

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

YURY JANSEN SOARES SIQUEIRA TÔRRES

ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO DO MESOCARPO DE
BABAÇU

São Luís - Ma

2014

YURY JANSEN SOARES SIQUEIRA TÔRRES

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO DO MESOCARPO DE
BABAÇU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pesquisa e Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel

São Luís

2014

Tôrres, Yury Jansen Soares Siqueira.

Estudo da hidrólise enzimática do amido do mesocarpo de babaçu / Yury Jansen Soares Siqueira Tôres. – São Luís, 2014.

63 f.

Impresso por computador (fotocópia).
Orientador: Adeilton Pereira Maciel.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Babaçu – química. 2. Amido. 3 Hidrólise. I. Título.

CDU 54: 633.855.34

Título: "Estudo da hidrólise enzimática do amido do mesocarpo de babaçu".

Yury Jansen Soares Siqueira Torres
Aprovado em 15 de agosto de 2014

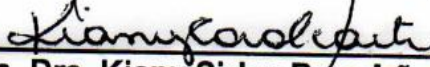
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel (Orientador-UFMA)



Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra (DEQUI-UFMA)



Profa. Dra. Kiany Sirley Brandrão Cavalcante (IFMA)

Aos meus pais Manuel Tôres dos Santos e Maria do Socorro Soares Siqueira Tôres e, a minha esposa Michele Sousa Travassos Tôres.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me concedeu uma vida abençoada, com saúde, proteção, paz interior, sabedoria e perseverança, que são fundamentais para vencer as dificuldades da vida, em especial, para realizar e concluir este trabalho.

Aos meus pais Manoel Tôrres dos Santos e Maria do Socorro Soares Siqueira Tôrres, as duas pessoas responsáveis pela minha criação, educação, e ensinamentos, que fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Sempre se preocuparam comigo e com o meu futuro.

A minha esposa Michele Sousa Travassos Tôrres, por seu incentivo e por acreditar na minha capacidade, proporcionando segurança e tranquilidade necessária para desenvolver este trabalho.

Ao Professor Adeilton Pereira Maciel, pela orientação, compreensão e paciência durante a elaboração desta dissertação. Obrigado por compartilhar os seus conhecimentos e acreditar no meu potencial, e se hoje concluo o mestrado, é pela oportunidade que me concedeu.

As professoras Cáritas e Kiany, pela atenção, ensinamentos e simplicidade ao transmitir seus valiosos conhecimentos. Meu sincero respeito e agradecimento.

Aos meus amigos do Laboratório de Biodiesel, pela cooperação e alegrias proporcionadas, em especial ao Jeferson.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Maranhão – FAPEMA pela concessão de bolsa de mestrado, em período do curso;

A UFMA e a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

“Pedi, e dar-se-vos-á; buscai, e achareis; batei, e abri-se-vos-á. Pois todo o que pede recebe; o que busca encontra; e a quem bate, abrir-se-lhe-á.”

Lucas 1:9,10.

RESUMO

O presente trabalho objetivou determinar a constituição do mesocarpo de babaçu, parâmetros morfológicos, estruturais e físico-químicos do amido deste polissacarídeo, responsáveis por determinar a relativa suscetibilidade ao ataque enzimático, assim como o rendimento de hidrólise enzimática. A farinha do mesocarpo de babaçu apresentou uma grande porcentagem em amido, o que faz deste fruto matéria-prima potencial para a produção de açúcares fermentáveis. Os grânulos do amido do mesocarpo de babaçu são, em sua grande maioria, de tamanhos médios (10-25 μm), e pequenos (5-10 μm), que de acordo com a literatura, quanto menores forem os grânulos, mais facilmente serão hidrolisados. O padrão de cristalinidade do amido é do tipo A, o mesmo apresentado por cereais como o milho. Em geral, amidos tipo A, são mais susceptíveis ao ataque enzimático do que amidos tipo B e C, e desta forma, sugere-se que isto possa favorecer a suscetibilidade deste amido a ação das enzimas. Após a hidrólise enzimática, o padrão de cristalinidade se manteve o mesmo, no entanto, os picos ficaram mais nítidos, demonstrando um caráter mais cristalino, tendo o índice de cristalinidade, passado de 28,5%, para 35,7%, o que sugere que a região amorfa do grânulo de amido foi hidrolisada de forma mais acentuada do que a região do cristalino. O único açúcar identificado através do método utilizado foi a glicose, o que demonstra a grande eficiência das enzimas alfa amilase e glucoamilase, na conversão completa do amido a glicose. As concentrações de glicose mínima e máxima obtidas nos experimentos do presente trabalho foram de 0,85 g e de 2,13 g, que corresponde aos rendimentos de 12 e 30%, considerados bem significativos, levando em consideração um tempo de reação relativamente curto, de apenas duas horas, o que demonstra a boa suscetibilidade do amido ao ataque enzimático. Diante dos parâmetros analisados, o rendimento de hidrólise considerado satisfatório, corrobora com as conclusões associadas à boa suscetibilidade do amido, baseadas exclusivamente em fatores dos parâmetros estruturais, morfológicos e físico-químicos.

Palavras-chave: amido, etanol, hidrólise.

ABSTRACT

The present work aimed to determine the constitution of babassu mesocarp, morphological parameters, physico-chemical and structural this starch polysaccharide, responsible for determining the relative susceptibility to enzymatic attack, as well as the yield of enzymatic hydrolysis. Babassu mesocarp flour presented a large percentage in starch, which makes this fruit raw material potential for the production of fermentable sugars. The starch granules babassu mesocarp are mostly medium-sized (10-25 μ m), and small (5-10 μ m), which according to the literature, the smaller are the beads more easily be hydrolyzed. The pattern of starch crystallinity is of type A, the same presented by hot cereals. In General, type A, starches are more susceptible to enzymatic attack than starches type B and C, and in this way, it is suggested that this may promote susceptibility of starch enzyme action. After enzymatic hydrolysis, the crystallinity pattern remained the same, however, the peaks were sharper, showing a more crystalline character, having the crystallinity index, history of 28.47 to 35.67, suggesting that the amorphous region of granule of starch was hydrolyzed to form sharper than the crystalline region. The only sugar identified was to glucose, which demonstrates the great efficiency of alpha amylase and Glucoamylase enzymes, complete conversion of starch to glucose. The minimum and maximum glucose concentrations obtained in experiments of this work were to 0.85 g and 2.13 g, which corresponds to income of 12 and 30, considered very significant, taking into consideration a relatively short reaction time of just two hours, which demonstrates the great susceptibility of starch by enzymatic attack. Before the parameters analyzed, the hydrolysis yield satisfactory, corroborates the conclusions taken from the great susceptibility of starch, based solely on factors of structural parameters, morphological and physico-chemical.

Keywords: starch, hydrolysis, ethanol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tamanho e composição médios de frutos do babaçu.	13
Figura 2. Estrutura da glicose	16
Figura 3. Fórmula estrutural da Amilose.	16
Figura 4. Fórmula Estrutural da Amilopectina.	17
Figura 5. (I) Cadeias da amilopectina em tipo A, B e C. (II) Estrutura da amilopectina formando as regiões e cristalinas no grânulo de amido. (III) Modelo da estrutura interna do grânulo de amido com a visualização dos anéis de crescimento e centro ou hilum.	19
Figura 6. Representação esquemática do grânulo de amido	20
Figura 7. Padrões de difração Raios X de amido de tipo A, B e C	21
Figura 8. Esquema geral de hidrólise do amido por enzimas amilolíticas.	25
Figura 9. Fluxograma do processo de hidrólise enzimática a partir da farinha do mesocarpo de babaçu.	29
Figura 10. Curva analítica obtida para a glicose	33
Figura 11. Micrografias obtidas por MEV dos grânulos de amido da farinha do mesocarpo de babaçu: (a) ampliada 900 vezes e (b) ampliada 2000 vezes	38
Figura 12. Curva de distribuição dos tamanhos dos grânulos do amido	39
Figura 13. Difratoograma de raios-x do amido do mesocarpo de babaçu nativo e hidrolisado	41
Figura 14. Perfil cromatográfico de açúcares do hidrolisado sobrepondo o padrão de glicose	44
Figura 15. Perfil cromatográfico de uma amostra de açúcares do hidrolisado sobrepondo a mesma amostra, porém contaminada pela glicose padrão.	45
Figura 16. Diagrama de Pareto para resposta em glicose.	47
Figura 17. Influência das enzimas α -amilases e glucoamilase para o rendimento de hidrólise.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição media da farinha do mesocarpo de babaçu	14
Tabela 2. Composição de amilose nos principais amidos comerciais	18
Tabela 3. Forma e dimensão dos grânulos de amido das principais fontes.	23
Tabela 4. Valores das leituras em triplicata para cada concentração, valores das médias e os desvios padrão.	32
Tabela 5. Composição química do mesocarpo do babaçu	35
Tabela 6. Composição inorgânica do mesocarpo de babaçu.	37
Tabela 7. Proporção de cristalinidade dentro de grânulos de amido de milho nativos com diferentes teores de amilose.	43
Tabela 8. Efeito da carga de enzimas sobre a hidrólise de amido a partir de 100 g / L de farinha de babaçu. A hidrólise foi realizada a 90° C durante 1 h e depois a 60° C durante mais 1 h.	45

ABREVIATURAS

Aa	Área amorfa
Ac	Área cristalina
AGU/g	Unidade da atividade declarada da glucoamilase
Desv pad	Desvio padrão
DXRFW	Espectrofotômetro de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda
EC	<i>Enzyme Comission</i>
ELSD-LT II	Detector de Espalhamento de Luz Evaporativo
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IC	Índice de Cristalinidade
KNU-S/g	Unidade da atividade declarada da α -amilase
LLD	Limite de detecção
m/v	Massa/Volume
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSA, MSB, MSC, MSD e MSE	Amido de milho tipos A, B, C, D e E
ppm	Partes por milhão
Rh	Radiação de Ródio
R. H.	Rendimento de Hidrólise
SEM	Scanning Electron Microscopy
WAXS	Amplo ângulo de espalhamento de raios X
WMS	Amido de milho ceroso
XRD	Difração de Raios X

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	9
2.OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Babaçu	13
3.2 Estrutura e características dos grânulos de amido	15
3.2.1 Estrutura e organização	15
3.2.2 Amilose e Amilopectina.....	16
3.2.3 Constituintes menores do amido	22
3.2.4 Propriedades do amido	23
3.3Hidrólise enzimática do amido	24
4. MATERIAS E MÉTODOS	28
4.1 Matéria-prima	28
4.2 Enzimas	28
4.3.Procedimento experimental para a hidrólise enzimática	28
4.4 Cálculo das variáveis de resposta	30
4.4.1 Rendimento de hidrólise.....	30
4.5 Métodos analíticos	30
4.5.1 Caracterização físico-química da farinha do mesocarpo de babaçu.....	30
4.5.2 Difração de raios X	31
4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	32
4.5.4 HPLC	32
4.5.5 Secção experimental	33
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	34
5.1 Características estruturais do grânulo do mesocarpo de babaçu.....	34
5.2 Microscopia eletrônica de varredura	36
5.3 Padrão de Raios X	40
5.4 Hidrólise enzimática	42
5.5 Análise da susceptibilidade do amido a hidrólise enzimática	46

6. CONCLUSÃO	49
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

O babaçu (*Orbignya sp*) é uma palmeira de grande valor comercial e industrial, principalmente por ser aproveitada de forma integral, seja para fins alimentícios, artesanais ou energéticos. Uma das grandes características do seu fruto é a alta porcentagem em amido presente em seu mesocarpo, que pode ser hidrolisado para a obtenção de açúcares fermentescíveis.

Muitos estudos são desenvolvidos no sentido de se obter combustíveis menos poluentes, a partir de matérias-primas renováveis como biomassa de amido, principalmente em virtude da quantidade limitada de combustíveis fósseis e de suas propriedades prejudiciais para o meio ambiente, o que incentiva a investigação para alternativas mais viáveis. Assim, muitos países estão agora empreendendo esforços no que diz respeito ao desenvolvimento de fontes renováveis de energia, que são ao mesmo tempo mais econômicas e ambientalmente amigáveis (MUSSATTO *et al.*, 2010).

O etanol é um combustível líquido, considerado como uma das principais alternativas em substituição à gasolina, pois além de ser menos poluente, pode ser produzido a partir de fontes de matérias-primas renovável. O bioetanol é considerado a mais limpa alternativa de combustível líquido para a gasolina (ZHENG *et al.*, 2012).

O amido é uma fonte limpa de carbono, não tóxico e renovável, disponível em abundância, amplamente utilizado como matéria-prima na produção de bioetanol (CHEN *et al.*, 2008; SANCHEZ; CARDONA, 2008). O amido é o principal hidrato de carbono de armazenamento de energia de plantas superiores, sendo constituído por dois polímeros de anidroglicose, a amilose e a amilopectina. Estes dois polímeros α -glucana estão organizados numa complexa estrutura granular de natureza semicristalina, com tamanhos de partículas variando de 1 a 100 μm de diâmetro. As características morfológicas tais como: a forma e o tamanho dos grânulos de amido apresentam diferenças significativas de acordo com a fonte botânica. Fósforo e lipídeos são não-hidratos de carbono, constituintes menores presentes nos grânulos de amido, e que exercem influencia significativa nas propriedades funcionais, podendo o fósforo estar presente na forma de monoésteres de fosfato ou fosfolipídeos, já os lipídeos, podem formar complexos com a amilose, influenciando no processo de gelatinização.

As fontes usuais de matéria-prima para a produção de etanol a partir de amido são os grãos de cereais: milho, trigo, cevada, grãos de sorgo, etc. O amido do milho é o mais frequentemente utilizado para a produção de bioetanol (SÁNCHEZ e

CARDONA, 2008). Vários trabalhos relatam a produção de etanol a partir de outras fontes de amido, como a biomassa de mandioca, arroz, sorgo doce e batata doce (LEE *et al.*, 93). É muito comum a produção de etanol a partir de plantas produtoras de açúcares, tais como beterraba, cana de açúcar, sorgo doce, frutos, e outros. Outra fonte de matéria-prima que pode ser hidrolisada para a obtenção de açúcares fermentáveis é a celulose, como encontrado em madeiras e outras hastes de vegetais.

A produção de bioetanol a partir de amido tem crescido rapidamente na América do Norte e em alguns países da Europa. Países como a França e os Estados Unidos utilizam o amido para a produção de etanol (SILVA *et al.*, 2006).

Na indústria, o bioetanol é gerado a partir de açúcares durante o processo de fermentação, que é realizada por microorganismos, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido tradicionalmente utilizada para a produção de etanol em escala industrial, no entanto, não produz o etanol diretamente a partir do amido bruto, porque estas leveduras não possuem a capacidade para degradar o amido cru em glicose. Para a produção de etanol a partir de amido, necessita-se de uma hidrólise prévia para a liberação dos açúcares.

Os grânulos de amido nativos são semicristalinos e resistem naturalmente a hidrólise por amilases (KIMURA; ROBYT, 1996). Quando gelatinizados, no entanto, eles são rapidamente hidrolisados e convertidos em açúcares e dextrinas. A hidrólise dos grânulos de amido nativos por amilases envolve uma reação entre uma enzima em solução e uma superfície sólida representada pelo grânulo. Para a hidrólise enzimática, do amido, além de água, há necessidade de agentes químicos ou enzimáticos capazes de romper as ligações glicosídicas (ZANIN *et al.*, 2000). A hidrólise enzimática tem sido muito utilizada pelas indústrias na produção de etanol a partir de amido. Uma das características mais importantes da catálise enzimática é sua especificidade, muito maior do que a da catálise química, quanto à reação e quanto ao substrato. As duas enzimas mais comuns utilizadas no processo de hidrólise são: a α -amilase e a glucoamilase. A Enzima α -amilase quebra as ligações α -1,4 do amido, mas não atua sobre as ligações α -1,6. A glucoamilase por outro lado pode atuar tanto nas ligações, α -1,4 como nas ligações α -1,6. Assim, o produto final da ação da glucoamilase é principalmente a glicose. Dependendo da fonte ou da origem do amido, a susceptibilidade destes polissacarídeos à amilase pode ser diferente.

Para a produção de etanol a partir do amido bruto pelo método convencional, requer os passos seguintes: gelatinização do amido bruto por cozimento,

liquefação do amido por adição de α -amilase, e a sacarificação enzimática dos produtos de liquefação de baixo peso molecular à glicose e a fermentação da glicose em etanol.

A hidrólise do amido é um passo chave em certos processos industriais, tais como a fabricação de cerveja, e a produção de xaropes de glicose e de bioetanol (ROBERTSON *et. al.*, 2005; TESTER *et al.*, 2006). O processo de hidrólise do amido nativo por amilases é bastante complexo, porque existem muitos fatores que contribuem para a relativa resistência dos grânulos a partir de fontes diferentes. O papel fundamental na hidrólise de amido granular é desempenhado pela sua estrutura supramolecular, cristalinidade e na presença de agentes complexantes (OATES, 1997; DONA, 2010). Estes fatores são determinados pela origem do amido. Os amidos de milho, batata, trigo e arroz são conhecidos por apresentarem alto teor de amido, e considerados como matérias-primas potenciais para a produção de etanol, e por isto, são largamente estudados quanto a sua constituição, morfologia e propriedades físico-químicas, que determinam seu comportamento nos mais diversos processos industriais, inclusive para a produção de xaropes de açúcares e etanol. Os amidos de fontes diferentes de plantas, tais como milho, batata, trigo e arroz têm recebido grande atenção em relação às propriedades estruturais e físico-químicas (MADSEN; CHRISTENSEN, 1996).

Mediante a grande porcentagem de amido presente no mesocarpo de babaçu e da possibilidade de incrementar na cadeia produtiva deste fruto a produção de etanol, se faz importante o estudo sobre a constituição, morfologia, e características, físico-químicas, bem como da suscetibilidade deste amido a hidrólise enzimática, já que esta etapa é o passo chave em processos industriais para a produção de etanol utilizando o amido.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a hidrólise enzimática do amido do mesocarpo de babaçu utilizando as enzimas α -amilase e glucoamilase, de forma a analisar as propriedades deste amido que estejam relacionadas com a sua suscetibilidade ao ataque enzimático. Além de contribuir para o desenvolvimento do conceito de produção de biocombustíveis por meio de fontes renováveis de energia.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar e quantificar os principais constituintes do mesocarpo de babaçu;
- Verificar a morfologia e as características físico-químicas do amido do mesocarpo de babaçu;
- Determinar o rendimento de hidrólise;
- Verificar qual enzima exerce maior influência na variável resposta (glicose);
- Determinar a relativa à suscetibilidade do amido de mesocarpo de babaçu;

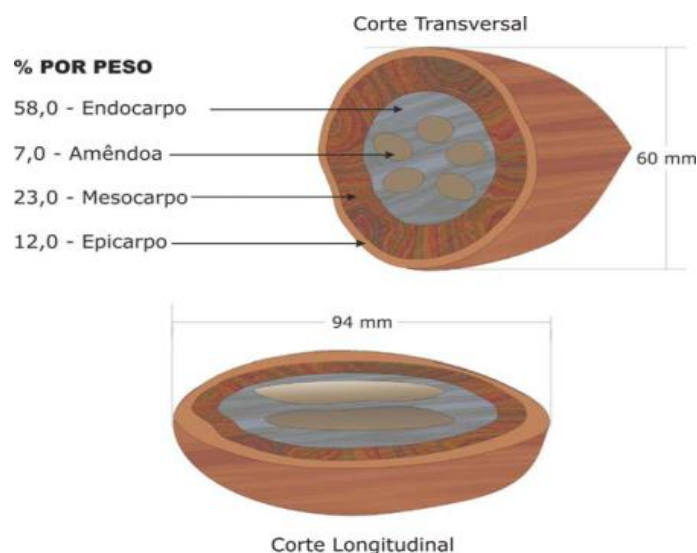
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Babaçu

O babaçu representa uma das palmeiras brasileiras mais importantes, pertencente à família *Palmae*. As “zonas do babaçu” ou “babaçuais” são áreas de alta abundância desta palmeira, estando presentes no sudeste da Amazônia, especialmente Maranhão e Piauí. Os babaçuais ocupam cerca de 18 milhões de hectares no país, sendo 10 milhões no Maranhão (CRUZ, 2006).

Inicia sua frutificação aos oito anos, atingindo sua produção plena aos 15 anos. O fruto (200 a 300 por cachos) também é conhecido popularmente como coco-de-macaco é um fruto oval alongado, de coloração castanha, que surge de agosto a janeiro, pesando de 90 a 280 gramas possui uma produção média anual de 2.000 frutos. Esse fruto apresenta: epicarpo (camada mais externa filamentosa), mesocarpo (com 0,5 a 1,0 cm e rico em amido), endocarpo (camada interna rígida, de 2 a 3 cm em média) e amêndoas (com 2,5 a 6 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura), vide Figura 1. Sendo 13% epicarpo, 20% mesocarpo, 60% endocarpo e 7% amêndoas (TEIXEIRA, 2000).

Figura 1. Tamanho e composição médios de frutos do babaçu.



Fonte: MAY, 1990

Do coco do babaçu obtém-se o endocarpo, epicarpo e mesocarpo, para o uso industrial, sendo passível de utilização na alimentação animal, na produção de fertilizantes e de carvão. A amêndoa do babaçu é a parte mais importante, a partir dela se extrai o óleo, produto de maior valor comercial.

FERREIRA *et al.* (2006) afirmam que o babaçu ocorre nativo nos Estados do Pará, Maranhão, Ceará, Piauí, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Tocantins e seu coco possui aproveitamento integral, sendo que uma tonelada de coco produz 40 kg de óleo (4 %) do total, 80 litros de álcool, 120 kg de combustíveis primários e 145 kg de carvão.

Do mesocarpo é obtida uma farinha amplamente comercializada no Maranhão. A farinha é obtida a partir da secagem e trituração do mesocarpo. O mesocarpo transformado em pó é peneirado, umedecido e finalmente torrado em fogo alto (BALICK, 1984; CRUZ, 2006). Tal farinha serve de alimento para pessoas e animais, como na forma de farinha substitutiva da mandioca (CARNEIRO *et al.*, 2009).

Verificam-se em alguns trabalhos valores semelhantes na porcentagem do mesocarpo de babaçu. O mesocarpo de babaçu apresenta uma composição rica em amido, entre 50% e 68,3% (CRUZ, 2011; MELO, 2007; ROSA, 1986; ROSENTHAL, 1975).

A farinha do mesocarpo de babaçu possui em média um teor de amido de 50% (m/m) em base de sólidos (Tabela 1) (BARUQUE FILHO *et al.*, 2000).

Tabela 1. Composição média da farinha do mesocarpo de babaçu.

Componentes	Composição (%)
Umidade	14
Amido	50
Proteína	2,3
Fibras	10
Gordura	2,8
Cinzas	1,3
Pentosanas	3,4
Carboidratos solúveis	1,3

Fonte: BARUQUE FILHO *et al.*, 2000

Estudos buscam investigar o potencial uso energético do babaçu, em uma série de produtos e subprodutos diferentes, como carvão, etanol, alcatrão, óleo, sabão, entre outros (BARUQUE FILHO *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2011).

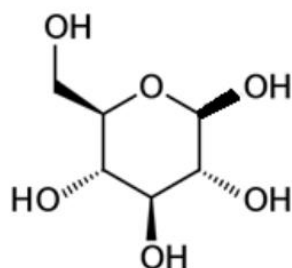
3.2. Amido

O amido é um polímero natural, renovável e biodegradável, produzidos por várias plantas, como uma fonte de energia armazenada (LE, 2010), e não tóxica (VAN *et al.*, 2000). Por ser um carboidrato de reserva, o amido encontra-se amplamente distribuído em várias espécies de vegetais, com abundância em grãos de cereais (40% a 90% do peso seco), leguminosas (30% a 50% do peso seco), tubérculos (65% a 85% do peso seco) e frutas imaturas ou verdes (40% a 70% do peso seco) (LAJOLO e MENEZES, 2006). Devido a suas propriedades físico-químicas e funcionais únicas, este polissacarídeo tem grande importância industrial, nos mais diversos setores (FRANCO *et al.*, 2001). O amido é utilizado na sua forma natural ou pode, através de processos adicionais, dar origem a produtos como amidos modificados, xaropes de glicose, maltose, frutose, maltodextrinas, entre outros (FRANCO *et al.*, 2001).

3.2.1. Características e estrutura do grânulo

O amido é um polissacarídeo formado por dois componentes principais: a amilose e amilopectina, além de pequenas quantidades de componentes não-hidratos de carbono, tais como lipídeos, proteínas e fosfatos (BULEON *et. al.*, 1998, JENKINS *et. al.*, 1993).

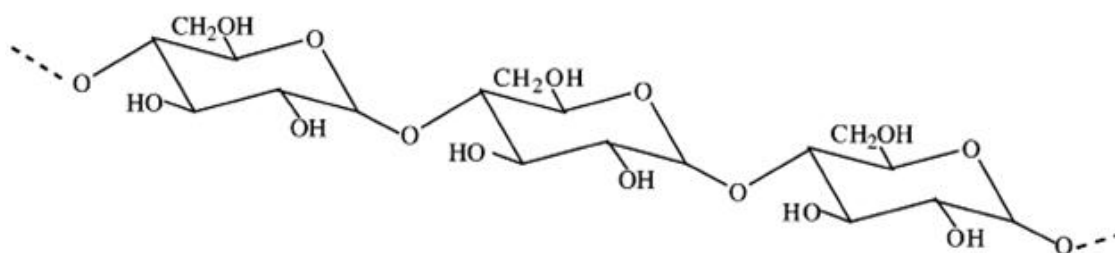
Apresenta-se na forma de grânulos de tamanhos e formatos variados, que são insolúveis em água fria (CEREDA *et al.*, 2001; THOMAS; ATWELL, 1999). A fórmula geral do amido é $(C_6H_{10}O_5)_n$. Quimicamente, pode-se afirmar que o amido é um polímero formado pela reação de condensação de moléculas de α -glicose com eliminação de água. As unidades de glicose estão ligadas entre si pelos carbonos C1-C4 e C1-C6 através do oxigênio, formando ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ (SURMELY *et. al.*, 2003). A glicose, glucose ou dextrose (Figura 02), é um monossacarídeo. É o hidrato de carbono mais importante, produzido pelas plantas verdes na fotossíntese a partir da H_2O , CO_2 e luz solar. A molécula de glicose pode existir numa forma de cadeia aberta (acíclica) e anel (cíclica).

Figura 2. Estrutura da glicose

Fonte: Ferreira *et al.*, 2009.

3.2.2 Amilose e amilopectina

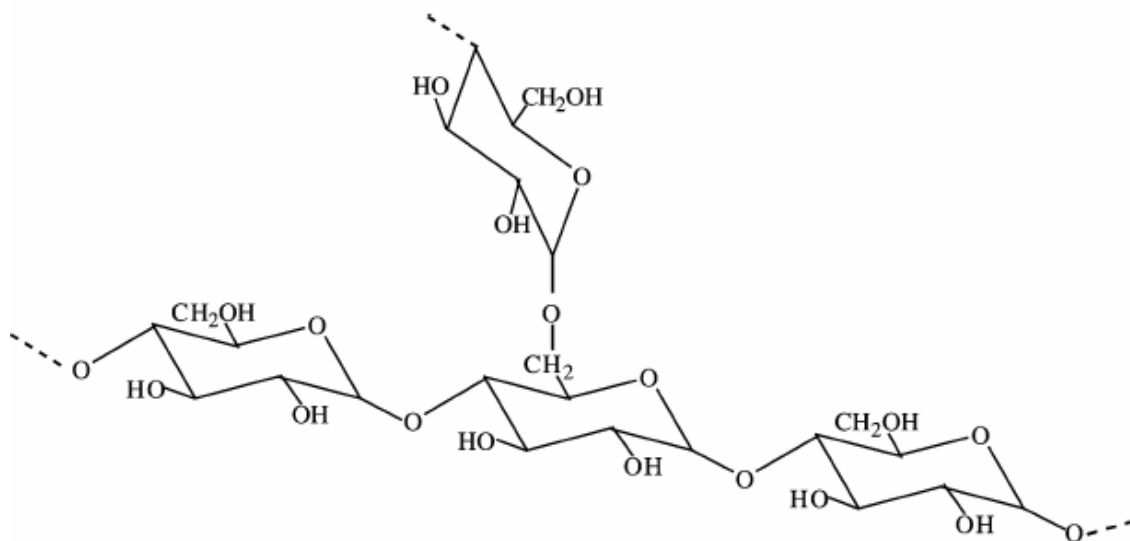
Independentemente de suas origens botânicas, variedades de amido contêm principalmente dois tipos diferentes de polímeros de anidroglicose, amilose e amilopectina. A amilose e amilopectina constituem 98% em peso seco do amido, e de acordo com a fonte botânica, ocorre variação no teor de seus constituintes (TESTER; KARKALAS e QI, 2004). A amilose é um composto que apresenta uma cadeia formada por unidades D-glicose contendo 99% de ligações α -1,4 e 1% de ligações α -1,6 (Figura 3) (DAMAGER *et al.*, 2010; PÉREZ e BERTOFT, 2010). A amilose, de menor peso molecular apresenta de $1,5 \times 10^5$ a 10^6 unidades de glicose, onde predominam as ligações D-glucana $\alpha(1,4)$ com número baixo de ramificações (FONTAINE *et al.*, 1993) o que lhe confere distribuição predominantemente linear (MANNERS, 1985; BILIADERIS, 1991; BALL *et al.*, 1996). O polímero de amilose apresenta-se na conformação helicoidal (não representado na Figura), existindo átomos de hidrogênio no interior da hélice, enquanto que os grupos hidroxilas permanecem na parte externa da mesma (BULÉON *et al.*, 1998).

Figura 3. Fórmula estrutural da Amilose.

Fonte: MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005

A amilopectina é um polímero que apresenta uma estrutura altamente ramificada, constituída por resíduos de D-glicose contendo 95% de ligações α -1,4 e 5% de ligações α -1,6 (Figura 4) (DAMAGER *et al.*, 2010; PÉREZ; BERTOFT, 2010). O peso molecular da amilopectina é cerca de 1000 vezes o peso molecular da amilose e varia de 1×10^7 a 5×10^8 g/mol (YOU *et al.*, 2002).

Figura 4. Fórmula Estrutural da Amilopectina.



Fonte: MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005.

Ocorre uma variação na proporção em que estas duas frações se encontram no grânulo de amido, de acordo com as espécies botânicas, e ainda pode variar para a mesma espécie, de acordo com o grau de maturação da planta (ELIASSON, 2004; TESTER *et al.*, 2004). A maioria dos amidos contém entre 20 e 25% de amilose (p/p), porém alguns amidos cerosos contêm menos de 1%, enquanto outros, como o amido de milho, possuem 65% deste polímero (PARKER; RING, 2001). A Tabela 2 mostra a porcentagem de amilose dos amidos mais comumente utilizados, sejam para fins alimentícios, ou para fins industriais diversos, como para produção de xaropes de açúcares e etanol.

Tabela 2. Composição de amilose nos principais amidos comerciais.

Fonte vegetal	(%) amilose	(%) amilopectina
Amido de milho	24,0-27,0	70
Amido de arroz	15,0-18,5	79
Amido de trigo	20,0-25,0	80
Amido de mandioca	16,7-25,0	80

Fonte: REGULY (1996).

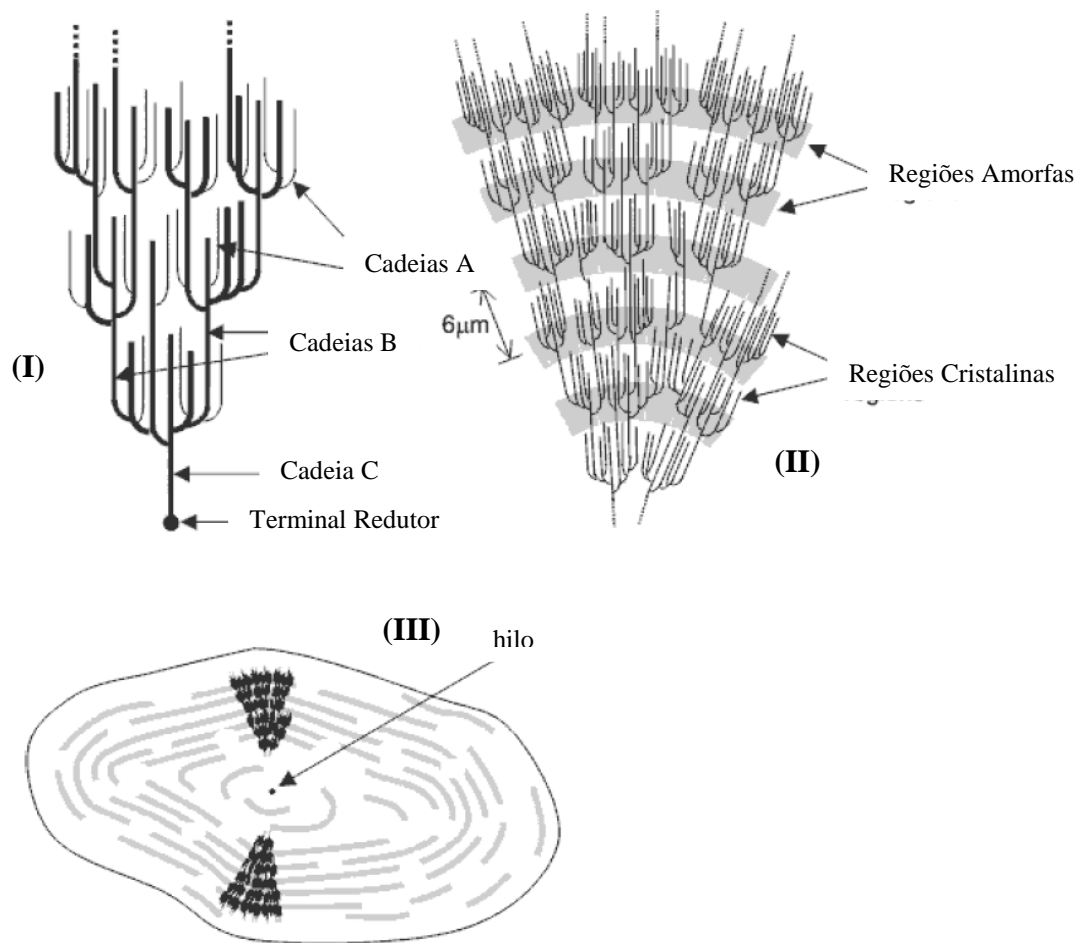
A funcionalidade e a organização física do amido se devem em muito, a estas duas macromoléculas (BILIADERIS, 1991). A amilose possui habilidade em formar pasta depois do grânulo de amido ter sido gelatinizado. Este comportamento é bem evidente em amidos com alto teor de amilose, como nos cerosos, e por isto, são considerados como amidos formadores de pasta. A formação da pasta decorre principalmente da reassociação dos polímeros de amido solubilizados depois da gelatinização (THOMAS; ATWEEL, 1999).

A presença de átomos de hidrogênio no interior da hélice torna-o hidrofóbico e permite que a amilose forme complexos de inclusão com iodo, resultando em uma coloração azul característica, pela absorção máxima no comprimento de onda de 620 nm. Quanto maior a afinidade por iodo, maior será o teor de amilose do amido (THOMAS; ATWEL, 1999). A amilopectina em presença de iodo proporciona coloração avermelhada e é estável em soluções aquosas diluídas (BILIADERIS, 1991).

As cadeias de amilopectina estão organizadas de maneiras diferentes, sugerindo uma classificação de cadeias A, B e C (Figura 5A). A amilopectina corresponde a um esqueleto de muitas ramificações, constituída por uma cadeia principal C, composta por ligações α -(1,4) e α -(1,6), com grupamento terminal redutor (ELIASSON, 1996; ELIASSON, 2004; VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004; LAJOLO; MENEZES, 2006). As cadeias A são aquelas compostas por uma cadeia não-redutora de glicose unidas por ligações α -(1,4) sem ramificações, sendo unida a uma cadeia tipo B

por meio de ligações α -(1,6). As cadeias do tipo B são compostas por glicoses ligadas em α -(1,4) e α -(1,6), contendo uma ou várias cadeias tipo A e podem conter cadeias tipo B unidas por meio de um grupo hidroxila primário.

Figura 5. (I) Cadeias da amilopectina em tipo A, B e C. (II) Estrutura da amilopectina formando as regiões e cristalinas no grânulo de amido. (III) Modelo da estrutura interna do grânulo de amido com a visualização dos anéis de crescimento e centro ou hilum.



Fonte: PARKER & RING (2001).

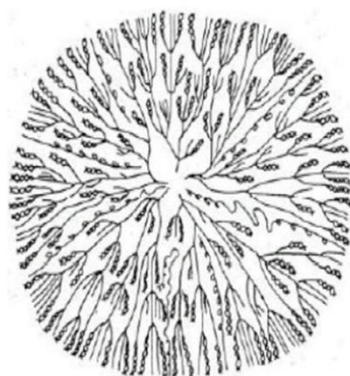
Estudos têm mostrado que além da amilose e da amilopectina, há a existência de um terceiro componente, denominado material intermediário (WANG *et al.*, 1993; KASEMSUWAN *et al.*, 1995). Esse componente pode também apresentar papel importante na determinação das propriedades funcionais do amido. A localização desta fração intermediária dentro do grânulo e o mecanismo detalhado de sua biossíntese não são bem conhecidos.

Os grânulos de amido são estruturas semicristalinas compostos de macromoléculas lineares e ramificadas, arranjadas na direção radial, onde as macromoléculas formam ligações de hidrogênio por estarem associadas paralelamente o que resulta no aparecimento de regiões cristalinas (GALLANT et al.,1997).

O grânulo de amido é birrefringente, e sob luz polarizada, apresenta uma imagem em forma de cruz, denominada de Cruz de Malta. Entretanto, a birrefringência não implica necessariamente em uma forma cristalina e sim, num alto grau de organização molecular dos grânulos (ZOBEL, 1988).

Os grânulos apresentam um hilo (Figua 5 C), que constitui o centro de nucleação, ao redor do qual se desenvolve o grânulo (WHISTLER; DANIEL, 1993). A estrutura molecular dos grânulos de amido inclui uma disposição alternada de lamelas amorfa e lamelas cristalina, depositadas em torno de um ponto central, denominado hilo, ou “hilum”. A estrutura em camadas característica dos grânulos de amido é devido aos anéis de crescimento, resultado de várias camadas concêntricas de diâmetro crescente que se estende do hilo para a superfície dos grânulos, gerados por deposição de amido (Figura 6) (TESTER *et al.*, 2004).

Figura 6. Representação esquemática do grânulo de amido.



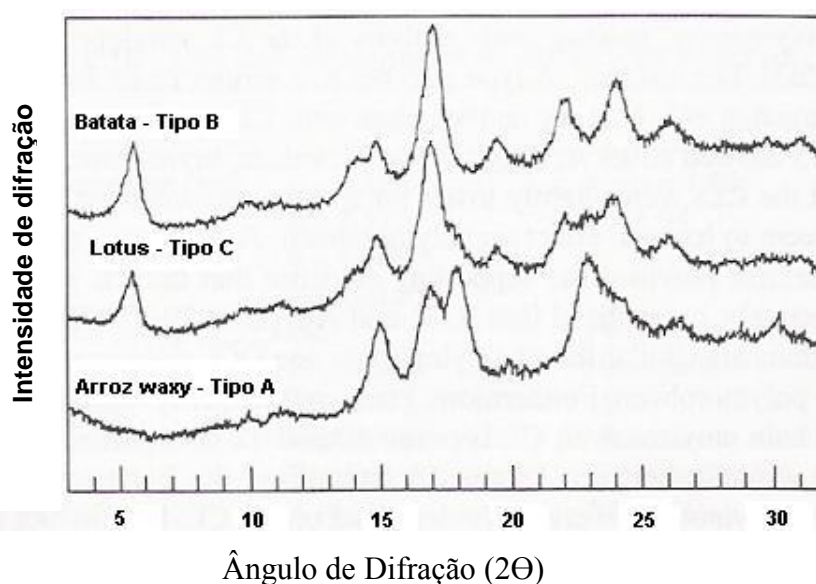
Fonte: JACKMAN, 2006

Os grânulos de amido estão organizados em regiões cristalinas e amorfas (Figura 5 B). A região cristalina é constituída de cadeias laterais da amilopectina, enquanto que os pontos de ramificação e a amilose são os principais componentes das regiões amorfas (PARKER; RING, 2001). As duplas hélices formadas por cadeias adjacentes de amilopectina constituem as regiões cristalinas, enquanto pontos de ramificação e amilose constituem as regiões amorfas (MIAO; ZHANG, et al. de 2009;

SRICHUWONG; JANE, 2007). Os polímeros amilose e amilopectina formam as regiões amorfas e cristalinas do grânulo de amido (ZHANG; ZHAO et al. de 2014). As áreas cristalinas do amido mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na presença de água, tornando-o mais ou menos resistentes ao ataque enzimático e químico (BILIADERIS,1991). A zona amorfa dos grânulos de amido é a menos densa, é mais susceptível aos ataques enzimáticos e absorve mais água a temperaturas inferiores à temperatura de gelatinização (ZAVAREZE, 2011). As estruturas de agregação (estrutura lamelar e, principalmente a estrutura cristalina) de amido desempenham um papel fundamental na determinação das propriedades (KIM; HUBER, 2010; ZHANG *et al.*, 2013). Em particular, a estrutura cristalina pode afetar a resistividade enzimática do amido (amido resistente) (ZHANG; CHEN, *et al.*, 2013).

A cristalinidade dos grânulos varia entre 15 a 45%, sendo descrita principalmente em função das duplas hélices, formadas pelas ramificações da amilopectina (HOOVER, 2001), que varia entre O amido nativo pode ser classificado em três padrões de cristalinidade, tipo A, tipo B e tipo C, conforme o seu tipo padrão de difração (Figura 7) (CHEETHAM et al.,1998).

Figura 7. Padrões de difração Raios X de amido de tipo A, B e C



Fonte: LIASSON, 1996.

O amido tipo A é associado com os amidos de cereais, tais como milho, trigo, enquanto que o amido tipo B, está presente em tubérculos como a batata. O amido do tipo C é uma mistura dos tipos, A e B, tais como o amido de ervilha lisa e vários amidos de feijão (CHEETHAM, 1998; ELSENHABER, 1992; ZOBEL, 1988). Adicionalmente, quando moléculas de amilose associam-se com lipídeos no grânulo de amido, é visualizado um padrão de Raios X tipo V, que é parcialmente resistente à digestão enzimática (GALLANT, 1992). O grau de cristalinidade relativa de uma amostra desconhecida pode ser determinada com base na separação e integração das áreas cristalinas e amorfas sob os picos de difração de raios X. O índice de cristalinidade relativa é útil quando se requer uma indicação da diminuição ou aumento da ordem molecular dos grânulos (BLANSHARD, 1987).

3.2.3. Constituintes menores do amido

Além da amilose e amilopectina, existem outros constituintes dos grânulos de amido, chamados de constituintes menores do amido, como fósforo e lipídeos.

Proteínas, lipídeos, e cinzas (minerais e sais) estão também presentes nos grânulos de amido em pequenas quantidades e no amido de trigo representam 0,4, 0,9 e 0,5%, respectivamente (THOMAS; ATWELL 1997). Os lipídeos representam a fração mais importante associada ao grânulo de amido, estando presente principalmente em amidos de cereais, sendo responsáveis pela fixação de cor, desenvolvimento de aromas e complexações, o que não acontece nos amidos de tuberosas (BULÉON *et al.*, 1998). Os lipídeos representam a fração mais importante associada aos grânulos de amido. A presença de fósforo principalmente na forma de fosfolípidos é uma característica da maioria dos amidos de cereais (MERIDITH *et al.*, 1978) enquanto que féculas de raízes e tubérculos contêm fósforo na forma de monoéster-fosfato (HIZUKURI, 1970). O fósforo inorgânico em geral está ligado a amilose, enquanto que na fécula de batata os fosfolípidos estão localizados na amilopectina. Um elevado teor de fósforo em amidos e féculas de tubérculos pode contribuir para aumento da viscosidade, da capacidade de ligação com água e poder de inchamento, sendo uma vantagem para muitas aplicações industriais (HOOVER, 2001).

Os amidos contêm também quantidades relativamente pequenas de sais minerais (cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio) os quais são, com exceção do fósforo, de pouca significância funcional.

3.2.4. Propriedades do amido

O amido apresenta diferentes propriedades conforme a origem botânica, notadamente na forma e tamanho dos grânulos, na proporção entre amilose e amilopectina, capacidade de absorção de água e temperatura de gelatinização (CABELLO, 1995). A forma e o tamanho no diâmetro dos grânulos de amido estão entre os fatores responsáveis para estabelecer os usos potenciais deste polissacarídeo. Os grânulos de amido variam de 1 a 100 µm em tamanho e as suas estruturas são dependentes de origem botânica (BLAZEK; GILBERT, 2011). São estabelecido em trabalhos uma correlação entre o tamanho do grânulo de amido, sua forma e a distribuição de tamanhos com suas propriedades funcionais e reológicas (NODA; TAKATA; NAGATA, 1992; MADSEN; CHRISTENSEN, 1996; SRIROTH *et al.*, 1999). A determinação do tamanho de partículas e sua distribuição têm obtido crescente interesse das indústrias alimentícias, devido à influência sobre as propriedades de processamento de alimentos em pó (LEONEL; GARCIA; REIS, 2004). Os grânulos de amidos são de formas e tamanhos variados (Tabela 3) (FRAZIER *et al.*, 1997)

Tabela 3. Forma e dimensão dos grânulos de amido das principais fontes.

Origem	Forma dos grânulos	Diâmetro dos grânulos (µm)
Milho	Oval e esférica	5-20
Batata	Esférica e angular	15-75
Trigo	Grânulos grandes – forma de disco	22-36
	Grânulos pequenos –forma esférica	2-3

Fonte: FRAZIER *et al.*, 1997

Os amidos nativos são insolúveis em água fria, e incham ligeiramente devido à difusão e absorção de água nas regiões amorfas. Este inchaço é reversível por secagem. No entanto, quando os grânulos de amido são aquecidos em água a temperaturas progressivamente mais elevadas, sofre uma série de mudanças conhecidas como gelatinização. Sabe-se que a gelatinização tem início no hilum e se expande rapidamente para a periferia, ocorrendo inicialmente nas regiões amorfas devido à fragilidade das ligações de hidrogênio nessas áreas, ao contrário do que ocorre nas regiões cristalinas (SINGH *et al.*, 2003). Se o aquecimento prossegue com uma quantidade suficiente de água, rompe-se a região cristalina e a água entra, fazendo o grânulo romper-se e perder a birrefringência, isto é, não se visualiza mais a cruz de Malta sob luz polarizada (GERMANI, 1999). Durante a gelatinização, a arquitetura e a ordem molecular (duplas hélices) dos grânulos de amido são interrompidos. Esta mudança de estado físico colabora para aumentar a susceptibilidade do amido a hidrólise enzimática (LAURO *et al.*, 1993). Esta série de eventos é uma das transformações mais importantes que ocorre no amido em termos de funcionalidade dos produtos alimentícios, reatividade, susceptibilidade ao ataque enzimático e formação de géis ou pastas (LINEBACK; RASPER, 1988).

A amilopectina por ser o principal polímero responsável pela cristalinidade do grânulo de amido, a presença de amilose diminui o ponto de solubilidade das regiões cristalinas e a energia de início de gelatinização. A gelatinização geralmente ocorre numa ampla faixa de temperatura característica para cada fonte de amido (ELIASSON, 1996; SINGH *et al.*, 2003). Os picos do processo de gelatinização podem estar situados entre 46°C e 137°C (MEDEIROS, 2006). Grânulos menores de amido possuem em geral temperatura de pasta mais baixa do que grânulos maiores (PARK; BAR; PAPINI, 1971; LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004). (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004) relataram que grânulos pequenos de amido de trigo e cevada são hidrolisados mais rapidamente por ácidos ou enzimas do que grânulos grandes.

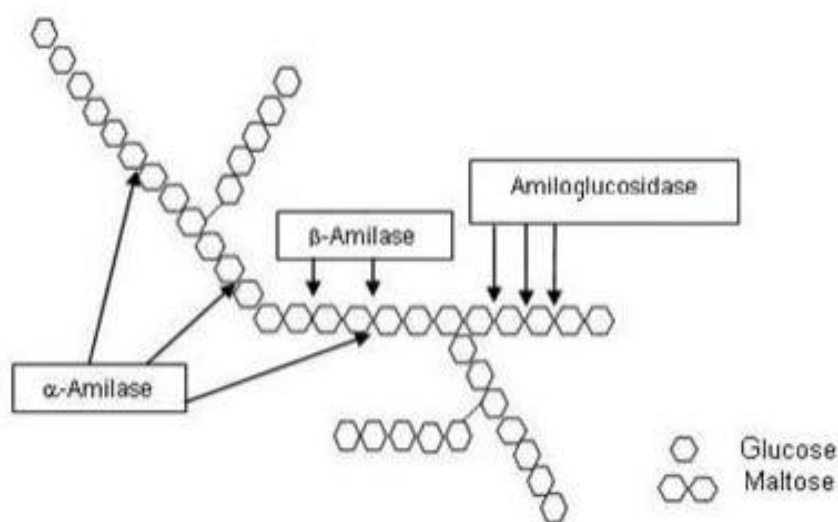
3.3 Hidrólise enzimática do amido

A hidrólise de amidos, comumente, é realizada por duas vias: enzimática e ácida (PASSOS, 2000). A quebra do amido por meio de enzimas exige uma série de condições distintas e muito específicas é mais onerosa e ainda não amplamente utilizada no Brasil. As enzimas permitem às indústrias usarem processos mais econômicos,

diminuindo o consumo de energia; são mais confiáveis e poluem menos, comparativamente ao emprego de ácidos. Sua especificidade evita resultados indesejáveis. Atualmente, as enzimas podem substituir muitos desses produtos químicos e permitir uma produtividade segura e ambientalmente amigável.

Uma variedade de enzimas amilolíticas é capaz de hidrolisar o amido ou outros polímeros de glicose, podendo estas, de acordo com sua maneira de atuação sobre a molécula de amido, ser classificadas como endoamilases ou exoamilases (Figura 8).

Figura 8. Esquema geral de hidrólise do amido por enzimas amilolíticas.



Fonte: VAN DER MAAREL et al. (2002).

As amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglucosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (REED, 1975).

As α -amilases utilizadas para fins industriais são derivadas principalmente de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Aspergillus oryzae* (COSTA, 1996). A α -amilase é a principal enzima envolvida na hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 (OATES, 1997; TAWIL et al., 2011). As amilases, de uma maneira geral, agem

na superfície do grânulo de amido, provavelmente em uma imperfeição estrutural ou fissura, depois estendem-se lateralmente formando cavidades cônicas. A ação contínua da α -amilase causa erosão nos grânulos que podem vir a ser dissolvidos completamente. A α -amilase (EC 3.2.1.1., α -1,4 glicano 4-glicanohidrolase) é uma endoamilase que cliva as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na amilose e amilopectina (açúcares componentes do amido) de forma aleatória na cadeia (VAN; *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003). Algumas α -amilases apresentam atividade de hidrólise das ligações glicosídicas α -1,6, mas com eficiência reduzida (LÉVEQUE *et al.*, 2000; SUVD *et al.*, 2001). Esta enzima hidrolisa amido por um mecanismo múltiplo ataque (ROBYT; FRENCH, 1970). Após a ação, liberam unidades de glicose, oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares e dextrinas. A maior aplicação para a α -amilase está na produção de hidrolisados de amidos (GUPTA *et al.*, 2003).

No processo completo de hidrólise, o amido é convertido em uma mistura de vários oligossacarídeos e dextrinas diferentes pelo uso da α -amilase. Essas maltodextrinas, ligeiramente doces, são submetidas a mais uma conversão pela adição de outras enzimas, promotoras do desdobramento total das moléculas de amilose ou amilopectina que ao se romperem transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e finalmente em glicose (ENZIMAS, 2004; JACQUES; LYONS; KELSALL, 1999). A glucoamilase é a enzima de escolha no uso simultâneo com as α -amilases, provocando um sinergismo na ação e uma hidrólise máxima do amido, por quebrar as ligações α -1,4 e α -1,6.

A glucoamilase clivam ambas as ligações glicosídicas, α -1,4 e/ou α -1,6 (PANDEY *et al.*, 2000; TAKAHA; SMITH, 1999). A amiloglucosidase (α -D-1,4 glicanglicohidrolase), também conhecida como glucoamilase (EC 3.2.1.3), é uma exoenzima que catalisa a reação de hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades não redutoras do amido, transformando-o em glicose. A ação da glucoamilase é lenta no ataque inicial à amilose, pois, sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose (OBEL, 2001).

Em geral, as moléculas de enzima afetam os grânulos de duas maneiras (LI *et al.*, 2011). Em primeiro lugar, as enzimas decorrem a superfície externa do grânulo e causa a ocorrência de fissuras características e poços (exocorrosão). Em segundo lugar,

as enzimas criam canais que as conduzem ao centro do grânulo, o que enfraquece a integridade dos grânulos e, conseqüentemente, leva a sua repartição (endocorrosão) (LI *et al.*, de 2004; OATES, 1997). Estes dois mecanismos de ação são também conhecidos por degradação centrípeta e degradação centrífuga. A degradação centrípeta ocorre a partir da superfície para o centro do grânulo, com as enzimas progredindo ao longo das cadeias de polissacáridos, formando cavidades na superfície. Por outro lado, a erosão centrífuga é provocada por enzimas no interior dos grânulos, que podem ser detectadas, a partir de uma vista externa do granulado, a partir da presença de pequenos poros formados na superfície (HELBERT, 1996). Na literatura se encontram amidos que são afetados por uma única maneira, como também existem tipos de amidos que são afetados pelas duas formas simultaneamente, o que depende da origem do amido, como também da origem das enzimas.

A susceptibilidade do amido ao ataque enzimático depende de suas características morfológicas, estruturais e físico-químicas. Amidos granulares são mais resistentes à hidrólise do que amidos gelatinizados. Muitos fatores, como origem botânica do amido, afetam a taxa e extensão da hidrólise de amidos granulares. Parâmetros estruturais também são importantes: cristalinidade, tamanho de grânulos e superfície específica disponível, taxa amilose/amilopectina, acessibilidade, porosidade e grau de integridade (JACOBS *et al.*, 1998).

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima

A farinha do mesocarpo de babaçu foi utilizada como substrato nas reações de hidrólise enzimática. Esta farinha foi obtida da Associação das Quebradeiras de Coco Babaçu de Itapecuru Mirim-MA.

4.2. Enzimas

Foram utilizadas duas classes de enzimas comerciais, a α -amilase (Liquozyme[®] SC DS) e a glucoamilase (Spirizyme[®] Fuel), generosamente fornecida pela Novozymes Latin America Ltda. A α -amilase é produzida pela Novozymes a partir de uma cepa selecionada de *Bacillus licheniformes*, geneticamente modificada. O pH ótimo de ação enzimática está entre 6 e 8 e temperatura de 90 a 105°C, tendo esta enzima o cálcio como cofator enzimático. A atividade enzimática da α -amilase é 240 KNU-S/g. A atividade da liquozyme é dada em KNU, onde 1 KNU representa a quantidade de enzima que hidrolisa 5,26g de amido por hora, avaliado pelo método Standard da Novozymes. A glucoamilase é produzida pela Novozymes a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*, geneticamente modificada. O pH ótimo de ação enzimática está entre 4 e 4,5 e temperatura de 58 a 60°C. A atividade enzimática da glucoamilase é 750 AGU/g. A atividade da spirizyme é dada em AGU, onde 1 AGU representa a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de maltose por minuto sob condições específicas

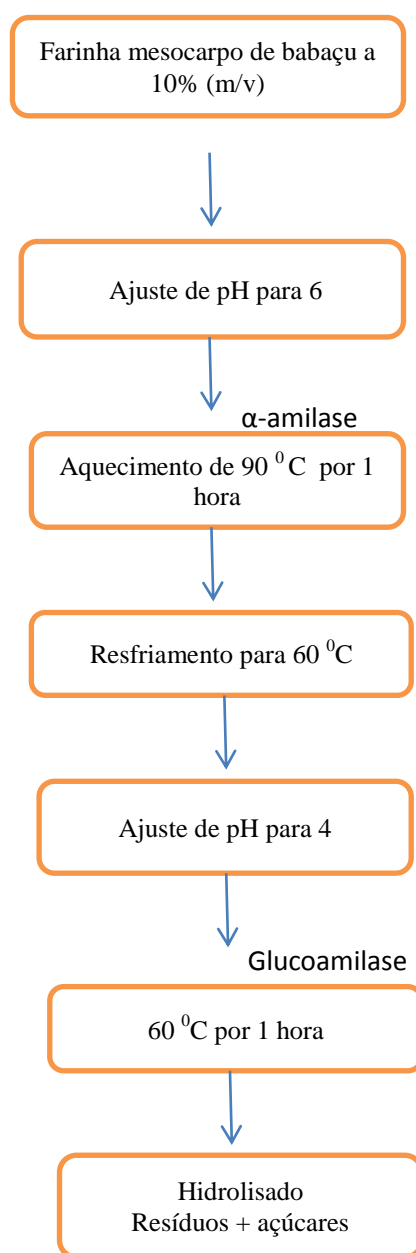
4.3. Procedimento experimental para a hidrólise enzimática

Para verificar a suscetibilidade do amido do mesocarpo de babaçu ao ataque enzimático, foram realizadas reações de hidrólise, utilizando as enzimas α -amilase e glucoamilase. Para cada experimento, utilizou-se 10 g da farinha do mesocarpo de babaçu, e água destilada o suficiente para produzir uma mistura inicial de 10% (m/v). As etapas de liquefação e sacarificação foram realizadas em temperaturas e valores de pH ótimos para cada enzima. O pH foi ajustado com solução de HCl e NaOH, ambos a

0,1 M. Através de ensaios preliminares, estabeleceu-se o tempo de reação em duas horas.

O fluxograma (Figura 9) mostra a produção de etanol a partir da farinha do mesocarpo de babaçu.

Figura 9. Fluxograma do processo de hidrólise enzimática a partir da farinha do mesocarpo de babaçu.



Fonte: próprio autor

Foi feito um planejamento experimental fatorial 2^2 com pontos centrais (2 fatores, 2 níveis e 4 pontos centrais), para estudar a ação das enzimas α -amilase e glucoamilase na hidrólise do amido granular do mesocarpo de babaçu. Para este conjunto de experimentos, foram utilizadas ferramentas estatísticas para análise dos resultados experimentais obtidos. Para tal, utilizou-se o software Statistica 10.0.

4.4. Cálculo das variáveis resposta

4.4.1. Rendimento de hidrólise

A eficiência de hidrólise, ou conversão de hidrólise, foi calculada através da Equação 1.0 (FERREIRA *et al.*, 2006; SLEIMAN e VENTURI NETO, 2004):

$$R. H. (\%) = \frac{\left(\frac{162}{180}\right) \times (Glicose\ final - Glicose\ inicial) \left(\frac{g}{L}\right) \times 100}{Concentração\ de\ farinha \left(\frac{g}{L}\right) \times Teor\ de\ amido (\%)} \quad (\text{Eq. 1.0})$$

Onde, R. H.(%) = Rendimento de Hidrólise (%)

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Caracterização físico-química da farinha do mesocarpo de babaçu

A determinação de carboidratos, amidos, proteínas, lipídeos, cinzas e umidade foram realizadas de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolf Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). A determinação da composição elementar foi realizada em um Espectrofotômetro de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda (WDXRF) da Bruker, modelo S8 Tiger, utilizando fonte de radiação de Ródio (Rh), potência geradora de 30 kV, corrente do tubo 33 mA, colimador 0,23 graus, cristal Li200, detector selado, LLD 1,0 ppm, filmes Myler® (3,6 μ m), recipientes de teflon e diâmetro da máscara 34 mm.

4.5.2. Difração de raios X

Com base na diferença de difração de Raios X em regiões cristalinas e amorfas do grânulo de amido, difração de raios X é geralmente usada para determinar a cristalinidade do amido (BENINCA et al.,2013; MUTUNGI *et al.*, 2012).

Os raios X produzidos a partir do bombeamento do ânodo por elétrons do cátodo acelerados por alta tensão são radiações eletromagnéticas que como tais, podem ser polarizadas, refratadas e refletidas. Em química de coordenação, a determinação da estrutura molecular de um composto é feita pela difração de raios X em monocristal. Porém, a dificuldade da obtenção do mesmo leva a opção do emprego do método do pó, do qual se obtém informações que podem conduzir a verificação de cristalinidade, comparação aos padrões catalogados e verificação de isomorfismo dentro de uma série de compostos. Com base nesses resultados, é possível obter conclusões a respeito da estrutura cristalina dos compostos (CARVALHO FILHO 2000). Com a hidrólise enzimática, pode-se observar a alteração de cristalinidade do amido (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998).

As análises por difração de raios X foram feitas em amidos de babaçu nativo e hidrolisado, utilizando-se o modelo D8 Advance da Bruker, equipado com detector linear, em geometria Bragg-Brentano, passo de $0,03^\circ$ e tempo de contagem por passo de 0,5s. As amostras foram medidas em condições de temperatura e umidade ambiente. Os Difractogramas obtidos foram cuidadosamente alisados e normalizada em relação à maior intensidade. A cristalinidade dos grânulos de amido nativo e parcialmente hidrolisado foi então quantificada em termos de índice de cristalinidade (IC), um parâmetro muitas vezes utilizado para descrever a quantidade relativa de material cristalino numa amostra. O IC foi definido como a razão entre a área da região cristalina e a área total coberta pela curva, composta pela área da região cristalina e a área da região amorfa, conforme a Equação 3.0:

$$IC(\%) = \frac{A_c}{A_c + A_a} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.0})$$

Em que A_c = área cristalina; A_a = área amorfa no difratograma.

4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

A forma e tamanho dos grânulos de amido foram visto com um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (FESEM Leo Supra 50VP, Carl-Ziess SMT, Oberkochen). Grânulos de amido foram montadas em bases de amostras de alumínio com fita adesiva dupla face e por pulverização catódica, com uma camada de 20-30 nm de ouro, usando Sputter Coater [Polaron (Fisons) SC515, VG Microtech, Sussex, Reino Unido]. A tensão de aceleração do SEM é de 5 kV.

4.5.4. HPLC

Foi utilizado para identificar e quantificar a glicose presentes nas amostras, através da comparação dos cromatogramas obtidos com o padrão de glicose. No padrão de glicose, o componente em questão é aluído nas mesmas condições da amostra a ser analisada, tendo a formação de um pico num determinado tempo, chamado de tempo de retenção, e conforme o tempo de retenção das substancias presentes nas amostras, os componentes são identificados. Os cromatogramas são gráficos do tempo em minutos pela resposta do detector.

O padrão de glicose foi obtido comercialmente e analisado em diferentes concentrações (ppm), e com leituras em triplicata, tendo sido determinado as médias e os desvios padrão, conforme a Tabela 4.

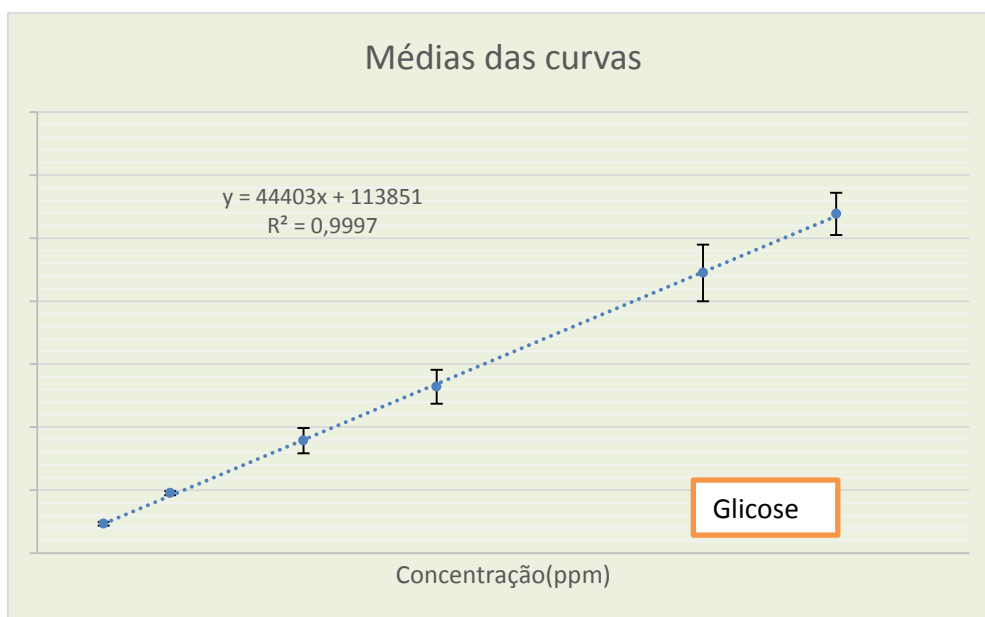
Tabela 4. Valores das leituras em triplicata para cada concentração, valores das médias e os desvios padrão.

Concentração (ppm)	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Médias	Desvio padrão
50	2574344,667	2267307,667	2335319,667	2335319,667	161260,8
100	4985016,333	4661507,333	4758415,667	4758415,667	166030,7
200	10598668	8929191,667	8764775,667	8929191,667	1014671
300	15294086,67	13204514,67	12786327,67	13204514,67	1343506
500	25760618,33	21602711,33	22239421	22239421	2239510
600	29450900	26922021	26283608	26922021	1675039

Fonte: próprio autor

Na Figura 10, temos a curva analítica obtida a partir dos valores das médias das três curvas.

Figura 10: Curva analítica obtida para a glicose



Fonte: próprio autor

O gráfico da concentração do componente pela área do pico obtido. Através deste foi quantificado a glicose da amostra através da área dos sinais cromatográficos. Os perfis em área foram convertidos em concentração (g L^{-1}) a partir de curva do padrão.

4.5.5. Secção experimental

Relação dos reagentes e equipamentos utilizados no presente trabalho.

Reagentes

Os reagentes utilizados foram: Acetonitrila e Água purificada por sistema Mili-Q (Milipore Sistem) e, o padrão de glicose de grau analítico.

Fase móvel

A fase móvel utilizada é constituída de água purificada por sistema Mili-Q (Milipore Sistem) e acetonitrila numa razão de 65:35 (V:V).

Equipamentos

Para o presente trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Shimadzu, Modelo 2010, equipamento de cromatografia líquida de alta resolução com injetor, detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD-LT II) e software LC solution.

- Coluna: de 25cm (CLC – NH₂(M) 25CM - Column); Volume de injeção: foi de 20 µL; Fluxo: fluxo constante de 1 ml por minuto; Temperatura da coluna: 25°C; pressão de 300 a 330KPa; Ganho: 7; Micro seringas Hamilton de 50 µL; Banho ultra-sônico.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Características estruturais do grânulo do mesocarpo de babaçu

A Tabela 5 mostra que o componente que apresentou uma maior porcentagem foi o amido com 64,25%. Valor semelhante para o mesocarpo de babaçu foi descrito, 60% (CINELLI *et al.*, 2014). Esta variação que ocorre entre a quantidade dos constituintes de uma mesma espécie vegetal é normal, pois sendo produto do extrativismo, sofrem influências do solo, clima, variação genética etc. A grande quantidade de hidratos de carbono constituintes do mesocarpo de babaçu o torna importante fonte de biomassa amilácea, o que demonstra o grande potencial deste fruto para a produção de açúcares fermentáveis.

Tabela 5 - Composição química do mesocarpo do babaçu

Componentes	Porcentagem (%)
Amido	64,28 ± 0,008
Cinzas	0,82 ± 0,042
Proteínas	2,85 ± 0,0006
Lipídeos	0,13 ± 0,024
Umidade	11,84 ± 0,10

Fonte: próprio autor

O amido é constituído praticamente de carboidratos, no entanto, alguns constituintes menores também estão presentes. Nas Tabelas 5 e 6 mostram os constituintes menores presentes no mesocarpo de babaçu, entre eles temos: lipídeos, fósforo, proteínas e cinzas. No amido de trigo encontram-se proteínas, lipídeos e cinzas (minerais e sais) nas quantidades de 0,4, 0,9, e 0,5%, respectivamente (LIM *et al.*, 1994). A composição do amido de origens botânicas diferentes pode variar de forma acentuada.

Tabela 6. Composição inorgânica do mesocarpo de babaçu.

Componentes químicos	Porcentagem (%)
Ca	0,26
P	0,16
Cl	0,47
S	0,07
K	1,07
Si	0,03

Fonte: próprio autor

Apesar dos constituintes menores nos grânulos de estarem presentes em quantidades mínimas, exercem grande influência nas propriedades do amido. Os compostos nitrogenados, lipídeos e minerais como o fósforo, exercem influências marcantes nas propriedades do amido (THOMAS et al, 1997). O fósforo é um dos constituintes não hidrato de carbono presentes em amidos, e que afeta significativamente as propriedades funcionais deste carboidrato. O fósforo é encontrado em três formas principais nos grânulos de amido: monoésteres de fosfato, fosfolípidos e de fosfatos inorgânicos e sua presença modifica as propriedades funcionais (LIM et al, 1994). Nos amidos de *Triticeae*, o teor de fósforo é muito perto do conteúdo de lisofosfolípidos, embora exista uma quantidade relativamente pequena de monoésteres de fosfato. No presente trabalho, os teores de fósforos 0,16% e de lipídeos 0,12% apresentam valores bem próximos.

Nos amidos de cereais, o fósforo está principalmente na forma de fosfolípidos, enquanto amidos de tubérculos e raízes são os únicos que contêm monoésteres fosfato, tendo o amido de batata um nível excepcionalmente alto destes monoésteres (BULÉON et al.,1998). Os monoésteres de fosfato são ligados covalentemente à fração de amilopectina do amido, o que aumenta a clareza da pasta de amido e a viscosidade, enquanto que a presença de fosfolípidos resulta em pastas opacas e de menor viscosidade (CRAIG *et al.*, 1989). Durante a gelatinização do amido do mesocarpo de babaçu, a pasta que se forma é opaca, provavelmente devido aos fosfolípidos constituintes.

A amilose pode existir na forma livre ou complexada com lipídeos em grânulos de amido nativo (CHEETHAM; TAO, 1998; TESTER; KARKALAS,

2002; TESTER *et al.*, 2004). Os complexos amilose-lipídeo que são formados nos grânulos de amidos não influenciam da maior ou menor suscetibilidade do amido ao ataque enzimático. Embora o amido amorfo seja rapidamente hidrolisado por α -amilase, a presença de lipídeos e, em particular amilose-lipídeo complexado não fornecem alguma resistência à hidrólise e solubilização (KARKALAS *et al.*, 1992; VASANTHAN, 1996; TESTER *et al.*, 2004). O complexo amilose-lipídeo apenas dificulta o acesso das α -amilase ao local ativo das cadeias de amilose, embora não confira resistência à hidrólise completa, mas apenas um perfil de hidrólise prolongada. Desta forma, a presença de complexo amilose-lipídeo em amidos não diminui a suscetibilidade do carboidrato ao ataque enzimático, mas apenas prolonga o tempo de reação (TESTER, 2006).

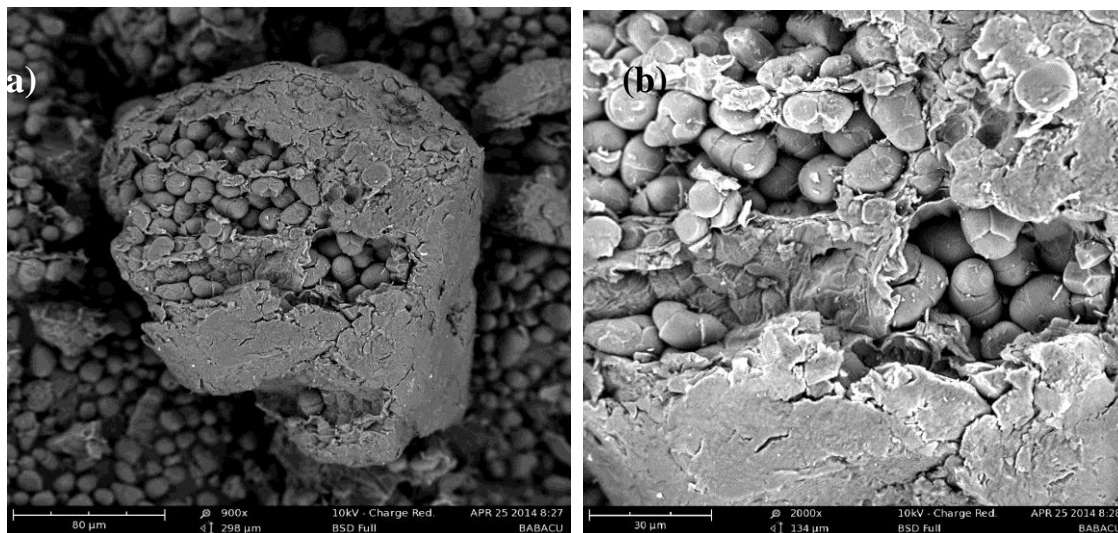
De acordo com a Tabela 6, um dos constituintes no mesocarpo de babaçu é o cálcio, elemento importante para a estabilidade térmica da enzima α -amilases. É demonstrado que as α -amilases na falta desse íon carecem de atividade (VALLEE, 1959). A hidrólise enzimática do mesocarpo de babaçu por enzimas α -amilases, provavelmente é favorecida pelo cálcio presente na farinha do mesocarpo de babaçu.

5.2 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 11 mostra que os grânulos de amido do mesocarpo de babaçu são heterogêneos em tamanho, com formas mais ou menos esféricas ou ovoides, apresenta a superfície lisa. A maioria dos grânulos de amido é oval, embora apresente formas redondas, esféricas, poligonais e também formas irregulares. Todos os grânulos de amido quando observados em microscópio eletrônico de varredura, apresentam superfície lisa, sem nenhuma fissura (HOOVER, 2001). O tamanho e a forma dos grânulos estão relacionados com a fonte biológica da qual o amido é isolado (LINDEBOOM, 2004). No entanto, alterações de clima, como temperatura e chuvas podem influir na formação do grânulo e na deposição do amido, influenciando sobre o tamanho e formato do grânulo de amido.

A morfologia dos grânulos de amido depende da bioquímica dos cloroplastos ou amiloplastos, assim como da fisiologia da planta (BADENHUIZEN, 1969).

Figura 11. Micrografias obtidas por MEV dos grânulos de amido da farinha do mesocarpo de babaçu: (a) ampliada 900 vezes e (b) ampliada 2000 vezes

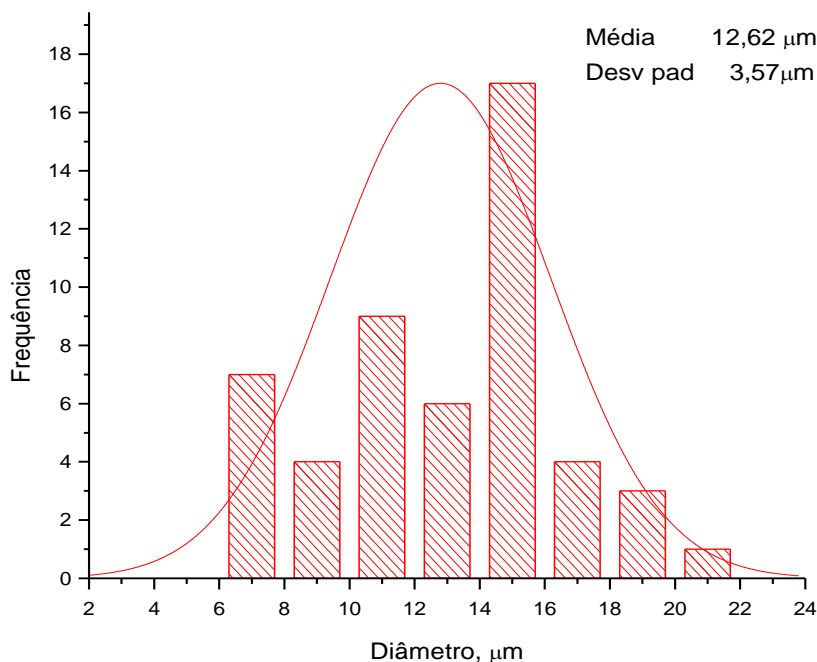


Fonte: próprio autor

As informações sobre o tamanho de grânulos de amido disponíveis na literatura servem para estabelecer a variabilidade do tamanho dos grânulos. O tamanho dos grânulos de amidos se refere à média do diâmetro dos grânulos. Grânulos de amidos foram classificados em grandes, como maiores que 25 μm , médios com valores entre 10 e 25 μm , pequenos, entre 5 e 10 μm , e bem pequenos, com tamanhos menores que 5 μm (LINDEBOOM, 2004). A distribuição de tamanhos de grânulos pode variar de menores que 5 μm , como no caso de amidos de arroz, e maiores que 100 μm , como no amido de batata (SANGUANPONG *et al.*, 2003).

A Figura 12 apresenta a distribuição granulométrica, onde se percebe uma variação no tamanho do diâmetro de 6 a 22 μm , tendo uma média de 12,62 μm .

Figura 12. Curva de distribuição dos tamanhos dos grânulos do amido.



Fonte: próprio autor

Os grânulos do mesocarpo de babaçu em sua grande maioria são de tamanhos médios, e os que possuem diâmetros entre 14-16 μm contribuem com uma maior porcentagem do total de grânulos. Verifica-se em algumas fontes botânicas amidos com os seguintes tamanhos: arroz, (3-10 μm), milho (5-20 μm), trigo (22-36 μm), a mandioca (5-25 μm) e batata (15-85 μm) (MACGREGOR, 1984). A variação apresentada nos diâmetro dos grânulos de amido do mesocarpo de babaçu variou de 6 a 22 μm , assemelhando-se com variação apresentadas para os grânulos do amido de milho. O tamanho dos grânulos de amido pode afetar suas propriedades físico-químicas, tais como a gelatinização, susceptibilidade da enzima, cristalinidade e solubilidade (LINDEBOOM, 2004).

Um passo fundamental para a hidrólise enzimática é a adsorção da enzima a superfície do grânulo de amido, etapa anterior à catálise enzimática, que depende principalmente do tamanho dos grânulos. Uma vez que o amido nativo está numa forma granular, a cinética de hidrólise é complicada pela necessidade de que a enzima se difunda para adsorver sobre a superfície dos grânulos, antes do passo catalítico (SLAUGHTER; ELLIS; BUTTERWORTH, 2001). A adsorção e ligação da enzima à superfície do grânulo é, portanto, um passo fundamental na hidrólise de amido. Os fatores principais que podem afetar a adsorção da enzima ao amido incluem o tamanho

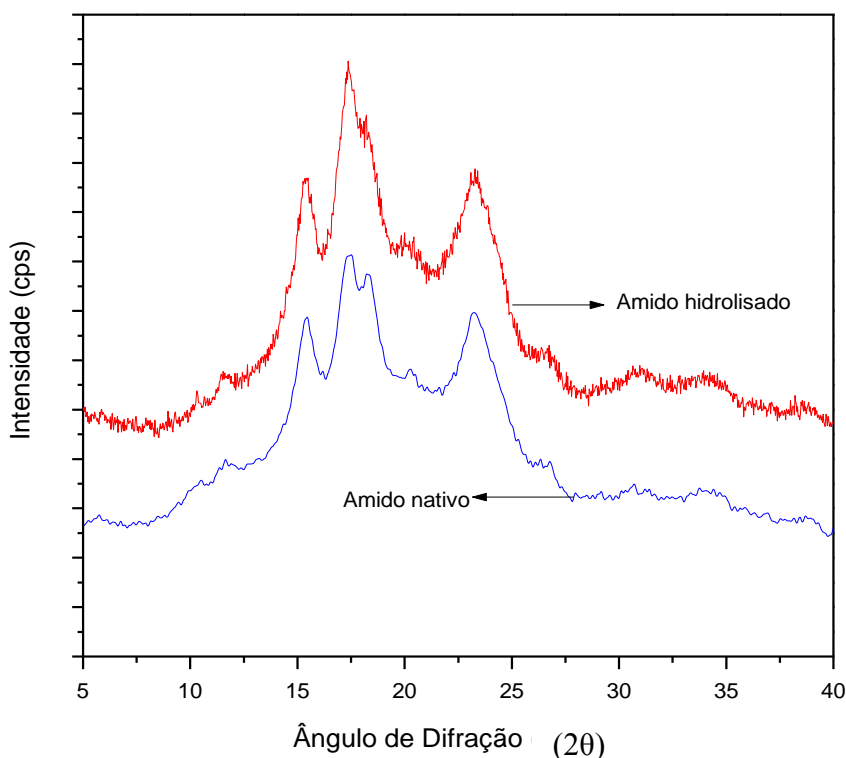
das partículas (e, portanto, a área de superfície exposta) do granulado, a presença de poros/fendas na superfície do grânulo e a estrutura supramolecular das cadeias de hidratos de carbono nas superfícies expostas do grânulo. (COLONNA *et al.*, 1992; TAHIR *et al.*, 2011). A hidrólise enzimática de grânulos de amido envolve enzimas em solução agindo sobre um substrato sólido, e assim a área superficial acessível às enzimas se torna um parâmetro cinético crítico CINELLI *et al.*, 2014). A atividade da α -amilase do pâncreas de suíno em grânulos de amido nativo é descrito em função da área da superfície do grânulo em vez da concentração do substrato (KONG *et al.*, 2003). A taxa de extensão da hidrólise pela α -amilase em amidos de diferentes fontes botânicas foi analisada, onde segue a seguinte ordem: trigo > milho > ervilha > batata, que reflete no aumento do tamanho dos grânulos (RING *et al.*, 1988). Resultados semelhantes foram relatados (FUKAI *et al.*, 1994). Estudos realizados com milho e cevada mostraram maior susceptibilidade enzimática para grânulos de menor diâmetro (FRANCO, *et al.*, 1992; TANG, 2002). O amido de batata doce em relação a outros grãos de amido é mais difícil de hidrolisar, por seus grânulos serem grandes e terem alta cristalinidade (VALLEE, 1959). É bem conhecido que os grânulos de amido de batata têm o maior tamanho entre os amidos mais conhecidos comercialmente, e que esta é, em parte, responsável pela reduzida sensibilidade a ação das amilases (NODA *et al.*, 2005).

Estes estudos sugerem que o tamanho das partículas, e, portanto à área de superfície, pode ser um determinante importante da eficiência de ligação da enzima ao grânulo de amido. Grânulos de tamanhos grandes possuem menor área superficial do que grânulos pequenos num mesmo montante de massa, o que pode facilitar a hidrólise dos grânulos de menor diâmetro. De acordo com a literatura, o amido de milho tem a hidrólise enzimática facilitada em função do tamanho de seus grânulos, por serem de tamanhos médio, o que se pode sugerir o mesmo para os grânulos de amido do mesocarpo de babaçu, uma boa suscetibilidade enzimática, já que possuem grânulos de tamanhos semelhantes ao do amido de milho.

5.3 Padrão de Raios X

A Figura 13 mostra que o amido do mesocarpo de babaçu, tanto em sua forma nativa, como hidrolisado, apresentarão padrão de cristalinidade do tipo A, com picos principais em 2θ iguais a 15° , 17° , 18° e 23° . Desta forma, a hidrólise não alterou o padrão de Raios X do amido do mesocarpo de babaçu, no entanto, o amido hidrolisado teve picos mais nítidos e um caráter mais cristalino. Este padrão de cristalinidade é típico de cereais, já observado e descrito em arroz (MITSUIKI et al, 2005).

Figura 13. Difratoograma de raios X do amido do mesocarpo de babaçu nativo e hidrolisado.



Fonte: próprio autor

O padrão de difração de Raios X depende da origem do amido, bem como as condições ambientais de crescimento (HUANG, 2007). O padrão de cristalinidade do amido constitui um dos principais fatores responsáveis pela suscetibilidade do amido ao ataque enzimático. Os amidos nativos que apresentam um padrão de difração tipo B,

como o amido de batata de alto teor de amilose é mais resistente a hidrólise enzimática do que o amido com uma estrutura cristalina tipo A, como os amidos de cereais (LI et al, 2011). De acordo com a literatura e por apresentar um padrão de difração de raios X tipo A, como os de cereais (exceto variedades alta de amilose), o amido do mesocarpo de babaçu provavelmente seja mais susceptível a hidrólise enzimática, se comparado com amidos de batata, que apresentam padrão de difração do tipo B e alto teor de amilose.

O amido é de natureza semi-cristalina, com diferentes graus de cristalinidade, isto é, 15-45% (ZOBEL, 1988). Acredita-se que as regiões de ataques das amilases ao amido são preferencialmente na região não cristalina e, assim, o grau de cristalinidade terão uma influência sobre a taxa de digestão do grânulo de amido. É sugerido que a distribuição dos cristalitos em grânulos de amido é um fator que controla a taxa de hidrólise (GÉRARD *et al.*, 2001). O índice de cristalinidade do amido nativo do mesocarpo de babaçu é de 28,47%, enquanto o índice de cristalinidade do amido hidrolisado foi de 35,67%. O aumento do índice de cristalinidade sugere que a região amorfa do grânulo de amido foi hidrolisada de forma mais acentuada do que a região do cristalino, provocando desta forma o aumento da cristalinidade do amido. Foi sugerido que a hidrólise enzimática ocorre principalmente na região amorfa nos grânulos de amido (GALLANT, 1972). Em trabalhos foi comprovado que a α -amilase ao penetrar nos grânulos de amido hidrolisam preferencialmente a região amorfa, antes da região do cristalino (GALANTE *et al.*, 1992; BERTOFT *et al.*, 1993a; BERTOFT *et al.*, 1993b). Desta forma, o aumento do índice de cristalinidade do amido do mesocarpo de babaçu é atribuído à hidrólise preferencial dos domínios amorfos pelas enzimas α -amilase e glucoamilase.

Amidos com quantidade menores de amilose possuem uma cristalinidade mais acentuada (CHEETHAM; TAO, 1998). O aumento da quantidade de amilose no amido é inversamente proporcional à quantidade da cristalinidade.

Tabela 7. Proporção de cristalinidade dentro de grânulos de amido de milho nativos com diferentes teores de amilose.

Amido	Teor de amilose (g/kg)	Quantidade de cristalinidade (WAXS ^a)
WMS	0	0,418
MAS	280	0.303
MSB	400	0,218
MSC	560	0.195
MSD	650	0.176
MSE	840	0,172

Fonte: Adaptado por Cheetham e Tao (1998) .

^a WAXS, amplo ângulo de espalhamento de raios X.

De acordo com o valor do índice de cristalinidade do amido do mesocarpo de babaçu (28,47%), e os valores dos teores de amilose correspondentes aos índices de cristalinidade na Tabela 7, sugere que o amido do mesocarpo de babaçu apresente pouca porcentagem de amilose. A quantidade de hidrólise do amido nativo é relatado como sendo inversamente proporcional ao teor de amilose (VASANTHAN; BHATTY, 1996; RENDLEMAN, 2000), onde os amidos ricos em amilose são particularmente mais resistentes (GALANTE *et al.*, 1992).

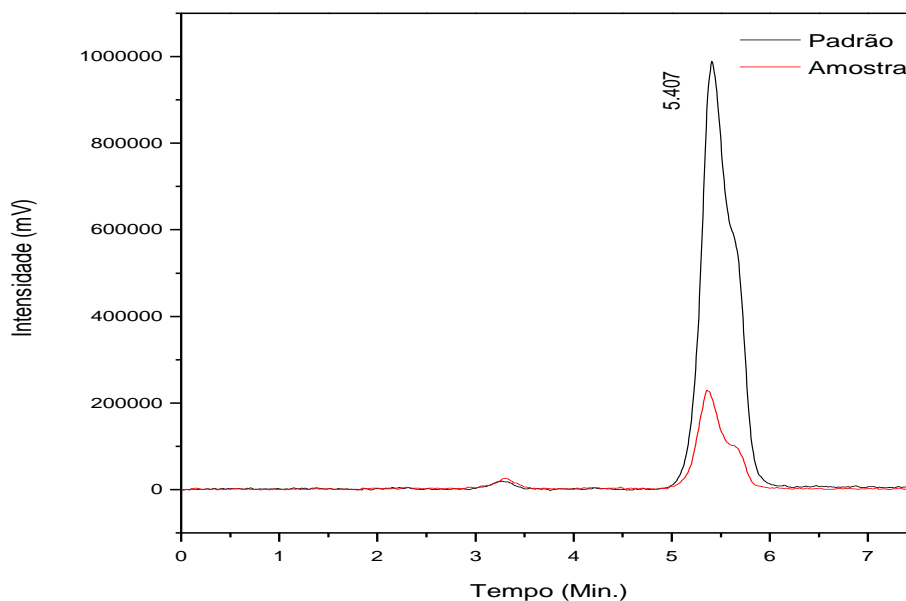
5.4. Hidrólise enzimática

A Figura 14 mostra que a análise cromatográfica para identificar a presença de açúcares nos hidrolisados de babaçu detectou através do método utilizado a presença de um único açúcar, a glicose, identificada através da comparação com o tempo de retenção do padrão de glicose, onde ambos, os hidrolisados e o padrão de glicose tiveram um tempo de retenção de 5,40 min. A Figura 15 mostra a análise cromatográfica de uma amostra do hidrolisado, bem como a análise da mesma amostra, porém, contaminada com a glicose padrão, onde se percebe que houve uma

potencialização do resultado, confirmando que o açúcar presente no hidrolisado é a glicose.

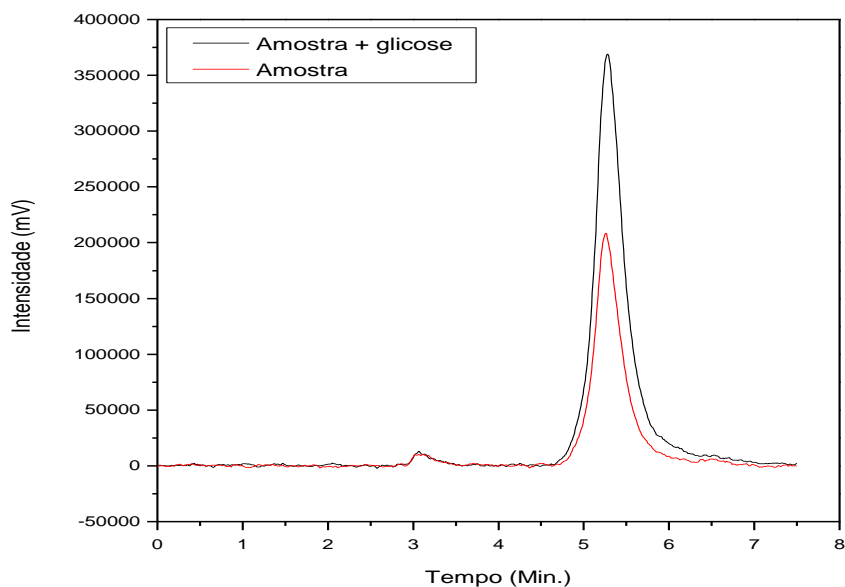
Por ter sido a glicose o único açúcar encontrado no hidrolisado, mostra que as enzimas α -amilases e glucoamilase utilizadas no presente trabalho exibiram uma elevada eficiência na conversão do amido do mesocarpo de babaçu a glicose, comparável com os resultados obtidos em outros trabalhos. As enzimas α -amilases hidrolisam as ligações químicas α -(1-4) do amido, produzindo maltose e maltodextrinas (RUIZ et al. 2011). As glucoamilase terminam de hidrolisar as cadeias maiores de dextrinas, para a obtenção de glicose (LÉVEQUE et al., 2000; SUVD et al., 2001). A glucoamilase é uma enzima de sacarificação, que hidrolisa as ligações α -(1-4) e α -(1-6) do amido, bem como dos polímeros menores, como maltose e maltodextrinas, produzindo desta forma, um fluxo de glicose (GRAY et al., 2006).

Figura 14. Perfil cromatográfico de açúcares do hidrolisado sobrepondo o padrão de glicose.



Fonte: próprio autor

Figura 15. Perfil cromatográfico de uma amostra de açúcares do hidrolisado sobrepondo a mesma amostra, porém contaminada pela glicose padrão.



Fonte: próprio autor

Tabela 8. Efeito da carga de enzimas sobre a hidrólise de amido a partir de 100 g / L de farinha de babaçu. A hidrólise foi realizada a 90° C durante 1 h e depois a 60° C durante mais 1 h.

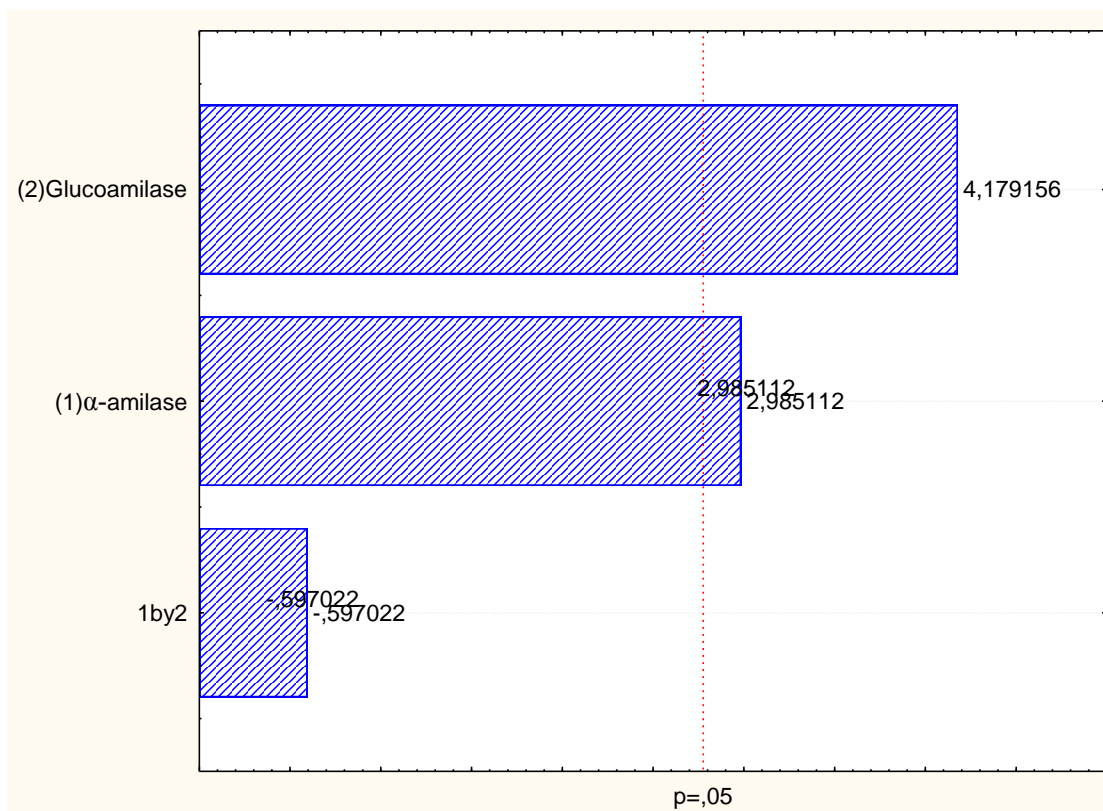
Experimentos	α – amilase (μL)	Glucoamilase (μL)	Concentração glicose (g)
1	50	50	0,85
2	150	50	1,49
3	50	150	1,70
4	150	150	2,13
5	100	100	1,73
6	100	100	1,75
7	100	100	1,77
8	100	100	1,84

Fonte: próprio autor

O rendimento do processo de hidrólise é calculado sobre a quantidade usada de matéria-prima, mais comumente considerando a quantidade do amido que entrou no processo (LEONEL; CEREDA, 1999). Levando em consideração a hidrólise total do amido presente nos 10 gramas de mesocarpo de babaçu, iria ser produzido 7,1 gramas de glicose. A Tabela 8 mostra a concentração de glicose obtida para todos os experimentos. As concentrações de glicose mínima e máxima obtidas nos experimentos do presente trabalho foram de 0,85 g e de 2.13 g, que corresponde aos rendimentos de 12 e 30%. O rendimento foi bem significativo, levando em consideração o curto tempo de reação dos experimentos, de apenas 2 horas. A hidrólise é completa quando uma quantidade em excesso de enzima ou um tempo de hidrólise longo é aplicado (BILIADERIS; GALLOWAY; 1989). Verificou-se um rendimento de 58% na hidrólise enzimática da farinha do mesocarpo de babaçu, num tempo de reação de 72 horas (CINELLI *et al.*, 2014). Os resultados de rendimento da hidrólise enzimática do amido do mesocarpo de babaçu mostram uma boa suscetibilidade deste polissacarídeo ao ataque das enzimas α -amilases e glucoamilases. Monna *et al.* (1989), estudaram a eficiência do uso destas duas enzimas em grânulos de amido de arroz, sagu e batata e concluíram que esta combinação apresenta bons rendimentos na conversão do amido à glicose em todos os substratos. Por ser a glicose o principal açúcar do processo fermentativo das leveduras *Saccharomyces*, e por ser a glicose o único açúcar obtido na hidrólise enzimática do mesocarpo de babaçu, o etanol produzido a partir desta fonte botânica provavelmente seja de boa qualidade.

Na Figura 16, verifica-se que as duas enzimas utilizadas nos experimentos foram significativas para a conversão do amido a glicose, no entanto, a enzima glucoamilase apresentou um maior efeito para a variável resposta.

Figura 16. Diagrama de Pareto para resposta em glicose.



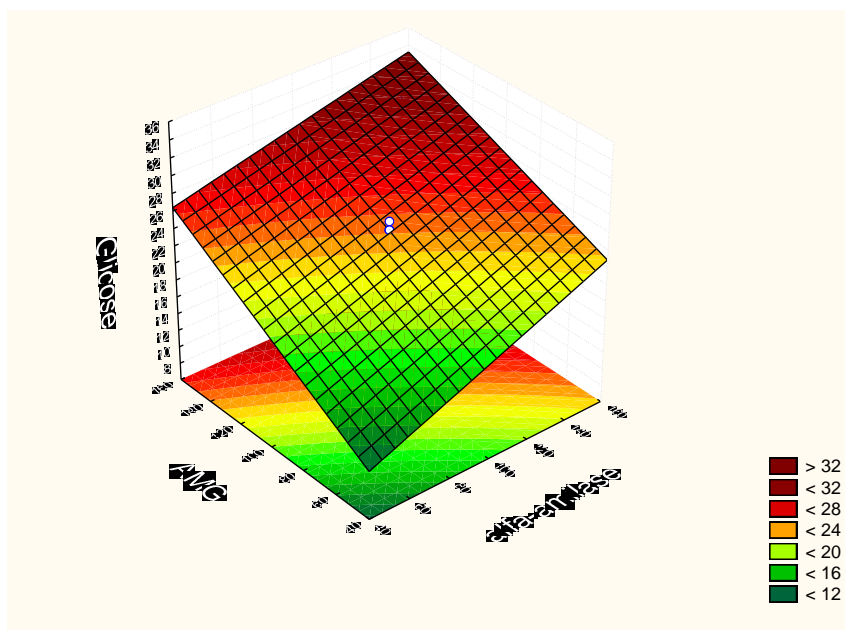
Fonte: próprio autor

A glucoamilase por ser uma enzima de sacarificação, ela rompe as ligações α -(1,4) e α -(1,6) do amido a partir da extremidade não redutora até glicose. O aumento da quantidade de α -amilases, enzima de liquefação, apresentou influência pouco significativa na resposta, provavelmente pelo fato dos experimentos com as menores quantidades de enzimas já terem sido suficientes para saturar os grânulos de amido, de forma que o aumento da carga enzimática nos demais experimentos em nada favorecia para o melhor rendimento da reação.

Pesquisadores estudando o efeito da concentração da enzima α -amilase em reações de hidrólise, como forma de investigar a relação enzima/substrato, observaram que a atividade da enzima e os valores de hidrólise aumentaram no intervalo de 0,2-1,6 g/l, a partir de 1,6g/l, até 2,0 g/l, a velocidade de hidrólise não foi alterado de forma significativa, indicando que a concentração no intervalo de 1,6-2,0 g/l devem saturar os grânulos de amido com moléculas de enzimas ativas (TEXTOR, 1998) Esta inibição deve resultar de algum tipo de inibição enzima-enzima que reduz a capacidade de ligação efetiva nos locais ativos do amido (VALLEE, 1959).

De acordo com a Figura 17, observa-se claramente que com o aumento da quantidade de enzima glucoamilase, a variável resposta aumenta, no entanto, o aumento da quantidade da enzima α -amilase não corresponde ao aumento da variável resposta.

Figura 17. Influência das enzimas α -amilases e glucoamilase para o rendimento de hidrólise.



Fonte: próprio autor

De acordo com a Figura 17, observa-se que com o aumento da quantidade de enzima glucoamilase, a variável resposta aumenta, no entanto, o aumento da quantidade da enzima α -amilase não corresponde ao aumento da variável resposta. Apesar da maior influência da glucoamilase, verificada através da Figura 16, por ter sido a glicose o único açúcar nas amostras, mostra que as duas enzimas se mostraram eficientes e necessárias no processo de hidrólise enzimática, principalmente por ter apenas açúcar, resultado só possível com a ação conjunta das duas enzimas, pois é sabido que pelo fato das alfas amilases não hidrolisarem as ligações α -1,6, a sua ação de forma isolada iria produzir outros açúcares além da glicose, como dextrinas e outros oligossacarídeos.

5.5. Análise da susceptibilidade do amido a hidrólise enzimática

O tamanho dos grânulos de amido, o teor de amilose, a estrutura cristalina ou a presença de complexos amilose-lipídeos são relatados como sendo fatores limitantes à hidrólise do grânulo de amido. Cada um destes fatores já foi detalhadamente estudado e, ainda, de forma isolada, em amidos de fontes diferentes, de forma a se estabelecer à influência que cada um exerce no processo de digestão enzimática. A extensão da taxa de hidrólise enzimática do amido granular tem sido atribuída à interação de muitos fatores, tais como a fonte de amido (RING *et al.*, 1988), a morfologia granular (BREWER; CAI; SHI, 2012; COLONNA; LELOUP; BULEON, 1992), a extensão de associação molecular entre os componentes de amido (DREHER *et al.*, 1984), a razão de amilose/amilopectina (HOOVER; SOSULSKI, 1985), o grau de cristalinidade (HOOVER; SOSULSKI, 1985), o tipo de forma cristalina polimórfica (A, B ou C) (JANE; WONG; MCPHERSON, 1997), complexos amilose-lipídeo (GURAYA *et al.*, de 1997; NEBENSY *et al.*, 2002). O mecanismo exato da digestão enzimática de grânulos de amido é complicado, porque estas características estruturais são muitas vezes interligadas (BIRD *et al.*, 2009). Uma maneira indireta que possibilita o entendimento da estrutura física e química dos amidos é através da utilização de enzimas no amido granular, através da cinética da reação (FRANCO *et al.*, 2001). No entanto, a relativa suscetibilidade do amido depende em grande parte da origem das enzimas utilizadas na reação. A hidrólise do substrato depende fortemente da estrutura do amido e da origem das amilases (BULEON *et al.*, 1998; COLONNA *et al.*, 1992; GALANTE *et al.*, 1992; GERARD *et al.*, 2001; GERNAT *et al.*, 1993; OATES, 1997; WILLIAMSON *et al.*, 1992). O rendimento de hidrólise indica de forma indireta o quanto o amido de uma fonte botânica é susceptível ao ataque enzimático, da sua fácil conversão à glicose.

Com base na literatura e nos parâmetros analisados no presente trabalho, o amido do mesocarpo de babaçu apresenta características morfológicas (grânulos em sua grande maioria de tamanho médios) e físico-químicas (padrão de cristalinidade tipo A) favoráveis ao ataque enzimático. Pelo fato do rendimento de hidrólise ter sido bem significativo no presente trabalho, isto apenas reforça o que já foi discutido, que as propriedades deste amido o torna bem susceptível ao ataque enzimático.

6. CONCLUSÃO

A quantidade de amido presente no mesocarpo de babaçu analisado está de acordo com os valores apresentados na literatura, em média, 64,3%, que faz desse fruto matéria-prima potencial para a produção de açúcares fermentáveis. Constituintes menores foram identificados em pouquíssimas quantidades, sendo o fósforo e lipídeos de maior importância funcional para o amido. Os grânulos de amido do mesocarpo de babaçu possuem formas mais ou menos esféricas ou ovoides. São heterogêneos em tamanho, com diâmetros em sua grande maioria de tamanhos médio, semelhantes ao amido de milho, e da mesma forma que este último, talvez tenha a hidrólise enzimática facilitada em função do tamanho favorável a ação das enzimas. O padrão de cristalinidade do amido é do tipo A, o mesmo apresentado por cereais como o milho e arroz. Após a hidrólise enzimática, o padrão de cristalinidade se manteve o mesmo, no entanto, os picos no difractograma ficaram mais nítidos, demonstrando um caráter mais cristalino, tendo o índice de cristalinidade aumentado, o que sugere que a região amorfa do grânulo de amido foi hidrolisada de forma mais acentuada do que a região do cristalino. De acordo com a literatura, amidos com um padrão de cristalinidade tipo A, são mais susceptível ao ataque enzimático. O único açúcar identificado pelo método utilizado foi a glicose, o que demonstra a grande eficiência das enzimas alfa amilase e glucoamilase na conversão completa do amido a glicose. As concentrações de glicose obtidas, assim como o rendimento de hidrólise foram bem significativos. As propriedades dos grânulos de amido do mesocarpo de babaçu, bem como o rendimento satisfatório de hidrólise, sugere que o amido deste fruto seja bem susceptível ao ataque enzimático. De acordo com o tratamento estatístico, as enzimas α -amilase e glucoamilase demonstraram ter influencia no processo de hidrólise do amido de mesocarpo de babaçu, sendo que a glucoamilase foi a que apresentou um maior efeito para a variável resposta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. R.; LACERDA, L. G.; MURAKAMI, F. S.; BANNACH, G.; DEMIATE, I. M.; SOCCOL, C. R.; FILHO, M. A. D. S. C. e SCHNITZLER, E. Thermal analysis as a screening technique for the characterization of babassu flour and its solid fractions after acid and enzymatic hydrolysis. *Thermochimica Acta*, v.519, n.1-2, p.50-54. 2011.

AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. Degradation of starchy food material by thermal analysis. *Thermochimica Acta*, v. 358, p. 57-63, 2000.

BADENHUIZEN, N. P. The biogenesis of starch granules in higher plants. New York: Appleton Crofts. 1969.

BALL, S. et al. From Glycogen to amilopectin: A model for biogenesis of the plant starch granule. *Cell*, v. 86, p. 349-352, 1996.

BALICK, M. J. Ethnobotany of Palms in the Neotropics. *Advances in Economic Botany*. p. 9-23, 1984.

BARUQUE FILHO, E. A.; BARUQUE, M. D. G. A. e SANT'ANNA JR. G. L. Babassu coconut starch liquefaction: an industrial scale approach to improve conversion yield. *Bioresource Technology*, v. 75, n.1, p. 49-55, 2000.

BLANSHARD, J.M.V. - "Starch granule structure and function: a physicochemical approach", in: *Starch: Properties and Potentials*, Galliard, T Chichester, John-Wiley, New York, cap.2, p.16, 1987.

BLAZEK, J.; Gilbert, E. P. Application of small-angle X-ray and neutrons scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. *Carbohydrate Polymers*, v.85, p. 281-293, 2011.

BERTOFT, E.; MANELIUS, R.; ZHU, Q. Studies on the structure of pea starches. 1. Initial stages in alpha-amylolysis of granular smooth pea starch. *Starch/Stärke* v. 45, p. 215-220, 1993a.

BERTOFT, E.; MANELIUS, R.; ZHU, Q. Studies on the structure of pea starches. Alpha-amylolysis of granular wrinkled pea starch. *Starch/Stärke* v. 45, p. 258-263, 1993b.

BENINCA, C.; COLMAN, T. A. D.; LACERDA, L. G. Thermal, rheological, and structural behaviors of natural and modified cassava starch granules, with sodium hypochlorite solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 111, p. 2217-2222, 2013.

BILIADERIS, C. G.; GALLOWAY, G. Crystallization behavior of amylose V complexes – Structure properties relationships. *Carbohydrate Research*, v. 189, p. 31-48, 1989.

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

BILIADERIS, C. G. Structures and phase-transitions of starch in food systems. *Food Technology*, v. 46, p. 98-105, 1992.

BIRD, A. R.; LOPEZ-RUBIO, A.; SHRESTHA, A. K.; GIDLEY, M. J. Resistant starching vitro and in vivo: factors determining yield, structure, and physiological relevance. In S. Kasapis, I. T. Norton, & J. B. Ubbink (Eds.), *Modern biopolymer science*, p. 449-510, 2009.

BREWER, R. L.; CAI, L.; SHI, Y.C. Mechanism and enzymatic contribution to in vitro test method of digestion for maize starches differing in amylose content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 4379-4387, 2012.

BULEON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V., BALL, S. Starch granules: Structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 23, 85-112, 1998.

CABELLO, C. Identificação de parâmetros para monitoramento de processo contínuo de hidrólise enzimática, na produção de glicose a partir de fécula de mandioca. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995, 208p.

CARNEIRO, A. P. M. et al. Babassu meal in finishing broiler feeder: performance, carcass yield and economical evaluation. *Ciência Animal. Brasileira*, v.10, n.1, p. 40-47, 2009.

CARVALHO FILHO, M. A, S. Preparação e estudo termoanalítico dos cinamatos de terras raras, exceto (escândio), no estado sólido. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, ARARAQUARA, 2000, 145p.

CEREDA, M. P.; FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO L. J. C. B.; LEONEL, M.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. Propriedades gerais do amido. Campinas: Fundação Cargill, v.1, 224 p, 2001.

CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. Carbohydrate Polymers, v. 36, p. 277-284, 1998.

CHEN, J. P.; Wu, K. W.; FUKUDA, H. Bioethanol production from uncooked raw starch by immobilized surface-engineered yeast cells. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 145, p. 59-67, 2008.

CINELLI B. A.; LOPEZ J. A.; CASTILHO L. R.; FREIRE D. M. G.; CASTRO A. M. Granular starch hydrolysis of babassu agroindustrial residue: A bioprocess within the context of biorefinery. Elsevier, v. 124, p. 41-48, 2014.

COLONNA, P.; LELOUP, V.; e BULEON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. European Journal of Clinical Nutrition, v. 46, p. 17-32 1992.

COSTA, J.A.V. Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996, 203p.

CRABB WD, Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. TIBTECH, v. 15, p. 49-352, 1997.

CRAIG, S. A. S.; MANINGAT, C. C.; SEIB, P. A.; HOSENEY, R. C. Starch paste clarity. Cereal Chemistry, v. 66, p. 173-182, 1989.

CRUZ, G.C.N.; COELHO, M. V. Characterization of the Ca-ATPase activity of *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera: Chysomelidae: Bruchinae) larvae. universidade Federal de Urberlandia – Mestrado em genética e bioquímica. Submetido para Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, 2006.

CRUZ, E. T. L. Caracterização do Mesocarpo de Babaçu (*Orbignya sp.*): Termoanálise (TG/DTA) e Avaliação do conteúdo de Amido. Monografia do curso de Farmácia. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

DAMAGER, I.; ENGELSEN, S. B.; BLENNOW, A.; Møller, B. L.; MOTAWIA, M. S. First principles insight into the α -glucan structures of starch: Their synthesis, conformation and hydration. Chemical Reviews, v. 110, p. 2049-2080, 2010.

DONA, A. C.; PAGES G.; GILBERT RG, KUCHEL PW. Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterize oligosaccharides or glucose release. *Carbohydr Polymer*, v. 80, p. 599-617, 2010.

ELIASSON, A. C. *Carbohydrates in food*. New York: Marcel Dekker, 664p, 1996.

ELIASSON, A. C. *Starch in food – Structure, function and applications*. New York: Boca Raton, CRC, 605p, 2004.

ELSENHABER, F.; SCHULZ, W. Monte carlo simulation of the hydration shell of double-helical amylose: A left-handed antiparallel double helix fits best into liquid water structure. *Biopolymers*, v. 32, p. 1643-1664, 1992.

ENZIMAS: Ferramentas indispensáveis num mundo vivo. Brasil: Conselho de informação sobre biotecnologia. 2004. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/pdf/fbci12port.pdf>>. acesso em 25 de janeiro de 2013.

FERREIRA, V. F; ROCHA, D. R; SILVA, F. C. Potencialidades e Oportunidades na Química da Sacarose e Outros Açúcares. *Química Nova*, v. 32. n. 3, p. 623-638, 2009.

FERREIRA, A. O. Desenvolvimento magistral de cápsulas gelatinosas duras de liberação entérica. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006, 163p.

FONTAINE, T. et al. Toward a understanding of biogenesis of the starch granule. *Biochemistry and molecular Biology*, v. 268, n.22, p. 16223-16230, 1993.

FRANCO, C. M. L.; CIACCO, C. F. Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules: Effect of the size of the granules. *Weinheim*, v. 44, n.11, p. 424-426, 1992.

FRANCO, C. M. L. et al. Propriedades do Amido, In: *Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Propriedades Gerais do Amido*. Campinas: Fundação Cargill, v.1, 2001.

FUKAI, Y.; TAKAKI, E.; KOBAYASHI, S. Changes in three kinds of starch granules after enzymatic treatment. *J. Agric. Chem. Soc. Jap.* V. 68, p. 793-800, 1994.

GALLANT, D.; MERCIER, C.; GUILBOT, A. Electron microscopy of starch granules modified by bacterial α -amylase. *Cereal Chem.* V. 49, p. 354-365, 1972.

GALLANT, D.; BOUCHET, B.; BULÉON A.; PÉREZ, S. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1992, 46, (suppl. 2), 3-16.

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, v. 32, n. 3, p. 177-191, 1997.

GERARD, C.; COLONNA, P.; BULEON, A.; PLANCHO, V. Amylolysis of maize mutant starches. *J. Sci. Food Agric.* V. 81, p. 1281-1287, 2001.

GERMANI R. Controle de qualidade tecnológica do grão e da farinha de trigo. Curso de Pós-Graduação em Controle e Garantia de Qualidade de Alimentos UFRJ – Embrapa/CTAA. Módulo III: controle de qualidade químico e físico-químico. Rio de Janeiro, p.27-31, 1999.

GERNAT, C.; RADOSTA, S.; ANGER, H.; DAMASCHUN, G. Crystalline parts of 3 different conformations detected in native and enzymatically degraded starches. *Starch-Staerke*, v. 45, p. 309-314, 1993.

GRAY, A. K.; ZHAO, L. Emptage, M. *Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.* v.10, p. 141-146, 2006.

GUPTA R.; GIGRAS P.; MOHAPATRA H.; GOSWAMI VK.; CHAUHAN B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Proc Biochem*, v. 38, p. 1599-616, 2003.

GURAYA, H. S.; KADAN, R. S.; CHAMPAGNE, E. T. Effect of ricestarch lipid complexes on in vitro digestibility complexing index and viscosity. *Cereal Chemistry*, v. 74, p. 561-565, 1997.

HIZUKURI, S. et al. Estimation of glucose 6-phosphateresidues in starch and the presence of other bound phosphates. *Starch/Stärke, Weinheim*, v. 22, p. 338-341, 1970.

HIZUKURI, S.; TAKEDA, Y.; YASUDA, M. Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydrate Research*, v. 94, n. 2, p. 205- 209, 1981.

HOOVER, R.; SOSULSKI, F. W. Studies on the functional characteristics and digestibility of starches from *Phaseolus vulgaris* biotypes. *Starch*, v. 37, p. 181-191, 1985.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A Review. *Carbohydrate Polymers*, v. 45, n.3, p. 253-267, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Metodos Quimicos e Fisicos para Analise de Alimentos*. S.P, v.1. 2005. 1018 p. (5^a edição).

JACOBS, H. et al. Impact of annealing on the susceptibility of wheat, potato and pea starches to hydrolysis with pancreatin. *Carbohydrate Research*, v. 305, p. 193-207, 1998.

JACQUES, K.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. *The alcohol textbook*. 3.ed. Nottingham: Nottingham Press, 386p, 1999.

JENKINS, P. J.; CAMERON, R. E.; DONALD, A. M. A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke*, v. 45, p. 417-420, 1993.

KARKALAS, J.; TESTER, R.F.; MORRISON, W. R. Properties of damaged starch granules. I. Comparison of a new micromethod for the enzymic determination of damaged starch with the standard AACC and Farrand methods. *J. Cereal Sci.* v.16, p. 237-251, 1992.

KASEMSUWAM, T.; JANE, J.; SCHNABLE, P.; ROBERTSON, D. Characterization of the dominant mutant amylose-extender (Ae1-5180) maize starch. *Cereal Chemistry*, v. 72, n. 5, p. 457-464, 1995.

KIM, K. S.; HUBER, K. C. Physicochemical properties and amylopectin fine structures of A- and B-type granules of waxy and normal soft wheat starch. *Journal of Cereal Science*, v. 51, p. 256-264, 2010.

KIMURA, A.; ROBYT, J. F. Reaction of enzymes with starch granules: reaction of isoamylase with native and gelatinised granules. *Carbohydr. Res.* v. 287, p. 255-261, 1996.

KONG, B. W.; KIM, J.I.; KIM, M.J.; KIM, J.C. Porcine pancreatic alpha-amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area. *Biotech. Prog.* v. 19, p. 1162-1166, 2003.

LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. *Carboidratos em alimentos regionales Ibero americanos*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 648p, 2006.

LE CORRE, D., BRAS, J., e DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: A review. *Biomacro-molecules*, v.11, p.1139-1153, 2010.

LEE, S. W., EBATA, T.; LIU, Y.C.; TANAKA, H. Co-immobilization of three strains of microorganisms and its application in ethanol production from raw starch under unsterile conditions. *J Ferment Bioeng*, v.75, p.36–42, 1993.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Avaliação da celulase e pectinase como enzimas complementares no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para produção de etanol. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 19, p. 113-117, 1999.

LEONEL, M.; GARCIA, A. C. B.; REIS, M. M. Caracterização físico-química e microscópica de amidos de batata-doce, biri, mandioca e taioba e propriedades de expansão após modificação fotoquímica. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 7, n. 2, p. 129-137, 2004.

LÉVÊQUE, E. et al Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, n.1, p. 3-14, 2000.

LI, J. H.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R.; ROSSNAGEL, B. G. Starch from hull-less barley: V. in-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. *Food Chemistry*, v. 84, p. 621-632, 2004.

LI, X.; GAO, W. Y.; WANG, Y. L.; JIANG, Q. Q.; HUANG, L. Q. Granule structural, crystalline, and thermal changes in native Chinese yam starch after hydrolysis with two different enzymes- α -amylase and gluco-amylase. *Starch*, v. 63, p.75-82, 2011.

LIM, S.; KASEMSUWAN, T.; JANE, J. Characterization of phosphorus in starch by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.71, p. 488-493, 1994.

LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R. T. Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starches Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch/Starke*, v. 56, p. 89-99, 2004.

LINEBACK, D. R.; RASPER, V. P. Wheat carbohydrates In: POMERANZ, Y. *Wheat: chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists, v.1, p. 277-372, 1988

MACGREGOR, A. W.; MORGAN, J. E. Structure of amylopectins isolated from large and small starch granules of normal and waxy barley. *Cereal Chem*, v.61, p.222-228, 1984.

MADSEN, M. H.; CHRISTENSEN, D. H. Changes in viscosity properties of potato starch during growth. *Starch*, v. 48, p. 245-249, 1996.

MANNERS, D. J. Starch. In: MANNERS, D.J. *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*. Edinburg: Academic Press, cap. 4, p. 149-19, 1985.

MEDEIROS, A. F. D.; SANTOS, A. F. O.; SOUZA, F. S. DE.; BASÍLIO JÚNIOR, I. D.; PROCÓPIO, J. V. V.; SANTANA, D. P. DE; MACÊDO, R. O. Estudo térmico de pré- formulados de metronidazol obtidos por spray drying. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v. 89, p. 775-781, 2007.

MELO, L. P. Análises físico-químicas do pão enriquecido com mesocarpo de babaçu. In: 2º Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa, 2007.

MEREDITH, P.; DENGATE, H. N.; MORRISON, H. R. The lipids of various sizes of wheat starch granules. *Starch/Stärke*, Weinheim, v. 30, p. 119-122, 1978.

MIAO, M.; ZHANG, T.; JIANG, B. Characterizations of Kabuli and Desi chickpea starches cultivated in China. *Food Chemistry*, v. 113, p. 1025-1032, 2009.

MONNA, M.; YAMAMOTO, Y.; KAGEI, N.; KAINUMA, K. *Starch Stärke*, v. 41, p. 382-385, 1989.

MOORTHY, S. N. Tuber crops starches, *Technology Bulletin*, n.18, Central Tuber Crops Research Institute, Triruvananthapuram, p.52, 2001.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal amylases – a overview. *Carbohydrate Polymers*, v.60, p.163-173, 2005.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARAES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol. Adv.* v.28 (6), p.817-830, 2010.

MUTUNGI, C.; PASSAUER, L.; ONYANGO, C.; JAROS, D.; e ROHM, H. Debranched cassava starch crystallinity determination by Raman spectroscopy: Correlation of features in Raman spectra with X-ray diffraction and C-13 CP/MAS NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 87(1), p. 598-606, 2012.

NEBENSY, E.; ROSICKA, J.; e TKACZYK, M. Effect of enzymatic hydrolysis of wheat starch on amylose–lipid complexes stability. *Starch*, v.54, p. 603-608, 2002.

NODA, T.; TAKAHATA, Y.; NAGATA, T. Properties of sweet potato starches from different tissue zones. *Starch/Stärke*, Weinheim v. 44, n.10, p. 365-368, 1992.

NODA, T.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; KIM, S.-J.; HASHIMOTO, N.; YAMAUCHI, H.; *et al.* Physicochemical properties and amylopectin structures of large, small and extremely small potato starch granules. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 245-251, 2005.

OBEL, L. B. Putting enzymes to work in bakery applications. *Cereal Foods World*, v. 46, n.9, p. 396-399, 2001.

OATES CG. Towards and understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends Food Sci Technol*, v. 8, p. 375-82, 1997.

PANDEY A.; NIGAM P.; SOCCOL CR.; SOCCOL VY.; SINGH D.; MOHAN R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*; v.31, p.135-52, 2000.

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, v. 34, n.1, p. 1-17, 2001.

PASSOS, M. Valorização biotecnológica do hidrolisado fosfórico de amido de mandioca: produção de biomassa e astaxantina utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002, 150p.

PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Stärke*, v.62, p. 389-420, 2010.

REED, G. *Enzymes in Food Processing*. 2.ed. New York: Academic Press Inc, p. 62-87, 1975.

REGULY, J. C. *Biotecnologia dos processos fermentativos*. [S.l.]: Editora Universitária/UFPel, 1996, 330 p.

REGULY, J. C. *Biotecnologia dos processos fermentativos: fermentações industriais e biomassa celular*. Pelotas: Editora Universitária, 1998, 224 p.

RENDLEMAN, J. A. Hydrolytic action of α -amylase on high amylose starch of lowmolecular mass. *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 31, p. 171-178, 2000.

RING, S. G., GEE, J. M., WHITTAM, M., ORFORD, P., JOHNSON, I. T. Resistant starch: Its chemical form in foodstuffs and effect on digestibility in vitro. *Food Chem.* v. 28, p. 97-109, 1988.

ROBERTSON, G. H.; WONG, D. W. S.; LEE, C. C.; WAGSCHAL, K.; SMITH, M. R.; ORTS, W. J. Native or raw starch digestion: A key step in energy efficient biorefining of grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 353-365, 2005.

ROBYT, J. F.; FRENCH, D. The action patterns of porcine pancreatic α -amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, v. 245, p. 1917-1927, 1970.

ROSA, I. G. Estudo químico, qualitativo e quantitativo, do resíduo amiláceo do coco babaçu. *Revista de Química Industrial*, v. 1, n.71, p. 56-62, 1986.

ROSENTHAL, F. R. T. O amido do coco de babaçu, algumas propriedades dos grânulos e das pastas. *Revista Brasileira de Tecnologia*, v. 6, p. 29-33, 1975.

RUIZ, M. I.; SANCHEZ, C. I.; TORRES, R. G.; MOLINA, R. D. Enzymatic hydrolysis of cassava starch for production of bioethanol with a Colombian wild yeast strain. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 22(12), p. 2337-2343, 2011.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feed stocks. *Bioresource Technology*, v. 99(13), p. 5270-5295, 2008.

SANGUANPONG, V., et al. Hydration and physicochemical properties of small particle cassava starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 83, p. 123-132, 2003.

SANTANA, N. B. Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzima e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFV, 2007, 104p.

SCHOCH, T. J. Non-carbohydrate substance in the cereal starches. *Journal of American Chemical Society*, v. 64, p. 2954-2957, 1964a.

SCHOCH, T. J. Fractionation of starch by selective precipitation with butanol. *Journal of American Chemical Society*, v.64, 2957-2961, 1942b.

SILVA, J. A.; SILVA, F. L. H.; ALVES, R. R. N.; SANTANA, D. P.; Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 695-698, 2006.

SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, v. 81, p. 219-231, 2003.

SLAUGHTER, S. L., ELLIS, P. R., BUTTERWORTH, P. J. An investigation of the action of porcine pancreatic α -amylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Elsevier, v. 1525, p. 29-36, 2001.

SLEIMAN, M.; VENTURI FILHO, W. G. Utilização de extratos de malte na fabricação de cervejas: Avaliação físico-química e sensorial. *Brazilian Journal Food and Technology*, v. 7, n.2, p. 145-153, 2004.

SRICHUWONG, S.; JANE, J.-L. Physico chemical properties of starch affected by molecular composition and structures: A review. *Food Science and Biotechnology*, v. 16, p. 663-674, 2007.

SRIROTH, K.; SANTISOPASRI, V.; PETCHALANUWAT, C.; KURUTJANAWONG, K., PIYACHOMKWAN, K., OATES, C. G. Cassava starch granule structure-function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v.38, p.161-170, 1999.

SURMELY, R. et al. Hidrólise do Amido. In: *culturas de tuberosas amiláceas latino americanas*. v.3, cap.15. p. 377-395, 2003

SUVD, D. et al. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase: possible factors determining the thermostability. *Journal of Biochemistry*, v.129, p.461-468, 2001.

TAHIR, R., ELLIS, P. R., BOGRACHEVA, T. Y., MEARES-TAYLOR, C., BUTTERWORTH, P. J. Study of the structure and properties of native and hydrothermally processed wild-type, lam and r variant pea starches that affect amylolysis of these starches. *Biomacromolecules*, v.12, p.123-133, 2011.

TAKAHA, T., SMITH, SM. The function of 4- α -glucanotransferases and their use for the production of cyclic glucans. *Biotechnol Genet Eng Rev*, v.16, p.257-80, 1999.

TANG, H., WATANABE, K., MITSUNAGA, T. Structure and functionality of large, medium and small granule starches in normal and waxy barley endosperms. *Carbohydrate Polym*, v. 49, n. 2, p. 217-224, 2002.

TAWIL, G., VIKSØ-NIELSEN, A., ROLLAND-SABATÉ, A., COLONNA, P., BULÉON, A. In depth study of a new highly efficient raw starch hydrolyzing α -amylase from *Rhizomucor* sp. *Biomacromolecules*, v.12, p.34-42, 2011.

TEIXEIRA, M. A. Estimativa do potencial energético na indústria do óleo de babaçu no Brasil. Anais do Encontro Energético Meio Rural. Anais. Unicamp-SP, 2000.

TESTER, R. F., KARKALAS, J. Starch. In: Steinbüchel, A. (series Ed.), Vandamme, E.J., De Baets, S., Steinbüchel, A. (volume Eds.) Biopolymers, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes. Wiley-VCH, Weinheim, V. 6, p. 381–438, 2002.

TESTER, R. F., KARKALAS, J., QI, X. Starch composition, fine structure and architecture. Journal of Cereal Science, v. 39, p. 151-165, 2004.

TESTER, R. F., QI, X., e KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases. Animal Feed Science and Technology, v. 130, p. 39–54, 2006.

THOMAS, D. J., ATWELL, W. A. Starches: practical guides for the food industry. Minnesota: Eagan Press Handbook Series, 1999, 94p.

TEXTOR, S.D., HILL, G.A., MACDONALD, D.G., DENIS, E.S. Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules. Can J Chem Eng, v. 76, p. 87-93, 1998.

VALLEE, B. L., STEIN, E. A., SUMMERWELL, W. N. FISHER, E.H. Metal content of α -amylases of various origins. J. Biol. Chem., v. 234, p. 2901-2929, 1959

VANDEPUTTE, G. E., DELCOUR, J. A. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. Carbohydrate Polymers, v. 58, n. 3, p. 245-266, 2004.

VAN DER BURGT, Y. E. M., BERGSMA, J., BLEEKER, I. P., MIJLAND, P. J. H. C., KAMERLING, J. P., VLIEGENHART, J. F. G. Structural studies on methylated starch granules. Starch, v. 52, n. 2-3, p. 40-43, 2000.

VAN DER MAAREL MJEK, VAN DER VEEN B, UITDEHAAG JCM, LEEMHUIS H, DIJKHUIZEN L. Properties and applications of starch converting enzymes of the α -amylase family. J Biotechnol v. 94, p.137–55, 2002.

VASANTHAN, T., BHATTY, R. S. Physicochemical properties of small- and large-granule starches of waxy, regular and high-amylose barleys. Cereal Chem. v. 73, p. 199–207, 1996.

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

WHISTLER, R. L., DANIEL, J. R. Carbohidratos In: FENNEMA O.R. Química de los alimentos Zaragoza: Acricibicia, p. 81-156, 1993.

YOU, S., IZYDORCZYK, M. S. Molecular characteristics of barley starches with variable amylose content. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 49, n.1, p. 33-42, 2002.

ZANIN, G. M. et al. Brazilian bioethanol program. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.84-86, p.1147-1161, 2000.

ZAVAREZE, E. R., DIAS, A. R. G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 317-328, 2011.

ZHANG, B. J., LI, X. X., LIU, J., XIE, F. W., CHEN, L. Supramolecular structure of A- and B-type granules of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, v. 31, p. 68-73, 2013.

ZHANG, B. J., ZHAO, Y., LI, X. X., LI, L., XIE, F. W., CHEN, L. Supramolecular structural changes of waxy and high-amylose cornstarches heated in abundant water. *Food Hydrocolloids*, v. 35, p. 700-709, 2014.

ZHENG, Y., Yu, C., CHENG, Y., LEE, C., SIMMONS, C., DOOLEY, T., ZHANG, R., JENKINS, R., VANDER GHEYNS, J. Integrating sugar beet pulp storage, hydrolysis and fermentation for fuel ethanol production. *Appl. Energy*, v. 93, p. 168-175, 2012.

ZHONG, F., LI, Y., IBANZ, A.M., OH, M.H., MCKENZIE, K.S., SHOEMAKER, C. The effect of rice variety and starch isolation method on the pasting and rheological properties of rice starch pastes. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 2, p. 406-414, 2009.

ZOBEL, H. F. Starch crystal transformations and their industrial importance, *Starch/Stärke*, v. 40, n.1, p. 1-7, 1988.