http://www.abam.com.br/livroscargil/volume3.htm>>. Acesso em: 20 maio 2009.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch: composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, Lodon, v. 39, n. 2, p. 151-165, Mar. 2004.

THOMAS, D. J.; ATWEEL, W. **Starches**: practical guides for the food industry. Minnessota: Eagan Press, 1999. 94 p.

THRESHER, J. S.; PODOLIN, D. A.; WEI, Y. R. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 4, p. 1334-1340, Oct. 2000.

TREICHEL, H. **Estudo da produção e purificação da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 utilizando meios industriais**. 2004. 100f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Economic Research Services. Amber waves: the economics of food, farming, natural resources, and rural America. 2008.

Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/Amber Wave/February 08/Findings/High Fructose.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2011.

WANG, Y. J.; WHITE, P.; POLLAK, L.; JANE, J. Amylopectin and intermediate materials in starches from mutant genotypes of the inbred line. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 70, n. 5, p. 521-525, Sept-Oct. 1993.

VAN DER VEEN, B. A.; UITDEHAAG, J. C. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1543, p. 336-360, 2000.

VANDAME, E.; DERYCKE, D. Microbial inulinases: Fermentation process, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 29, p. 139-176, 1983.

VERACHTERT, H.; DE MOT, R. **Yeast: biotechnology and biocatalysis**. New York: Marcel Decker, 1990. p. 257-296.

VICENTE, A. A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica**. 2000. 224 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

VIEIRA, F. C. **Efeito do tratamento com calor e baixa umidade sobre características físicas e funcionais dos amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*), de batata-doce (*Ipomoea batatas*) e de gengibre (*Zingiber officinale*)**. 2004. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.