

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM HIDROLISADOS DE AMIDOS DE MANDIOCA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.

Determination of carbohydrates concentration in cassava starches's hydrolysates  
by infrared spectrometry

Cláudio CABELLO<sup>1</sup>

### RESUMO

A determinação da concentração de amido em amostras de féculas de mandioca segue metodologia proposta pela AOAC que permite quantificá-lo indiretamente após efetuar a sua hidrólise total e a determinação da concentração de glicose obtida. Esta metodologia consome tempo para as etapas de digestão enzimática com amilases para hidrolisar o amido e a sequente determinação dos açúcares redutores por Somogy-Nelson. Apresenta imprecisões devido à hidrólise incompleta dos amidos que se ligam à matéria-graxa, proteínas e fosfatos, pela limitação da hidrólise enzimática e também pelas reações de transglicosilação causadas pelas glucoamilases utilizadas. Este trabalho se propôs a definir um outro protocolo de análise onde os amidos gelatinizados e/ou hidrolisados poderiam ser quantificados a partir da concentração de carbono orgânico, determinado num espectrofotômetro de absorção gasosa para CO<sub>2</sub> e a concentração de açúcares redutores totais. Amido de mandioca devidamente purificado foi submetido à hidrólise ácida e os produtos da hidrólise em diferentes tempos foram analisados quanto a sua concentração de açúcares redutores e quantificação de carbono orgânico total. Ensaios demonstraram que a diferença entre o valor teórico esperado e o medido por esta metodologia foi de 0,42%, o tempo de realização reduziu-se significativamente e a metodologia mostrou-se mais robusta a erros de manipulação.

**Palavras-chave:** amido, análise carboidrato, fécula de mandioca, TOC.

### SUMMARY

*The determination of the concentration of starches in starch samples follows methodology proposed by AOAC that allows to quantify it indirectly after making your total hydrolysis and the determination of the concentration of obtained glucose. This methodology consumes approximately 6 hours for the stages of enzymatic digestion with amylases for to hydrolyse the sample of starch and the sequent determination of the sugar reducers for Somogy and Nelson. Besides the consumed time, the determinations present imprecisions due to the incomplete hydrolysis of the starches that link to the matter-grease and proteins, for the limitation of the enzymatic hydrolyse and also for the transglucosylation reactions caused by the used amyloglucosidase. This work intended to define another analysis protocol where the starches gelling and/or hydrolysates are quantified starting from*

<sup>1</sup> CERAT/UNESP - Rua José Barbosa de Barros, 1780 CEP 18610-307 Botucatu - SP dircerat@fca.unesp.br

*the concentration of organic carbon in an spectrophotometer of gaseous absorption for CO<sub>2</sub> (carbon dioxid) and the concentration of sugars total reducers. It was verified that the difference between the expected theorical value and the measured value for this methodology was 0,42%, the time of accomplishment was reduced significantly and the methodology was shown more robust to manipulation mistakes.*

**Keywords:** starch, carbohydrates analysis, cassava's flour, TOC.

## 1. INTRODUÇÃO

Os amidos são utilizados na indústria de alimentos para conferir características funcionais em produtos devido principalmente à presença dos polissacarídeos amiloses e amilopectinas que os compõe. A amilose é um polímero de cadeia linear contendo ligações glicosídicas tipo  $\alpha$  1-4, apresentando peso molecular de  $1,5 \times 10^5$  a  $10^6$  g/mol. As amilopectinas são de cadeia ramificada onde cadeias de 1-4  $\alpha$ -D-glucana possuem conexões axiais tipo 1-6  $\alpha$ -D-glucana a cada 20-25 unidades glicose da cadeia linear e peso molecular da ordem de  $5 \times 10^6$  a  $10^8$  g/mol (BANKS, GREENWOOD, KHAN, 1971). Estes dois polissacarídeos estão presentes nos grânulos de amido em diferentes proporções e, em função de suas estruturas moleculares, conferem características de viscosidade, solubilidade, poder de gelificação ou de adesão, e outras mais, diretamente relacionadas a sua origem botânica (MUA, JACKSON, 1997). Quimicamente os amidos das mais diversas fontes botânicas são iguais, ou seja, são carboidratos que diferem apenas na composição relativa e organização dos biopolímeros que o compõe (ZOBEL, 1988; HOOVER, 2001). A presença de proteínas, matérias graxas, e outras substâncias orgânicas e inorgânicas, lhes conferem características funcionais particulares

que o indicam para utilização nas indústrias de alimentos, químicas, etc.

A separação de amilose e amilopectina em amostras de amido gelatinizado é eficientemente realizada utilizando-se colunas cromatográficas para filtração em gel (GERARD et al. 2001) que separa seus componentes através da permeação e exclusão por tamanho e, deste modo, pode-se obter frações purificadas desses polissacarídeos. A permeação na coluna cromatográfica gera frações coletadas em numerosos frascos que demandarão análises de concentrações e para avaliação de tamanhos das cadeia poliméricas dos biopolímeros contidos (INOUCHI, et al. 1983; FREDRIKSSON et al., 1997). Cada uma das frações de permeado, é submetida à uma hidrólise enzimática com enzima amilolítica (amiloglucosidase) para transformação dos polissacarídeos presentes em glicose que, desta maneira, será quantificada geralmente pelo método de Somogy- Nelson (NELSON, 1944; SOMOGY, 1945). Considerando a quantidade de frações, geralmente dezenas, e os passos necessários para efetuar cada uma dessas análises enzimáticas, verifica-se que o tempo total consumido no experimento tem um peso significativo na sua realização, bem como a vulnerabilidade à erros de manipulação. Este

fato restringe naturalmente a sua aplicação mais intensivamente.

Algumas indústrias monitoram continuamente a concentração de matéria orgânica em águas residuárias do seu processo utilizando aparelho analítico denominado TOC (carbono orgânico total) que determina o teor de carbono orgânico e inorgânico (TEIXEIRA, JARDIM, 2004). Estes valores permitem avaliações e gestões sobre o processo de produção, ao tratamento das águas residuárias, custos, etc, otimizando todo o sistema produtivo a um custo relativamente baixo. O método permite respostas rápidas na atuação no sistema e esta concepção foi considerada para ser aplicada na solução de elevado número de amostras contendo carboidrato como analito.

O objetivo deste trabalho foi verificar a concentração de carboidratos em cada uma das frações do permeado de uma corrida cromatográfica de separação dos biopolímeros contidos numa amostra de amido de mandioca, por metodologia que não utilize a hidrólise enzimática e posterior análise espectrofotométrica para indiretamente avaliar a sua concentração. Optou-se por determinar o carbono orgânico total (TOC) onde o carbono orgânico é queimado em forno de alumina a 680°C transformando-se em CO<sub>2</sub> que é detectado num espectrofotômetro para gás com comprimento de onda na região do infravermelho.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparo e caracterização da amostra de fécula de mandioca

A amostra de fécula de mandioca foi fornecida pelo CERAT - Centro de Raízes e Amidos Tropicais a partir de estoques excedentes originados de extrações industriais recentes. Foi inicialmente lavada em água a pH neutro por três vezes para remoção de compostos solúveis e a seguir secas em estufa a 35°C. Alíquotas de 20,0 gramas das amostras foram convenientemente desengorduradas em aparelho Soxhlet utilizando etanol em refluxo durante um período de 8 horas para remoção de matérias graxas. As amostras foram ressuspensas em água destilada e após decantação, foram pré-secadas em estufa a 35°C até teor de umidade em torno de 12%, após o que as mesmas foram submetidas à temperatura de 105°C para secagem final. Após secagem as diferentes alíquotas foram misturadas.

A composição química das féculas de mandioca antes e após tratamento de purificação foi determinada de acordo com metodologias descritas pela AOAC (1975):

a) concentração de proteínas: amostra de amido foi tratada com ácido inorgânico que produziu um sal amoniacal que por diluição em solução ácida padronizada, foi titulada. O resultado foi multiplicado pelo fator 6,25 para quantificação em equivalente proteínas (método Kjeldahl).

b) matéria graxa: amostra de amido foi colocada em cartucho de papel filtro e instalado em câmara do extrator Soxhlet cujo refluxo do solvente éter de petróleo removeu a matéria graxa que foi quantificada através da variação de massa do frasco coletor após evaporação do eluente;

c) teor de cinzas: amostra de amido foi calcinada em forno até temperatura de 550°C para remoção de matéria orgânica e por diferença de massa quantificou-se a matéria inorgânica oxidada;

d) teor de amidos: amostra de amido foi hidrolisada utilizando-se enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase e, em seguida, foi efetuada a determinação de açúcares redutores, aplicando um fator de 0,9 e transformado em equivalente de amido.

## 2. Hidrólise ácida da amostra de fécula de mandioca

Amostra de fécula de mandioca purificada de 5,00 g foi dispersa em 95,0 mL de água destilada num béquer com capacidade para 250 mL. Foi verificada a massa total do conjunto numa balança semi-analítica com duas casas decimais, ou seja, resolução de 0,01 g e, em seguida, o conjunto foi colocado num banho-maria sob agitação até atingir 90°C quando foi adicionado 1 mL de HCl 3M para que o pH ficasse em torno de 1,5. Novamente foi pesado o conjunto e acrescentado o volume de água destilada necessária para que a concentração de soluto fosse de 5% (peso/peso). O béquer retornou ao banho maria na temperatura em ebulição com um vidro de relógio justaposto em sua borda superior para evitar perda excessiva por evaporação. Agitação periódica foi efetuada a cada dois minutos utilizando-se bastão de vidro. Foram efetuados ensaios em triplicatas.

O tempo inicial foi considerado como sendo o de adição do HCl e a cada período de 20 minutos, o béquer era retirado, seco externamente e adequadamente colocado na

balança sendo então reposta a água de modo a recuperar o valor da massa do início daquele período de tempo. Uma alíquota de 2 ml era coletada por meio de uma pipeta volumétrica e diluída em água destilada num balão volumétrico de 50 ml. Registrava-se a massa do béquer e retornava ao banho maria. Manteve-se inalterada a concentração de soluto a 5%. Foram assim coletadas amostras nos tempos de 20, 40, 60, 80 e 100 minutos de hidrólise.

## 3. Determinação da concentração de açúcares redutores

Nas amostras diluídas obtidas nos diversos tempos de hidrólise foram realizadas determinações da concentração de açúcares redutores em duplicata pelo método de Somogy-Nelson (NELSON, 1944 e SOMOGY, 1945).

## 4. Determinação da concentração de Carbono Orgânico Total (TOC)

Nas amostras diluídas obtidas nos diversos tempos de hidrólise foram realizadas determinações da concentração de carbono orgânico total utilizando um espectrofotômetro gasoso de absorção no infravermelho marca Shimadzu, modelo TOC-5000A. Cada amostra foi previamente filtrada em membrana 0,22  $\mu$ m para remoção de particulado insolúvel e foi tomado o valor médio de 03 (três) leituras consecutivas da concentração em ppm de Carbono. Amostras padrão de biftalato de potássio ( $C_8 H_5 O_4 K$ ) equivalente a 1.000 ppm de carbono foram injetadas para efetuar ajustes na curva de calibração do aparelho.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 podem ser observados os valores das concentrações de amido, proteínas, matérias graxas e cinzas na amostra de fécula

de mandioca antes e após o tratamento de purificação.

**TABELA 1.** Efeitos do tratamento de purificação aplicado na amostra de fécula de mandioca.

Composto	Antes (%)	Após (%)
Amido	88,50	97,90
Proteínas	0,34	n.d.
Matéria-graxa	0,22	0,04
Cinzas	0,12	0,04

n.d. – não detectado

A remoção das proteínas e significativa diminuição nos teores de matéria graxa e cinzas mostram a elevação da concentração de amidos, mas ainda remanescem 2,02% de contaminantes que provavelmente são pequenos fragmentos de tecidos celulares das raízes onde estavam contidos os amidos que não foram separados no processo de extração da fécula da raiz de mandioca. Ácidos graxos formam complexos de inclusão com as amiloses e são removidos por tratamentos mais enérgicos com temperaturas acima de 120°C (ZOBEL, STEPHEN, 1995).

Após a fase de gelatinização do amido onde ocorrem a liberação dos polissacarídeos amilose e amilopectina arranjados nos grânulos, inicia-se um processo de hidrólise das ligações tipo  $\alpha$ -1,4, se o meio aquoso contiver hidrogênio ionizável disponível e temperatura elevada para superar a energia de ativação, em torno de 138,6 kJ/mol em pH 1,10 (ZHEREBTSOV, et al. 1995). Estas rupturas das ligações ocorrem aleatoriamente produzindo dextrinas,

oligossacarídeos e unidades glicose que possuem uma extremidade redutora, ou seja, uma carbonila com capacidade de fornecer elétrons numa reação de oxiredução e, esta propriedade, é utilizada para quantificar a concentração de açúcares redutores totais numa solução ao reduzir cátions cúprico conforme reação do método Somogy-Nelson (NELSON, 1944 e SOMOGY, 1945).

Quando se efetua a determinação de açúcares redutores está se quantificando também dextrinas e este efeito não tem afetado a intensa aplicação desta metodologia em trabalhos de pesquisas, principalmente em técnicas de fracionamento de amidos hidrolisados em cromatografia de permeação em gel (HIZUKURI, 1986; CHEETHAM, TAO, 1997). Assim considerado é também possível caminhar em sentido contrário e determinar a concentração de amido a partir da concentração de açúcares redutores. Estequiometricamente a reação de hidrólise ao incorporar uma molécula de água em cada unidade de glicose anidra

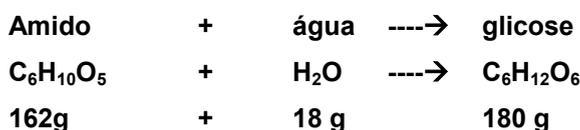
(monômero), componentes das amiloses e amilopectinas, produz um aumento em massa de 11,1%, ou seja, 100 g de amido produzirão teoricamente 111,1 g de glicose. Segundo LLOYD & NELSON (1984), a conversão de amido a glicose atinge um máximo em torno de 94% em peso. A metodologia da AOAC (1975) utiliza um fator de conversão de 90% e baseando-se nesta recomendação, assume-se que 100,0 g de amido produzem 100,0 g de glicose.

Os resultados observados nos ensaios e inseridos na Tabela 2 permitem observar que a concentração de amido hidrolisado calculado a partir da concentração de açúcares redutores totais vai aumentando em função do tempo de hidrólise e que as correspondentes concentrações de carbono orgânico medido espectrofotometricamente mostram um leve sentido inverso, ou seja, tendem a diminuir.

**TABELA 2.** Valores da porcentagem de amido hidrolisado e concentração de carbono orgânico em função do tempo de hidrólise com respectivos desvios. (Fator de diluição 1:25)

Tempo de hidrólise (minutos)	Amido hidrolisado (%)	Desvio padrão (%)	Carbono Orgânico (ppm)	Desvio padrão (%)
20	7,4	0,305	885,2	8,838
40	18,0	0,603	884,6	9,133
60	23,6	0,755	881,2	3,387
80	33,4	1,457	879,1	6,065
100	43,8	1,22	880,7	7,23
120	53,8	1,653	880,1	5,074

No gráfico da Figura 1 observa-se este fato que seria devido à reação de hidrólise que ocorre pois quando se hidrolisa uma ligação glicosídica, ocorre a incorporação do grupo hidroxílico e do cátion hidrogênio e, estequiometricamente, cada mol de glicose produzida, incorpora um mol de água. Deste modo, 1 mol de amido mais 1 mol de água é igual a 1 mol de glicose:



A concentração de Carbono na molécula da glicose é de 72 gramas em cada mol e representa 40% do peso total. Fazendo a relação inversa, a massa total de uma amostra seria obtida pelo produto de 2,5 vezes a massa de carbono medida e tem-se:

$$ART = \frac{TOC \text{ (ppm)} \times 2,5 \times d \text{ (g/l)}}{1000} \quad (1)$$

Semelhantemente, em relação ao amido obtém-se:

$$AMIDO = \frac{TOC \text{ (ppm)} \times 2,25 \times d \text{ (g/l)}}{1000} \quad (2)$$

Utilizando esta última relação (2) para uma amostra de amido puro de concentração

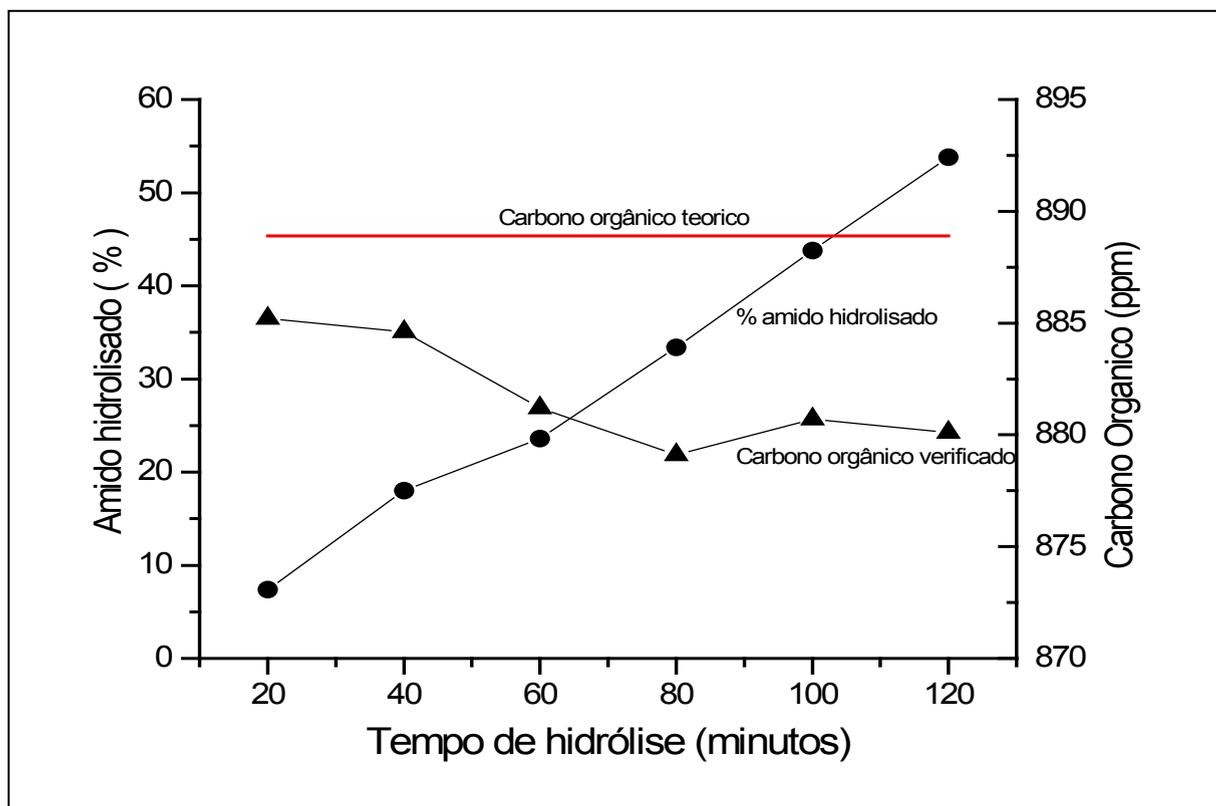
onde:

ART - concentração de açúcares redutores totais

TOC - concentração de Carbono Orgânico Total

d - fator de diluição

5%, diluição de 1:25, obter-se-ia o valor do carbono orgânico teórico de 888,9 ppm e aplicando-se também aos valores dispostos na Tabela 2, pode-se observar no gráfico da Figura 1 o perfil de evolução da hidrólise em função do tempo.



**FIGURA 1.** Variação da concentração de amido hidrolisado, do carbono orgânico das amostras em função do tempo e concentração de carbono orgânico teórica de uma amostra pura.

Na Figura 1 observa-se a tendência de diminuição da concentração de carbono orgânico

nas amostras conforme ocorre aumento do teor de açúcares redutores. Isto porque estão

ocorrendo modificações na composição química do soluto, ou seja, está havendo uma diminuição na quantidade de carbono para uma mesma quantidade de matéria que está sendo coletada e analisada em função do tempo. A incorporação de moléculas de água nas glicoses anidras que vão sendo despolimerizadas das amiloses e amilopectinas fazem com que a porcentagem relativa de carbono na molécula diminua. Considerando esta modificação progressiva no analito, o tempo de 20 minutos para realizar hidrólise de uma amostra de amido é suficiente e adequada para coletar amostras, determinar a concentração em ppm de carbono, e utilizar a equação (2) para avaliar a concentração de uma amostra de amido.

Os valores de medidas obtidos experimentalmente não foram iguais ao valor teórico de 888,9 ppm de carbono que uma amostra pura deveria apresentar e, neste caso, a diferença ocorre em função de contaminantes na amostra de fécula de mandioca. Estes contaminantes na amostra representariam a diferença de 3,7 ppm observada entre o valor teórico e o valor medido no tempo de 20 minutos de hidrólise. Utilizando a equação (2) este valor alcançaria 0,21 g/L ou 0,42%. Na comparação com o valor determinado através da metodologia da AOAC indicado na Tabela 1, esta diferença seria de 1,05 g/L ou 2,1%.

A utilização do equipamento espectrofotômetro gasoso de absorção no infravermelho para determinar a concentração de carbono nas amostras de amido hidrolisado, aditou maior resolutividade ao diminuir a manipulação e o tempo requerido quando

comparado ao método analítico comumente utilizado.

Considerando que a diferença entre o valor medido utilizando a metodologia proposta e o valor teórico esperado, devido a presença de contaminantes, se reduziria a 0,42%, conclui-se que esta metodologia pode ser aplicada com segurança na determinação da concentração de amidos em amostras de féculas e/ou amidos, substituindo com vantagens a técnica convencional de quantificá-los indiretamente através da concentração de açúcares redutores.

#### 4. REFERÊNCIAS

AOAC – Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 12<sup>a</sup> ed. Washington, 1975. 1094 p.

BANKS, W.; GREENWOOD, C. T.; KHAN, K. M. The interaction of linear, amylose oligomers with iodine. **Carbohydrate Research**, v. 17, p. 25-32, 1971.

CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. The effects of amylose content on the molecular size of amylose, and on the distribution of amylopectin chain length in maize starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 251-261, 1997.

FREDRIKSSON, H.; ANDERSSON, R.; KOCH, K.; AMAN, P. Calibration of a size-exclusion chromatography system using fractions with defined amylopectin unit chains. **Journal of Chromatography A**, v. 768, p. 325-328, 1997.

- GERARD, C.; BARRON, C.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V. Amylose determination in genetically modified starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 19-27, 2001.
- HIZUKURI, S. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. **Carbohydrate Research**, v. 141, p. 295-299, 1985.
- HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 253-267, 2001.
- INOUCHI, N.; GLOVER, D. V.; TAKAYA, T.; FUWA, H. Development changes in fine structure of starches of several endosperm mutants of maize. **Starch**, v. 35, p. 371-376, 1983.
- LLOYD, N. E.; NELSON, W. J. Glucose and fructose containing sweeteners from starch. In: WHISTLER, R.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. **Starch Chemistry and Technology**, 2<sup>a</sup> ed. Orlando: Academic Press, 1984, p. 611-60.
- MUA, J. P.; JACKSON, D. S. Relationships between functional attributes and molecular structure of amylose and amylopectin fractions from corn starch. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 3848-3854, 1997.
- NELSON, N. A. Photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.
- SOMOGY, M. Determination of blood sugar. **Journal Biological Chemistry**, v. 160, p. 69-73, 1945.
- TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. **Processos oxidativos avançados**. v. 03, Campinas: Editora UNICAMP/LQA 2004, 83p.
- ZHEREBTSOV, N. A.; RUADEZ, I. D.; YAKOVLEV, A. N. Mechanism of acid-catalyzed and enzymatic hydrolysis of starch. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 599-603, 1997.
- ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch**, v. 40, p. 44-50, 1988.
- ZOBEL, H. F.; STEPHEN, A. M. Starch: structure, analysis and application. In: STEPHEN, A.M. **Food polyssacharides and their application**. 1ed. New York: Marcel Dekker, 1995, p. 19-66.