

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

Propriedades físico-químicas do amido isolado, estudo de parâmetros enzimáticos durante o armazenamento e caracterização de enzimas amilolíticas em raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walp)

Gerby Giovanna Rondán Sanabria

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Finardi Filho

São Paulo

2010

Gerby Giovanna Rondán Sanabria

Propriedades físico-químicas do amido isolado, estudo de parâmetros enzimáticos durante o armazenamento e caracterização de enzimas amilolíticas em raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walp)

**COMISSÃO JULGADORA
DA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR**

**PROF. DR. FLAVIO FINARDI FILHO
ORIENTADOR/PRESIDENTE**

1° EXAMINADOR

2° EXAMINADOR

3° EXAMINADOR

4° EXAMINADOR

SÃO PAULO, _____ DE _____.

Dedico este trabalho aos meus pais, Edgar e Paquita, aos meus irmãos e a minha eterna avó Adela (*in memoriam*) pelo apoio incondicional, vocês são fonte de luz e inspiração.

A todos aqueles que fazem parte da minha vida e dessa vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta oportunidade, por me indicar o caminho a seguir e me brindar fortaleza em cada etapa.

Meus sinceros agradecimentos ao professor Dr. Flavio Finardi Filho pela orientação, apoio, confiança e paciência durante a minha estadia no laboratório de Biotecnologia de Alimentos. Obrigada também por ter enriquecido minha formação profissional como pesquisadora que carregarei por toda a minha vida.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental FCF/USP e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À prof. Dra. Duclerk Fernandes Parra do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela possibilidade de uso do DSC, especialmente ao técnico Eliosmar pela realização das análises.

À prof. Dra. Isabel de Fatima Correia Batista do Instituto Butantan pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo emprego de CLAE e ao técnico Rafael pela realização das análises. Também a agradeço pelas valiosas sugestões e conselhos durante a qualificação.

Às professoras Dra. Beatriz Cordenusi e Ursula Maria Lanfer Marquez, pelas valiosas sugestões e conselhos durante o exame de qualificação.

Ao departamento de Tecnologia de Bioquímico-Farmacêutica, especialmente ao técnico Alexander pelo auxílio no uso do texturômetro.

À empresa National Starch, especialmente à Andréia Carvalho que possibilitou a utilização do Viscoamilograma Brabender.

A Liz do Laboratório de Caracterização Tecnológica do departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo, da Escola Politécnica da USP, pela boa disposição nas análises das micrografias de amido.

À amiga Cintia Giora pelo apoio e amizade durante o período do trabalho, obrigada pelos bons momentos.

À amiga Valdinéia Castro pela amizade e apoio nas correções do português.

Às amigas do laboratório Sinara Backes, Beatriz Valcarcel, Natalia e a técnica Tatiana pela amizade e a convivência agradável. Obrigada Sinara pela correção do meu português.

Às técnicas Lucia e Tânia do laboratório de Química e Bioquímica de alimentos pela boa disposição quando precisei de alguns reagentes.

Aos meus pais Edgar Rondán, Paquita Sanabria e irmãos (Julio, Mary, Yenni, Leodan, Diana e Edgar) pelo apoio constante, obrigada pela confiança e amor.

Ao meu grande amor Juan Roberto Rodriguez pelo amor brindado e paciência durante minha estadia no Brasil.

À Joana de Almeida Santos pelos momentos de alegria e o auxílio que proporcionou aos componentes do Laboratório

Aos amigos do CRUSP, bloco G, apartamento 604 de ontem e de hoje: Helena, Nara, Gil, Thiago, Erick, Zuzi, Dannielli, Roberta e André. Pela convivência agradável e os bons momentos compartilhados.

Aos meus amigos do vôlei, Edward Velarde, Erick Portugal, Ligia Cateriano, Maritza Zuñiga e Zoraida Lopez, obrigada pela companhia e amizade sincera nesta jornada da minha vida e tornando-a agradável.

A todos os meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho.

A todos aqueles que estiveram ao meu lado ou longe, se preocupando e torcendo por mim. Muito obrigada.

RESUMO

SANABRIA, R. G. G. **Propriedades físico-químicas do amido isolado, estudo de parâmetros enzimáticos durante o armazenamento e caracterização de enzimas amilolíticas em raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walp).** 2010, 115 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A maca (*Lepidium meyenii* Walpers) é uma planta herbácea bienal da família Brassicaceae, cultivada principalmente na região dos Andes da América do Sul. A parte subterrânea vem sendo consumida por muito tempo devido a seu valor nutricional e energético, mas é mais conhecida no mercado peruano e internacional por alegadas propriedades terapêuticas. Esta raiz apresenta até 76% de carboidratos, dos quais 30% é amido. Este trabalho teve como objetivos estudar: as propriedades físico-químicas e funcionais do amido isolado; os parâmetros enzimáticos durante o armazenamento e a purificação parcial de enzimas amilolíticas. Em relação às propriedades do amido, este apresentou um teor de amilose de 20% valor semelhante aos encontrados em raízes e tubérculos similares. A turbidez das suspensões de amido apresentou estabilidade durante o armazenamento. A temperatura de gelatinização e a viscosidade da pasta foram a 45,7° e 46°C, respectivamente. Com base nos dados obtidos, o amido de maca seria indicado para alimentos que requeiram temperaturas moderadas no processamento, não sendo apropriado para o emprego em alimentos congelados. Os parâmetros enzimáticos medidos tais como teor de amido total, teor de açúcares solúveis, atividade amilolítica total, atividade de α e β amilases, não mostraram diferenças significativas entre as medidas durante um período de armazenamento de 16 dias. As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) dos grânulos de amido mostraram grãos íntegros com superfícies lisas, com algumas depressões ao redor dos grânulos os quais poderiam indicar o início de ataque enzimático, ou fraturas na purificação. Em relação à purificação de enzimas amilolíticas, foi possível separar uma fração ativa com a carboximetilcelulose (CMC) seguida de cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) que permitiu a separação de duas frações protéicas, analisadas por eletroforese SDS-PAGE e eletroforese bidimensional (2D). Os polipeptídeos identificados no gel 2D apresentaram massa molecular semelhante entre 22 a 27 kDa, e os pontos isoelétricos entre 4,8 e 7,3.

Palavras chave: Maca, *Lepidium meyenii* W., propriedades físico-químicas e funcionais, amido, purificação de enzimas amilolíticas.

ABSTRACT

SANABRIA, R. G. G. **Physico-chemical properties of isolated starch, enzymatic parameters during storage, and characterization of amyolytic enzymes of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) root.** 2010, 115 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Maca (*Lepidium meyenii* Walpers) is a biennial herbaceous plant from Brassicaceae family, grown mainly in the Andes of South America. The underground part has been consumed for a long time due to its nutritional value and energy, but is best known in the Peruvian and international market for alleged therapeutic properties. This root has up to 76% carbohydrates, of which 30% is starch. This work aimed to study: the physico-chemical properties of isolated starch, the enzymatic parameters during storage and partial purification of amylases. In relation to the properties of starch, the amylose content showed a 20% value similar to those found in roots and tubers alike. The turbidity of starch suspensions was stable during storage. The gelatinization temperature and viscosity of the paste were 45.7 ° and 46 ° C, respectively. Based on data obtained from the starch of litter would be given to foods that require moderate temperatures in processing and is not suitable for use in frozen foods. The enzymatic parameters measured such as total starch content, soluble sugars, total amyolytic activity, activity of α and β amylases, showed no significant differences between the measures over a storage period of 16 days. Electronic microscopy (SEM) of starch granules showed grains with smooth surfaces, with some depressions around the granules which could indicate the beginning of enzymatic attack, or fractures in the purification. Regarding the purification of amylases was possible to separate an active fraction with carboxymethylcellulose (CMC) followed by high-resolution liquid chromatography (HPLC) which allowed the separation of two protein fractions, analyzed by SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis (2D). The polypeptides had a molecular mass between 22 and 27 kDa and isoelectric points ranging from 4.8 to 7.3.

Key words: Maca, *Lepidium meyenii* W., physico-chemical and functional properties, starch, amyolytic enzymes purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Duas variedades de maca logo após a colheita. As barras verticais indicam o tamanho aproximado das plantas.	2
Figura 2 – Estrutura química da amilose, cujo número de resíduos de glicose (n) pode chegar a alguns milhares.	7
Figura 3 – Estrutura química da amilopectina, apontando as ligações α -1,4 e α -1,6.	7
Figura 4 - Representação da estrutura da amilopectina	8
Figura 5 - Estrutura da molécula da amilopectina e sua organização dentro do grânulo de amido. (a) representação da estrutura de um grânulo contendo camadas amorfas e cristalinas, representando os anéis de crescimento; (b) visão ampliada da camada semicristalina de um anel de crescimento, consistindo de lamelas cristalinas e amorfas alternadas; (c) representação da estrutura de um cluster da amilopectina dentro da camada semicristalina do anel de crescimento; (d) e (e) Visão ampliada dos clusters.	10
Figura 6 - Representação da estrutura do grânulo de amido e seus níveis de organização molecular interna amilose e amilopectina.	12
Figura 7 - Representação da alteração do grânulo de amido em suspensão submetido a processo térmico.	16
Figura 8 - Hidratação comparativa dos amidos de maca e mandioca em função da temperatura. A: Poder de intumescimento; B. Capacidade de absorção de água; C: % de Solubilidade.	31
Figura 9 - Efeitos na turbidez no gel do amido de maca, mandioca e mandioquinha durante o armazenamento.	32
Figura 10 - Comparação das pastas de amido à estabilidade ao congelamento durante o período de armazenamento.....	33
Figura 11 - DSC Endotermas de gelatinização de diferentes amidos: (A) mandioquinha; (B) mandioca e (C) maca.....	34
Figura 12 - Viscoamilograma de amido de maca e mandioquinha.	36
Figura 13 - Perfil de análise de textura (TPA): (A) maca; (B) mandioca; (C) Mandioquinha	38
Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura do amido de maca.....	40
Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura da raiz de maca liofilizada.	41

- Figura 16** – Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas α -amilase, β -amilase, glicoamilase, isoamilase e pululanase. 46
- Figura 17** – (A) Perfil de atividade amilolítica empregando amido como substrato; (B) concentração de proteína determinada pelo método de Bradford; (C) Atividade α -amilásica empregando substrato específico (PNP5); (D) Atividade β -amilásica empregando substrato específico; (E) Teores de amido total e (F) Teores de açúcares solúveis totais. As determinações de A-D foram realizadas em extratos enzimáticos brutos. E e F foram quantificadas na própria raiz. 58
- Figura 18** – Atividade amilolítica total em géis de poliacrilamida PAGE-nativo (6,5%). Os géis foram incubados em tampão fosfato 0,01M (pH 6,0) contendo 1,0% de amido solúvel de batata a 30 °C. sobre agitação moderada. (A) 2 horas e (B) 3 horas, posteriormente foram corados com solução aquosa de iodo (I_2 13 mM e KI 40 mM). Massa inicial de 8 μ g de proteína para cada amostra. 59
- Figura 19** – Eletroforese em gel de poliacrilamida (A) Gel proveniente do PAGE-nativo (6,5%), o gel de transferência não foi incubado em amido nem corado com iodo. (B) Perfil protéico em SDS-PAGE (15%) bidimensional, revelado com prata. A elipse indica a migração das proteínas contidas no PAGE-nativo para o SDS-PAGE. 60
- Figura 20**- Eletroforese bidimensional-nativo do extrato bruto da raiz de maca. (A) Gel PAGE-nativo 6,5%, focalização isoeletrica realizada em gradiente de pH linear de 3 a 10 empregando tiras de 7 cm, (B) Gel PAGE-nativo 6,5%, focalização isoeletrica realizada em gradiente de pH linear de 4 a 7 (7cm). Os géis foram incubados em tampão fosfato pH 6,0 (0,1M) durante 3 h e corados com iodo (I_2 13 mM e KI 40 mM). Foram colocados 60 μ g de proteína em cada tira. 61
- Figura 21** – A) Perfil protéico dos extratos enzimáticos em SDS-PAGE (15% de poliacrilamida) corado com coomassie blue G-250, (B) SDS-PAGE 15% de poliacrilamida corado com prata. Para a revelação com prata e coomassie foram empregado 8 e 10 μ g de proteína, respectivamente. 62
- Figura 22** - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 2° dia (A1-A3) e 4° dia de armazenamento (B1-B3). O teor de amido foi 40,29 % e 38,50%, respectivamente. 64
- Figura 23** - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 6° dia (C1-C3) e 8° dia de armazenamento (D1-D3). O teor de amido foi 39,15 % e 39,73%, respectivamente. 65
- Figura 24** - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 10° dia (E1-E3) e 12° dia de armazenamento (F1-F3). O teor de amido foi 38,95 % e 40,06%, respectivamente. 66
- Figura 25** - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 14° dia (G1-G3) e 16° dia de armazenamento (H1-H3). O teor de amido foi 37,69 % e 37,97%, respectivamente. 67

- Figura 26** - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 22 ° dia de armazenamento, cujo teor de amido foi 38,47%..... 68
- Figura 27** - Micrografias em MEV do amido nativo de maca hidrolisados por α -amilase pancreática, 19,5 U/mg de amido em tampão acetato a pH 4,8 durante 2 h a 37 °C..... 70
- Figura 28** – Micrografias em MEV do amido nativo de maca hidrolisados com o extrato bruto da própria raiz (1mL de extrato bruto/g de amido) em tampão fosfato 0,01 M pH 6,0 durante 2 horas a 30 71
- Figura 29** - Classificação de enzimas amilolíticas..... 74
- Figura 30** – Esquema usado para a realização da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D –PAGE). Após a aplicação da amostra o gel é submetido a um campo elétrico para separação bidimensional. Na primeira dimensão ocorre a separação das proteínas de acordo com o pI e na segunda dimensão, a separação se dá de acordo à massa molecular. Em seguida, as proteínas separadas são recortadas do gel e fragmentadas com tripsina. Os peptídeos gerados pela digestão enzimática podem ser analisados por espectrometria de massas. 79
- Figura 31** – Cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose) da fração 30-90% de sulfato de amônio a partir de extrato de maca com 4 dias após a colheita, eluída com gradiente de 0-1,0 M de NaCl. A atividade amilolítica total foi determinada pelo método iodométrico, empregando amido 0,1% (1U de atividade corresponde a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 200 nMol de amido em 15 minutos a 30 °C em 50 μ L de amostra). As frações com atividade foram reunidas..... 91
- Figura 32** - Cromatografia de troca iônica (CMC) da fração DEAE-celulose, eluída em tampão Tris–maleato 0,1M (pH 6,0) e com gradiente de 0-1,0 M de NaCl e 2,0 mM de CaCl_2 . A atividade amilolítica total foi determinada pelo método iodométrico, empregando amido 0,1% (1U de atividade corresponde a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 200 nMol de amido em 15 minutos a 30 °C em 50 μ L de amostra)..... 91
- Figura 33** – Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (15%) referente às etapas de purificação. O gel foi corado com prata, foram colocados 8 μ g de proteína por amostra. 1) EB; 2) 30-90% de sulfato de amônio; 3) pool de DEAE-Celulose e 4) Pool de CMC. 92
- Figura 34** – Perfil cromatográfico, obtido após eluição do pool protéico da CMC (com atividade amilolítica e β -amilásica), foi empregada uma coluna C4 de fase reversa (250 x 4,6 mm; 5 μ m) para CLAE. A fração ativa foi ressuspensa em solução A (ácido TFA 0,1%), foram injetados 50 μ L de amostra e o material foi eluído com um gradiente de 0 a 100% de solução B (90% de metanol, 0,1% de ácido TFA em água mQ), durante 20 minutos com fluxo de 1 mL/min. 94
- Figura 35**- Eletroforese SDS-PAGE e SDS-sem agente redutor em 15% de poliacrilamida, obtida com os picos coletados por CLAE. 1) Pool de CMC; 2-3) P2 e P3 desnaturados com agente redutor e 4-5) P2 e P3 sem a adição do agente redutor. O gel foi corado com prata.... 94
- Figura 36**- Gel bidimensional das proteínas totais obtidas da raiz de maca. (A) As proteínas foram separadas em gel de 12% de poliacrilamida empregando tiras de IPG com gradiente de

pH entre 3 a 10. EP) Extrato protéico. (B) Gel com 12% de poliacrilamida empregando tiras de IPG com gradiente de pH entre 4 a 7. Ambos os géis foram corados com prata..... 96

Figura 37 -Gel bidimensional (15% de poliacrilamida) de proteínas fracionadas por CLAE, coradas com prata. (A, A1) pico 3; (B,B1) pico 2. 97

Figura 38 – Eletroforese SDS-PAGE em 15% de poliacrilamida, dos picos coletados por CLAE. 1) 30 – 90% sulfato de amônio; 2-5) P2; 6-9) P3. O gel foi corado com Commassie Blue G-250. As elipses indicam as bandas que foram removidas e juntadas em um único tubo para a digestão. 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades avaliadas na análise de perfil de textuta (TPA)	19
Tabela 2 - Composição químicas de raízes de maca e do amido isolado	29
Tabela 3 : Propriedades de gelatinização de amidos de maca, mandioca e mandioquinha.	35
Tabela 4 : Propriedades da pasta de amidos de maca e mandioquinha.....	37
Tabela 5 - Propriedades de textura de amido de maca, mandioca e mandioquinha.	38
Tabela 6 - Purificação parcial de amilases em extratos de maca, após cromatografia de troca iônica. Para a eluição em DEAE foi empregado tampão Tris-HCl 0,1M (pH 7,5) e um gradiente de NaCl de 0 a 1 M e CMC tampão Tris-Maleato 0,1M (pH 6) e um gradiente de NaCl entre 0 a 1 M e 2,0 mM de CaCl ₂	90
Tabela 7 – Spost identificados de acordo a seu pI e massa molecular dos picos 3 e 2 coletados por CLAE.	97

INDICE GERAL

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1 CAPITULO 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS DE AMIDO DAS RAÍZES DE MACA (<i>Lepidium meyenii</i> Walp.).....	5
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	5
1.1.1 AMIDO.....	5
1.1.2 ESTRUTURA DO GRÂNULO DE AMIDO	9
1.1.3 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DO AMIDO	13
1.1.3.1 Capacidade de absorção de água (CAA), poder de intumescimento (PI) e solubilidade dos grânulos de amido.	13
1.1.3.2 Gelatinização e retrogradação.....	15
1.1.3.3 Perfil de textura do gel de amido	18
1.2 OBJETIVOS	20
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	20
1.3 MATERIAS E MÉTODOS	21
1.3.1 AMOSTRA	21
1.3.2 REAGENTES	21
1.3.3 MÉTODOS	21
1.3.3.1 Isolamento dos grânulos de amido	21
1.3.3.2 Determinação de amido total	22
1.3.3.3 Determinação de amilose	22

1.3.3.4	Determinação de açúcares solúveis totais	23
1.3.3.5	Determinação da composição química.....	23
1.3.4	DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS	24
1.3.4.1	Poder de intumescimento (PI), capacidade de absorção de água (CAA) e solubilidade (S).....	25
1.3.4.2	Turbidez.....	25
1.3.4.3	Estabilidade ao congelamento e refrigeração.....	25
1.3.4.4	Microscopia eletrônica de varredura	26
1.3.5	PROPRIEDADES TÉRMICAS.....	26
1.3.5.1	Propriedades da pasta do amido.....	26
1.3.5.2	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	27
1.3.5.3	Propriedades de Textura do gel de amido	27
1.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
1.4.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	28
1.4.2	PODER DE INTUMESCIMENTO (PI), CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA (CAA) E SOLUBILIDADE (S).....	29
1.4.3	TURBIDEZ	32
1.4.4	ESTABILIDADE AO CONGELAMENTO E REFRIGERAÇÃO	32
1.4.5	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	33
	To: temperatura inicial;.....	35
	Tp: temperatura do pico de gelatinização;.....	35
	Tc: temperatura final; ΔH : entalpia de gelatinização.....	35
1.4.6	PROPRIEDADES DA PASTA	35
1.4.7	PROPRIEDADES DE TEXTURA DO GEL DE AMIDO.....	37
1.4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	39
1.5	CONCLUSÕES	42
2	CAPITULO 2 – PARÂMETROS ENZIMÁTICOS DURANTE O ARMAZENAMENTO DAS RAÍZES DE MACA (<i>Lepidium meyenii</i> Walp.)	43
2.1	REVISÃO DE LITERATURA	43
2.1.1	TUBEROSAS AMILÁCEAS DA AMERICA DO SUL	43
2.1.2	AMILASES	45

2.1.3	α - AMILASE.....	47
2.1.4	β - AMILASE.....	48
2.1.5	GLICOSIDASES E ENZIMAS DESRAMIFICADORAS.....	49
2.2	OBJETIVOS	51
2.2.1	OBJETIVO GERAL.....	51
2.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.3.1	MATERIAL DE TRABALHO	52
2.3.2	REAGENTES	52
2.3.3	MÉTODOS	52
2.3.3.1	Extração enzimática.....	52
2.3.3.2	Determinação da atividade enzimática.....	53
2.3.3.3	Determinação de açúcares totais.....	53
2.3.3.4	Determinação de amido total	54
2.3.3.5	Isolamento dos grânulos de amido e MEV	54
2.3.3.6	Determinação da concentração de proteínas.....	54
2.3.3.7	Eletroforese SDS-PAGE (desnaturante) e PAGE-nativo (não desnaturante).....	54
2.3.3.8	Análise estatística	55
2.4	RESULTADOS E DISCUSÃO	56
2.4.1	ATIVIDADE ENZIMÁTICA, AÇÚCARES TOTAIS E AMIDO TOTAL.....	56
2.4.2	ATIVIDADE HIDROLÍTICA EM PAGE-NATIVO E PERFIL PROTÉICO EM SDS-PAGE	59
2.4.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	62
2.5	CONCLUSÕES	72
3	CAPÍTULO 3 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS DE RAÍZES DE MACA (<i>Lepidium meyenii</i> Walp.)	73
3.1	REVISÃO DA LITERATURA	73
3.1.1	ENZIMAS AMIOLÍTICAS	73
3.1.2	APLICAÇÕES INDÚSTRIAS DAS AMILASES.....	74
3.1.3	METODOLOGIA DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMILASES	76
3.1.3.1	Eletroforese bidimensional.....	77
3.1.3.2	Identificação de proteínas.....	79

3.2	OBJETIVOS	81
3.2.1	OBJETIVO GERAL	81
3.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	81
3.3	MATERIAS E MÉTODOS	82
3.3.1	MATERIAL E REAGENTES	82
3.3.2	EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA.....	82
3.3.3	PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS	82
3.3.3.1	Fracionamento com sulfato de amônio	83
3.3.3.2	Cromatografia de troca aniônica.....	83
3.3.3.3	Cromatografia em carboximetilcelulose	84
3.3.3.4	Cromatografia liquida de alfa eficiência (CLAE)	84
3.3.3.5	Extração fenólica das proteínas de raízes de maca.....	85
3.3.3.6	Focalização isoeétrica (primeira dimensão).....	85
3.3.3.7	SDS-PAGE (segunda dimensão)	86
3.3.3.8	Detecção de proteínas (spots ou bandas).....	86
3.3.3.9	Digestão das proteínas.....	87
3.4	RESULTADOS E DISCUSÃO	89
3.4.1	FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	89
3.4.2	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	93
3.4.3	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	95
3.4.4	IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS PARA O SEQÜENCIAMENTO	97
3.5	CONCLUSÕES	99
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	100

INTRODUÇÃO GERAL

A maca é uma raiz que pertence à família das Brassicaceae, é uma planta herbácea anual ou bienal. Esta planta é cultivada nos Andes centrais do Peru em altitudes de 3500 a 4500 m, em terrenos caracterizados rochosos e pobres, estéreis, sol e ventos fortes, e temperaturas subcongelantes (Figura 1). Neste habitat seria quase impossível o cultivo no altiplano de outras plantas, com exceção de algumas gramíneas e espécies de Solanáceas (FLORES et al., 2003). A maca é cultivada há pelo menos 2000 anos, mas sua origem é pouco conhecida. Há oito ou mais ecótipos na área de cultivo que são diferenciados de acordo com a cor das raízes: amarelo, roxo, branco, cinza, preto, amarelo/púrpura e branco/roxo (GONZALES et al., 2006).

A variedade amarela de maca é a mais comum. A parte subterrânea denominada de hipocótilo é a parte comestível, sendo um alimento básico para os povos indígenas desta zona árida. Os hipocótilos de maca são consumidos frescos ou secos, as raízes secas podem ser armazenadas durante anos, podendo ser consumidos em água ou leite, ou transformados em sucos, bebidas alcoólicas ou em infusões como “café” de maca (OCHOA; UGENT, 2001; QUIROZ; CARDENAS, 1992; REA, 1994)

Contudo a maca não é utilizada apenas como um alimento, mas empregada também na medicina tradicional e folclórica, especialmente como afrodisíaco e para aumentar a fertilidade feminina e de fêmeas de animais domesticados. Segundo a história oral, durante a conquista do império inca, os espanhóis alimentavam seus cavalos com maca para minimizar a redução na capacidade reprodutiva devido à altitude (QUIROZ ; CARDENAS, 1992).

A maca também tem outras alegações medicinais, de acordo com as crenças tradicionais, como a propriedade de curar ou aliviar o reumatismo, melhorar doenças respiratórias, pode agir como: laxante, regulador hormonal, estimulante metabólico e de memória, antidepressivo, antianêmico, e ainda usado para combater leucemia, AIDS, câncer e alcoolismo, entre outros (QUIROZ ; CARDENAS, 1992).

Esta extensa lista de alegações é característica da medicina folclórica de muitos povos, dão informações para desenvolvimentos de novos suplementos alimentares, bem como de medicamentos a partir de fontes naturais. O interesse econômico tem motivado diversos estudos científicos em relação a composição química de maca e de seu potencial farmacológico.



Figura 1 – Duas variedades de maca logo após a colheita. As barras verticais indicam o tamanho aproximado das plantas.

A composição de maca já está bem estudada. Por ser uma raiz, tem considerável abundância em proteínas, ácidos graxos insaturados e minerais. A maca fresca contém 80% de sua massa em água, enquanto no pó desidratado, 8,87 a 11,6 % correspondem a proteínas, 1,09 a 2,2 % a lipídios, e 54,6 a 60,0 % de carboidratos, sendo 23,4% de sacarose, 1,55% de glicose, 4,56% de oligossacarídeos, 30,4% de polissacarídeos, e 8,23 a 9,08% de fibras, e 4,9 a 5,0% de minerais. Em média, essa composição corresponde uma energia de 663 kJ/100g em base seca (DINI et al., 1994; YU; JIN, 2004; VALENTOVA, et al., 2006).

No hipocótilo, o conteúdo dos ácidos linoléico e oléico situa-se entre 52,7 a 60,3% do total dos ácidos graxos, enquanto o teor de minerais reportado por Dini et al, (1994) em (mg/100g em base seca) foi de 16,6 para Fe, 0,8 de Mn, 5,9 de Cu, 3,8 de Zn, 18,7 de Na, 2050 de K e 150 de Ca.

Vários metabolitos secundários também foram encontrados, como macaene e macamida, que apresentam atividade biológica, bem como os glicosinulatos e seus derivados presentes na maca representam um interesse científico, em particular como agentes de combate a patógenos e câncer. São também compostos químicos que produzem o aroma e sabor picante da maca (ZHENG et al., 2000, GANZERA et al., 2002; FAHEY et al., 2001)

Outro composto farmacologicamente ativo foi detectado em hipocótilos de maca. O ácido 1R, 3S-1-metiltetrahydro- β -carbonila-3-carboxílico, um inibidor da enzima monoaminaoxidase (MAO), é empregado em psiquiatria para o tratamento de transtornos depressivos e em neurologia para o alívio dos sintomas da doença de Parkinson (VOLZ; GLITER, 1998; PIACENTE et al., 2002)

Alem, da maca a região dos Andes é conhecida por sua grande diversidade de raízes e tubérculos, os quais são consumidos pela população rural como alimentos principais de

consumo diário devido ao alto conteúdo de carboidratos, principalmente amido. São exemplos de raízes e tubérculos andinos: a oca (*Oxalis tuberosa*), o olluco (*Ullucus tuberosus*), a mashua (*Tropaeolum tuberosum*), a batata (*Solanum tuberosum*), a mandioquinha (*Arracacia xanthorrhiza*) entre outras espécies.

O amido, além de seu conteúdo energético, é um material com muitas aplicações industriais, que vão desde alimentos até a produção de papel e adesivos. Apenas em pequena parte, o amido é empregado no seu estado natural, a maior parte é modificado mediante o uso de agentes químicos, o que obriga aos produtores de alimentos a declará-lo como aditivo, contrariando as tendências atuais de consumo de produtos naturais.

A busca de produtos amiláceos naturais tem levado a pesquisas de novas fontes de amido para substituir os quimicamente modificados. Por esta razão, nos últimos anos, aumentou o número de estudo de espécies não convencionais para conhecer suas propriedades físico-químicas dessa maneira aumentar o interesse da indústria de alimentos ou outros mercados e, conseqüentemente, permitiria aumentar a produção de pequenos agricultores. Entre as novas fontes estão: biri, gengibre, araruta, batata doce, inhame, açafraão (PERONI; ROCGA; FRANCO, 2006), oca, achira (SANTACRUZ, 2004), mandioquinha (PIRES; VEIGA; FINARDI-FILHO, 2002), e novas variedades de mandioca (SIMONE-PASCUAL, 2005).

O amido é conhecido como um carboidrato de reserva sintetizado por plantas superiores e constitui a principal fonte de energia da maioria dos organismos vivos (NUÑES-SANTIAGO et al., 2004). Sua presença em raízes e tubérculos como a mandioca (*Manihot esculenta*), a batata (*Solanum tuberosum*), a mandioquinha (*Arracacia xanthorrhiza*), assim como em sementes e grãos de cereais contribuem, sobretudo, para as propriedades de textura de alguns alimentos e como matéria prima em algumas aplicações industriais como espessante, estabilizante coloidal, geleificante, adesivo e agente de retenção de água (GODFREY; WEST, 1996; EVANS; HIASMAN, 1979; LII, et al, 1996).

Cerca de 70-80% da composição de raízes e tubérculos corresponde a água, 16-24% é representado pelo amido e de 4% a proteínas e lipídeos. O tamanho do grânulo varia de 1 a 110 μm , dependendo da fonte de amido em questão. Amidos provenientes de tubérculos possuem grânulos maiores relativamente aos amidos de cereais (HOOVER, 2001).

Entre as propriedades funcionais de amidos, a formação de gel é sem dúvida a mais desejável. Géis de amido estão intimamente associados à capacidade de retenção de água e a problemas práticos como sinerese e textura sensorialmente arenosa. O conjunto dessas características pode determinar o interesse industrial de certos amidos para formulação de

alimentos, usados para diversos fins como espessantes, estabilizantes, geleificantes, veículo de aromas entre outros na formulação de alimentos com diversos ingredientes, sejam doces ou salgados (RESIO et al., 2000).

Embora o emprego do amido seja muito amplo, subprodutos resultantes de sua degradação têm também larga aplicação industrial, como amido solúvel, dextrinas e xaropes, através de hidrólise química ou enzimática.

A degradação *in vitro* do amido frente a enzimas amilolíticas varia dependendo da origem do amido e do grão de gelatinização. Nos tecidos vegetais, a suscetibilidade ao ataque enzimático é influenciada por fatores como a relação amilose:amilopectina, a estrutura cristalina, o tamanho de partícula e a presença de inibidores enzimáticos (ZHANG; OATES, 1999).

As enzimas amilolíticas são vantajosas devido a sua capacidade de catalisar reações contínuas sob condições moderadas, o que nem sempre é possível utilizando processos químicos, além de estes apresentarem hidrólises não específicas e formação de produtos não desejados. As aplicações das enzimas amilolíticas são inúmeras. De uma maneira geral, podem ser utilizadas sempre que seja necessária a hidrólise parcial ou total do amido. Na indústria de alimentos, as amilases são amplamente empregadas na obtenção de amido modificado, na produção de xaropes com elevado teor de glicose, na melhoria dos produtos de panificação e na indústria cervejeira.

A mobilização do grânulo de amido envolve a conversão da matriz semicristalina insolúvel, em açúcares solúveis que podem ser substratos para o metabolismo intermediário. As amilases atuam nas ligações α -1,4 da amilose, formando dextrinas e unidades de glicose, após a sua ação enzimática (BECK; ZIEGLER, 1989). As β -amilases são exoenzimas que atuam nas ligações α -1,4 glicosídicas, atuando apenas na penúltima ligação da extremidade não redutora do substrato. Esta enzima vem sendo apontada, recentemente, como enzima chave na hidrólise do amido transitório (SMITH et al., 2005).

No presente estudo o objetivo foi caracterizar as propriedades físico-químicas do amido de maca, estudar os parâmetros enzimáticos durante o armazenamento das raízes e purificar as enzimas amilolíticas endógenas localizadas nas raízes, empregando técnicas de cromatografia de troca iônica assim como a CLAE e eletroforese bidimensional (2D).

1 CAPÍTULO 1

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS DO AMIDO DAS RAÍZES DE MACA (*Lepidium meyenii* Walp)

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Amido

O amido é o polissacarídeo de reserva mais importante em plantas superiores e o mais abundante na natureza, só competindo em quantidade com a celulose. É originado nas células de plantas como raízes tuberosas, folhas, rizomas, sementes, frutas. Apresenta-se na forma de grânulos com formato e tamanho dependentes da sua fonte botânica, as formas dos grânulos variam desde 0,5 até 175 μm . (SINGH et al., 2003).

O amido é formado nos plastídios das plantas superiores, é sintetizado nas folhas, onde serve como carboidrato de reserva temporário, acumulando-se nos cloroplastos durante o dia e servindo como fonte principal para a síntese de sacarose citosólica durante a noite. Essa sacarose é então transportada para os órgãos de armazenamento das plantas, como sementes, frutas, tubérculos e raízes (VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004; TESTER et al., 2004)

Devido às suas propriedades físico-químicas e funcionais exclusivas, o amido tem grande importância nos mais diversos setores industriais. É a matéria-prima utilizada tecnologicamente na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e recentemente no desenvolvimento de biomaterias. Pode ser utilizado na sua forma natural ou por intermédio de processamentos adicionais, dando origem a produtos como amidos modificados, xaropes de glicose, maltose ou frutose e maltodextrinas, entre outros. Na área de biomaterias é empregado na obtenção de biofilmes de extrusão para a obtenção de termoformadores de diversas aplicações (MONTERREY-QUINTERO, 1999; FRANCO et al., 2001; ROCHA et al., 2008).

As fontes comerciais de amido nos mercados nacional e internacional são de grãos de cereais (40 - 90%), leguminosas (30 - 50%), tubérculos (65 - 85%) e frutas imaturas ou verdes (40 - 70%) (LAJOLO; MENEZES, 2006). Atualmente, existem estudos de

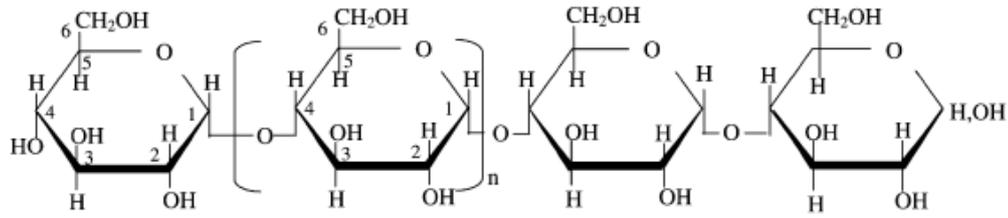
viabilização comercial de amidos nativos de outras fontes, próprias da América do Sul, menos conhecidas como sorgo, kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*), cará (*Discorea alata*), assim como na família dos pseudocereais como a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow) e o amaranto (*Amaranthus caudatus*) (JACOBSEN et al., 2003; MALI et al., 2002; AHAMED et al., 1996).

Os métodos de extração do amido presentes na literatura variam desde uma simples extração com água pura até o emprego de reagentes químicos. A qualidade da extração do amido é avaliada em função ao conteúdo dos macronutrientes tais como proteínas, lipídios, fibras e cinzas. A qualidade do amido é avaliada em função ao menor conteúdo destes componentes. A extração com água é um método que ajuda à preservação do grânulo de amido e conseqüentemente suas propriedades funcionais, mas a desvantagem de seu uso é a elevada presença de proteína e lipídios (ASCHER et al., 1998; CHAUHAN et al., 1992; KAR et al. 2005).

As propriedades mais importantes para a utilização do amido nas diferentes aplicações industriais são as propriedades físico-químicas: gelatinização e retrogradação; e as funcionais: solubilidade, intumescimento, absorção de água, sinérese e comportamento reológico de pasta e gel (WANG; WHITE, 1994)

Estruturalmente o amido é constituído por duas moléculas quimicamente distinguíveis, a amilose e a amilopectina, que diferem no tamanho molecular e grau de ramificação (MIZUKAMI; TAKEDA; HIZUKURI, 1999). As proporções em que estas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie, e o grau de maturação da mesma planta (ELIASON, 2004, TESTER, 2004).

A amilose é um polímero cuja massa molecular varia de 10^5 a 10^6 g/mol ou unidades/Daltons, unidas por ligações $\alpha(1-4)$ (Figura 2), apresenta algumas ramificações na posição $\alpha(1-6)$ (TAKEDA et al., 1990). A amilose não é solúvel em água mas pode formar misturas hidratadas por sua capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio com as moléculas mais próximas e formar uma estrutura helicoidal, em espiral ou dupla hélice. Os grupos hidroxil-glicosídicos localizam-se na parte externa da superfície do espiral, enquanto a superfície interna é formada por oxigênios glicosídicos e grupos metileno resultando numa cavidade hidrofóbica. Esta natureza hidrofóbica da amilose lhe permite a complexação com outras moléculas não polares, como alcoóis de cadeia longa, monoglicéridos, tensoativos e ácidos graxos (THOMAS; ATWELL, 1999; HERNANDEZ-MEDINA et al., 2008).

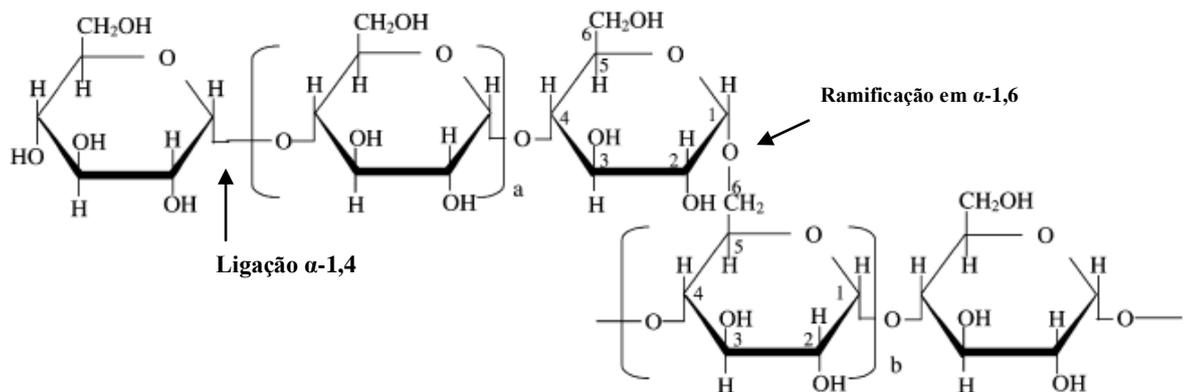


Fonte: TESTER; KARKALAS; QI (2004).

Figura 2 – Estrutura química da amilose, cujo número de resíduos de glicose (n) pode chegar a alguns milhares.

A amilopectina é um polímero altamente ramificado formada por unidades de glicose, unidas por ligações α -1,4 (94-96%) e α -1,6 (4-6%) (Figura 3), tais ramificações se encontram localizadas aproximadamente a cada 15 – 25 unidades de glicose. A massa molecular é entre 10^7 a 10^9 g/mol, ressaltando que este valor varia de acordo com a fonte botânica, com as condições de separação da amilose e amilopectina, bem como quanto ao método empregado para a determinação da massa molar (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1986).

A amilopectina representa em media 70 a 85% do grânulo de amido, as cadeias externas da amilopectina se organizam na forma de dupla hélice e algumas formam estruturas cristalinas. A dupla hélice não possui uma cavidade central, ao igual como acontece na conformação da amilose, devido à presença das ramificações no interior. Por causa disso, perde a habilidade de formar complexos com outras moléculas (BULÉON et al., 1998; SRICHUWONG et al., 2005). Em presença de iodo reage formando um complexo de coloração avermelhada em função do pequeno tamanho das cadeias helicoidais em α -(1,4).



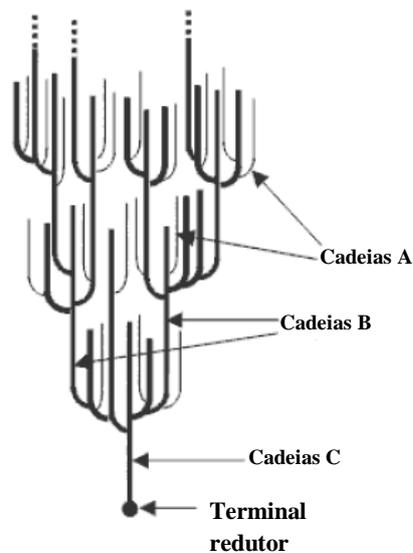
Fonte: TESTER & KARKALAS; QI (2004).

Figura 3 – Estrutura química da amilopectina, apontando as ligações α -1,4 e α -1,6. As ramificações das moléculas de amilopectina ocorrem em dupla hélice, formadas por

ligações pontes de hidrogênio com os grupos hidroxilas. Em geral as moléculas de amilopectina têm 1,0 a 1,5 nm de diâmetro e 12 a 40 nm de comprimento (BE MILLER; WHISTLER, 1993, ZOBEL, 1998).

A molécula de amilopectina (Figura 4) é constituída de uma cadeia principal C que contém o terminal redutor da molécula e numerosas cadeias ramificadas A e B. Onde as cadeias A são mais externas, não ramificadas e são conectadas às cadeias B ou C por ligações α -(1,6). As cadeias B são mais internas e ramificadas, podendo se ligar a outras do tipo A ou B por ligações α -(1,6) (BULEON et al., 1998; HOOVER, 2001).

A amilopectina é, estrutural e funcionalmente, a mais importante das duas frações, pois tem o poder de formar o grânulo, mesmo sem a participação da amilose, como ocorre em mutantes que são desprovidos da cadeia linear. Quanto à amilose, acredita-se que sua localização dentro do grânulo esteja entre as cadeias de amilopectina e aleatoriamente entremeadada entre as regiões amorfas e cristalinas (OATES et al., 1997; TESTER, et al., 2004).



Fonte: Adaptado de PARKER; RING (2001)

Figura 4 - Representação da estrutura da amilopectina

1.1.2 Estrutura do grânulo de amido

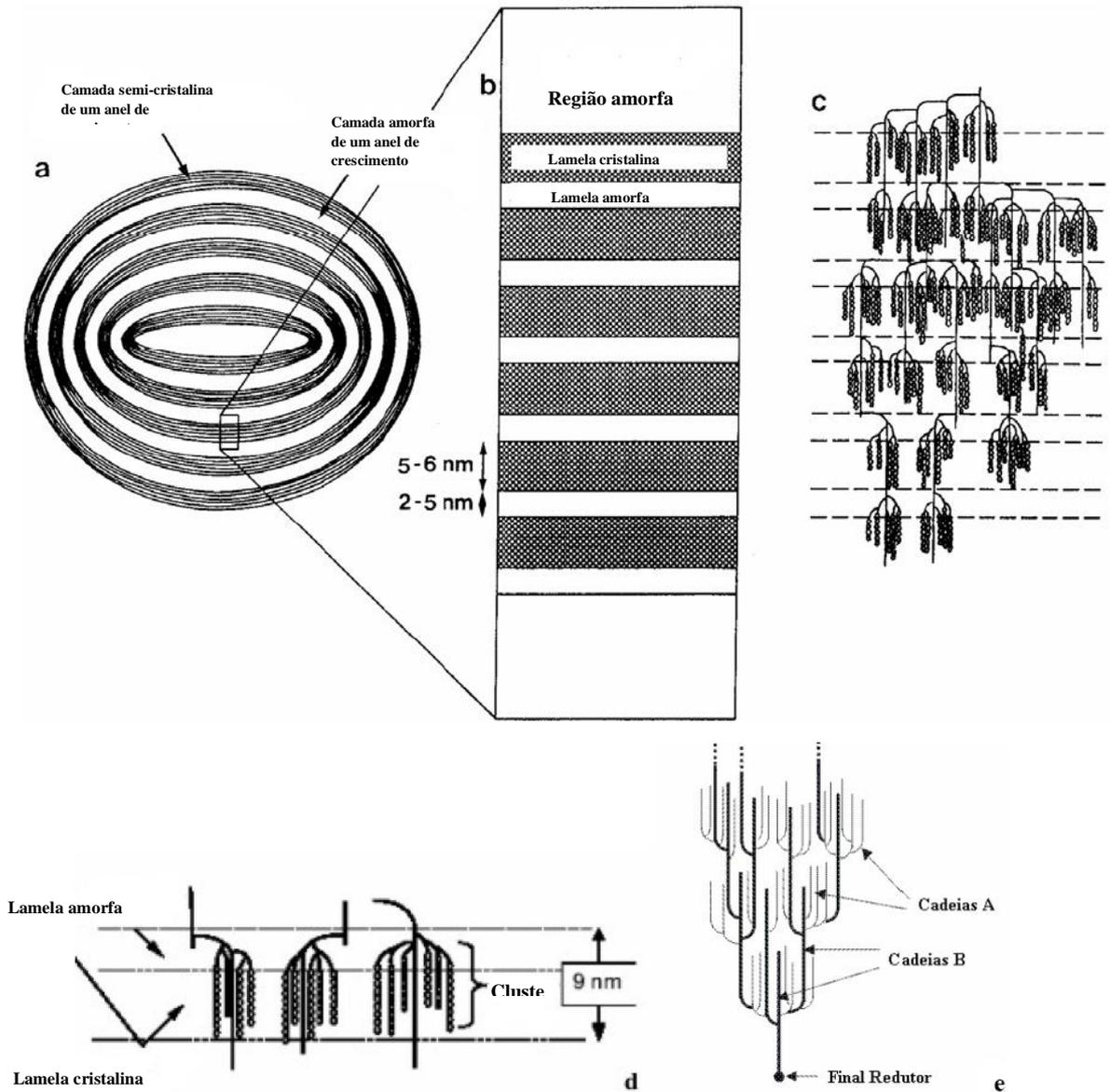
O grânulo de amido possui um alto grau de organização molecular, característica responsável pela birrefringência quando visto microscopicamente sob luz polarizada, e cristalinidade, que pode ser observada pela cruz de malta, o que caracteriza a orientação radial das macromoléculas. A planta sintetiza amido em forma compacta semicristalina para minimizar o espaço e maximizar a concentração de energia armazenada. Este processo envolve vários sistemas enzimáticos. Quando a planta precisa de energia para o crescimento e desenvolvimento ela utiliza o amido (TESTER et al, 2004; ELIASON, 2004). As variações que ocorrem em algumas propriedades do amido são influenciadas não somente pela composição química ou a relação amilose-amilopectina, mas também dependem do arranjo dos componentes nas regiões amorfas e cristalinas (CEREDA et al., 2002).

O grânulo cresce dentro do amiloplasto por deposição de sucessivas camadas a partir de um ponto central denominado hilo, encontrado no centro da cruz e considerado o ponto central de crescimento do grânulo. Cada anel pode ser chamado de lamelas, estrias ou capas. Esses anéis representam camadas concêntricas alternando alto e baixo índice de refração, densidade, cristalinidade e susceptibilidade ao ataque químico ou enzimático (ELIASON, 2004; LAJOLO; MENEZES, 2006).

Vários modelos estruturais das regiões cristalinas foram propostos para explicar a maneira como as cadeias de amilopectina agregam-se para formar uma estrutura altamente ramificada. A Figura 5 mostra um modelo da estrutura do grânulo de amido, no qual a camada mais densa esta formada de lamelas cristalinas (5 a 6 nm) e amorfas (2 a 5 nm) alternadas, compondo anéis de crescimento semicristalinos com cerca de 120 a 400 nm de espessura, que são rodeados por camadas amorfas de tamanho similar (JENKINS; DONALD, 1995) (Figura 5 a-b). As zonas amorfas são menos compactas e possuem ligações mais fracas, sendo mais susceptíveis ao ataque ácido e enzimático (CEREDA et al., 2002; JACOBS; DELCOUR, 1998).

O modelo proposto atualmente para a amilopectina é a de cadeias curtas formando duplas hélices associadas por cadeias A e seriam mais resistentes à hidrólise ácida, estas cadeias estariam compactadas de forma paralela, formando uma estrutura organizada por empacotamento, com zonas cristalinas e amorfas alternadas. As cadeias A mais externas formam duplas hélices que são arranjadas nas regiões cristalinas e aos pontos de ramificação se distribuem nos clusters e se encontram principalmente nas regiões amorfas. As áreas

alternadas entre os sucessivos clusters apresentariam a maior parte das ramificações em α -1,6 a qual seria menos resistente à hidrólise, sendo denominadas de lamela amorfas (Figura 5c-e) (FRENCH, 1973; ROBIN et al., 1974; PARKER; RING, 2001).



Fontes: JENKINS et al., 1994; TESTER et al., 2004; CEREDA et al., 2002

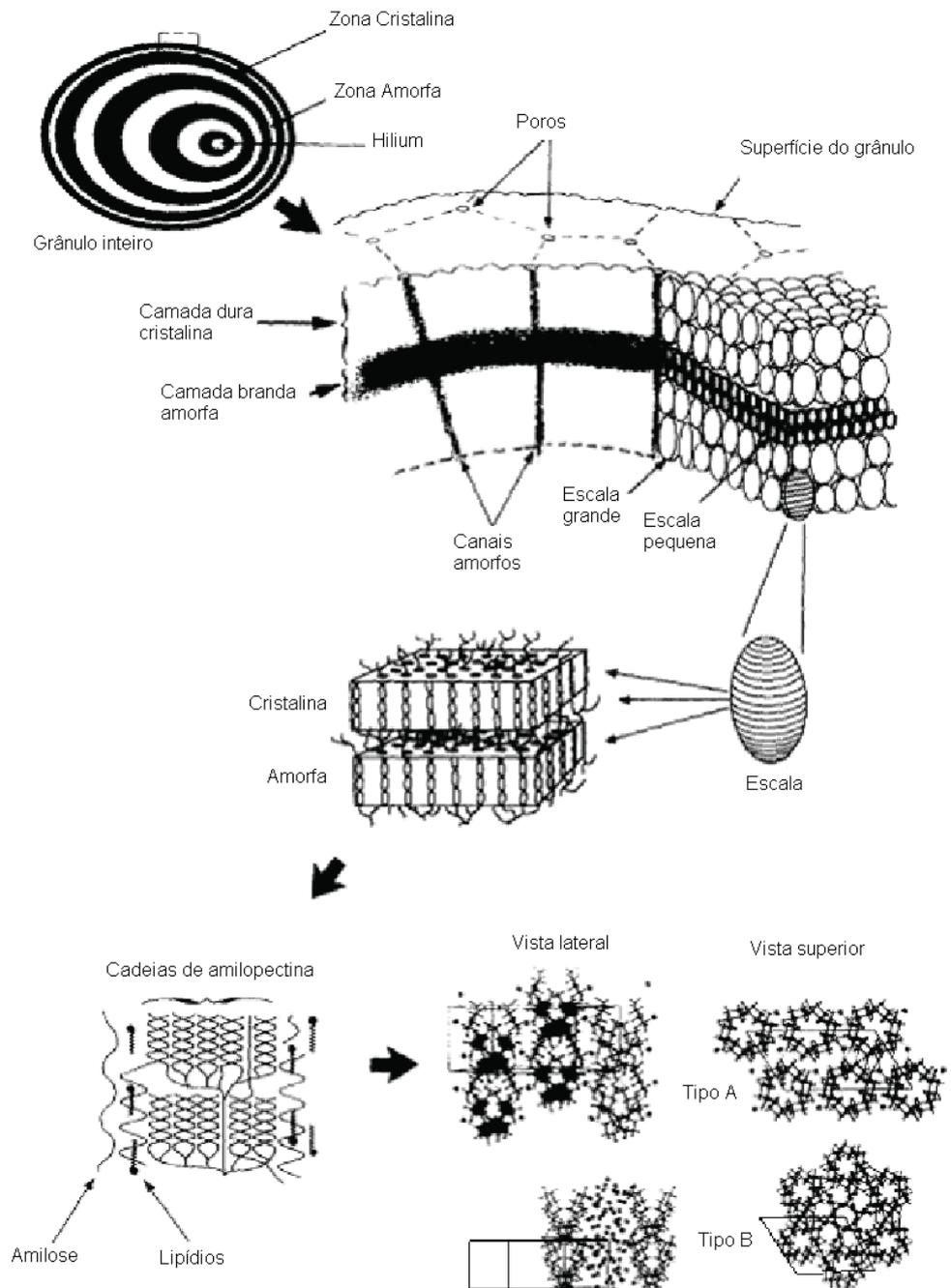
Figura 5 - Estrutura da molécula da amilopectina e sua organização dentro do grânulo de amido. (a) representação da estrutura de um grânulo contendo camadas amorfas e cristalinas, representando os anéis de crescimento; (b) visão ampliada da camada semicristalina de um anel de crescimento, consistindo de lamelas cristalinas e amorfas alternadas; (c) representação da estrutura de um cluster da amilopectina dentro da camada semicristalina do anel de crescimento; (d) e (e) Visão ampliada dos clusters.

Segundo Biliaderis e Tonogal (1991) e Lacerda et al. (2008), as áreas cristalinas do amido são as que mantêm a estrutura do grânulo, controlando seu comportamento na presença de água e a resistência aos ataques enzimáticos ou químicos. A zona amorfa dos grânulos é a região menos densa, pois as moléculas se encontram mais distantes umas das outras, o que resulta numa região mais frágil que absorve mais água em temperaturas abaixo do ponto de gelatinização.

A natureza cristalina do amido é uma característica importante para o empacotamento dentro do grânulo. O grau de cristalinidade dos grânulos é de difícil precisão devido ao tamanho, porém normalmente varia entre 15 – 45%. A presença de moléculas de água é fundamental para manter a cristalinidade do grânulo, a qual pode ser destruída por ação mecânica como moagem, alta pressão ou por temperaturas elevadas, resultando na perda da característica de birrefringência e dos padrões de raios-X.

A amilose e a amilopectina são depositadas em camadas sucessivas e se superpõem ao redor de um núcleo chamado hilum; esta característica confere ao amido um caráter semicristalino, com regiões cristalinas e ordenadas onde se concentra a amilopectina (Figura 6).

Por apresentarem regiões amorfas os grânulos de amido proporcionam padrões específicos de cristalinidade, e podem ser determinados por difração de raios – X. Os padrões de difração são utilizados para diferenciar os amidos dos cereais e tubérculos. Também detecta as mudanças de cristalinidade da amilopectina, como resultado dos tratamentos físicos e químicos dos grânulos de amido. Os arranjos desses empacotamentos das cadeias da amilopectina geram diferentes padrões de cristalização sendo as mais conhecidas as duas poliformas A e B e a intermediária C. esta classificação esta baseada na variação do conteúdo de água e na configuração de empacotamento de duplas hélices (IMBERTY et al., 1991; BULEON, 1998).



Fonte: Gallant et al.. (1997)

Figura 6- Representação da estrutura do grânulo de amido e seus níveis de organização molecular interna amilose e amilopectina.

Amidos de cereais apresentam padrões tipo A e é descrito como uma unidade celular monoclinica altamente condensada e cristalina, onde 12 resíduos de glicose de duas cadeias no sentido anti-horário abrigam quatro moléculas de água entre as hélices, em geral é constituída por baixos teores de fósforo e cadeias curtas de amilopectina. No segundo grupo

estão classificados os amidos dos tubérculos apresentando o padrão tipo B, como a batata, com altos níveis de fósforo e cadeias longas de amilopectina e amidos com alto teor de amilose. Os derivados de leguminosas apresentam o modelo tipo C, que é um padrão cristalográfico que resultam provavelmente das misturas dos padrões A e B, porém com maior tendência ao padrão A (ELIASON, 1996; OATES, 1997; ELIASON, 2004).

As duplas hélices nas duas formas polimórficas A e B são idênticas em termos de estrutura helicoidal. No entanto, o empacotamento destas duplas hélices na estrutura cristalina do tipo polimórfico A é relativamente compacto, com baixo conteúdo de água, apresentando de 4-8 moléculas de água por hélice e uma estrutura monoclinica. A remoção da água é impossível sem uma completa destruição da estrutura cristalina. No caso polimórfico B, é uma estrutura com maior conteúdo de água, tornando a hélice mais hidratada, com 36 moléculas de água por hélice para cada 12 resíduos de glicose, formando um cristal de tipo hexagonal (IMBERTY et al., 1991; TESTER et al., 2004). Além de serem considerados mais ricos em amilose, esses tipos de amido apresentam formatos e tamanhos semelhantes e são resistentes tanto a hidrólise enzimática quanto acida (LAJOLO; MENEZES, 1996).

Segundo LI et al. (2004), a maior susceptibilidade dos amidos com cristalinidade tipo A à hidrólise ocorre devido à presença de poros superficiais que poderiam ser alargados pela ação das enzimas, facilitando o ataque no interior do grânulo. Outra possível hipótese poderia ser a presença de camadas protetoras, chamados blocos cristalinos, incorporados estruturalmente ao redor dos grânulos tipo B, os quais são menos fortemente empacotados (OATES, 1997).

1.1.3 Propriedades tecnológicas do amido

1.1.3.1 Capacidade de absorção de água (CAA), poder de intumescimento (PI) e solubilidade dos grânulos de amido.

O amido é o agente gelificante e espessante mais usado na indústria de alimentos, ele proporciona textura a uma grande diversidade de alimentos como sopas, molhos, alimentos processados, etc. Além desta característica, o amido também possui outras propriedades

funcionais como capacidade de absorção de água, poder de intumescimento e a solubilidade dos grânulos, a gelatinização, a viscosidade e a retrogradação. Estas propriedades podem ser influenciadas pela razão de amilose/amilopectina, a relação de água/amido, a taxa de aquecimento, morfologia, cisalhamento, adição de outros componentes como o açúcar, sal e a proteína (KISLENKO; OLIYNYK; GOLACHOWSKI, 2006; THEBAUDIN; LEFEBRVE; DOUBLIER, 1998).

A capacidade de absorção de água (CAA) é uma das principais propriedades funcionais do gel: a água é retida na estrutura do gel por forças de capilaridade ou simplesmente é aprisionada na malha gelificada. Na maior parte dos estudos efetuados, a CAA foi determinada empregando forças de centrifugação, e a água liberada do gel é quantificada por diferença de massas. Vale salientar que neste tipo de ensaio a velocidade de centrifugação é relativamente elevada e a quantidade de água expelida vai depender, não só da capacidade intrínseca do gel de reter a água, bem como da compressibilidade do próprio gel, sendo que maior a compressibilidade implicará em menor quantidade de água retida. Esta análise proporciona resultados importantes para resolver problemas práticos como a sinérese, textura sensorialmente arenosa e aumento de rendimento (OTTE et al., 2000; HINRICHS et al., 2003).

O poder de inchamento (PI) e a solubilidade (S) variam de acordo com a fonte botânica fornecendo evidências da magnitude de interação entre as cadeias de amido dentro dos domínios amorfos e cristalinos. A extensão dessas interações é influenciada pela proporção amilose:amilopectina e pela característica delas em termos de distribuição e massa molecular, grau de polimerização, comprimento das ramificações e conformação (HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003; FRANCO et al., 2001). Segundo Singh et al. (2003), quando as moléculas de amido são aquecidas em excesso de água irão inchar até que a pressão osmótica gerada pelos grânulos se iguale à firmeza da rede do gel gerada pelo intumescimento dos mesmos, momento no qual a estrutura cristalina é rompida e as moléculas de água formam pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila expostos da amilose e a amilopectina, o que causa um aumento no intumescimento e na solubilidade do grânulo e de sua água oclusa (PARKER; RING, 2001).

Esta propriedade de intumescimento do amido é essencialmente em parte controlada pela estrutura da amilopectina (comprimento de cadeia, extensão de ramificação, massa molecular), composição do amido, e arquitetura granular (proporção de regiões cristalinas e amorfas). A amilose age como diluente, mas pode ter essa ação inibida pela ligação com outros componentes presentes no amido ou acrescentada na suspensão, o que

consequentemente dificultaria o intumescimento do amido. Em geral, elevadas temperaturas de transição têm sido associadas a altos graus de cristalinidade, os quais fornecem a estabilidade estrutural e tornam os grânulos mais resistentes à gelatinização (ZOBEL, 1998; SINGH et al., 2003).

1.1.3.2 Gelatinização e retrogradação

O processo de gelatinização está relacionado à perda de ordem molecular e estrutural, o que leva ao intumescimento irreversível do grânulo com o rompimento das ligações de hidrogênio entre as moléculas de amilose e amilopectina, perda da birrefringência e perda da cristalinidade no interior dos grânulos. A água entra nos grânulos e se liga a grupos hidroxila da molécula, provocando perda da amilose para a solução, por lixiviação, e leva ao aumento da viscosidade, à dissociação das duplas hélices e à solubilização do amido (Figura 7). A gelatinização ocorre em uma faixa de temperatura onde os grânulos maiores gelatinizam primeiro, seguido pelos de menor tamanho, ocorrendo durante um intervalo de temperatura muito menor do que o da perda da estrutura cristalina do grânulo (PARKER; RING, 2001; LINDEBOOM et al., 2004, SRICHUWONG, 2005). Todas estas alterações fazem parte do processo de gelatinização, com o gel de amido considerado como um composto, no qual os grânulos gelatinizados, contendo principalmente amilopectina, estão embebidos por uma matriz de amilose, que se encontra dispersa na solução, e grânulos intumescidos de amido, parcialmente desintegrados.

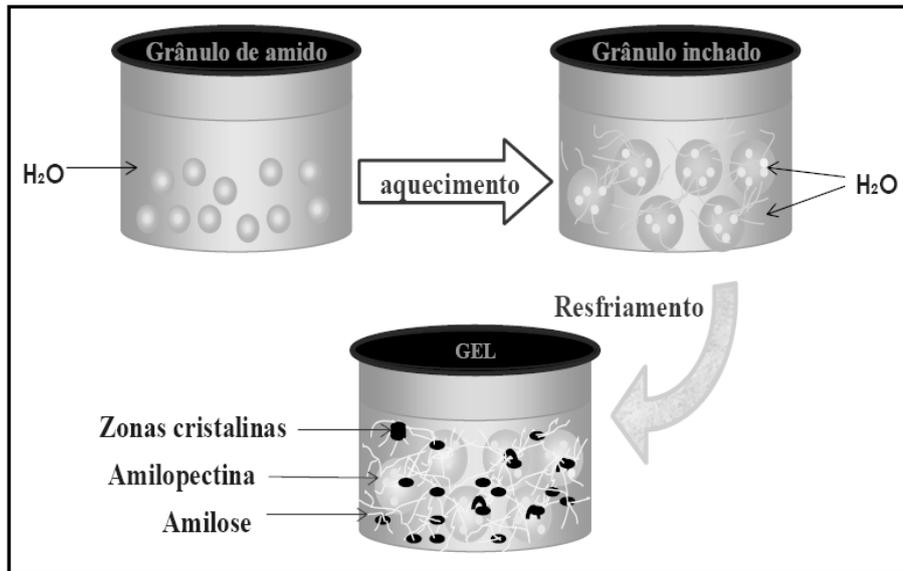


Figura 7 - Representação da alteração do grânulo de amido em suspensão submetido a processo térmico.

A temperatura de gelatinização inicial e a faixa de temperatura onde ocorre todo o processo de gelatinização está relacionada com a taxa de aquecimento utilizada e as proporções de amido:água, o tipo de grânulo, a cristalinidade e heterogeneidade dentro da população de grânulos no amido (BILIADERIS et al., 1986; TANG et al., 2001). Nos termogramas é possível determinar três parâmetros do processo de gelatinização: temperatura de início (T_0), de gelatinização ou de pico (T_p) e conclusão (T_c) (GUNARATNE; HOOVER, 2002; SHIN et al., 2004). As três temperaturas corresponderiam: (1) Início de intumescimento dos grânulos de amido (T_0), (2) intumescimento máximo ou volume máximo, chamado de temperatura de gelatinização (T_p) e (3) ruptura e posterior esvaziamento dos grânulos (T_c). Assim, pode-se determinar, também, a entalpia de gelatinização (ΔH_{gel}), que é uma medida física expressa em (Joule/grama de matéria-prima em base seca) relacionada com a energia absorvida durante o processo de gelatinização, definido como um processo do tipo endotérmico (MANO et al., 2003).

Atualmente varias técnicas têm sido utilizadas para avaliar o comportamento dos grânulos frente à gelatinização, tais como difração de raios X, dispersão de nêutrons de pequeno ângulo, microscopia com luz polarizada e, sobretudo, calorimetria diferencial de varredura (DSC). Além disso, alguns equipamentos também avaliam a viscosidade de pastas de amido, como o viscoamilógrafo Brabender, o viscoanalisador rápido (RVA) e os viscosímetros de rotação, os quais fornecem parâmetros sobre o comportamento do grânulo de amido na gelatinização (SINGH et al., 2003; ELIASSON, 2004).

Quando uma suspensão de amido gelatinizada é armazenada e resfriada resulta a formação do gel de amido, ou geleificação. A partir desse ponto, o sistema pode sofrer um fenômeno denominado retrogradação (PARKER; RING, 2001). Durante o armazenamento as moléculas de amido vão perdendo energia e as moléculas de hidrogênio se tornam mais fortes, assim, as cadeias começam a se reassociar em um estado mais ordenado. Essa reassociação dá lugar à formação de simples e duplas hélices, resultando no enredamento ou na formação de zonas de junção entre as moléculas, com o surgimento de áreas cristalinas. Como a área cristalizada altera o índice de refração, o gel vai se tornando mais opaco à medida que a retrogradação se processa. A amilose que foi exsudada dos grânulos inchados forma uma rede por meio da associação com cadeias que rodeiam os grânulos gelatinizados (ELIASSON, 1996).

Devido a esta característica, a viscosidade da pasta aumenta (setback), tornando-se um sistema viscoelástico turvo em concentrações de amido $\geq 6\%$ (p/p). De maneira geral, amidos com alta tendência a retrogradação produzem pastas mais opacas, pois a maior compactação das moléculas dificulta a passagem da luz. A forte interação das cadeias entre si promove a saída de água do sistema, sendo essa expulsão chamada de sinérese (ELIASSON, 2004; LAJOLO; MENEZES, 2006).

Sabe-se que durante a estocagem e o processo de congelamento e descongelamento o fenômeno de retrogradação/sinérese é drasticamente acelerado, com impacto na textura, aceitabilidade e digestibilidade dos produtos que contém amido. Em geral as características dos géis são influenciadas pela relação amilose e amilopectina na solução, sendo que géis formados com elevadas concentrações de amilose oferecem maior resistência térmica e mecânica e são menos degradados, química ou enzimaticamente, quando comparados com géis ricos em amilopectina (ELIASSON et al., 2004; JAYAKODY, 2001).

Alguns autores relataram que o conteúdo de amilose é um dos fatores que influenciam a retrogradação do amido, mas a amilopectina e o material intermediário são responsáveis na retrogradação refrigerada (KAUR et al., 2002; YAMIM et al., 1999).

Segundo Huang (2006), os amidos de leguminosas oferecem elevada temperatura de gelatinização, resultando em pastas mais viscosas do que as dos cereais, oferecem maior resistência ao intumescimento e à ruptura, rápida retrogradação e alta elasticidade dos géis. Estas propriedades são essenciais para a fabricação de produtos como salsicha, patês e macarrão instantâneo e a resistência da pasta a altas temperaturas, pois garantem boa aplicação em enlatados e produtos extrusados (HUANG et al., 2007; AGUNBIADE; LONGE, 1999).

1.1.3.3 Perfil de textura do gel de amido

A textura é um dado importante para o desenvolvimento de novos produtos ou na otimização dos diferentes processos industriais. Técnicas de avaliação sensorial e métodos instrumentais são empregados para a determinação dos parâmetros de textura nos alimentos. As propriedades de textura e mecânicas dos géis são influenciadas pela composição do amido, da amilose, do intumescimento dos grânulos e a interação entre as fases continua e dispersa (SINGH et al., 2006).

Shandu e Singh (2007) estudaram as propriedades do amido de milho e mostraram que o conteúdo de amilose está diretamente relacionado com a dureza e a gomosidade dos géis, sendo a firmeza do gel causada pela retrogradação, associada à sinérese e à cristalização da amilopectina. Amidos que possuem géis mais duros geralmente apresentam maior conteúdo de amilose e longas cadeias de amilopectina. As propriedades avaliadas na análise de perfil de textura estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades avaliadas na análise de perfil de textura (TPA)

Propriedade	Unidade	O que é?	Medida no gráfico	Relação com a análise sensorial
Dureza	N	Força necessária para deformar o produto a uma determinada distância.	Força máxima necessária para comprimir o gel na primeira compressão	Corresponde à força para morder e comprimir o alimento na boca
Adesividade	J	Trabalho necessário para deslocar o dispositivo de compressão da amostra	Área negativa na curva entre a primeira e segunda compressão	Força necessária para remover o alimento que adere na língua, dentes e mucosas
Coesividade	adimensional	Força simulada para romper as ligações internas da massa	Área da segunda compressão dividida pela área da primeira	Grau de deformação da amostra durante a ruptura pelos dentes
Elasticidade	mm	Forma com que o produto retorna à sua condição inicial após parcial compressão	Relação entre a força da segunda compressão e a força da primeira	Grau como o alimento retoma a sua forma após uma compressão parcial da língua contra os dentes ou céu da boca
Gomosidade	N	Força necessária para desintegrar o material	Dureza x Coesividade	Energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido para um estado pronto a ser engolido, sem mastigar.
Mastigabilidade	N.mm	Força necessária para desintegrar o material	Gomosidade x Elasticidade	Número de mastigações necessárias para tomar o alimento com consistência adequada para ser engolido

Fonte: KALVIAINEM; ROININEN; TUTORILA, (2000).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- O objetivo deste trabalho foi estudar as propriedades físico-químicas e funcionais do amido de maca.

1.2.2 Objetivos específicos.

- Isolar o amido de maca;
- Determinar a composição química do amido de maca;
- Avaliar a capacidade de absorção de água, o poder de intumescimento, a solubilidade, a gelatinização e a viscosidade;
- Estudar os parâmetros de textura na pasta de amido;
- Analisar a morfologia do grânulo de amido, empregando a microscopia eletrônica de varredura.

1.3 MATERIAS E MÉTODOS

1.3.1 Amostra

As raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walp) foram adquiridas num mercado local do estado de Arequipa – Peru, 4 dias após a colheita. As raízes foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% e secas à temperatura ambiente. Após a higienização uma parte foi usada para a extração do amido e outra parte foi armazenada em sacos de polietileno e congelada a -20 °C até sua utilização.

1.3.2 Reagentes

Todos os reagentes empregados foram adquiridos da Sigma Chemical Co. e Aldrich Chemical Co., Invitrogen e GE Life Sciences.

1.3.3 Métodos

1.3.3.1 Isolamento dos grânulos de amido

O amido da raiz de maca foi extraído empregando o método descrito por Singh e Singh (2001), com algumas adaptações. Raízes de maca foram manualmente descascadas, cortadas em pequenos cubos (aproximadamente 3 mm de aresta) e homogeneizados num liquidificador comum ou triturador Turrax com água destilada durante 3 min. O homogenato foi filtrado em 3 camadas de membrana fina de algodão e o filtrado coletado num becker, posteriormente foi centrifugado a 1300 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado,

e o precipitado (amido) foi resuspenso em água e lavado várias vezes (entre 8 a 10 vezes) até a obtenção de um amido branco e livre de impurezas (pigmentos) e o sobrenadante fosse translúcido. Finalmente o amido foi coletado e seco a temperatura ambiente em ar ventilado. O amido seco foi homogeneizado e armazenado a -20°C .

1.3.3.2 Determinação de amido total

A determinação do amido total foi realizada de acordo com o método descrito por Arêas e Lajolo, (1981), com algumas modificações. Inicialmente a amostra foi triturada em nitrogênio líquido e cerca de 0,5 g foi pesado e homogeneizado com uma solução de NaOH 0,5 M em homogeneizador Potter durante 5 minutos. Posteriormente o pH foi neutralizado com 5 mL de ácido acético 0,5 M, o volume foi completado com água para 50 mL em um balão volumétrico. A uma alíquota de 2 mL foram adicionados 8,0 mL de etanol absoluto para a precipitação do amido e centrifugado a $12000 \times g$ durante 15 minutos. O precipitado contendo o amido foi lavado com etanol 80 % (2X) e, posteriormente, foi seco e hidrolisado com 2 mL de uma solução contendo amiloglicosidase e α -amilase pancreática (14,0 e 0,4 U/mL, respectivamente, Sigma) em tampão acetato 0,2 M (pH 4,8), por um período de 2 h a 37°C . A reação foi interrompida pela adição de ácido perclórico 0,6 M.

A glicose liberada foi quantificada pelo método de Antrona (0,1% de antrona em ácido sulfúrico 76%), descrito por Viles e Silverman (1946), utilizando glicose como padrão. A concentração de glicose liberada foi medida pela leitura de absorbância a 620 nm. O teor de amido foi calculado através da quantidade de glicose determinada $\times 0,9$.

1.3.3.3 Determinação de amilose

O teor de amilose do amido extraído foi determinado seguindo o método de Morrison e Laignelet (1983) adaptado para as condições atuais. A 40 mg de amido isolado foram adicionados 5,0 mL de DMSO (Dimetildisulfoxido e uréia a 6 M, 9:1), a suspensão foi agitada vigorosamente, incubada em banho fervente por 30 minutos e em seguida colocada numa estufa a 100°C por 90 min. Uma alíquota de 0,5 mL desta solução foi diluída a 50 mL

com água destilada e foi adicionado 1,0 mL de I₂-KI (2 mg I₂, 20 mg KI/mL). Finalmente foi medida a absorvância a 635 nm em espectrofotômetro UV-VIS B582. O teor de amilose foi avaliado por meio de uma curva de calibração, usando uma mistura de soluções puras de amilose e amilopectina (0 a 100 % de amilose e 100 a 0% de amilopectina).

1.3.3.4 Determinação de açúcares solúveis totais

Os açúcares solúveis totais foram extraídos de aproximadamente 1 g de amostra de amido, aos quais foram adicionados 5,0 mL de etanol a 80 %. As amostras foram agitadas durante 10 minutos em banho a 80 °C com agitação e posteriormente centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos o sobrenadante foi recolhido em balão de 25 mL. A extração foi repetida mais uma vez, os sobrenadantes foram juntados no balão e o volume ajustado com etanol a 80 %. Uma alíquota de 1,0 mL foi concentrada em speed-vac e posteriormente o precipitado foi ressuspenso com água. O teor de açúcares foi determinado pela reação com antrona como descrito anteriormente.

1.3.3.5 Determinação da composição química

A composição química do amido das raízes de maca foi determinada através de métodos convencionais, preconizados pelo Instituto Adolfo Lutz, (1985) e AOAC (1980). Os resultados apresentados correspondem à média de três determinações.

Umidade

As medidas foram realizadas por dessecação em estufa a 105 °C, até a obtenção da massa constante da amostra. A umidade foi calculada através da diferença entre as massas iniciais e finais das amostras.

Cinzas

As determinações foram realizadas pelo método gravimétrico, através da incineração da amostra e, posteriormente, calcinação da matéria prima a 550 °C em mufla.

Lípides

A extração lipídica residual da maca foi feita de forma contínua em aparelho do tipo Soxhlet, utilizando como solvente o éter etílico.

Proteínas

As análises foram realizadas através do método micro-Kjeldahl (AOAC, 1980), que se baseia na determinação do nitrogênio. O fator de conversão do nitrogênio em proteína foi de 6,25.

Fibra

Para a análise de fibra alimentar total (FAT), foi empregado o método enzimático-gravimétrico (PROSKY et al., 1992). O método consiste na digestão enzimática da amostra com α -amilase termoestável, amiloglicosidase e protease para a remoção de contaminantes do amido e de proteína, com posterior filtração em cadinhos (resíduo fibra insolúvel). A precipitação da fração solúvel (sobrenadante) foi realizada com etanol a 98% (v/v) e posterior filtração. O resíduo e o precipitado retidos foram lavados com 78 e 95% de etanol e acetona e, posteriormente, foram secos em estufa a 105 °C durante uma noite, esfriados em dessecador para serem pesados. Cada ensaio foi realizado em quadruplicata e uma prova em branco em paralelo.

1.3.4 Determinação de propriedades funcionais

Para a realização destas análises foram empregados amidos de mandioca e mandioquinha, os quais já foram estudados em nosso laboratório, e com o intuito de comparação com os dados mostrados na literatura (SANTACRUZ et al, 2002; PIRES, 2005).

1.3.4.1 Poder de intumescimento (PI), capacidade de absorção de água (CAA) e solubilidade (S).

O poder de intumescimento e a solubilidade dos grânulos de amido de maca foram determinados em triplicata, seguindo o método de Leach, McCowen e Schoch (1959). Suspensões aquosas de 2% de amido (w/v) foram aquecidas em banho de água em temperaturas constantes e agitação, durante 30 minutos. Cada suspensão foi esfriada e centrifugada a 3000 x g por 15 min, o decantado foi pesado e o sobrenadante colocado numa estufa a vácuo a 120 °C durante 4 h. Os dados obtidos foram empregados para calcular a capacidade de absorção de água, o poder de intumescimento e a solubilidade dos grânulos de amido.

1.3.4.2 Turbidez

A turbidez dos géis de amido de maca foi medida como descrito por Perera e Hoover (1999), através de uma suspensão aquosa 1% colocada em banho de água à temperatura constante (90 °C) e agitada constantemente durante 1 h. A pasta foi resfriada à temperatura ambiente e armazenada a 4°C durante 5 dias. A turbidez foi medida a cada 24 horas, através do valor da absorbância a 640 nm em espectrofotômetro (Micronal B582) a partir do tempo zero.

1.3.4.3 Estabilidade ao congelamento e refrigeração

As condições estabelecidas para a determinação da estabilidade ao congelamento e refrigeração foram adaptadas de Eliasson e Ryang (1992). Uma suspensão de amido a 6% foi aquecida até 95 °C durante 15 minutos, em seguida foi esfriada até 50 °C e conservada durante 15 minutos nesta temperatura. Porções de 50 mL foram colocadas em tubos de centrifuga e estes foram acondicionados a três temperaturas: ambiente (~25°C), 4 °C e -10 °C, durante 5 dias. A cada 24 h as amostras foram retiradas do ambiente armazenado, para o

descongelamento ou estabilização da temperatura, posteriormente foram centrifugadas a 8000 x g por 10 min e foi quantificada a água expelida durante o armazenamento.

1.3.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Os grânulos de amido extraídos durante o armazenamento foram observados empregando um microscópio eletrônico de varredura modelo Quanta 600 FEG (marca FEI - Laboratório de Caracterização Tecnológica, Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo da Escola Politécnica da USP). As amostras foram preparadas em “stubs” e fixadas sobre fita dupla face de carbono e cobertas com platina para a metalização no equipamento modelo Modular High Vacuum Coating System MED 020, marca Bal – Tec. As imagens obtidas são de elétrons secundários, operando em modo 5 KV.

1.3.5 Propriedades Térmicas

1.3.5.1 Propriedades da pasta do amido

As propriedades da pasta de amido de maca foram determinadas seguindo o método descrito por Wiesenborn et al, (1994), usando um viscoamilógrafo (viscoamylograph) (Brabender PT-100, Germany). Uma suspensão aquosa de 8 % de amido (base seca) foi aquecida de 25 até 95 °C numa faixa de 1,5 °C/min e mantida durante 20 minutos a 95 °C, posteriormente foi esfriada até 50 °C na mesma faixa de temperatura e conservada nesta segunda temperatura por 20 min. Os resultados obtidos do amilograma foram empregados para calcular a viscosidade máxima, consistência, breakdown e setback em Unidades Brabender (UB).

1.3.5.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para determinar a temperatura de gelatinização do amido foi empregado um DSC, (modelo 822^o, Mettler Toledo, Simple Robot, TSO 801R0, operado com Software EXSTAR6000). Em amostras de 3,0 mg de amido (base seca) foram adicionados 70 % de água destilada para formar uma suspensão. A cápsula foi hermeticamente fechada e equilibrada à temperatura ambiente durante 1 h antes do aquecimento no equipamento. A calibração do sistema foi realizada com índio metálico e uma cápsula de alumínio vazia foi tomada como referência. As amostras foram analisadas entre 10 a 120 °C numa faixa de aquecimento de 10 °C/min. As transições térmicas das amostras de amido foram definidas como T_o (temperatura inicial), T_p (temperatura do pico), T_f (temperatura final) e ΔH_{gel} referente à entalpia de gelatinização. As entalpias foram calculadas automaticamente das amostras de amido em base seca.

1.3.5.3 Propriedades de Textura do gel de amido

As propriedades de textura do gel de amido de maca foram determinadas mediante o perfil de análise de textura (TPA) empregando um equipamento TA/XT2 (Stable Microsystems, Surrey, England). Uma suspensão de amido a 6% foi aquecida até 95 °C durante 15 minutos, posteriormente resfriada a 50 °C e mantida nesta temperatura por 15 min. A pasta formada foi transferida em porções de 40 mL em frascos beakers de 50 mL e esfriados a temperatura ambiente, em seguida foram armazenados a 4°C durante 24h. Os géis formados nos frascos foram diretamente usados na análise de textura, com probe cilíndrico P/25 de diâmetro cada gel foi penetrado em 10 mm. Foram obtidas duas curvas de força-tempo com velocidade de 1,0 mm/s, durante os ciclos de penetração. Da curva de perfil de textura, foram calculados a fraturabilidade, a dureza, a coesividade, a adesividade, a elasticidade, a gomosidade e a mastigabilidade. As análises de TPA foram realizadas em triplicata.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Composição química

Os resultados referentes à composição química do amido de maca são mostrados na Tabela 2. O amido isolado apresentou 0,28% de lipídios, 0,2% de fibra e 0,12% de resíduo mineral fixo, não sendo possível quantificar o conteúdo de proteínas em função de seu baixo teor. O amido isolado atingiu 88% de pureza, proporção considerada elevada quando comparada com a pureza de algumas variedades de *P. ahipa* (56–59%) e similares as de batata doce vermelha (87%) (OSUNDAHUNSI et al., 2003; TORRUCO-UCO; BETANCUR-ANCONA, 2007). Em diferentes culturas de batata doce, o teor de amido variou de 43 a 79% e nele o conteúdo de amilose é de 17 a 22% (MADHUSUDHAN et al., 1992). Este fato pode ser influenciado pela fonte botânica, condições climáticas e tipos de solo durante o cultivo, bem como o tempo de colheita, pois, uma colheita tardia de batatas pode reduzir de 22% para 18% seu conteúdo de amido (NODA et al., 2004).

O amido de maca apresentou 20,5% de amilose e 79,5% de amilopectina (Tabela 2). Este resultado difere de amidos de milho (28,3% e 71,7%), batata doce vermelha (34,2% e 65,8%), mangarito (*Xanthosoma saggitifolium*) (24% e 76%) e makal (*Xanthosoma yucatanensis*) (22,4% e 77,6%) (MOORTHY, 2002; OSUNDAHUNSI et al., 2003; CHARLES et al., 2005; TORRUCO-UCO; BETANCUR-ANCONA, 2007).

Tabela 2- Composição químicas de raízes de maca e do amido isolado

Componentes	% em base seca Raíz de maca	% em base seca Amido de maca
Proteína	17,69 ± 1,96	NI
Lipídios	3,61 ± 0,04	0,28 ± 0,03
Carboidratos	72,78 ± 0,2	99,06 ± 0,02
Fibra solúvel	8,50 ± 0,32	NI
Fibra insolúvel	23,24 ± 0,07	NI
Amido total	23,17 ± 1,06	87,83 ± 0,87
Açúcares totais	18,87 ± 0,35	NI
Açúcares redutores	13,10 ± 0,17	NI
Amilose	ND	20,45 ± 0,91
Amilopectina	ND	79,54 ± 0,91
Resíduo mineral fixo	5,93 ± 0,18	0,12 ± 0,01

NI não identificado, ND não determinado.

1.4.2 Poder de intumescimento (PI), capacidade de absorção de água (CAA) e solubilidade (S).

O poder de intumescimento (PI) ou inchamento, a capacidade de absorção de água (CAA) e a solubilidade do amido de maca estão diretamente correlacionadas com o incremento da temperatura. As Figuras 8A (PI), 8B (CAA) e 8C (S) mostram o poder de intumescimento, a capacidade de absorção de água e a solubilidade dos grânulos de amido de maca, respectivamente. De acordo com as figuras foram observados níveis baixos de PI, CAA e solubilidade em temperaturas de 30 e 40°C, com intumescimento gradativo do grânulo a partir de 50°C até 90°C. O poder de intumescimento dos grânulos de amido de maca a 90 °C foi de 119,0 g água/g amido, a capacidade de absorção de água de 45,9 g água/g amido e 61,4% de solubilidade, estes dados são altos se comparados com o amido de mandioca (Figura 8B), ou com os dados observados por Betancur-Ancona et al. (2001) que foi de 58,8 g água/g amido. Igualmente elevados são os valores de algumas variedades de milho (13,7 a 20,7 g água/g amido) (SHANDU; SINGH, 2007) e diferentes variedades de batatas (36,5 a 40,5 g/g) (SINGH; McCARTHY; SINGH, 2006).

Amidos com amilose em proporção reduzida mostram elevado poder de intumescimento e baixa solubilidade quando são aquecidos em excesso de água. A estrutura molecular cristalina do amido é quebrada e as moléculas de água se ligam por pontes de hidrogênio aos grupos hidroxila livres da amilose e amilopectina. Estas ligações poderiam causar um incremento na capacidade de absorção e solubilidade (SINGH et al., 2003).

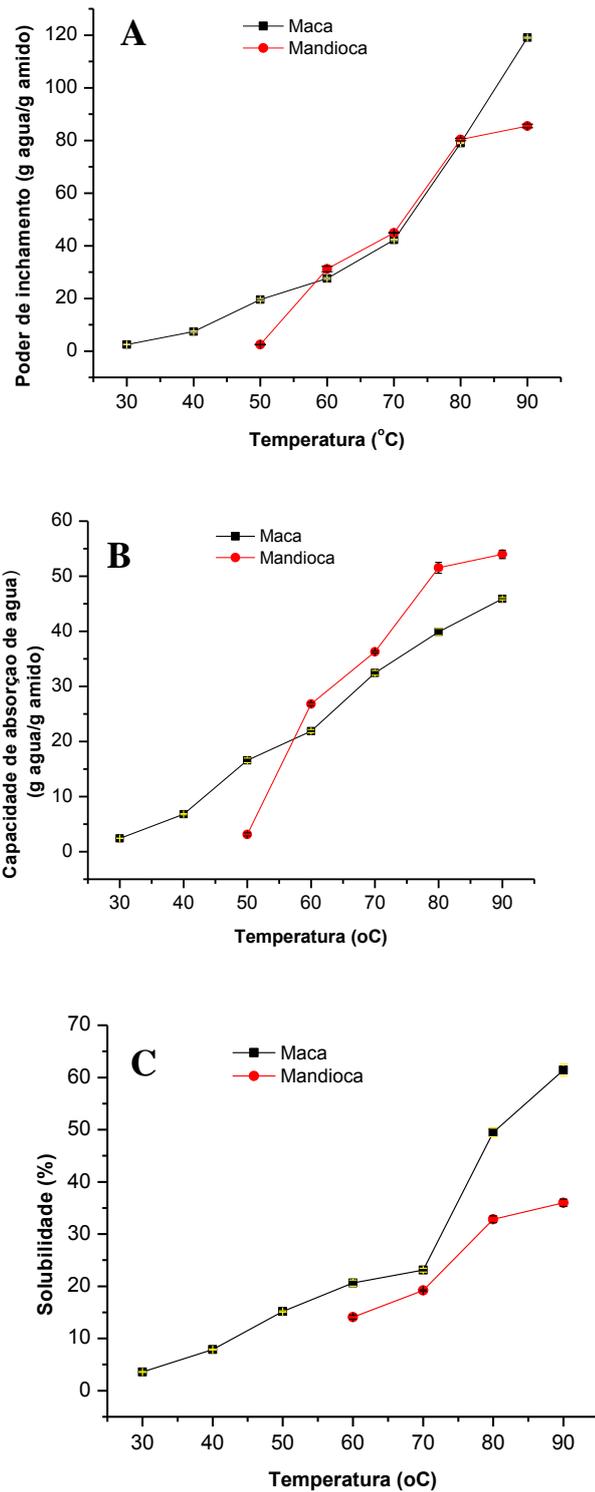


Figura 8 - Hidratação comparativa dos amidos de maca e mandioca em função da temperatura. A: Poder de intumescimento; B. Capacidade de absorção de água; C: % de Solubilidade.

1.4.3 Turbidez

As suspensões de amido de maca gelatinizadas apresentaram relativa estabilidade durante o armazenamento, mostrando uma pequena diminuição na absorbância após o primeiro dia (de 0,51 a 0,49) com um pequeno aumento após o segundo dia de armazenamento (Figura 9). Nessa figura também se observa que o amido de maca é mais estável que o amido de mandioca e semelhante, em comportamento, ao amido de mandioquinha. Dados de literatura mostram que em amidos de batatas a turbidez aumentou gradativamente durante os 5 primeiros dias de armazenamento a 4 °C, variando de 1,25 a 1,85 do 1º ao 5º dia de armazenamento (KAUAR; SINGH; SODHI, 2002). SHANDU et al., (2007) observaram, em variedades de milho, um aumento progressivo na turbidez do gel de 1,6 a 2,2, durante o armazenamento entre 0 e 120 h.

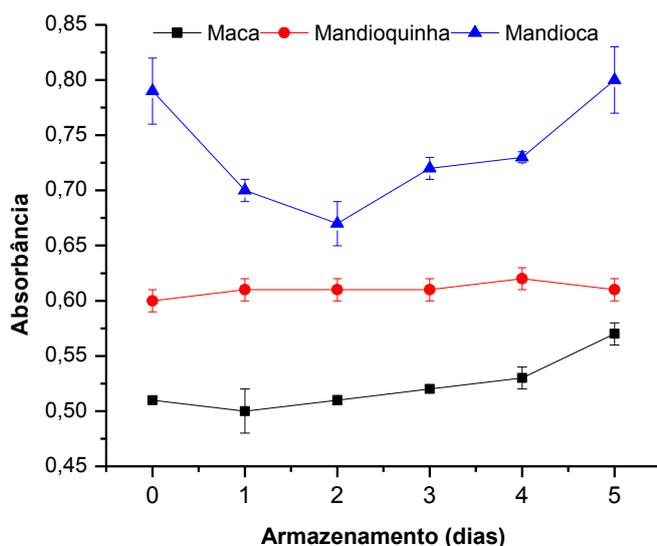


Figura 9 - Efeitos na turbidez no gel do amido de maca, mandioca e mandioquinha durante o armazenamento.

1.4.4 Estabilidade ao congelamento e refrigeração

A sinérese caracteriza a estabilidade do amido ao congelamento e à refrigeração conforme mostra a Figura 10. A pasta apresentou elevada estabilidade quando armazenada à temperatura ambiente e sob refrigeração (4°C), não apresentando sinérese. Entretanto, a pasta mostrou baixa estabilidade ao congelamento no período de armazenamento (-10°C) e com isso elevada sinérese (4,5%) quando comparada com o amido de mandioca e mandioquinha

(Figura 10). Elevados valores de amilose em amidos influenciam nas propriedades de gelatinização e de retrogradação. Amidos com alto teor de amilose, como batata (20,1 a 31,0%), milho (22,4 a 32,5%), taro (28,7 a 29,9%) e mandioca (18,6 a 23,6%), apresentam alta sinérese, através da grande quantidade de água expulsa durante o processo de retrogradação (GUNARATNE; HOOVER, 2002; SINGH et al., 2003). A baixa sinérese em pastas de amido é atribuída ao conteúdo baixo de amilose, mas também às possíveis ocorrências de agregação e cristalização da amilose durante as primeiras horas de armazenamento, enquanto na amilopectina adviria em estágios posteriores (MILES et al., 1985; SINGH et al., 2006).

A retrogradação da pasta é indiretamente influenciada pelo arranjo estrutural das cadeias do amido dentro das regiões amorfas e cristalinas do grânulo não gelatinizado, agindo na ruptura do grânulo durante a gelatinização e também nas interações que ocorrem dentro das cadeias do amido durante o armazenamento do gel (PERERA; HOOVER, 1999).

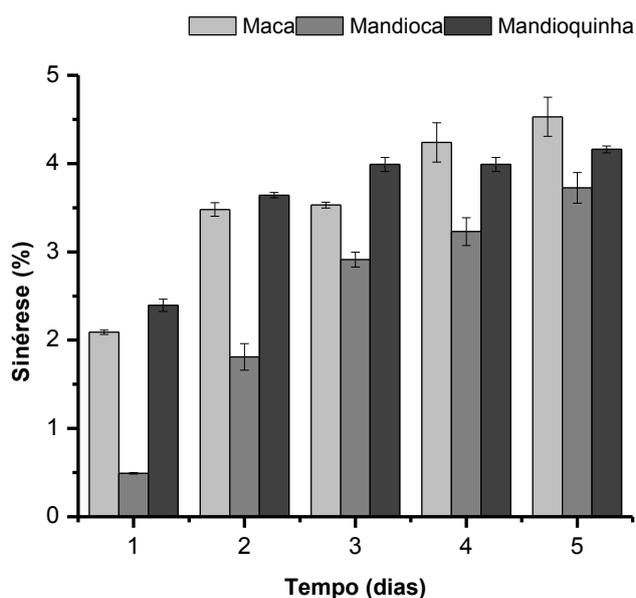


Figura 10 - Comparação das pastas de amido à estabilidade ao congelamento durante o período de armazenamento.

1.4.5 Calorimetria Diferencial de varredura (DSC)

A temperatura de gelatinização do amido de maca apresentou valor baixo (Figura 11 e Tabela 3), com uma temperatura inicial (T_0) de 45,7 °C, a temperatura do pico de

gelatinização (T_p) foi de 47,7 °C e a temperatura final (T_c) foi de 51,16 °C, sendo que a entalpia de gelatinização (ΔH_{gel}) calculada foi de 6,22 J/g. A Tabela 3 reproduz os pontos relevantes da Figura 11 para facilitar a discussão dos resultados.

A temperatura de gelatinização do amido de maca foi menor quando comparada com as temperaturas de gelatinização dos amidos de mandioca (61,54, 64,82 e 69,45 °C) e mandioquinha (59,54, 61,95 e 65,86 °C), amidos empregados como referência para a comparação dos dados (Tabela 3). Na literatura encontram-se dados de temperatura de gelatinização para diversos produtos, tais como: amido de milho (62,3, 66,3 e 72,9 °C) (BETANCURT-ANCONA et al., 2001), batata doce branca (66,7, 70,7, e 74,8 °C), batata (60, 69 e 80 °C) e mandioca (62,4, 69,3 e 84,1 °C) (PÉREZ; BREENE; BAHNASSEY, 1998; OSUNDAHUNSI et al., 2003). No amido de maca a baixa temperatura de gelatinização indica que o início da gelatinização requer menor energia ($\Delta H_{gel} = 6,22$ J/g) quando comparada com os amidos de mandioquinha e mandioca (10,5 e 9,8 J/g), respectivamente, e as mostradas por Betancurt-Ancona et al., (2001) para mandioca (9,6 J/g) e milho (10,3 J/g), bem como para batata doce branca (10,5 J/g) (OSUNDAHUNSI et al., 2003).

Li, Berke e Glover (1994) reportaram ΔH_{gel} na faixa de 8,2 a 12,3 J/g para diferentes amidos de milho tropical, e explicaram que a variação da energia de gelatinização poderia apresentar diferenças entre as forças de ligação da dupla hélice que forma a cristalografia da amilopectina, o qual resultou em diferente alinhamento das ligações de pontes de hidrogênio dentro das moléculas de amido (SANDHU et al., 2007).

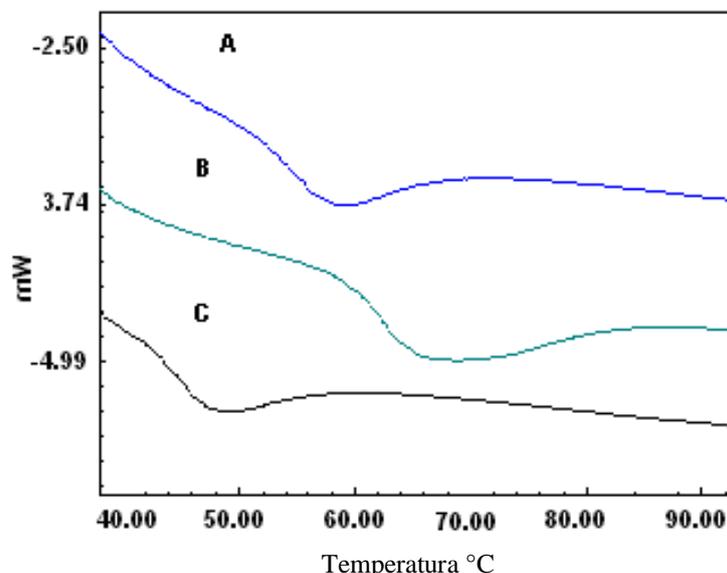


Figura 11- DSC Endotermas de gelatinização de diferentes amidos: (A) mandioquinha; (B) mandioca e (C) maca.

Tabela 3: Propriedades de gelatinização de amidos de maca, mandioca e mandioquinha.

Variedade	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	ΔH _{gel} (J/g)
Cassava	61,54	64,82	69,45	9,85
Maca	45,7	47,7	51,16	6,22
Mandioquinha	59,54	61,95	65,86	10,48

To: temperatura inicial;

Tp: temperatura do pico de gelatinização;

Tc: temperatura final; ΔH: entalpia de gelatinização

1.4.6 Propriedades da pasta

As propriedades da pasta são influenciadas por vários fatores, tais como o tamanho do grânulo, a relação entre amilose/amilopectina, características moleculares do amido e as condições do processo térmico empregado para induzir a gelatinização (ZHOU et al., 1998).

A Figura 12 e a Tabela 4 mostram o comportamento reológico do amido de maca e amido de mandioquinha medido em Viscoamilografo Brabender. O gráfico fornece informações sobre as características da viscosidade da pasta durante o aquecimento e resfriamento, tais como a temperatura na qual o amido começa a formar pasta, a estabilidade da viscosidade durante o período de agitação a temperatura constante e como ele se comporta durante o resfriamento. Nesta figura observa-se que o perfil do amido de maca apresenta semelhança ao de mandioquinha (Figura 12). Durante o aquecimento de 25 a 95°C (durante 40 min.) o amido de maca começou a gelatinizar aos 46 °C apresentando uma viscosidade de 100 UB e o pico máximo de gelatinização foi a 47,5 °C com uma viscosidade máxima de 1260 UB. Ao atingir os 95°C a viscosidade foi de 780 UB e após 20 minutos de aquecimento nesta mesma temperatura a viscosidade da pasta diminuiu para 410 UB, durante o resfriamento até 50 °C a viscosidade da pasta aumento para 850 UB (Figura 12).

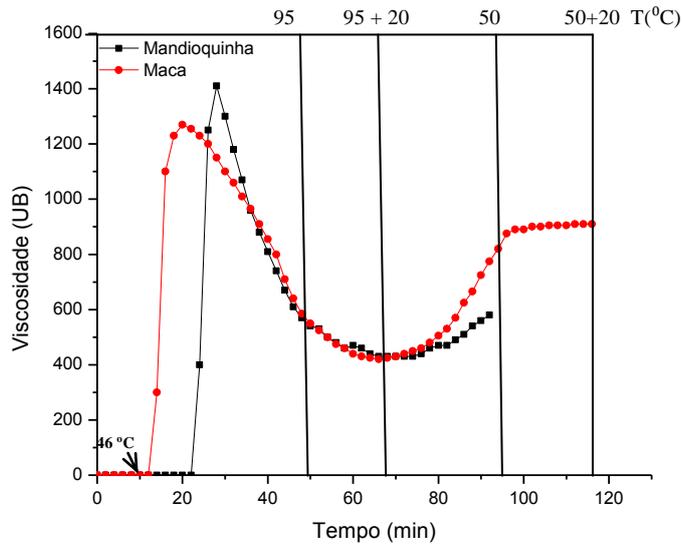


Figura 12 - Viscoamilograma de amido de maca e mandioquinha.

A Tabela 4 mostra a análise do viscoamilograma (Figura 12). Observa-se que a temperatura do pico de viscosidade ($47,5^{\circ}\text{C}$) é semelhante à temperatura do pico de gelatinização ($47,7^{\circ}\text{C}$) a qual foi analisada no DSC. Amidos com baixas temperaturas de empastamento estariam relacionadas com um menor grau de associação nas zonas amorfas dos grânulos e conseqüentemente uma menor resistência do grânulo ao intumescimento. Após atingir a viscosidade máxima a ruptura (*breakdown*) da pasta foi de 850 UB o que poderia indicar uma pequena resistência durante o aquecimento ($95^{\circ}\text{C} + 20$ minutos), o amido de mandioquinha apresentou o mesmo perfil em relação à ruptura. Amidos de makal (-8 BU), mandioca (306 UB) e milho (22 UB) (BETANCOUR-ANCONA et al., 2007) apresentaram maior resistência ao aquecimento. A consistência da pasta do amido de maca teve valor negativo (-410 UB), porém maiores que o da mandioquinha (-820 UB). Estes dados são muito baixos quando comparados com os amidos de makal, mandioca e milho (180, 75 e 282 UB, respectivamente) (BETANCUR-ANCONA, 2001, TORRUCO-UCO, 2007). O valor de *setback* do amido de maca foi de 440 UB, o qual é considerado elevado quando comprado com os amidos de mandioca, makal e milho (-231, 172 e 304 UB, respectivamente) (BETANCUR-ANCONA, 2001).

Valores baixos de consistência e *setback* aumentam a estabilidade da pasta em processos mecânicos e abaixam a tendência na retrogradação durante o resfriamento, sendo o caso de amidos com alto poder de intumescimento e conseqüentemente de elevada viscosidade, como os amidos de batata, mandioca e os cerosos (OSUNDAHUNSI et al.,

2003). Os grânulos desses amidos incham muito quando cozidos em água e as forças ficam frágeis frente à agitação mecânica tendo como consequência a instabilidade ao cozimento (SANDHU et al., 2007). Por outro lado, amidos ricos em amilose apresentam grânulos com intumescimento limitado devido à rigidez interna das moléculas lineares fortemente associadas e os grânulos desses amidos não incham o suficiente para formar pastas viscosas quando cozidos em água sob condições normais (SANDHU et al., 2007).

Tabela 4: Propriedades da pasta de amidos de maca e mandioca

Parâmetros	Amido	
	Maca	Mandioca
Pico de viscosidade (UB)	1260	1400
Viscosidade a 95 °C (UB)	780	610
Temperatura do pico de viscosidade (°C)	47,5	62
Viscosidade a 95 °C por 20 minutos (UB)	410	470
Viscosidade a 50 °C (UB)	850	580
Breakdown (UB)	850	930
Consistência (UB)	- 410	-820
Setback (UB)	440	110

BU: Unidades Brabender.

^a Ruptura: pico de viscosidade (BU) – viscosidade a 95 °C por 20 min (UB)

^b Consistência: Viscosidade a 50°C (UB) – pico de viscosidade (UB)

^c setback: viscosidade a 50°C (UB) – viscosidade a 95°C por 20 min (UB)

1.4.7 Propriedades de Textura do gel de amido.

As propriedades de textura do gel de maca e dos amidos empregados como referência (mandioca e mandioca) foram determinadas por um analisador de textura e estão mostradas na Tabela 5 e Figura 13. O perfil de textura do gel de amido de maca apresentou elevada fraturabilidade (2,2 N) e dureza (4,1 N) e valores menores de adesividade e coesividade quando comparado com os amidos de mandioca e mandioca (Tabela 5). A firmeza do gel é principalmente causada pela retrogradação do gel de amido, a qual esta associada à sinérese da perda da água e cristalização da amilopectina, amidos com elevada viscosidade de pasta resultam em géis com elevada dureza e fraturabilidade (MILES et al.,

1985). Géis de amidos que apresentam elevada dureza tendem a ter elevado conteúdo de amilose e longas cadeias de amilopectina (MUA; JACKSON, 1997). Numa variedade de amido de batata, Sandhu et al., (2007) encontraram elevada fraturabilidade e dureza, atribuindo esta propriedade à presença do elevado percentual de grânulos largos e baixo conteúdo de amilose.

Tabela 5 - Propriedades de textura de amido de maca, mandioca e mandioquinha.

Amido	Fraturabilidade (N)	Dureza (N)	Adesividade (Ns)	Coesividade	Gomosidade (N)	Elasticidade (s)	Mastigabilidade (Ns)
Maca	2,231	4,126	0,7925	0,506	2,085	0,912	1,901
Mandioquinha	1,760	0,879	1,986	0,582	0,947	0,850	0,805
Mandioca	1,077	1,096	0,910	1,037	0,627	0,815	0,511

N: Newton; Ns: N/segundo

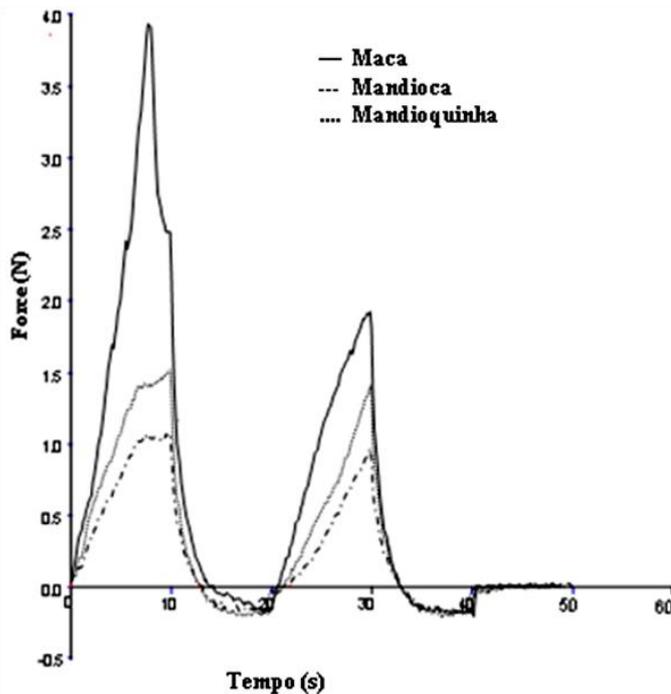


Figura 13- Perfil de análise de textura (TPA): (A) maca; (B) mandioca; (C) Mandioquinha

1.4.8 Microscopia eletrônica de varredura.

A morfologia e a distribuição dos grânulos de amido da raiz de maca estão mostradas na Figura 14. Os grânulos apresentaram diversas formas e diversos tamanhos entre eles morfologia circular, oval e irregular com uma distribuição de grânulos entre 11,9 μm de comprimento e 4,2 μm de diâmetro, com grânulos pequenos de 7,4 μm de comprimento e 5,3 μm de diâmetro e grânulos grandes de 14,9 μm de comprimento e 9,3 de diâmetro. Esta morfologia observada apresentou semelhança com o amido do biri (*Canna edulis*) e oca (*Oxalis tuberosa*), também conhecidas como raízes andinas, com tamanhos entre 35 e 101 μm e 22 e 55 μm , respectivamente (SANTACRUZ et al., 2002). Em nosso laboratório Valcarcel-Yamani (2010) está estudando tres variedades de tuberculos andinos, nos quais observou para oca (*Oxalis tuberosa*) morfologia elipsoide e oval com uma distribuição de grânulos entre 7,8 a a 53,7 μm de comprimento e diâmetros de 6,8 a 19,3 μm ; para o olluco (*Ullucus tuberosus*) os grânulos mostraram-se simétricos e irregulares, com tamanhos entre 6,2 a 31.1 μm de comprimento e 5,5 a 22,7 μm de diametro; finalmente para o amido de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) a morfologia foi tanto esférica quanto oval truncada, com distribuição de tamanho variando de 4,4 a 15,5 μm de comprimento e 4,1 a 13,7 μm de diâmetro (dados não publicados).

Alguns autores têm demonstrado a influência da variação da temperatura no cultivo de batata doce, trigo e milho, com relação ao tamanho do grânulo de amido e observaram a diminuição no tamanho e conseqüentemente mudanças nas propriedades físico-químicas dos grânulos de amido (SHI et al., 1994; LU et al., 1996; NODA; KOBAYAS; SUDA, 2001). Com relação ao amido de maca provavelmente as baixas temperaturas do cultivo da raiz poderia influenciar na morfologia e no tamanho dos grânulos de amido, já que durante o desenvolvimento do hipocótilo as temperaturas oscilam entre 7 a -10°C . No entanto, não há registros do cultivo deste produto em outras condições ambientais, nem estudos referentes às propriedades do amido de maca, fato que não permite confirmar essa hipótese.

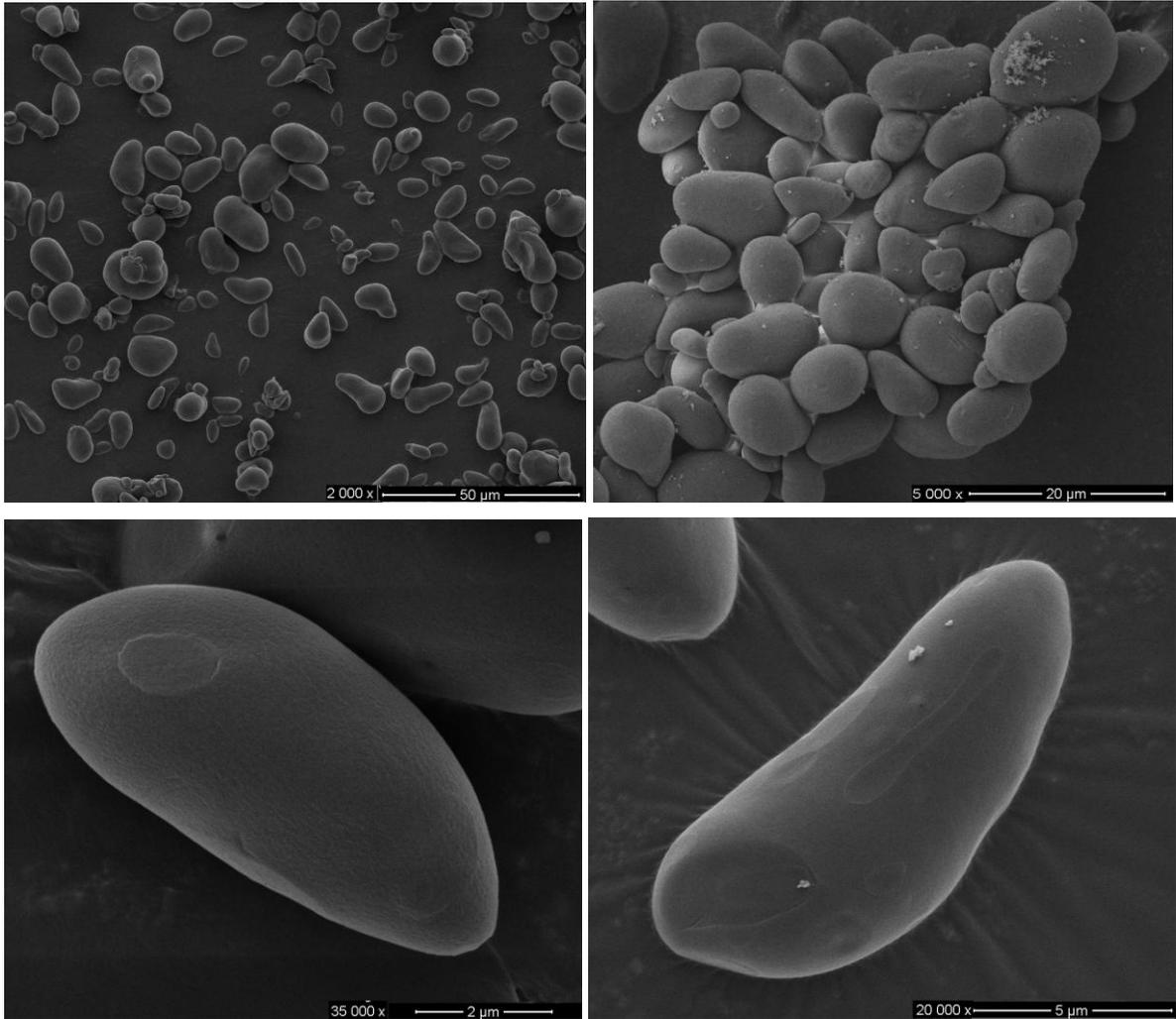


Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura do amido de maca.

A microscopia eletrônica de varredura da raiz liofilizada (Figura 15) mostra a distribuição dos grânulos no interior da raiz com uma estrutura porosa, o que indicaria a perda da água. Também se observa a zona medular formada por células parenquimatosas de reserva na qual se vêem restos de amiloplastos envolvendo os grânulos de amido. As micrografias mostram a presença de grãos com diversos tamanhos e morfologia semelhante com os observados do amido isolado da raiz de maca, este dado também indica que o método de extração empregado foi o adequado, visto que durante o processo de extração não se mostrou degradação ou quebra do amido, mantendo íntegros os grânulos e sem a presença de resíduos celulares, como são mostrados na Figura 14.

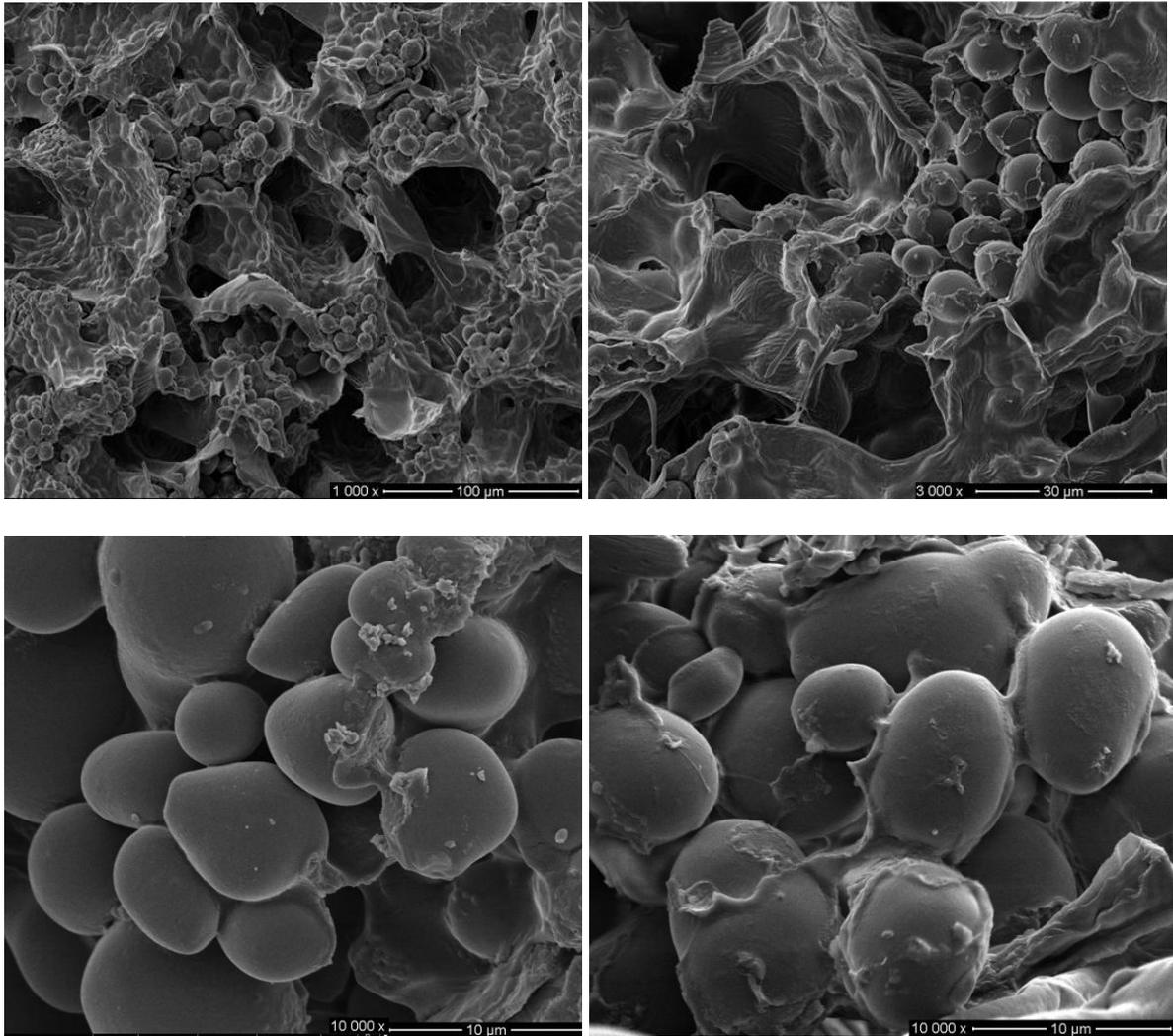


Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura da raiz de maca liofilizada.

1.5 CONCLUSÕES

- O amido isolado de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) mostrou-se íntegro e isento de fragmentos e restos celulares.
- As propriedades físico-químicas do amido de maca sugerem o uso deste produto como ingrediente para alimentos e outras aplicações industriais que requeiram processamentos a baixas temperaturas e dispensem o congelamento.
- A elevada firmeza e a estabilidade do gel durante a refrigeração são propriedades que demonstram o potencial de emprego do amido de maca como espessante, estabilizante e agente gelificante em alimentos refrigerados, mas seriam inadequados em alimentos congelados devido à sinérese após a retrogradação.

2 CAPITULO 2

PARÂMETROS ENZIMÁTICOS DURANTE O ARMAZENAMENTO DAS RAIZES DE MACA (*Lepidium meyenii* WALP.)

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Tuberosas amiláceas da America do Sul

A America do Sul é uma região que apresenta uma grande diversidade de raízes e tubérculos fontes de amido, estando alguns deles em fase de investigação científica devido à grande aceitação regional. A alta perecibilidade de algumas amiláceas no período pós-colheita envolve reações enzimáticas, oxidativas e microbiológicas. Embora alguns aspectos relacionados à deterioração pós-colheita já estejam bem estabelecidos, como a perda de matéria fresca e a deterioração provocada por microorganismos, os mecanismos de degradação não são suficientemente conhecidos para algumas raízes e tubérculos. Frente a este fato as pesquisas têm mostrando um interesse cada vez maior em torno a novas matérias primas amiláceas ricas em amido nos últimos anos. Neste ponto, os países em regiões tropicais, como o Brasil apresentam grande vantagem em relação aos principais produtores de amido no mundo, que estão localizados em regiões temperadas devido à variedade de culturas tropicais amiláceas. Dentre as amiláceas tropicais merecem destaque a mandioca, a araruta (*Maranta arundinacea*), a mandioquinha salsa e a batata doce, visto o interesse do mercado consumidor, principalmente para uso desses amidos em panificação e na fabricação de alimentos infantis.

A mandioquinha salsa, originária dos Andes é cultivada no Brasil nas regiões Sudeste e Sul. Durante seu armazenamento, a mandioquinha apresenta pontos de amolecimento gradual do tecido que poderiam ser resultantes de degradação microbiana ou pela ação de enzimas endógenas. Em nosso laboratório Pires e Finardi-Filho (2005), estudaram as alterações na

atividade de enzimas amilolíticas, pectinolíticas e celulásicas da mandioquinha-salsa durante o período pós-colheita, sob diferentes condições de armazenamento.

Simone-Pascual (2005) estudou as alterações pós-colheita em raízes de mandioca da variedade Zolhudinha catalogada pela EMBRAPA como IM-158, provenientes da região amazônica, que se destaca pela alta atividade amilolítica. A autora mostrou que houve um pequeno aumento na atividade amilolítica durante o período de armazenamento (11 dias) e conseqüentemente incrementou a concentração de açúcares totais, a qual poderia ser resultado da hidrólise do amido. Nesse estudo também foram identificadas duas isoformas de α -amilase, com alta atividade e resistência térmica.

A maca é uma amilácea cultivada na região dos Andes para o consumo direto e exportação no mercado Europeu e Asiático. Estudos referentes a esta raiz com relação a mecanismos de degradação de carboidratos não são bem conhecidos, bem como, estudos referentes ao comportamento da raiz durante o armazenamento. Sanabria, Pires e Finardi-Filho (2005) determinaram as melhores condições de pH para extração de amilases, pectinesterase (PE) e poligalacturonase (PG), bem como, temperatura e pH para a máxima atividade enzimática. Sendo que o melhor pH para a extração de amilases foi a pH 6,0 e a máxima atividade amilásica foi a pH 6,0 e a temperatura 30°C. Para a PE a maior atividade foi observada a pH 6,6 e a e 49,4 °C, quando a enzima foi extraída em pH 8,5. A PG apresentou maior atividade a pH 5,4 a uma temperatura de e 46 °C, extraída em pH 6,0. Também foi observada uma elevada atividade de β -amilase quando comparada com a α -amilase, no extrato amilásico. Estes dados sugerem novos estudos com foco em mecanismos de degradação de carboidratos e monitoramento da atividade enzimática durante o período de armazenamento ou durante o período de brotamento.

Outras duas amiláceas tropicais de origem andina são o biri (*Canna edulis*) e o ahipa (*Pachyrhizus ahipa*) são fonte de amido que são extraídos de forma artesanal. O biri é uma planta perene que alcança de 1 a 2 m de altura e é cultivada no Brasil apenas como planta ornamental, o seu amido é de fácil extração, pois seus grânulos são grandes (35 a 101 μ m). Já o ahipa é uma leguminosa originaria da America do Sul e pode ser considerada uma matéria prima amilácea muito interessante devido ao rápido desenvolvimento da planta, com colheita em 5 meses, considerável adaptabilidade a variações climáticas e elevado teor de amido, cerca de 45-55% base seca, o qual apresenta 95 a 99 % de amilopectina (LEONEL; CEREDA, 2002).

Algumas culturas amilásicas apresentam uma característica interessante, como a possibilidade de longo período de armazenamento sem mostrar degradação. Esta propriedade

é denominada de dormência e de muita importância para o consumo alimentar, pois determina o tempo que os tubérculos podem ser transportados, distribuídos e armazenados. Uma vez que a dormência é quebrada o brotamento se inicia, alterando suas características e tornando-se inadequado para o consumo. No entanto, a quebra de dormência é uma etapa essencial para a reprodução do vegetal. O período de dormência é uma parada no desenvolvimento de brotos, sementes, embriões sobre condições desfavoráveis de crescimento, podendo ocorrer em qualquer fase do ciclo de vida da planta inteira, ou de determinados órgãos, no qual o crescimento é temporariamente suspenso. Os mecanismos de dormência e alterações metabólicas durante o período de dormência e brotamento são pouco conhecidos (HARIPRAKASH; NAMBISAN, 1996; BARKER; KEATINGE; ASIEDU, 1999; ABDUL et al, 2007).

O inhame é uma tuberosa recentemente estudada devido ao efeito de dormência que apresenta sobre a composição, aparência e propriedades fisiológicas. As investigações sobre as alterações bioquímicas no armazenamento têm mostrado que as mudanças no conteúdo de amido, açúcares e proteína ocorrem durante o armazenamento muito prolongado (70 a 90 dias). A diminuição do conteúdo de amido foi muito significativa durante o brotamento, uma diminuição média foi observada após 90 dias de armazenamento. A hidrólise do amido reflete-se no aumento de açúcares redutores e não redutores, observado durante diferentes fases de dormência e brotação. O aparecimento de maltose após o brotamento indicaria a presença de uma amilase envolvida na degradação de amido, explicando a alta atividade de β -amilase no tubérculo em todos os estágios estudados (KEATINGE; ASIEDU, 1999; ABDUL et al, 2007).

Para ter uma melhor compreensão do mecanismo de degradação de carboidratos durante a dormência e brotação de tubérculos, seria necessário monitorar a atividade destas enzimas sobre o metabolismo de carboidratos durante este período, devendo ser investigado o papel destes mecanismos endógenos que desencadeiam alterações metabólicas nos tubérculos durante a dormência.

2.1.2 Amilases

As enzimas amilolíticas são proteínas que constituem uma classe de hidrolases, responsáveis pela degradação do amido e seus derivados. Estas enzimas são a α -amilase,

considerada uma endoamilase, a β -amilase, uma exoamilases, e as glucoamilases, ou amiloglicosidase. As duas últimas produzem glicose a partir do amido, a β -amilase produz maltose e a α -amilase dá origem à formação de dextrinas. Também dentro destas enzimas encontram-se as enzimas desramificadoras, as quais atacam as ligações α -(1,6) do pululano conhecidas como pululanases e as isoamilases atuando na amilopectina e glicogênio. Este grupo de enzimas tem grande importância biotecnológica com aplicações em alimentos, fermentação, indústria têxtil e de papel (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005).

As amilases são classificadas como endoamilase ou exoamilases segundo seu ponto de atuação; encontram-se amplamente distribuídas na natureza e são obtidas de diversas fontes, tais como plantas, animais e microorganismos. A Figura 16 mostra uma representação da atuação destas enzimas sobre seu substrato natural, o amido.

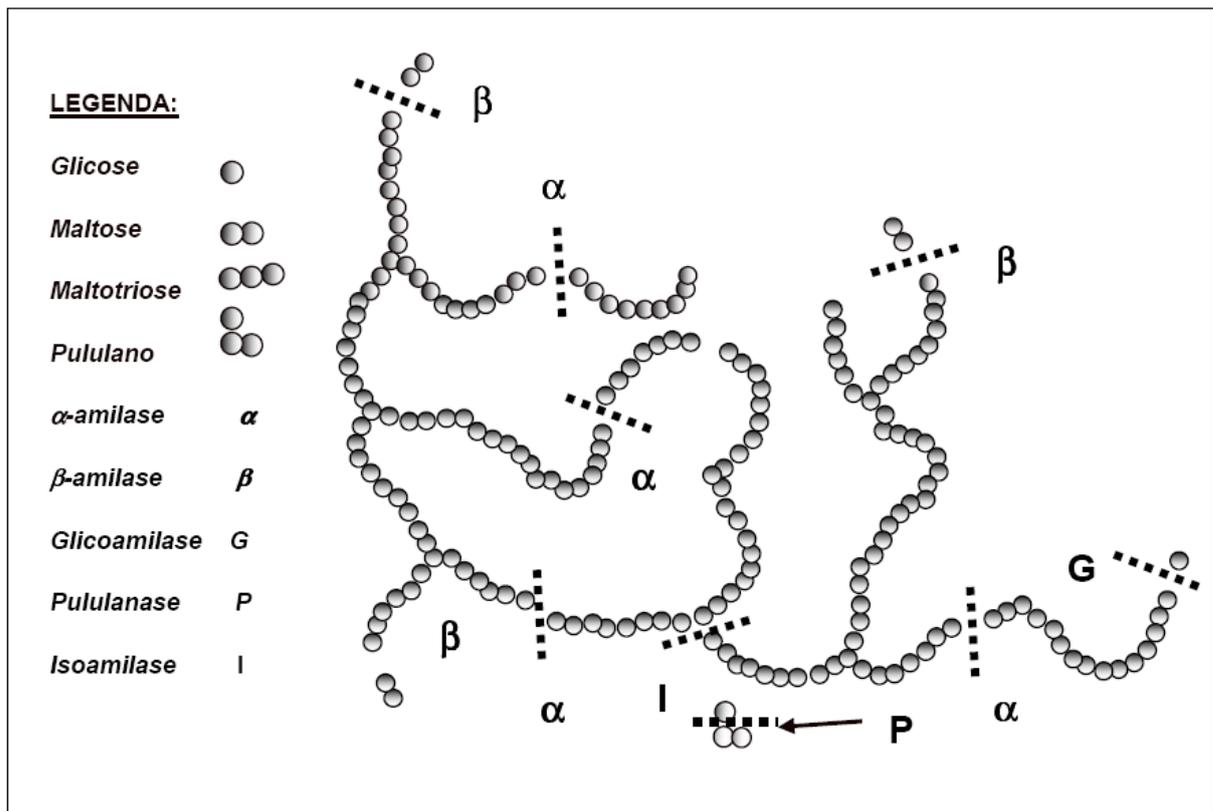


Figura 16 – Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas α -amilase, β -amilase, glucoamilase, isoamilase e pululanase.

2.1.3 α – Amilase

Segundo Pandey et al (2005) a α -amilase é uma endoamilase (α -1,4-D-glucan-glicano-hidrolase, E.C.3.2.1.1) que atua hidrolisando aleatoriamente as ligações α -1,4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose, com a formação de uma mistura de oligossacarídeos, unidades de glicose, maltose e dextrinas. O ataque ocorre de forma não seletiva sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose.

A α -amilase atua isolada ou simultaneamente com outras enzimas amilolíticas, apresentando importantes aplicações em diversos campos, como na indústria de alimentos, bebidas e na obtenção de produtos têxteis e farmacêuticos. As α -amilases endógenas de emprego industrial estão contidas em sementes de cereais e são utilizadas na indústria de panificação e cervejarias, enquanto às de origem microbiana são empregadas em processos onde é necessária a sacarificação e a liquefação do amido.

As α -amilases de cereais cumprem um papel importante durante a germinação, por converterem o amido do endosperma da semente em nutrientes para o crescimento. Sua ação é regulada por meio da expressão gênica em termos de transcrição, por ação positiva do ácido giberélico (AG) e por ação negativa pelo ácido abscísico (ABA) (KARRER et al., 1991; MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005).

O massa molecular da maioria das α -amilases varia de 10 a 210 kDa, dependendo da sua origem. As α -amilases microbianas apresentam massa molecular entre 50 a 60 kDa, sendo que as α -amilases bacterianas apresentam variação de 28 a 78 kDa e as α -amilases fúngicas 41 a 69 kDa, nas quais cada molécula contem pelo menos um íon cálcio (Ca^{+2}) (PANDEY et al, 2005). Os efeitos de pH e temperatura são fatores que influenciam diretamente os parâmetros de atividade ótima, estabilidade enzimática e a eficiência catalítica. As α -amilases de plantas superiores e de mamíferos, geralmente, são estáveis entre pHs 5,5 e 8,0 (THOMA et al., 1971), enquanto as α -amilases de cereais geralmente tem atividade ótima entre pHs 4,5 e 5,5. O pH é um fator importante na estabilidade de enzimas. As α -amilases sofrem inativação irreversível em pHs extremos (NIRMALA; MURALIKRISHNA, 2003). O pH ótimo para a atividade de α -amilase em batata (*Solanum tuberosum* L.) foi determinado entre 7,2 e 8,0, diferente da maioria das α -amilases de outras fontes vegetais, que situam-se em torno de 6,0 (WITT ; SAUTER, 1996).

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes na hidrólise enzimática. A temperatura ótima para atividade de α -amilases em cereais está entre 40 e 55°C (NIRMALA; MURALIKRISHNA, 2005). Geralmente, as α -amilases são mais termoestáveis quando comparadas com as β -amilases; além disso, as α -amilases, que contêm uma molécula de cálcio na sua estrutura, são menos sensíveis a altas temperaturas quando comparadas a β -amilases, enzimas que não necessitam de íons estabilizadores. Altas concentrações de cálcio geralmente retardam a inativação térmica a 50°C, principalmente para α -amilase de cereais (THOMA et al., 1971). No entanto, a maioria das α -amilases é inibida por íons metálicos como Fe^{3+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} e Zn^{2+} (MAMO; GESSESSE, 1999).

2.1.4 β – Amilase

A β -amilase (α -1,4-D-glucan maltohidrolase, E.C.3.2.1.2) possui atividade exoamilolítica, hidrolisando somente a penúltima ligação glicosídicas α -1,4 de polissacarídeos a partir da extremidade não redutora sobre a penúltima ligação oxido, separando duas unidades de glicose na forma de β -maltose e β -dextrina limite, por uma inversão no carbono anomérico de α para β . Essa mudança conformacional é a razão pela qual a enzima recebe a denominação de β -amilase (TODAKA; KANEKATSU, 2007).

A β -amilase se encontra presente somente em plantas superiores e são abundantemente encontradas em trigo, soja, batata doce e algumas culturas de microorganismos, não estando presentes em animais. (BEMMILLER; WHISTLER, 1996; KOHNO et al., 1989; ZIEGLER, 1999). Vikso et al. (1997) encontraram níveis maiores de α -amilase, β -amilase e α -glicosidase em extratos brutos de tubérculos de batata em relação às folhas, as quais só apresentavam atividade β -amilásica. Em alguns vegetais, a β -amilase está sempre relacionada à degradação do amido de reserva, podendo representar uma proteína de reserva. Em alfafa, a β -amilase, é hidrolisada para fornecer nitrogênio aos aminoácidos necessários ao brotamento, sendo que na desfolha diminui a atividade da nitrogenase, assim como a absorção do nitrogênio do solo (GANA et al., 1998).

Estudos genéticos em batata e *Arabidopsis* mostraram que a β -amilase desempenha um papel importante na degradação do amido transitório em órgãos fotossintéticos. Em *Arabidopsis* há pelo menos nove genes que codificam as isoenzimas da β -amilase,

distribuídas entre o citossol, o cloroplasto e ainda no vacúolo da célula. Recentemente foi reportado que os mecanismos de regulação e expressão da β -amilase respondem a vários fatores como resposta a estresses ambientais, tais como estresse de pressão e temperatura e de teor de açúcares. Estes mecanismos parecem ser uma resposta geral para muitas espécies de plantas (TODAKA; KANEKATSU, 2007; KAPLAN; SUNG; GUY, 2006).

A indústria de amido utiliza a β -amilase microbiana ou vegetal na produção de xaropes com alta concentração de maltose, empregados regularmente na fabricação de bebidas, para conferir ao produto maior viscosidade, e resistência ao escurecimento (ZIEGLER, 1999).

Em geral, as β -amilases possuem maior massa molecular em relação as α -amilases, podendo chegar até 152 kDa, ou ainda no caso da batata doce que conta com um tetrâmero de 215 kDa. As β -amilases microbianas encontradas no gênero *Bacillus* variam de 35 a 59 kDa, sendo muito menores do que as de plantas (ZIEGLER, 1999).

O pH ótimo para atividade de β -amilases situa-se, geralmente, entre 4,0 e 6,0, apresentando estabilidade na faixa de pH entre 4,0 e 9,0 a 20°C, durante um período de 24 horas. Em relação aos pHs mais ácidos, as β -amilases provenientes de grãos, como a soja e a ervilha, apresentam maior estabilidade, quando comparadas com enzimas provenientes de outras fontes, como o trigo e a cevada. O pH ótimo para o trigo, o malte e a batata-doce varia entre 5,0 e 6,0 (THOMA et al., 1971; MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005).

2.1.5 Glicosidases e enzimas desramificadoras

As α -glicosidases (E.C.3.2.1.10) são enzimas que atuam sobre a maltose liberada pela β -amilase produzindo moléculas de glicose e, além dela, outras formas de glicosidases podem atuar sobre os glucanos maiores como amido e amilopectina. Estas enzimas têm capacidade de degradar tanto ligações α -(1,4) como α -(1,6). No entanto, as ligações α -(1,6) são rompidas a uma velocidade muito menor, não descartando a possibilidade que estas moléculas possam degradar o amido completamente, produzindo glicose, e não apenas sobre produtos de degradação de outras enzimas. Na prática, entretanto, isso só ocorre em incubações por longos períodos, provavelmente devido às irregularidades da molécula de amilose (MC KNIGHT; MAZZIEIRO, 2000).

Em geral, entre 4 e 5% das ligações em amilopectina são α -(1,6) nos pontos de ramificação, a atuação de uma enzima desramificadora é essencial para a completa hidrólise do amido. Estas enzimas atuam sob as ligações glicosídicas α -(1,6) de oligossacarídeos ramificados e dextrina limites, produzidos pela ação das demais enzimas que degradam o amido. Foram divididas em dois tipos: uma denominada pululanases (E.C.3.2.1.142) encontrada em microorganismos, ou dextrinase limite (E.C.3.1.2.41) localizadas nos cloroplastos de plantas, e a outra, isoamilase (E.C.3.2.1.68). As pululanases quebram as ligações α -(1,6) do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -(1,6) e que não podem ser degradados por α ou β amilase (ANTO et al., 2006). A isoamilase é desramificadora que ataca as ligações α -(1,6) da amilopectina e glicogênio, requerendo no máximo três unidades de glicose na ramificação (ANTO et al., 2006; ZEEMAN et al., 2004).

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

- Estudar parâmetros enzimáticos durante o armazenamento nas raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walp.)

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar atividade das α e β amilases em extratos enzimáticos, empregando substratos específicos para estas enzimas;
- Determinar os teores de açúcares solúveis totais e amido total, nas raízes de maca durante o período inicial de armazenamento;
- Isolar o amido das raízes de maca e observar por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Material de trabalho

As amostras de maca foram coletadas no próprio lugar de plantio no estado de Junin-Peru a 4500 m de altitude e as análises foram realizadas num período de 16 dias, sendo os ensaios efetuados a cada dois dias, começando do segundo dia após a colheita. As amostras que não foram utilizadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C .

2.3.2 Reagentes

Todos os reagentes empregados foram adquiridos da Sigma Chemical Co. e Aldrich Chemical Co. Invitrogen e GE Technology Infrastructure Healthcare life Sciences.

2.3.3 Métodos

2.3.3.1 Extração enzimática

As raízes foram descascadas e cortadas em pequenos cubos de aproximadamente 3,0 mm de aresta. A 10 gramas de amostra foram adicionados 30 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0), e foi homogeneizado em triturador UltraTurrax, por aproximadamente 3 min. Após a trituração, o homogenato foi filtrado e centrifugado a 10.000 rpm/30 min/4 °C. O sobrenadante foi dialisado durante 12 h contra água destilada a uma temperatura de 4°C, e armazenado em microtubos de 1,5 mL a -20°C , para as análises posteriores, a solução final foi denominada de extrato enzimático ou extrato bruto. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.3.2 Determinação da atividade enzimática

Inicialmente, foi determinada a atividade amilolítica total nos extratos enzimáticos por meio da formação do complexo amido-iodo (STREET, 1974). Alíquotas de 50 μL de extrato bruto foram incubadas em 200 μL de uma solução de amido de batata 0,1%, 500 μL de tampão fosfato 0,05M (pH 6,0) e 200 μL de uma solução de HCl 0,01M. Após a incubação durante 15 min a 30 °C a reação foi interrompida pela adição de 400 μL de solução de iodo (I_2 10 mM e KI 14 mM). O volume de reação foi completado com água destilada até 10 mL e a leitura de absorbância foi feita a 578 nm em espectrofotômetro Micronal B582. Uma unidade de atividade amilolítica (1U) foi definida como a quantidade de amido, em nanogramas, hidrolisada por minuto por mL de extrato enzimático nas condições da reação.

Posteriormente, foram empregados substratos específicos para a detecção da atividade amilásica. Para a β -amilase foi realizada seguindo o método descrito por McCleary Codd (1989), utilizando-se o reagente Betamyl[®] que contém o *p*-nitrofenil-maltopentosídeo (PNPG5) como substrato. Na determinação da atividade α -amilásica empregou-se o método descrito por McCleary e Sheehan (1987), que utiliza o reagente Ceralpha[®] contendo como substrato *p*-nitrofenil-maltoheptosídeo bloqueado na extremidade não redutora (BPNPG7).

A reação de ambos os métodos ocorre na presença de α -glicosidase, que libera o *p*-nitrofenol, o qual desenvolve uma coloração amarela em meio alcalino, possibilitando a leitura em um comprimento de onda de 410 nm. Para a detecção da atividade enzimática, foram incubados 50 μL de extrato com 50 μL de substrato (Megazyme[®] ou Ceralpha[®]) e, após a incubação a 30°C por 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 750 μL de 1% (p/v) Trizma-base (pH > 10) e a absorbância medida a 410 nm. Para a quantificação da atividade enzimática, foi utilizada uma curva padrão de *p*-nitrofenol. Uma unidade de atividade enzimática (1U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mMol de *p*-nitrofenol por μg de proteína por min, nas condições da reação.

2.3.3.3 Determinação de açúcares totais

A extração dos açúcares totais foi realizada de acordo ao método descrito anteriormente no capítulo 1 (item 1.7.3.4). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.3.4 Determinação de amido total

O amido total foi determinado de acordo ao método descrito no capítulo anterior (item 1.7.3.2). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.3.5 Isolamento dos grânulos de amido e MEV

O isolamento dos grânulos de amido seguiu o método como descrito no item 1.7.3.1, para posteriormente serem observados por MEV segundo o método descrito no item 1.7.4.4. A extração foi realizada até o 16^o dia após a colheita como foi mencionado anteriormente e aos 22^o dia para conferir se houve degradação.

2.3.3.6 Determinação da concentração de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976), foi empregado o kit da Bio-Rad. A 30 μ L de extrato enzimático foi adicionado 970 μ L de água e 1,0 mL do reagente de Bio-Bradford, após 5 minutos de reação foi realizada a leitura a 595 nm, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

2.3.3.7 Eletroforese SDS-PAGE (desnaturante) e PAGE-nativo (não desnaturante)

A alteração do perfil protéico durante o armazenamento foi observada por eletroforese realizada em géis de poliacrilamida, sob condições não-desnaturantes e desnaturantes. As corridas em condições desnaturantes seguiram o método descrito por Laemmli (1970), utilizando-se tampão Tris/glicina (pH 8,8). O gel de concentração foi de 3,5% de poliacrilamida e de 15 % no gel de separação, contendo SDS 0,1 %. Em condições não-desnaturantes, as corridas foram realizadas em géis contendo 6,5% de poliacrilamida no mesmo tampão sem a adição de SDS (HAMES, 1990). A eletroforese ocorreu entre 120 a 180 V a 4 °C. Ao término de cada corrida, os géis foram revelados, com prata ou Coomassie Blue R-250 para a detecção de bandas protéicas. Para a atividade amilolítica o gel foi

incubado durante 3 horas em tampão fosfato pH 6,0 (0,1M) contendo 1 % de amido e posteriormente foi corado com iodo (I_2 10 mM e KI 14 mM), para a detecção de atividade amilolítica.

2.3.3.8 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados obtidos, inicialmente, todas as variáveis tiveram suas variâncias testadas por gráficos de dispersão e pelo teste de Hartley. Em seguida, análise de variância univariada foi realizada para os parâmetros enzimáticos, seguida do teste de Tukey, para comparação entre as médias. Um valor de significância menor que 0,05 foi considerado neste estudo. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc. South America, Tulsa, OK, USA).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Atividade enzimática, açúcares totais e amido total

A Figura 17 mostra os resultados obtidos do conteúdo de proteínas solúveis, atividade amilolítica total, atividade α e β amilásica, assim como o teor de amido e açúcares solúveis totais. A Figura 17A representa o perfil de atividade amilolítica total, na qual se observam algumas variações da atividade durante o período de armazenamento, dentro da mesma ordem de grandeza: no segundo dia de armazenamento a atividade foi de 12,23 U e no 16º dia foi de 12,49 U. Esta última representa a maior atividade, enquanto no 12º dia foi determinada a menor atividade com 11,52 U. Apesar das variações entre as medidas, os dados não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$). Na determinação de proteínas (Figura 17B) a máxima concentração foi de 1,11 mg/mL no 16º dia, e as menores concentrações foram de 0,9 mg/mL no 6º e 8º dia, também se observaram algumas variações nas concentrações de proteínas, mas estas variações não apresentaram diferenças significativas entre elas ($p \leq 0,05$).

O perfil de atividade para α e β amilase (Figura 17C e 17D) empregando substratos específicos não apresentaram diferenças significativas entre as atividades medidas, mesmo apresentando algumas variações entre os dados. Para a α -amilase a menor atividade foi no 4º dia de armazenamento com 5,3 U e a maior foi no segundo dia com 6,6 U. A β -amilase apresentou maior atividade no 4º dia de armazenamento e a menor no 2º dia.

A Figura 17E representa os dados da quantificação do amido total e a Figura 17F do teor de açúcares solúveis. A concentração de amido apresentou algumas variações durante o monitoramento, sendo que no 2º e 12º dia apresentaram a maior concentração de amido com um teor de 40%, no 14º e 16º dia apresentaram a menor concentração com 37 % de amido. Estes dados não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no teor de amido durante o armazenamento. A concentração de açúcares solúveis também não apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) durante as análises, sendo que a menor concentração foi observada no 8º dia 16,1% e a maior no 6º dia com 17,59%.

Todo este conjunto de dados, atividade amilolítica, atividade α e β amilásica, amido total e açúcares solúveis, observados durante o armazenamento, poderia explicar o porquê de

as raízes de maca se conservam durante um período prolongado até ficarem secas, quando armazenadas a temperatura ambiente.

As alterações nos teores de amido e açúcares, durante o armazenamento é uma característica comum em diversos vegetais, devido a hidrólise do amido com a liberação de açúcares, pela ação de enzimas ou por microorganismos oportunistas que degradam o vegetal. A maca é uma raiz capaz de resistir ao ataque enzimático, não apresentando degradação do amido durante o período de armazenamento, porém a perda de água também é rápida.

Comparando com outras raízes e tubérculos, foi observado que raízes de inhame e batata doce são resistentes ao ataque enzimático (IKEDIABI; OTI, 1983). O inhame pode ser armazenado a temperaturas entre 20 e 28^oC por 29 semanas e, durante o período de armazenamento, foi observada uma baixa atividade enzimática nas primeiras nove semanas, que aumentou rapidamente em seguida, quando o teor de amido foi reduzido gradativamente. Assim como o inhame, a batata doce também é uma cultura resistente, quando armazenada a 20^oC, com umidade relativa controlada (75%) podendo ser estocada por 3 meses. Os autores sugerem que a baixa atividade do tubérculo neste período inicial decorreu do estado de dormência, o que poderá responder pelo longo período de vida de prateleira do tubérculo.

O período de dormência depende da própria cultivar, das condições climáticas durante o desenvolvimento da cultura, do grau de maturação dos tubérculos, de injúrias mecânicas, de doenças e danos causados por insetos nos tubérculos (SILVA et al., 2004; PANNEERSELVAM et al., 2007). Varias são as técnicas empregadas para a quebra do estado de dormência como, por exemplo, corte dos tubérculos, choques térmicos, abafamentos e uso de substâncias químicas. No período analisado, a raiz de maca poderia estar em estado de dormência ou repouso. Este mecanismo poderia ser visto como uma defesa natural da espécie, uma vez que é governada por fatores específicos que regulam ou paralisam o desenvolvimento dos órgãos até que as condições de reprodução da planta sejam favoráveis. A maca é uma raiz bienal, apresentando uma fase vegetativa com o crescimento e a expansão do órgão de reserva e uma fase reprodutiva, caracterizada pela produção de flores e frutos, sem dúvida quando as condições climáticas são favoráveis, como ausência de geadas e abundante umidade, a maca pode completar o seu ciclo de cultivo em um ano (QUIROZ; ALIAGA, 1997).

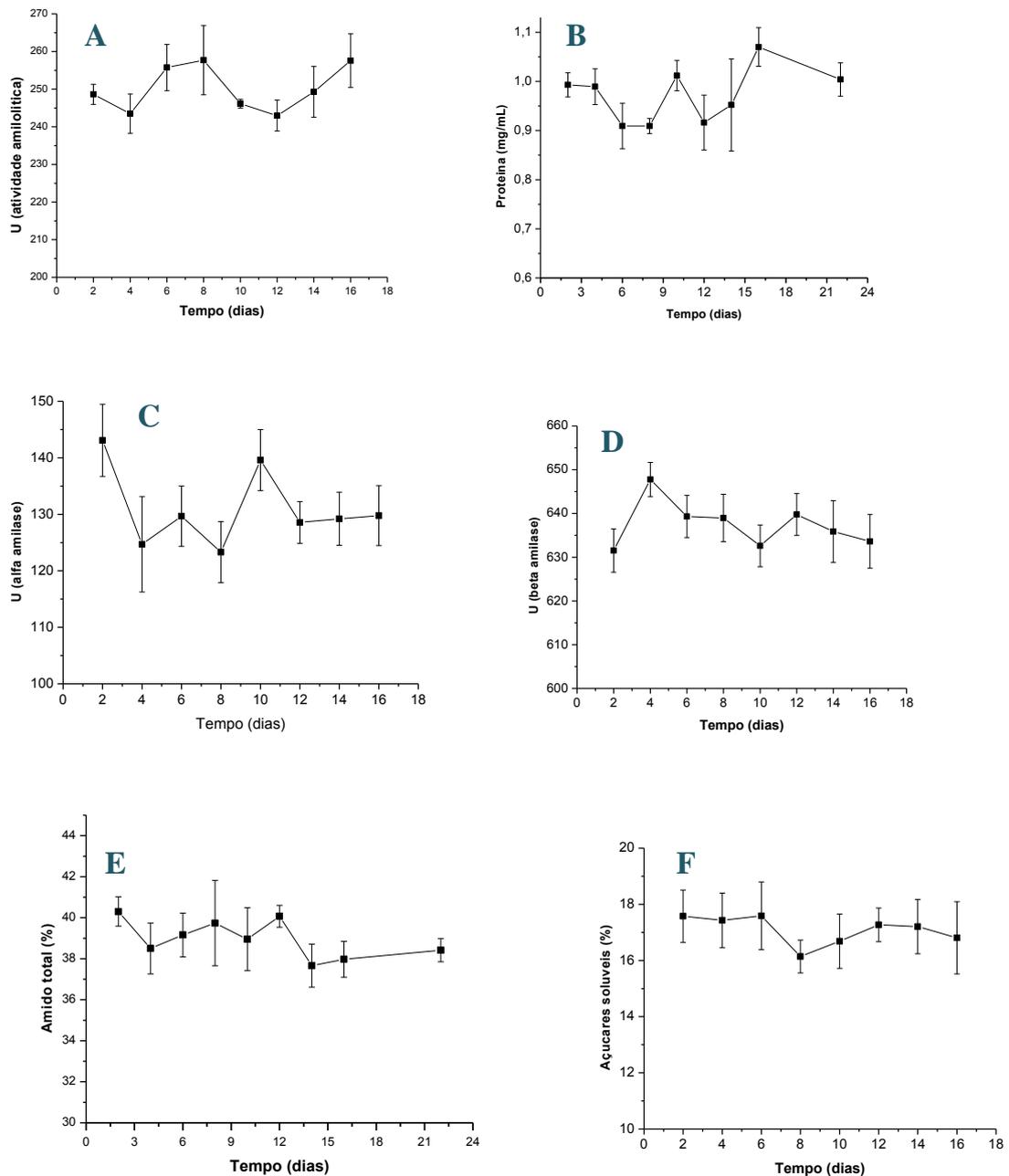


Figura 17 – (A) Perfil de atividade amilolítica empregando amido como substrato; (B) concentração de proteína determinada pelo método de Bradford; (C) Atividade α -amilásica empregando substrato específico (PNP5); (D) Atividade β -amilásica empregando substrato específico; (E) Teores de amido total e (F) Teores de açúcares solúveis totais. As determinações de A-D foram realizadas em extratos enzimáticos brutos. E e F foram quantificadas na própria raiz.

2.4.2 Atividade hidrolítica em PAGE-nativo e perfil protéico em SDS-PAGE

Para verificar o perfil da atividade amilolítica nos extratos brutos das raízes de maca durante o armazenamento, foram empregados géis de poliacrilamida contendo 1,0 % de amido como substrato, com o intuito de identificar e comparar o conjunto de enzimas com atividade amilolítica durante o período de armazenamento. Foram realizados vários ensaios para estabelecer as melhores condições de visualização das bandas protéicas que apresentavam atividade amilolítica em contato com amido. O meio continha 1% de amido em tampão fosfato 0,02 M, sendo incubado até 3 h, à temperatura de 30°C. O melhor resultado foi alcançado após 180 min (Figura 18) com o aumento da intensidade de outras bandas não observadas em 2h. Na figura observam-se 3 bandas em diferentes posições (A1, A2, A3) e com intensidades diferentes na migração eletroforética. A primeira banda (A1) apresenta maior intensidade, provavelmente com maior afinidade pelo substrato, ou poderia ser um conjunto de isoformas, devido à localização de diferentes enzimas com mesma migração no gel. Este perfil conserva-se aparentemente imutável durante todo o período de armazenamento, tanto quanto as regiões das bandas A2 e A3, o que poderia indicar que não houve diferença no perfil de ação amilolítica em gel durante o período observado de armazenamento.

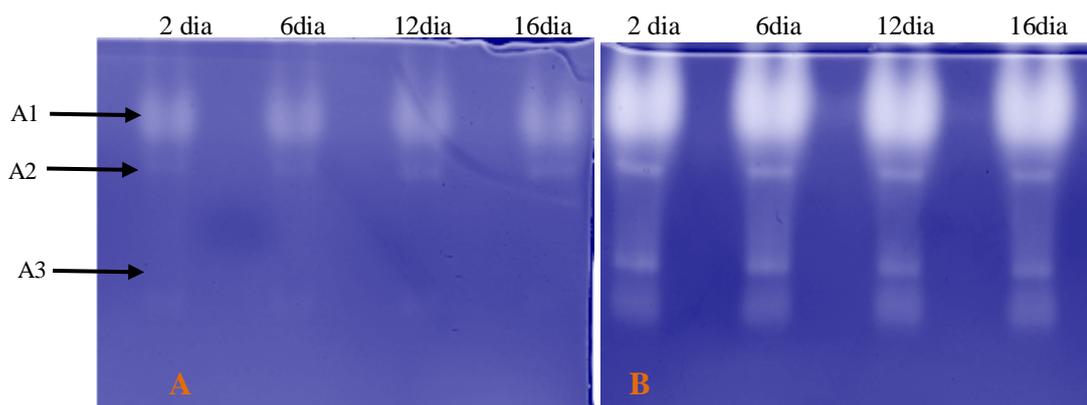


Figura 18 – Atividade amilolítica total em géis de poliacrilamida PAGE-nativo (6,5%). Os géis foram incubados em tampão fosfato 0,01M (pH 6,0) contendo 1,0% de amido solúvel de batata a 30 °C. sobre agitação moderada. (A) 2 horas e (B) 3 horas, posteriormente foram corados com solução aquosa de iodo (I₂ 13 mM e KI 40 mM). Massa inicial de 8 µg de proteína para cada amostra.

Para detalhar o perfil deste grupo de enzimas com atividade amilolítica, foi empregada a eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão foi usado gel em PAGE-nativo 6,5%, sem coloração e aplicado sobre o segundo gel em SDS-PAGE (Figura 19).

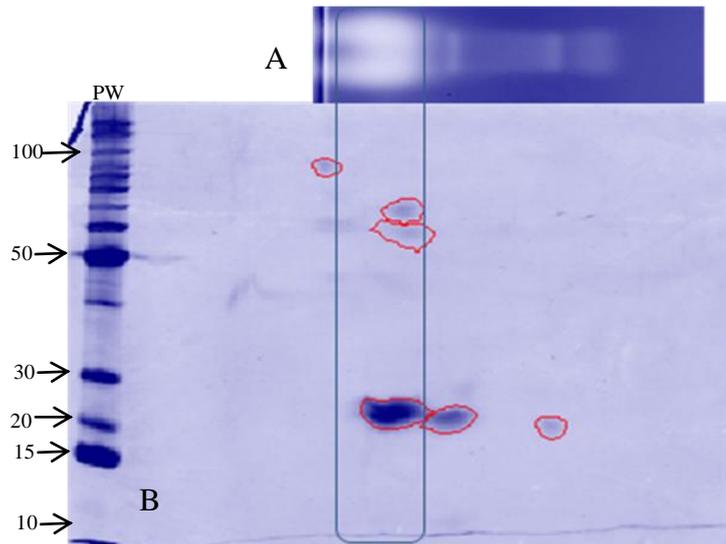


Figura 19 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (A) Gel proveniente do PAGE-nativo (6,5%), o gel de transferência não foi incubado em amido nem corado com iodo. (B) Perfil protéico em SDS-PAGE (15%) bidimensional, revelado com prata. PW) padrão de massa molecular. A elipse indica a migração das proteínas contidas no PAGE-nativo para o SDS-PAGE.

No perfil protéico (Figura 19B) é possível visualizar a migração de varias proteínas presentes na banda com maior intensidade na qual se concentra a maior atividade amilolítica contendo proteínas com massa molecular variando de 20 a 100 KDa. Este dado poderia reforçar o mencionado anteriormente da formação de um complexo protéico ou conjunto de isoformas. As isoformas, no entanto, se caracterizam pela semelhança de massas moleculares e pequenas alterações de pontos isoelétricos, fato que não foi possível comprovar em função da utilização de um gel nativo no lugar de focalização isoelétrica. No caso presente, houve um impedimento natural para favorecer a preservação da integridade funcional das formas enzimáticas.

Outro dado que poderia reforçar a hipótese da formação do complexo enzimático está mostrado na Figura 20, no qual se mostram géis bidimensionais-nativos de acordo ao ponto isoelétrico. A figura mostra (Elipse vermelha) um conjunto de enzimas com intensa atividade amilolítica e com pI próximos, também se observam outras enzimas muito próximas com atividade amilolítica e com pI menores. Na Figura 20B se mostra um gel bidimensional-nativo com gradiente de pH de 4 a 7, neste gel pode-se observar melhor a separação dos pI.

Mesmo assim não foi possível identificar claramente os pI dos spots, provavelmente devido aos interferentes presentes no extrato enzimático. Esta metodologia encontra-se ainda pouco explorada, mas poderia contribuir para a identificação de possíveis isoenzimas e separá-las de acordo ao pI e massa molecular, de modo a preservar a atividade enzimática.

Todaka e Kanekatsu (2007) desenvolveram um método analítico para a detecção de isoenzimas de β -amilase usando eletroforese bidimensional, os autores identificaram cinco isoenzimas com 50kDa e pI entre 5,7 a 6,4 e com elevada atividade amilolítica e duas isoenzimas com 100kDa após serem separados em PAGE-nativo na segunda dimensão, os géis foram incubados com amido e corados com iodo.

De uma forma geral as enzimas são encontradas nos tecidos dos vegetais em misturas complexas, geralmente as células apresentam centenas de enzimas diferentes que, requerem purificação para o estudo aprofundado de uma delas. Em alguns casos é possível, através de métodos específicos, utilizarem enzimas de forma impura, mas na maioria dos casos, a presença de outras enzimas interfere na disponibilidade e integridade do substrato desviando a validação de atividade específica.

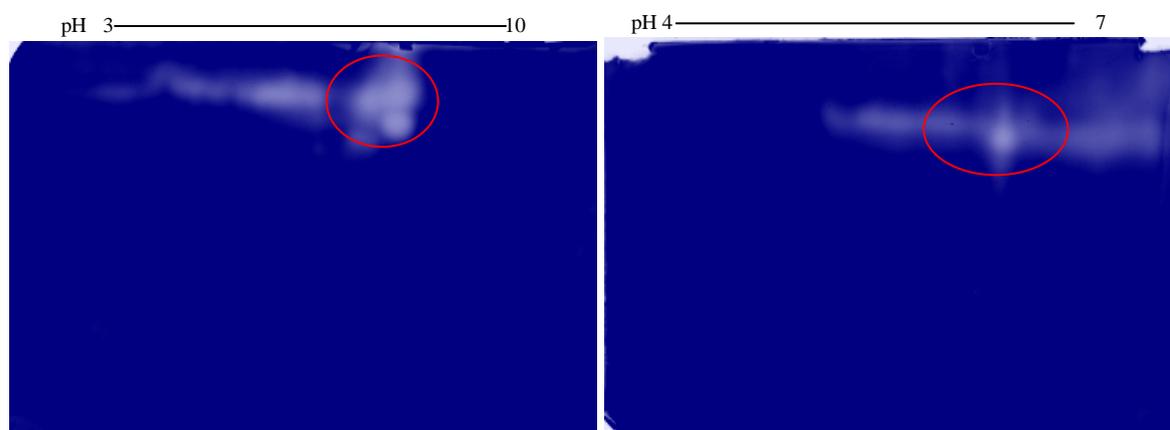


Figura 20- Eletroforese bidimensional-nativo do extrato bruto da raiz de maca. (A) Gel PAGE-nativo 6,5%, focalização isoeétrica realizada em gradiente de pH linear de 3 a 10 empregando tiras de 7 cm, (B) Gel PAGE-nativo 6,5%, focalização isoeétrica realizada em gradiente de pH linear de 4 a 7 (7cm). Os géis foram incubados em tampão fosfato pH 6,0 (0,1M) durante 3 h e corados com iodo (I_2 13 mM e KI 40 mM). Foram colocados 60 μ g de proteína em cada tira.

Na Figura 21 foram observadas varias proteínas nos extratos enzimáticos durante o período de armazenamento. Tanto no gel corado com Coomassie, quanto com prata, observam-se duas bandas intensas na faixa de 20 a 25 kDa o que poderia indicar que se encontram em maior concentração ou poderia ser algum tipo de enzima. Este perfil se

observa semelhante durante todo o processo de armazenamento, confirmando mais uma vez que não houve incremento na concentração de proteínas, nem degradação das mesmas durante o armazenamento. Para poder verificar se houve o não degradação das proteínas por protease durante a extração, foi adicionado na solução extratora agentes protetores, como o PVP-40 (1%) e benzamidina 1 mM, e pudemos confirmar que não houve degradação no perfil protéico SDS-PAGE nem PAGE-nativo (dados não apresentados).

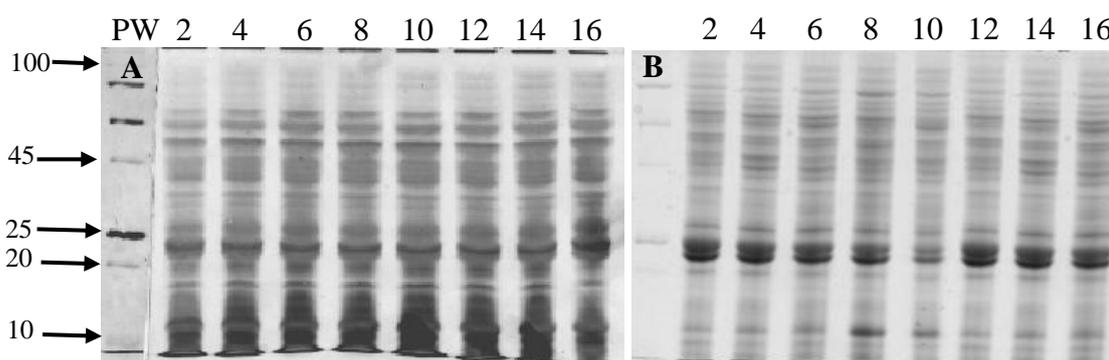


Figura 21 – A) Perfil protéico dos extratos enzimáticos em SDS-PAGE (15% de poliacrilamida) corado com coomassie blue G-250, (B) SDS-PAGE 15% de poliacrilamida corado com prata. Para a revelação com prata e coomassie foram empregado 8 e 10 μ g de proteína, respectivamente.

2.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos permite observar detalhadamente a morfologia dos grânulos de amido, assim como qualquer alteração na sua superfície. O amido de maca extraído durante o período de armazenamento (16 dias) foi observado por MEV como se mostra nas Figuras 22 - 25.

Na Figura 22 se observa os grânulos de amido os quais se encontram distribuídos em diversos tamanhos e formatos, com predominância do formato oval. Os grânulos apresentam uma superfície lisa sem mostrar ataque enzimático aparente, também se vê depressões circulares e ovais (setas verdes) ao redor dos grânulos como se fossem camadas de amido em formação ou também poderia ser o início de um ataque enzimático. Pode se observar algumas fissuras (setas laranja) os quais poderiam ser algumas alterações provocadas durante o processo de extração e purificação ou preparo da amostra, mas que poderia facilitar ao ataque

enzimático. Uma característica comum de ataque enzimático por α e β amilase são os mostrados por Zhang e Oates (1999), onde se observa que os amidos de cereais com superfícies porosas são mais susceptíveis a hidrólise enzimática que os amidos de superfície lisa como dos tubérculos.

De modo geral, os grânulos não apresentaram degradação aparente durante os 16 dias de armazenamento, estes dados estão relacionados com os resultados obtidos no item **2.4.1** os quais mostraram que não houve variação no conteúdo de açúcares e do amido, porém não mostrou hidrólise do amido pela ação de enzimas amilolíticas (Figuras 23-25).

A Figura 26 mostra os grânulos de amido extraídos aos 22^o dias quando a raiz estava quase seca, supúnhamos que poderia ter alguma diferença, mas o perfil das micrografias foram semelhantes sem mostrar ataque enzimático, o teor de amido nesta amostra foi de 38,41%.

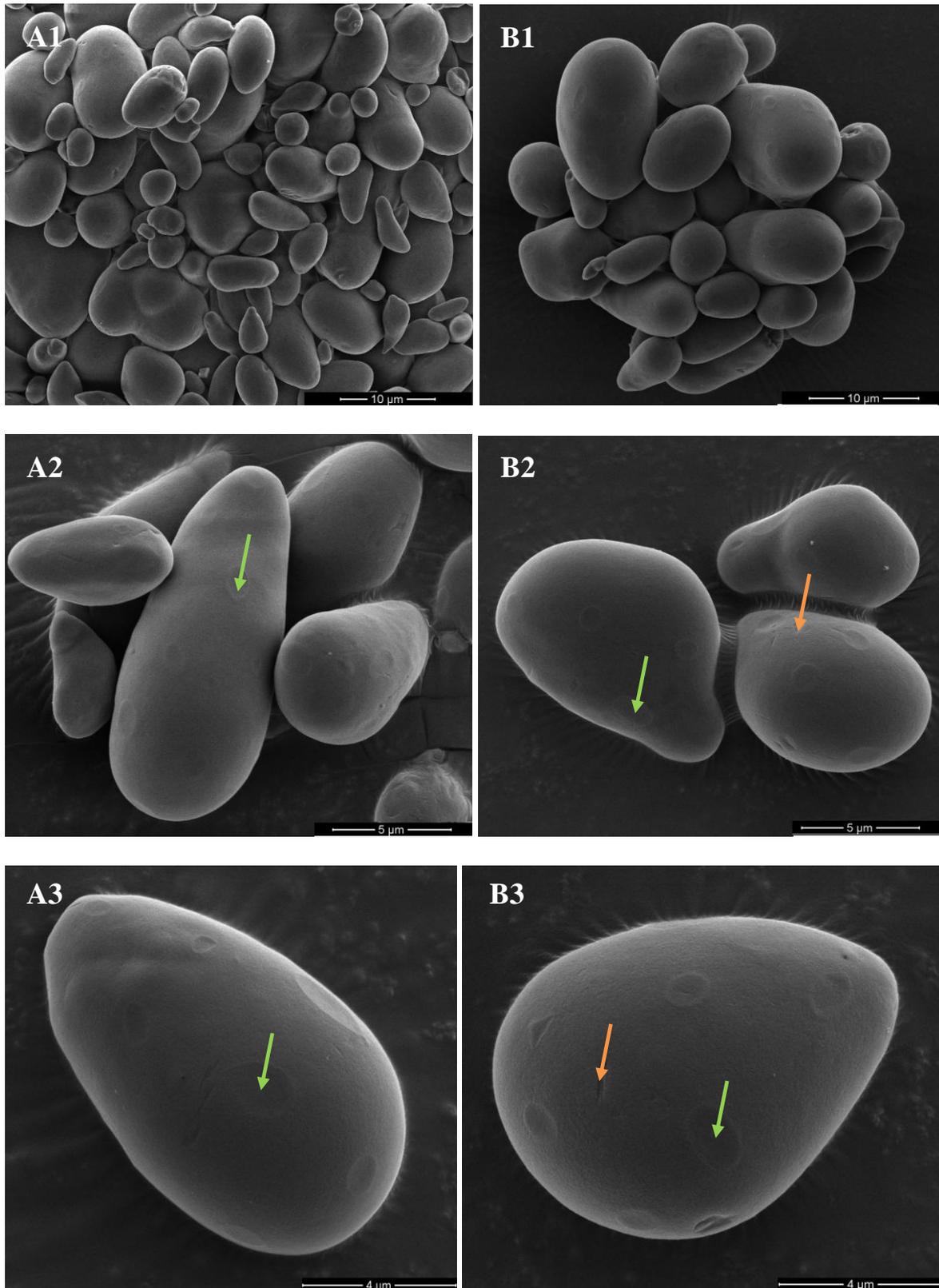


Figura 22 - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 2º dia (A1-A3) e 4º dia de armazenamento (B1-B3). O teor de amido foi 40,29 % e 38,50%, respectivamente.

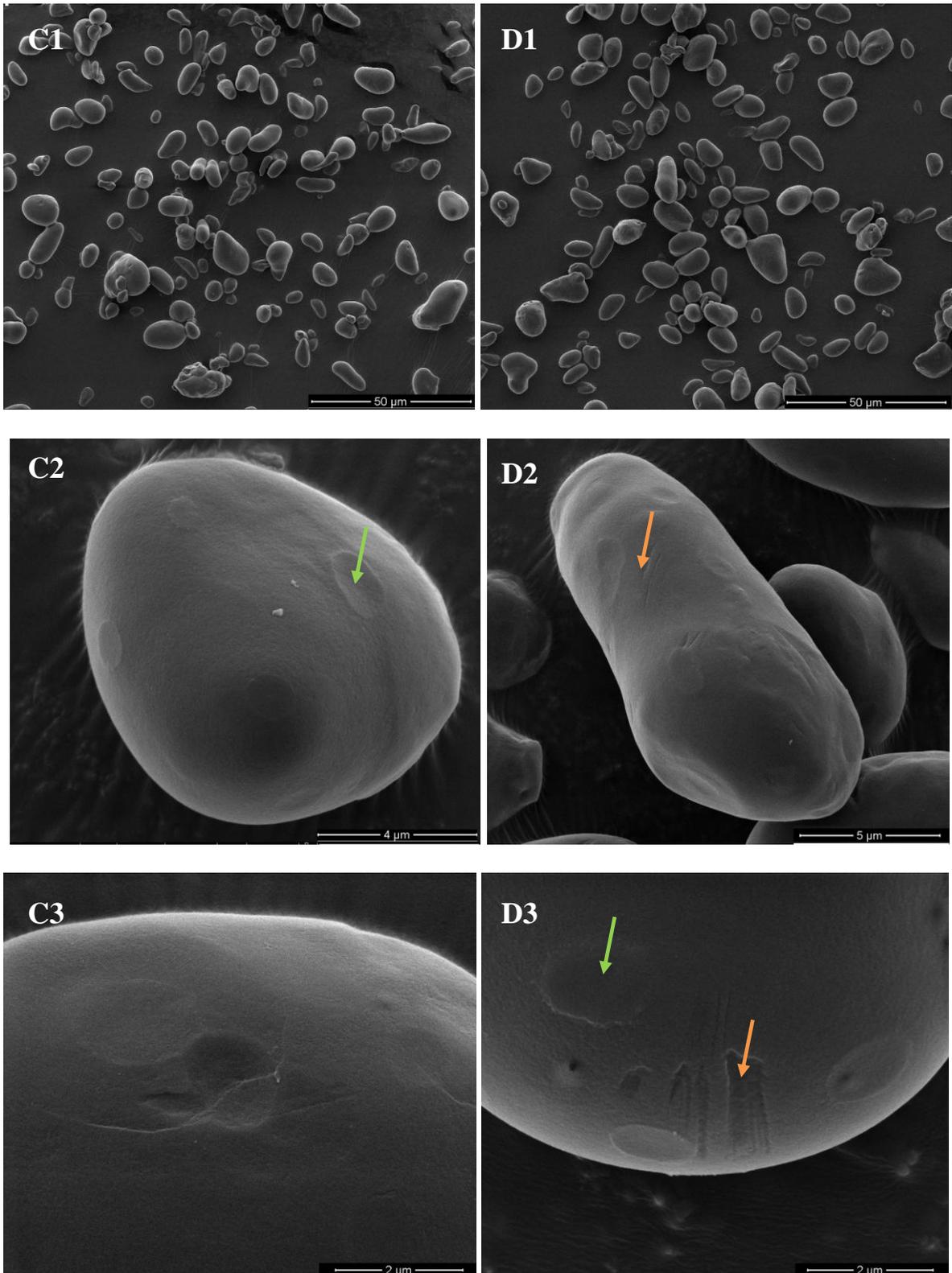


Figura 23 - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 6^o dia (C1-C3) e 8^o dia de armazenamento (D1-D3). O teor de amido foi 39,15 % e 39,73%, respectivamente.

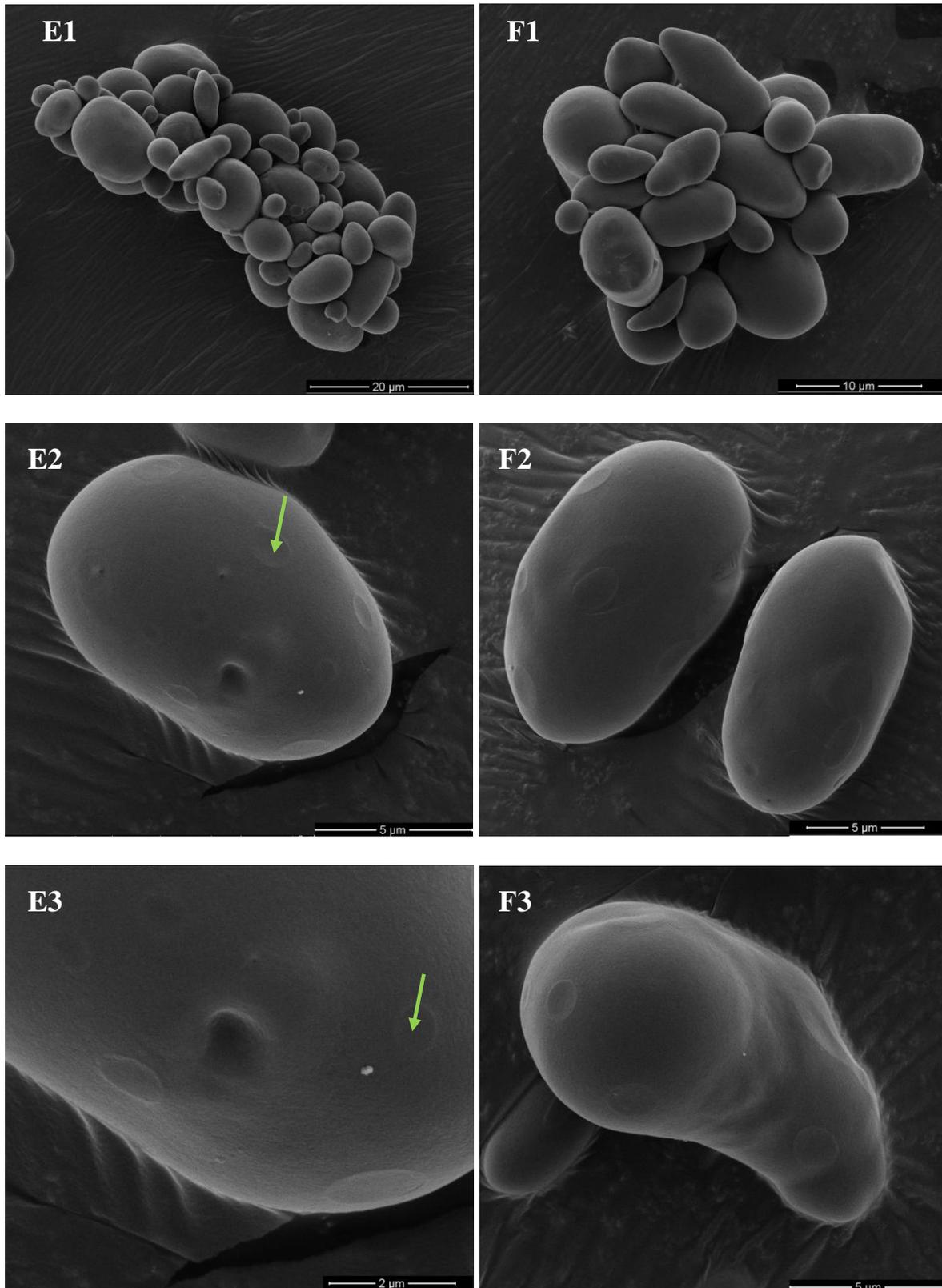


Figura 24 - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 10^o dia (E1-E3) e 12^o dia de armazenamento (F1-F3). O teor de amido foi 38,95 % e 40,06%, respectivamente.

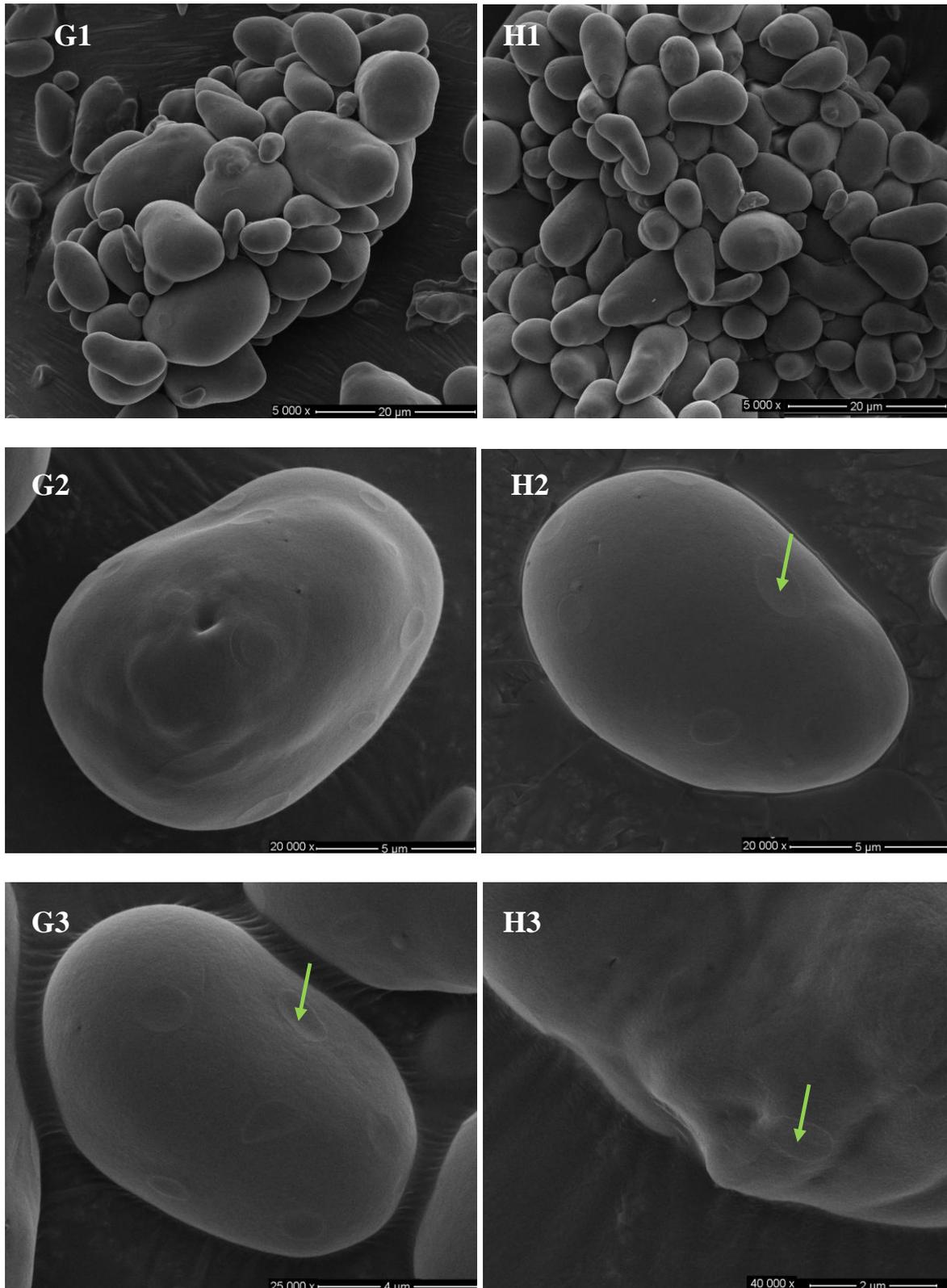


Figura 25 - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 14^o dia (G1-G3) e 16^o dia de armazenamento (H1-H3). O teor de amido foi 37,69 % e 37,97%, respectivamente.

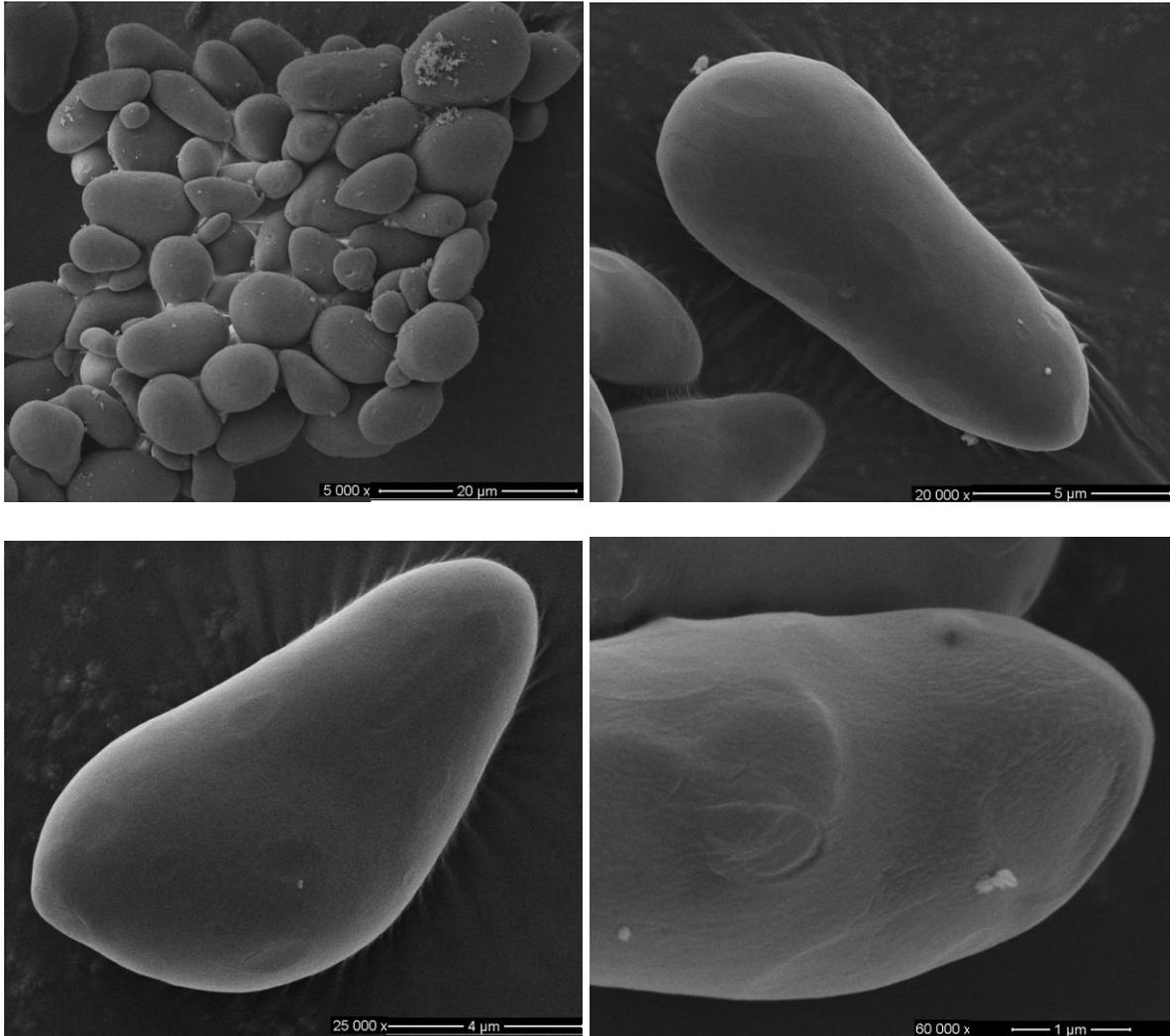


Figura 26 - Microscopia Eletrônica de varredura dos grânulos de amido de maca no 22^o dia de armazenamento, cujo teor de amido foi 38,47%.

Para ter mais detalhes sobre a ação de amilases na hidrólise do amido de maca, foram incubados o amido isolado com α -amilase pancreática e com o extrato bruto da própria raiz durante 2 horas a 37 °C (Figuras 27 – 28). Pode-se observar pelas micrografias que essas depressões circulares mostradas nas superfícies dos grânulos ficaram mais expostas (setas azuis) sofrendo corrosão e tornando-se mais susceptíveis ao ataque enzimático, em alguns casos atravessando o grânulo e determinando fraturas totais (setas brancas).

Quando o amido foi hidrolisado com o extrato bruto de maca (Figura 28), também as depressões circulares ficaram mais visíveis, mas os grânulos apresentaram mais resistência a hidrólise enzimática do que quando foi hidrolisado com α -amilase. Alguns grânulos de amido sofreram corrosões internas côncavas, as quais são características da hidrólise por uma α -amilase como mostrado na Figura 27.

De modo geral no amido de maca a degradação parece ocorrer da superfície para o interior do grânulo podendo ser denominada de hidrólise centrípeta, e em seguida o núcleo é completamente degradado para dentro da sua periferia denominada hidrólise centrifuga. Fazendo a comparação da ação da α -amilase sob o grânulo de amido de maca, parece ter semelhança com o mostrado por Apimam et al. (2007) que estudaram a hidrólise de amido de batata por α -amilase de *Bacillus sp.*, e observaram por MEV que a degradação foi primeiramente da superfície do grânulo em direção ao centro (hidrólise centrípeta) em seguida o núcleo foi completamente degradado. No entanto os autores sugerem que é muito difícil avaliar a organização estrutural no interior da parte degradada dos grânulos por MEV.

A susceptibilidade no ataque enzimático dos grânulos de amido depende de vários fatores, como o conteúdo de amilose e amilopectina, estrutura cristalina, tamanho de partícula, temperatura de gelatinização e presença e inibidores enzimáticos. Em amido de batata doce, o elevado conteúdo de amilopectina foi associado com a elevada temperatura de gelatinização e, conseqüentemente, com a menor susceptibilidade ao ataque por α -amilase (ZHANG; OATES, 1999).

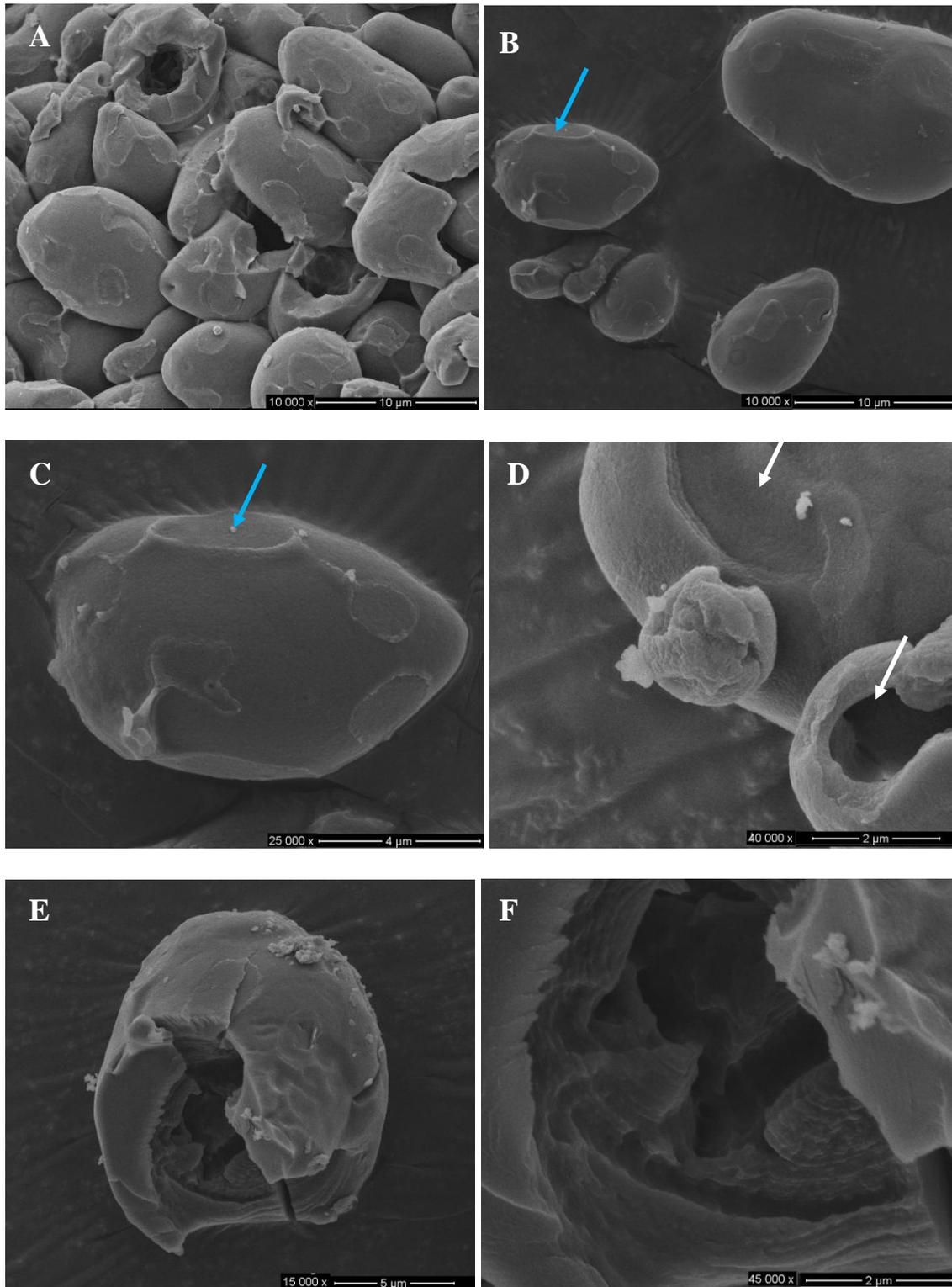


Figura 27 - Micrografias em MEV do amido nativo de maca hidrolisados por α -amilase pancreática, 19,5 U/mg de amido em tampão acetato a pH 4,8 durante 2 h a 37 °C.

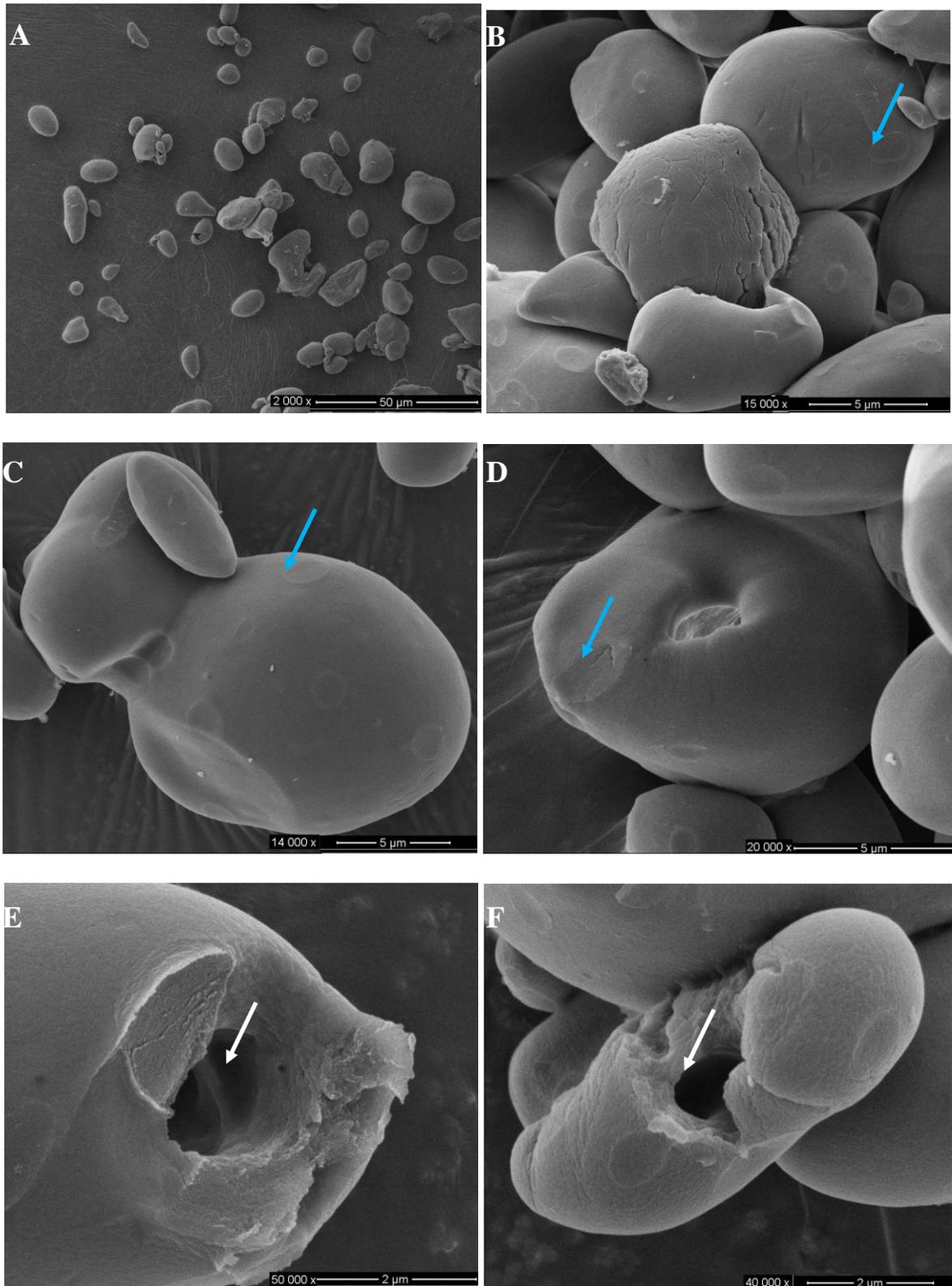


Figura 28 – Micrografias em MEV do amido nativo de maca hidrolisados com o extrato bruto da própria raiz (1mL de extrato bruto/g de amido) em tampão fosfato 0,01 M pH 6,0 durante 2 horas a 30

2.5 CONCLUSÕES

Em base aos dados obtidos no presente trabalho pode se concluir que:

- Durante o período de armazenamento inicial as raízes de maca não apresentaram variações significativas na atividade amilolítica total, nem tampouco nas atividades de α e β amilases;
- No mesmo período não houve variações significativas nos teores de amido total e no conteúdo de açúcares solúveis totais;
- Foram observadas diversas enzimas amilolíticas através de ensaio in vitro, porém inativas nos hipocótilos íntegros durante o período de armazenamento estudado;
- O amido isolado durante o período de armazenamento não apresentou degradação característica da ação de enzimas amilolíticas;
- O amido de maca foi susceptível ao ataque enzimático quando submetido a ação de α -amilases exógenas, apresentando uma corrosão centrípeta;
- Após a colheita a raiz de maca parece estar em estado de dormência, por não se encontrar nas condições adequadas para o brotamento

3 CAPÍTULO 3

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÓTICAS DE RAÍZES DE MACA (*Lepidium meyenii* Walp.)

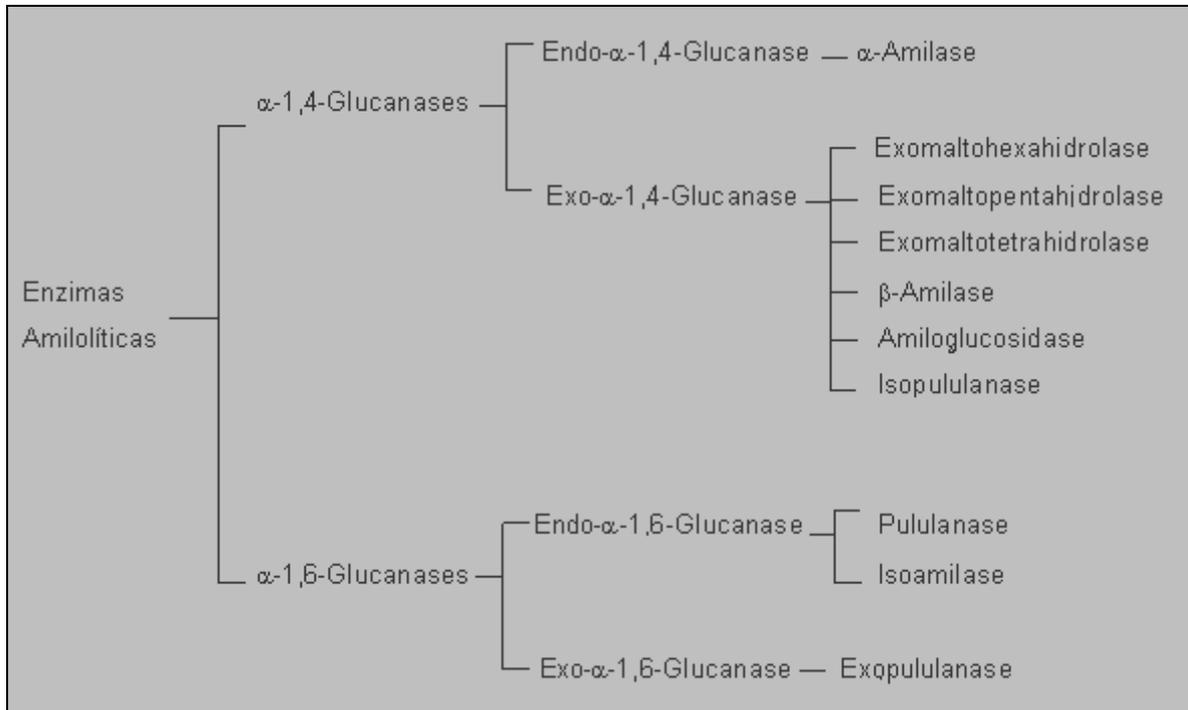
3.1 REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 Enzimas amilolíticas

Enzimas, catalisadores orgânicos, produzidos por células vivas, atuam na totalidade das reações químicas de um organismo. As reações catalisadas pelas enzimas ocorrem também nos alimentos e podem influenciar positiva ou negativamente na sua qualidade. Todas as enzimas são compostas basicamente de proteínas, embora muitas possuam um grupo prostético não protéico, como flavinas, heminas, íons metálicos. Características importantes das enzimas são a especificidade sobre o substrato, a alta velocidade das reações, a atividade sob reações brandas de temperatura e de pH, a baixa concentração, bem como a auto regulação comandada por fatores fisiológicos e genéticos (FELLOWS, 1994; BELITZ e GROSCH, 1997).

As enzimas empregadas em processos industriais são obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (malteamilase, papaína, bromelina, ficina), animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e microrganismos (amilases, proteases, pectinases, invertase, glicose-oxidase, celulase, glicose-isomerasas) (PARK, 1975). As enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial, em processos de clarificação de bebidas, de fabricação de aromas e realçadores de sabor, de produção e transformação de matérias primas, entre outros. Atualmente grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e tem aplicação quase completa na hidrólise do amido para a fabricação de derivados importantes para indústrias de alimentos, medicamentos e de produtos químicos (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005). Os principais grupos de enzimas que hidrolisam amidos são α -amilase, β -amilase, glicoamilase e enzimas

desramificantes (isoamilases e pululanases) (ROBINSON, 1991; FELLOWS, 1994). A Figura 29 mostra uma classificação geral das enzimas amilolíticas.



FONTE: NIGAM; SINGH (1995)

Figura 29 - Classificação de enzimas amilolíticas.

3.1.2 Aplicações indústrias das amilases

A amilase é a mais importante enzima hidrolítica usada nas indústrias de amido. Sua comercialização é antiga, como produto farmacêutico para o tratamento de distúrbios digestivos. No cenário atual, as amilases possuem aplicação em diversos setores industriais, tais como alimentos, detergentes, indústria têxtil e de papel. Nas indústrias de processamento de amido, as amilases microbianas substituíram totalmente a hidrólise química (GUPTA et al., 2003).

O emprego mais conhecido da amilase é na panificação. Kim et al. (2006) estudaram o efeito do uso da α -amilase como aditivo na indústria de alimentos sobre as propriedades da massa e do pão através da combinação da farinha refinada com amilases, promovendo a aplicação em alimentos processados. A adição de α -amilase, além de ter efeito

antienvelhecimento, aumentando a vida de prateleira do produto, proporciona uma melhora na elasticidade do miolo, o que é fundamental no processo de panificação, uma vez que a atividade de α -amilase é muito baixa na farinha de trigo. Além disso, algumas enzimas e amidos modificados com α -amilase são conhecidos pelo efeito sinérgico que exercem nos processos de panificação.

A tecnologia atual da panificação exige a ocorrência do processo fermentativo numa velocidade adequada e uniforme. A suplementação de farinhas com α -amilases fúngicas promove aumento na taxa de fermentação e reduz a viscosidade da massa, resultando no aumento do volume e da textura do produto, além de aumentar a disponibilidade de açúcar fermentável na massa. O aumento do teor de açúcar no produto final melhora o paladar e a qualidade da tostagem do pão. A α -amilase tem um efeito marcante na viscosidade e na maciez da massa. Além disso, confere ótimo volume final, sedosidade e textura (MC KNIGHT; MAZZIEIRO, 2000).

O maior mercado de α -amilase está na produção de amido hidrolisado, para a obtenção de glicose e frutose como produto final. O amido é convertido em xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS). Devido ao seu alto poder adoçante, é utilizado em grande quantidade nas indústrias de bebidas, como adoçante em refrigerantes (PANDEY et al. 2000b; VAN DER MAAREL et al., 2001).

Avanços tecnológicos na indústria têxtil oferecem maior resistência ao fio durante o processo de tecelagem e, para tal, o fio precisa ser resistente à quebra, o que é feito aplicando-se uma camada removível de proteção de goma aos fios. Neste caso, o amido é bastante atrativo, pois tem baixo custo, apresenta grande disponibilidade em diversas regiões do mundo e pode ser removido facilmente. A α -amilase tem sido utilizada para a extração da goma das fibras do tecido, uma vez que a enzima quebra as moléculas do amido em dextrinas que são solúveis em água, podendo ser facilmente removidas através da lavagem (GUPTA et al., 2003).

As enzimas são um dos ingredientes utilizados nos detergentes atuais e a principal vantagem desta aplicação é que estes detergentes são mais suaves quando comparados aos detergentes comuns. Os primeiros detergentes utilizados para máquinas de lavar louça eram agressivos, causando severos danos quando ingeridos e não eram compatíveis às porcelanas ou a utensílios de madeira. Isso forçou as indústrias de detergentes a procurar soluções mais eficientes. As α -amilases têm sido usadas em detergentes desde 1975 e atualmente estão presentes em cerca de 90% destes produtos. Uma das limitações da amilase é a baixa estabilidade em meio com baixo teor de cálcio. Além disso, alguns tipos de amilases são

sensíveis a agentes oxidantes presentes em alguns componentes da formulação. Para resolver tal problema, as amilases têm sido utilizadas em combinação com outras enzimas, como as proteases, e os compostos oxidantes têm sido substituídos por outros que não afetam a estabilidade enzimática (MITIDIERI et al., 2006).

3.1.3 Metodologia de purificação e caracterização molecular de amilases

A aplicação de enzimas em setores farmacêuticos e clínicos requer amilases puras de alta qualidade. Deste modo, é importante desenvolver processos economicamente viáveis para a obtenção de enzimas puras e com máxima atividade específica. Vários métodos clássicos têm sido empregados para a purificação de amilases de diferentes fontes, tradicionalmente, são incluídas diversas etapas como centrifugação da cultura, concentração seletiva do sobrenadante, comumente por ultracentrifugação ou por liofilização, diálise, precipitação das enzimas por sulfato de amônio ou solventes com o ácido tricloroacético (TCA), etanol e acetona gelada. O extrato bruto, ou sobrenadante, é submetido à liofilização e em seguida à cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel de filtração. Muitas amilases já foram purificadas usando apenas uma única etapa de cromatografia, mas dependendo das características bioquímicas da amilase em questão, são necessárias duas ou mais etapas de purificação (ZIEGLER, 1999; MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2003).

Resinas de DEAE-celulose foram empregadas na purificação da maioria das amilases de cereais e a DEAE-Sephadex® para a separação de isoenzimas de malte. A cromatografia de afinidade é uma das melhores técnicas para a purificação seletiva de enzimas.

A focalização isoeletrica é uma técnica que separa proteínas com base no ponto isoeletrico (PI) e é usada principalmente para separar isoenzimas que diferem entre si em relação ao valor do pI entre 0,05 unidades de pH. Esta técnica têm sido empregada para separar isoenzimas de amilases de cevada e α -amilase de trigo (DAS; SEM-MANDI, 1992; DAUSSANT et al., 1981; TODAKA; KANEKATSU, 2007).

3.1.3.1 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional (2D) foi inicialmente desenvolvida por O'Farrel e Klose em 1975 e desde então vem sendo uma técnica valiosa para a análise funcional das proteínas. A metodologia original consistia na preparação de géis cilíndricos de poliacrilamida, em que um gradiente de pH era estabelecido por meio de uma pré-corrída com anfóteros específicos ou anólitos, que apresentam alta capacidade tamponante em pHs próximos aos seus pontos isoelétricos (pIs) as proteínas eram submetidas a uma eletroforese com focalização isoelétrica e posteriormente a uma eletroforese na presença de SDS por meio de um sistema convencional descrito por Laemmli (1970). Dessa forma as proteínas eram separadas na primeira dimensão de acordo com seus pIs e na segunda dimensão em função da sua massa molecular (SDS-PAGE) Apesar de engenhosa a metodologia era muito demorada, difícil de reproduzir em muitos laboratórios e dependia da habilidade do pesquisador para a obtenção de resultados consistentes. (PANDEY; MANN, 2000).

Um avanço importante que contribuiu para o aumento da reprodutibilidade da eletroforese 2D foi o desenvolvimento dos géis em forma de tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG- immobilized pH gel) que contém grupos tamponantes ácidos e básicos. Outro avanço importante foi o aperfeiçoamento dos métodos de preparação das amostras protéicas, os quais consistem nas seguintes etapas:

- Na extração, utilização de diferentes tampões para amostras específicas;
- Na precipitação, concentração das proteínas e eliminação de substâncias interferentes;
- Na solubilização das proteínas.

Atualmente a eletroforese 2D têm sido amplamente utilizada devido aos inúmeros avanços das metodologias empregadas. O uso de gradientes imobilizados de pH (IPG) na focalização e a otimização do processo de aplicação das amostras têm permitido a utilização de quantidades cada vez menores de proteínas (CÁNOVAS et al., 2004). Em plantas o preparo da amostra também merece preocupação, pois trata-se de uma etapa crítica e absolutamente essencial para a obtenção de bons resultados. Neste sentido, especial atenção deve ser destinada ao preparo inicial da amostra, em que diferentes métodos de extração podem ser testados e utilizados para isolar e fracionar as proteínas dos materiais vegetais (CARPENTIER et al., 2005; NATARAJAN et al., 2005) Os tecidos vegetais possuem grande quantidade de água e baixa relação proteína/matéria fresca, além de possuir substâncias que

interferem na análise protéica, como compostos fenólicos, enzimas proteolíticas e oxidativas, terpenóides, pigmentos, ácidos orgânicos, íons inibitórios e carboidratos. Após a extração, geralmente as proteínas são precipitadas em soluções salinas, tamponantes e/ou solventes orgânicos, visando à eliminação da maioria dos interferentes (CARPENTIER et al., 2005).

A seleção da solução extratora ideal, aquela que solubiliza a maior quantidade de proteínas, depende de cada espécie, tecido e das proteínas de interesse. As diferentes soluções extradoras possuem afinidades com classes específicas de proteínas, o que permite uma extração diferencial de acordo com o método utilizado (CARPENTIER et al., 2005). Os métodos mais utilizados para extração de proteínas totais em células e tecidos vegetais utilizam soluções caotrópicas, geralmente a base de uréia e tiouréia ou diretamente com ácido tricloroacético (TCA)/Acetona (CARPENTIER et al., 2005; NATARAJAN et al., 2005; SARAVANAN; ROSE, 2004) seguido de pelo menos um método de precipitação para a concentração das proteínas e a eliminação dos interferentes (CARPENTIER et al., 2005)

Nos dias atuais a eletroforese 2D em gel de poliacrilamida e a identificação de proteínas por espectrometria de massas representam uma tecnologia integrada, através da qual milhares de espécies de proteínas podem ser separadas, detectadas e quantificadas. Além disso, centenas de proteínas podem ser identificadas pela análise seqüencial da mistura de peptídeos gerada pela digestão de pontos individuais produzidos durante a etapa de separação (SHEVCHENKO et al, 1996;). Na Figura 30 podemos observar um diagrama esquemático ilustrando as etapas envolvidas na metodologia empregada na eletroforese bidimensional, utilizando gel de poliacrilamida (2D-PAGE).

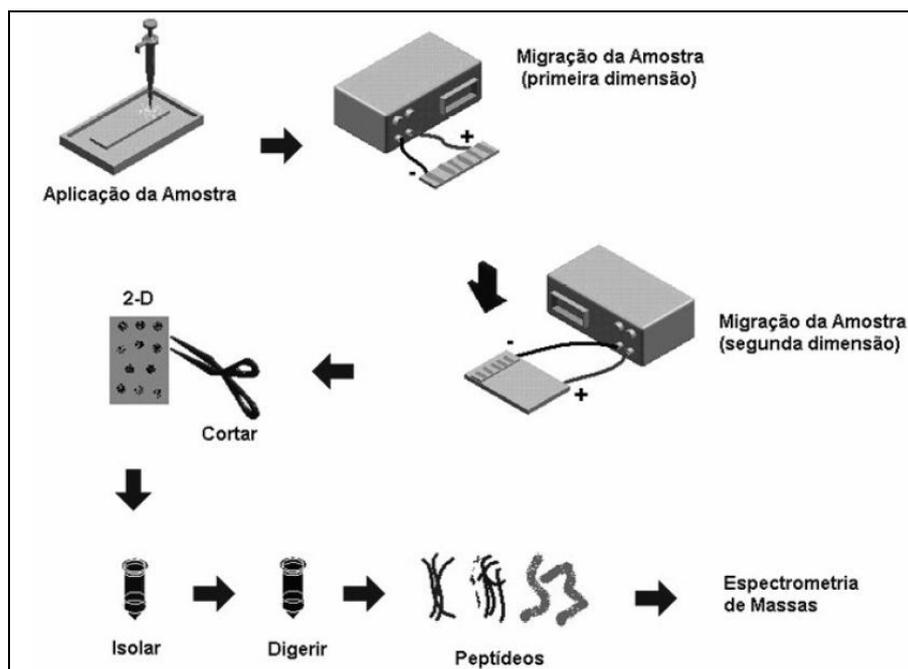


Figura 30 – Esquema usado para a realização da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D –PAGE). Após a aplicação da amostra o gel é submetido a um campo elétrico para separação bidimensional. Na primeira dimensão ocorre a separação das proteínas de acordo com o pI e na segunda dimensão, a separação se dá de acordo à massa molecular. Em seguida, as proteínas separadas são recortadas do gel e fragmentadas com tripsina. Os peptídeos gerados pela digestão enzimática podem ser analisados por espectrometria de massas.

3.1.3.2 Identificação de proteínas

Nas últimas décadas grandes avanços têm sido obtidos na identificação de proteínas por meio da análise por espectrometria de massas.

Uma das técnicas empregadas é a espectrometria de massas com base na dessorção e ionização das proteínas com laser auxiliado por uma matriz (MALDI-Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), que analisa a massa através do tempo de voo dos íons no tubo de análise, esta técnica analisa a massa de fragmentos peptídicos obtidos da digestão das proteínas com uma enzima proteolítica, como a tripsina. O padrão de massa obtido é comparado em bancos de dados para a identificação das proteínas. Apesar de rápido e prático este método fornece apenas o grau de similaridade dos padrões de massas dos peptídeos entre proteínas anotadas. Portanto fazem-se necessários métodos complementares para a

certificação da identidade da proteína, por exemplo, o seqüenciamento completo por meios bioquímicos clássicos, tais como a degradação de Edman.

Outra técnica é a espectrometria de massas baseada na ionização por pulsos elétricos em meio líquido (ESI – ionização por electrospray) Neste caso ocorre a análise da massa de todos os fragmentos obtidos da colisão dos polipeptídios contra um gás inerte como o argônio. A massa de todos os fragmentos e a massa teórica dos resíduos de aminoácidos é então utilizada em um algoritmo computacional utilizado para determinar a seqüência dos resíduos de aminoácidos, esta técnica é uma ferramenta eficiente que pode substituir o seqüenciamento clássico.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

- Isolar e caracterizar enzimas amilolíticas em raízes de maca (*Lepidium meyenii* W.)

3.2.2 Objetivos específicos

- Purificar enzimas amilolíticas encontradas em raízes de maca;
- Caracterizar as moléculas de enzimas amilolíticas isoladas.

3.3 MATERIAS E MÉTODOS

3.3.1 Material e reagentes

Para a purificação da enzima amilolítica foram empregadas raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) com 4 dias após a colheita. Todos os reagentes empregados nesta fase do trabalho foram de grau analítico e, em alguns casos, de grau HPLC. O sulfato de amônio, a DEAE-celulose e CMC-celulose foram obtidos da Sigma Chemical Co. St. Louis. A tripsina Gold, grau espectrometria de massas, foi adquirida da Promega. Os anfólitos e as tiras IPG foram adquiridos da GE Healthcare.

3.3.2 Extração enzimática.

A extração enzimática foi realizada em raízes de maca após 4 dias de armazenamento, foi seguindo o método descrito no item 2.3.3.1.

3.3.3 Purificação de enzimas amilolíticas

O extrato bruto de raízes de maca, obtido no Capítulo 2 (item 2.3.3.1), foi usado para as etapas descritas a seguir.

3.3.3.1 Fracionamento com sulfato de amônio

Seguindo a metodologia testada anteriormente (SANABRIA, 2005), o extrato enzimático foi fracionado com sulfato de amônio, na forma de solução saturada de 0-30%. O sobrenadante recuperado por centrifugação a 13000 x g/20 minutos/4°C foi novamente fracionado com sulfato de amônio sólido até 90%, após 6 horas de precipitação a 4 °C e agitação constante a suspensão foi centrifugada a 13000 x g/20 minutos/4°C. Posteriormente o precipitado foi solubilizado em tampão de extração (tampão fosfato 0,01M pH 6,0) e dialisado contra o mesmo tampão até prova negativa de sulfato em solução de cloreto de bário. Em seguida a amostra dialisada (fração protéica) foi aplicada em DEAE-celulose ou armazenada em microtubos a -20°C para análises posteriores.

3.3.3.2 Cromatografia de troca aniônica

Após o fracionamento do extrato enzimático com sulfato de amônio, 500 µL da fração protéica foram eluídos em uma coluna cromatográfica (1,25 x 30 cm) empacotada com resina DEAE-Celulose, previamente tratada e equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M (pH 7,5). As proteínas que não foram adsorvidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio, aproximadamente 2 vezes o volume da coluna (60 mL de tampão de equilíbrio). As proteínas adsorvidas foram eluídas utilizando um gradiente linear de cloreto de sódio na faixa de 0-1,5 M em tampão Tris-HCl 0,05M (pH 7,5). Foram coletadas frações de 2 mL num fluxo de 0,2 mL/min., o perfil de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm e a atividade enzimática, foi medida empregando uma solução de amido 0,1% e substratos específicos para α e β -amilase, como descrito anteriormente. As frações com maior atividade foram reunidas e dialisadas contra água destilada 12 h/4 °C, em seguida liofilizadas e armazenadas a -20 °C, para sua posterior purificação, ou colocada em carboximetil-celulose (CMC).

3.3.3.3 Cromatografia em carboximetilcelulose

A fração ativa proveniente da eluição com DEAE-Celulose foi aplicada em coluna (1,23 x 30 cm) contendo CMC, previamente tratada e equilibrada com tampão Tris-maleato 0,01 M (pH 6,0). Após a eluição do material no retido foi aplicado um gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M em tampão Tris-maleato 0,01 M (pH 6,0), e 2,0 mM de CaCl₂. A eluição foi desenvolvida num fluxo de 0,2 mL/min e foram coletadas frações de 2 mL. O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância em λ_{280} nm. A atividade enzimática foi determinada como descrito anteriormente. As frações que apresentaram maior atividade enzimática foram reunidas e dialisadas contra água destilada por 12 h a 4 °C. Esta fração ativa foi liofilizada e armazenada a -20 °C. Todos os passos de purificação foram acompanhados por eletroforese SDS-PAGE.

3.3.3.4 Cromatografia líquida de alfa eficiência (CLAE)

A fração ativa proveniente da CMC foi aplicada em uma coluna Protein C4 (Vidac) de fase reversa (250 x 4,6 mm; 5 μ m) para CLAE. Os reagentes empregados foram de grau CLAE. A purificação foi realizada em um equipamento marca Shimadzu LCsolution equipado com duas bombas (A e B) modelo LC-20AT, um controlador modelo CBM-20, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20 e um injetor automático SIL-20AC. A fração protéica foi ressuspensa em uma solução A de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA), e foram injetados 50 μ L de amostra na coluna C4 e o material foi eluído com um gradiente de 0 a 100% de solução B (90% de metanol, 0,1% de TFA em água bidestilada), durante 20 minutos com fluxo de 1 mL/min, o procedimento foi repetido duas vezes. Os picos de maior intensidade foram coletados em tubos de plástico e concentrados, posteriormente submetidos à análise por eletroforese SDS-PAGE, SDS-nativo e 2D.

3.3.3.5 Extração fenólica das proteínas de raízes de maca

As proteínas totais da raiz de maca foram extraídas empregando o método descrito por Hajduch et al. (2005) com algumas modificações. Raízes de maca foram trituradas até pó em nitrogênio líquido. A cada 2 g de amostra foram adicionados 5,0 mL de tampão Tris – fenol (pH 8,8) e 5,0 mL de tampão e extração (Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5), 10 mM de EDTA, 0,2 % de 2-mercaptoetanol e 0,9 M de sacarose). O homogenato foi agitado vigorosamente durante 30 min a 4°C e centrifugado a 5000 x g por 15 minutos a 4°C, a fase fenólica foi extraída com uma pipeta Pasteur e a solução reservada. Ao precipitado foi adicionado novamente fenol e tampão de extração para execução de uma nova extração.

As proteínas da fase fenólica foram precipitadas com 5,0 volumes de carbonato de amônio 0,1 M em 100 % de metanol gelado durante 16 h e a -20 °C. O precipitado foi centrifugado a 5000 x g durante 20 minutos e o pellet de proteína foi lavado por duas vezes com 5,0 mL de carbonato de amônio em metanol seguido de acetona 80 % e etanol 70 % ambas as soluções foram mantidas sobre refrigeração. A proteína foi seca e ressuspensa com 1,0 mL de solução de solubilização (8 M de uréia, 2 M tiuréia, 2 % de CHAPS e 50 mM de DTT), e quantificada de acordo com o método de Bradford como descrito anteriormente.

3.3.3.6 Focalização isoeletrica (primeira dimensão)

Na primeira dimensão da eletroforese 2D as proteínas foram separadas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI), através do processo de focalização isoeletrica (IEF), utilizando o sistema Ettan IPGphor III - GE Healthcare. A caracterização das proteínas presentes na amostra foi realizada usando tiras de IPG (*immobilized pH gel*) de 7 cm, com gradiente de pH de 3-10.

As tiras foram reidratadas durante 20 h a temperatura ambiente em equipamento adequado, utilizando alíquotas de 20 a 50 µg de proteínas dissolvidos em 125 µL de tampão (8 M uréia, 2% de CHAPS, 0,5% (v/v) de anfólitos (pH 3-10), 20 mM ditioneitol (DTT) e 0,005% (p/v) de azul de bromofenol). As tiras foram cobertas com óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes e da amostra.

A focalização isoeétrica foi realizada nas condições de temperatura, voltagem e tempo, de acordo com as recomendações do fabricante. Após a focalização isoeétrica, as tiras foram retiradas do equipamento e utilizadas para eletroforese SDS-PAGE ou armazenadas a -20 °C.

3.3.3.7 SDS-PAGE (segunda dimensão)

Após a focalização isoeétrica, as tiras de IPG foram submetidas à segunda dimensão (SDS-PAGE). Inicialmente as tiras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos em solução redutora de equilíbrio (50 mM de Tris-HCl a pH 8,8, 6 M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS, 0,002% de azul de bromofenol e 1% de DTT). Em seguida foram lavadas com água destilada e colocadas por mais 15 minutos em solução de alquilação (50 mM de Tris-HCl a pH 8,8, 6 M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS, 0,002% de azul de bromofenol e 2,5% de iodoacetamida (IAA)).

A eletroforese da segunda dimensão foi realizada em géis verticais homogêneos de 15 ou 12% de poliacrilamida, conforme descrito por Laemmli (1970). Depois de equilibradas, reduzidas e alquiladas, as tiras foram inseridas no topo do gel de acrilamida e fixadas com uma solução de agarose 0,5% (p/v) solubilizada em tampão de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina e 0,1% (p/v) SDS). A separação eletroforética das proteínas foi realizada a 4°C. Em cada corrida eletroforética foi empregado um padrão de massa molecular e o gel foi revelado com prata ou Coomassie Brilliant Blue.

3.3.3.8 Detecção de proteínas (spots ou bandas)

As proteínas separadas nos géis de acrilamida foram visualizadas através da coloração por Coomassie Brilliant Blue G250, realizada segundo o protocolo de Candiano et al. (2004), modificado. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, conforme descrito a seguir. Os géis foram colocados em uma solução fixadora (40% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético) durante 60 minutos, posteriormente foram lavados duas vezes com água destilada

deionizada por 10 minutos e mantidos por 12 h em solução de coloração (0,1% (p/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 2% (v/v) ácido orto-fosfórico, 10% (p/v) sulfato de amônio e 20% (v/v) metanol). Depois de corados os géis foram lavados com 1% (v/v) ácido acético até a eliminação completa do corante excedente. O gel corado foi então armazenado em solução contendo 15% de sulfato de amônio.

3.3.3.9 Digestão das proteínas

As frações coletadas dos picos por CLAE foram concentradas e realizada as eletroforeses bidimensional e unidimensional em géis de poliacrilamida 15%. Os géis foram digitalizados e as imagens obtidas por meio do equipamento ImageScanner III, LabScan 6.0 (GE Healthcare). As análises dos géis foram realizadas pelo software ImageMaster 2D Platinum versão 6.0 (GE-Healthcare). A detecção das massas moleculares (MW) e pI experimentais da enzima isolada foram determinados automaticamente pelo programa a partir de alguns pontos de referência anotados manualmente. Os *spots* selecionados no caso da eletroforese bidimensional, e as bandas da eletroforese unidimensional, foram cortados e submetidos à metodologia de digestão de proteínas conforme proposto por Celedon et al. (2007).

A região do gel contendo as proteínas (*spot* ou banda) foi extraída de cada uma das repetições do gel com o auxílio de um bisturi, cortadas em segmentos de aproximadamente 1 mm³, colocados em tubos eppendorf e imersos em solução de descoloração (50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) três vezes por cerca de 30 min. Em seguida o gel foi desidratado duas vezes com 100% (v/v) ACN por 10 min. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente do gel deixado evaporar a temperatura ambiente.

Os fragmentos de gel foram reidratados e reduzidos em DTT (20 mM DTT / 50 mM AMBIC) a 56 °C por 40 min e alquilados com iodoacetamida (55 mM IAA / 50 mM AMBIC) no escuro por 30 min. A iodoacetamida foi removida e os fragmentos lavados em 25 mM AMBIC e posteriormente desidratados em 100% ACN. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente do gel deixado evaporar a temperatura ambiente.

Os fragmentos de gel foram reidratados com 15 μ l de solução contendo 150 ng de tripsina (Promega V528A) em 25 mM de AMBIC. Após 15 min adicionou-se 25 mM de AMBIC até completa cobertura dos *spots*. A digestão foi realizada a 37 °C por no máximo 14 horas. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de solução bloqueadora (50% v/v ACN e 5% v/v ácido fórmico).

Após a digestão enzimática o líquido excedente foi transferido para novo tubo. Para a eluição dos peptídeos da acrilamida os fragmentos de gel foram submetidos a três lavagens de 15 min com solução de eluição (50% v/v ACN e 1% v/v ácido fórmico) e duas lavagens com 100% ACN a 40 °C sob sonicação. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida à secagem em um concentrador à temperatura ambiente. Após a secagem os peptídeos foram ressuspensos em 10 μ l de 1% (v/v) ácido fórmico, para posterior análise e identificação por espectrometria de massas.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Fracionamento com sulfato de amônio e purificação por cromatografia de troca iônica

O fracionamento de proteínas com sulfato de amônio é um processo que tem sido utilizado com frequência como uma etapa importante na purificação de muitas enzimas. Alguns pesquisadores usaram esta etapa para a purificação de β -amilase de grãos de milho germinado, de um inibidor de α -amilase de grãos de arroz, e β -amilase de folhas de batata (YAMASAKI, 2003; IUKEY et al, 2000; VIKSO-NIELSEN et al, 1997). Neste trabalho, a precipitação fracionada com sulfato de amônio (30-90%) permitiu eliminar 37% dos interferentes presentes no EB, obtendo 63% de rendimento em relação ao conteúdo inicial de proteínas, o rendimento da atividade amilolítica foi de 84,4% e 68% para β -amilase (Tabela 6).

Na cromatografia com DEAE-celulose não foi possível separar as proteínas contaminantes da preparação, pois estas não foram adsorvidas na resina, mas, ainda assim, foi uma etapa considerada importante na qual foi possível eliminar alguns interferentes (Figura 31) e a obtenção de frações protéicas mais límpidas. Após a eluição das frações com atividade foi colocado o gradiente de concentração de NaCl, comprovando que a fração ativa fora eluída em tampão inicial. As frações foram reunidas (pool) e a atividade amilolítica foi quantificada, resultando em 8,57 U e representando um rendimento de 69,2% em relação à atividade inicial do EB, a atividade de α -amilase não foi possível ser identificada, provavelmente devido a uma inibição ou devido a perda de durante o processo de eluição. O pool foi dialisado, concentrado por liofilização e ressuscitado em tampão fosfato para posterior eluição em CMC (Figura 32), após a eluição, as frações com atividade foram reunidas e o pool apresentou atividade amilolítica de 6,78 com um rendimento de 54,7% em relação à atividade inicial. Nesta etapa de purificação foi possível purificar 11,57 vezes em relação à atividade amilolítica e 6,14 vezes com respeito à β -amilase (Tabela 6). Vale ressaltar que em todas as etapas de purificação foram empregados substratos específicos tanto para α como para β -amilase.

Tabela 6 - Purificação parcial de amilases em extratos de maca, após cromatografia de troca iônica. Para a eluição em DEAE foi empregado tampão Tris-HCl 0,1M (pH 7,5) e um gradiente de NaCl de 0 a 1 M e CMC tampão Tris-Maleato 0,1M (pH 6) e um gradiente de NaCl entre 0 a 1 M e 2,0 mM de CaCl₂.

Processo	Proteína (mg)	Atividade total (U)			Atividade específica (U/mg prot.)			Rendimento (%)				Fator de purificação			
		A.A	α -A	β -A	A.A	α -A	β -A	P	A.A	α -A	β -A	P	A. A.	α -A	β -A
E.B.	29,7	247,6	144,6	606,8	8,34	4,87	20,43	100,00	100,00	100,00	100,00	1,00	1,00	1,00	1,00
30-90%	18,9	209,0	17,4	413,4	11,06	0,92	21,87	63,75	84,41	12,03	68,13	1,57	1,32	5,30	1,07
DEAE	10,2	171,4	---	311,0	16,80	---	30,49	34,54	69,22	---	51,25	2,09	2,00	---	1,48
CMC	1,5	135,6	---	176,6	90,40	---	117,60	4,73	54,77	---	29,07	21,17	11,57	---	6,14

EB: Extrato enzimático; A.A: atividade amilásica; A: amilase; P: proteína.

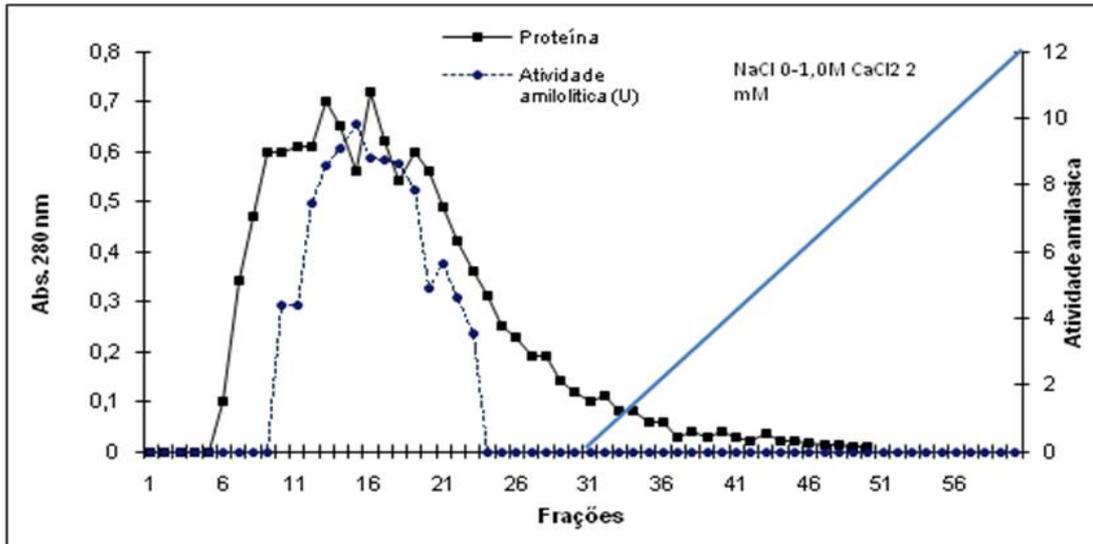


Figura 31 – Cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose) da fração 30-90% de sulfato de amônio a partir de extrato de maca com 4 dias após a colheita, eluída com gradiente de 0-1,0 M de NaCl. A atividade amilolítica total foi determinada pelo método iodométrico, empregando amido 0,1% (1U de atividade corresponde a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 200 nMol de amido em 15 minutos a 30 °C em 50 µL de amostra). As frações com atividade foram reunidas.

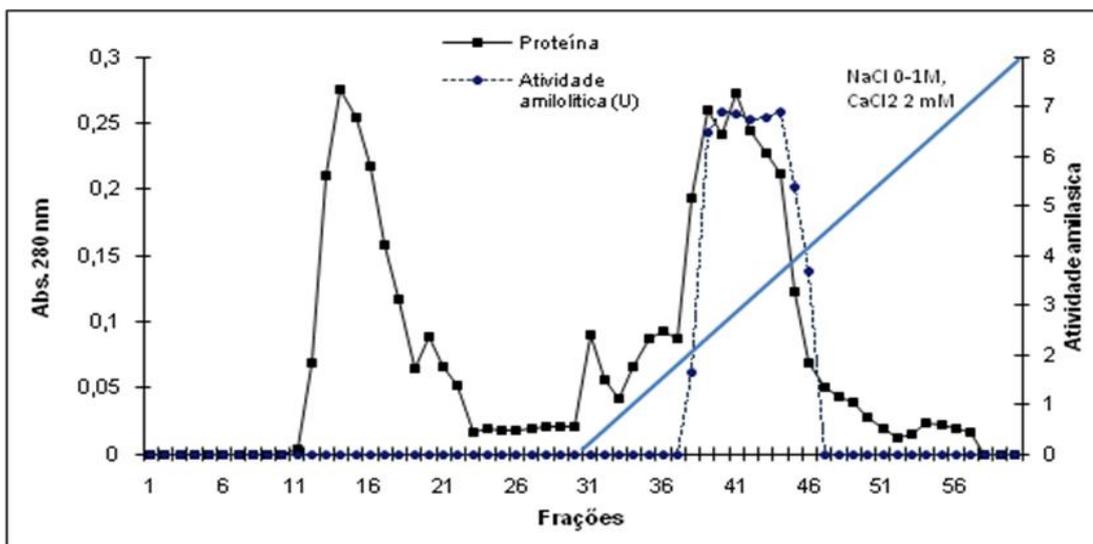


Figura 32 - Cromatografia de troca iônica (CMC) da fração DEAE-celulose, eluída em tampão Tris-maleato 0,1M (pH 6,0) e com gradiente de 0-1,0 M de NaCl e 2,0 mM de CaCl₂. A atividade amilolítica total foi determinada pelo método iodométrico, empregando amido 0,1% (1U de atividade corresponde a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 200 nMol de amido em 15 minutos a 30 °C em 50 µL de amostra).

A Figura 33 demonstra o perfil protéico de todas as etapas de purificação, o EB apresenta uma diversidade de bandas com diferentes pesos moleculares entre 10 a 120 kDa. No gel

podemos observar uma banda com maior intensidade (A), a qual foi separada por CMC, e apresentou atividade amilolítica e atividade β -amilásica. Esta fração obtida foi dialisada, concentrada e eluída numa coluna C4 de fase reversa para monitorar a pureza da proteína parcialmente purificada.

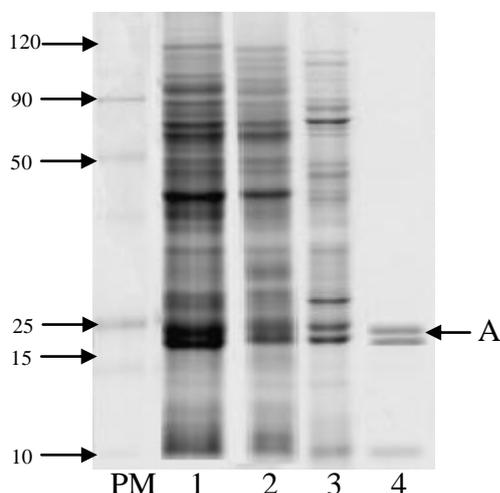


Figura 33 – Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (15%) referente às etapas de purificação. O gel foi corado com prata, foram colocados 8 μ g de proteína por amostra. 1) EB; 2) 30-90% de sulfato de amônio; 3) pool de DEAE-Celulose e 4) Pool de CMC.

Na literatura, Roy e Hedge (1985) aplicaram um método cromatográfico rápido e simples para a purificação de β -amilase de batata doce (*Ipomea batata*): após o fracionamento do extrato bruto com sulfato de amônio a 40-60% de saturação, os autores realizaram a cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50, em tampão fosfato 25 mM (pH 8,0) contendo 2 mM 2-mercaptoetanol. A eluição foi realizada através de um gradiente de NaCl de 0-0,5M. Para uma melhor purificação, a amostra obtida foi recromatografada na mesma coluna regenerada. Esse procedimento permitiu a obtenção de uma β -amilase pura em gel de eletroforese, sem contaminação de α -amilase, α -glicosidase, amiloglicosidase nem fosfatase, enzimas normalmente presentes nestes extratos.

MacGregor et al. (1971) descreveram métodos de separação de formas ativas de amilases, presentes no malte de cevada, através de cromatografia de troca iônica em CMC, empregando gradiente de eluição. As enzimas α - e β -amilase foram separadas uma da outra e cada enzima apareceu em duas formas diferentes, duas para α -amilase e duas para β -amilase. Essa separação foi dependente do gradiente salino aplicado, sendo a eluição de uma das α -amilases foi em alta concentração de NaCl.

3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A fração protéica coletada da CMC e eluída na coluna C4 de fase reversa resultou na eluição de 3 picos (P1, P2, P3) (Figura 34). Foram coletadas as frações destes picos, medida a atividade e então submetidos à eletroforese SDS-PAGE, SDS sem a adição de β -mercaptoetanol (agente redutor) e eletroforese bidimensional. As frações coletadas, no entanto, não apresentaram atividade enzimática, provavelmente foi inativada pela ação do ácido TFA. Mesmo assim foram realizadas as eletroforeses para permitir a visualização do perfil protéico da enzima.

A Figura 35 representa o perfil protéico dos picos coletados por CLAE, no gel o P₁ não apresentou bandas, enquanto o P2(2) e P3(3) apresentaram duas bandas, com peso molecular entre 20 kDa e 10 kDa, para ambos os picos, resultando em uma boa separação. Esta separação por CLAE poderia indicar uma possível isoforma da proteína parcialmente purificada em CMC. Entretanto é prematuro admitir esta hipótese como correta, visto que as frações perderam atividade enzimática. Outro dado interessante desta proteína é a possível ligação de ponte di-sulfeto, já que, conforme pode ser observado na eletroforese a proteína apresentou apenas uma banda quando não foi adicionado o agente redutor β -mercaptoetanol como pode ser observado para as amostras P2(4) e P3(5).

A cromatografia líquida de fase reversa tem sido uma ferramenta importante para a separação das duas bandas mostradas no gel de CMC. Como estas proteínas apresentavam massas moleculares muito próximas a elevada resolução deste método permite separar polipeptídios de seqüências semelhantes tanto de pequenos peptídeos quanto de grandes proteínas e, até mesmo, polipeptídios que diferem entre si por apenas um resíduo de aminoácido (RIVIER; MCCLINTOCK, 1983).

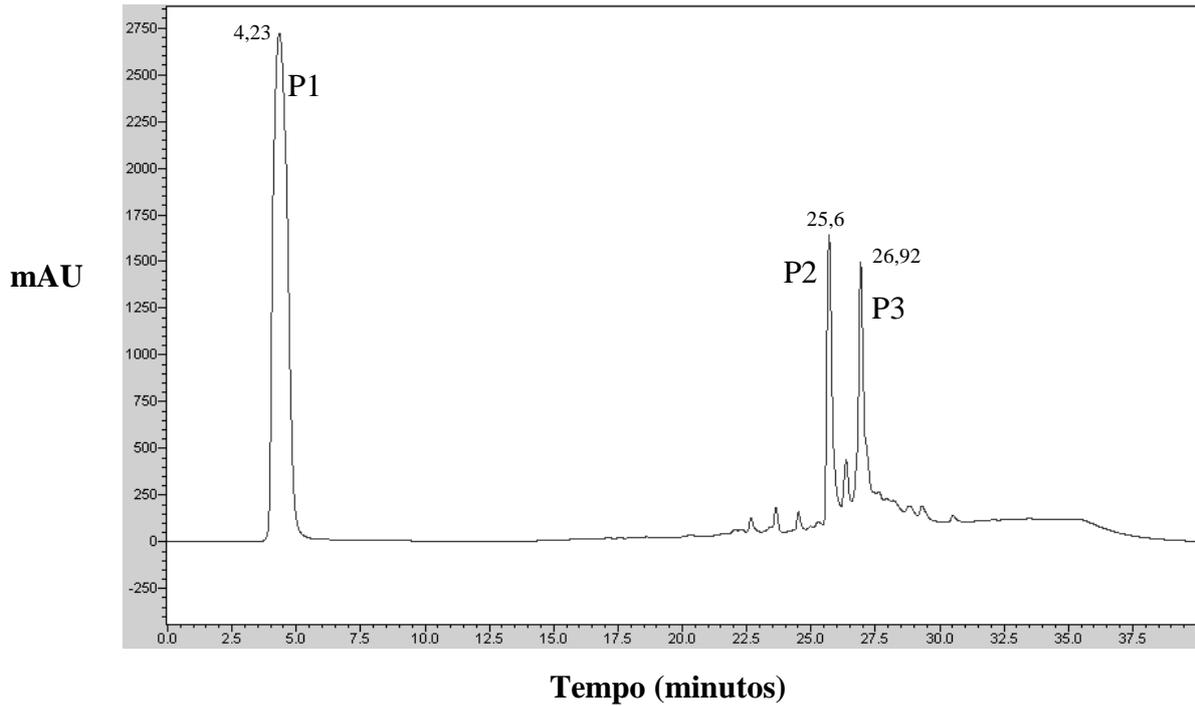


Figura 34 – Perfil cromatográfico, obtido após eluição do pool protéico da CMC (com atividade amilolítica e β -amilásica), foi empregada uma coluna C4 de fase reversa (250 x 4,6 mm; 5 μ m) para CLAE. A fração ativa foi ressuspensa em solução A (ácido TFA 0,1%), foram injetados 50 μ L de amostra e o material foi eluído com um gradiente de 0 a 100% de solução B (90% de metanol, 0,1% de ácido TFA em água mQ), durante 20 minutos com fluxo de 1 mL/min.

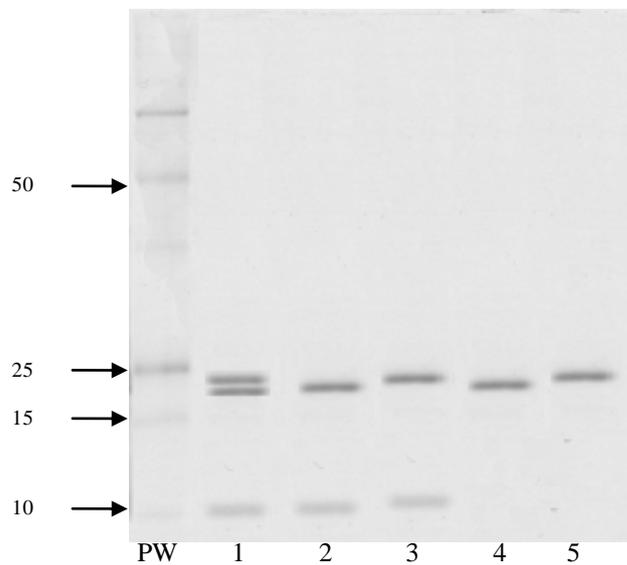


Figura 35- Eletroforese SDS-PAGE e SDS-sem agente redutor em 15% de poliacrilamida, obtida com os picos coletados por CLAE. 1) Pool de CMC; 2-3) P2 e P3 desnatados com agente redutor e 4-5) P2 e P3 sem a adição do agente redutor. O gel foi corado com prata.

3.4.3 Eletroforese bidimensional

Com o objetivo de comparar diferentes comportamentos protéicos e, obter melhores dados para a caracterização da proteína purificada, foi analisado o mapa protéico da raiz liofilizada da maca. Na Figura 36 podemos observar o gel representativo do mapa protéico da raiz de maca, no gel bidimensional pode-se observar uma separação das proteínas (spots) de acordo com seu ponto isoelétrico e massa molecular. O gel unidimensional fornece poucas informações sobre as frações protéicas que representam a raiz de maca, entretanto quando esta mesma amostra é submetida à eletroforese 2D podemos observa uma separação detalhada dos vários spots protéicos que compõem cada uma das frações analisadas.

No gel 2D quando foi utilizado um gradiente de pH de 3-10 observa-se a presença de várias proteínas distribuídas em um amplo espectro de ponto isoelétrico e pesos moleculares (Figura 36). No entanto, houve maior concentração de *spots* com pI entre 4 a 7 e massa molecular entre 15 a 100 kDa. Há, ainda, uma fração protéica com maior intensidade entre pI de 4 a 7 e massa molecular entre 15 a 25 kDa (círculo preto), a qual poderia corresponder à proteína separada na CMC. Para aumentar a resolução deste conjunto de proteínas, foi empregado um gradiente de pH de 4 a 7, o qual permitiu melhor separação dos spots (círculo preto), devido ao predomínio destas proteínas. Nesta faixa de pH também foi possível visualizar um conjunto de spots em torno de 10 kDa (circulo azul).

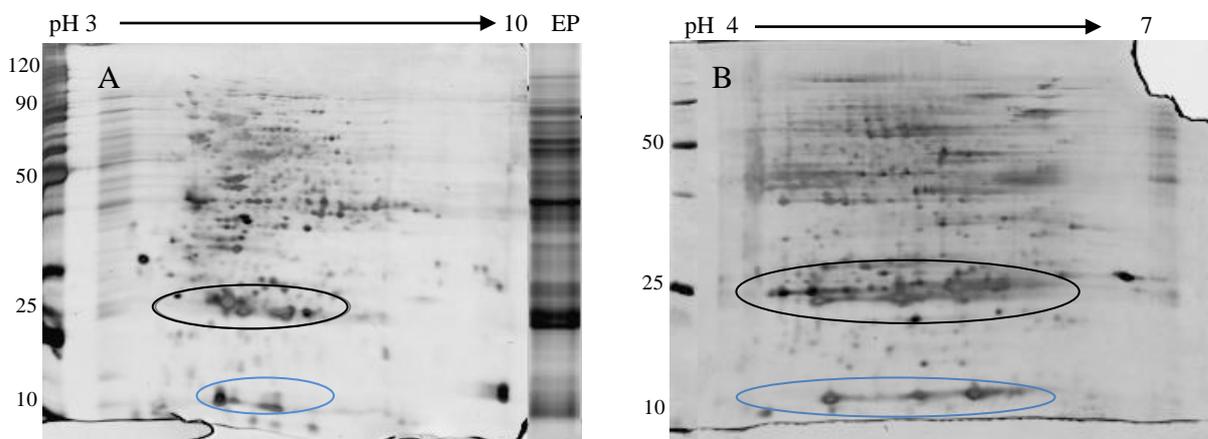


Figura 36- Gel bidimensional das proteínas totais obtidas da raiz de maca. (A) As proteínas foram separadas em gel de 12% de poliacrilamida empregando tiras de IPG com gradiente de pH entre 3 a 10. EP) Extrato protéico. (B) Gel com 12% de poliacrilamida empregando tiras de IPG com gradiente de pH entre 4 a 7. Ambos os géis foram corados com prata.

Esta análise proteômica do gel obtido pela eletroforese 2D, permitiu a separação adequada do conjunto de proteínas totais e compará-lo com os perfis protéicos das eletroforeses 2D das frações coletadas por CLAE (Figura 37). O perfil protéico do P3 (Figura 37A) apresenta dois conjuntos de *spots* distribuídos no gel: no primeiro conjunto foram identificados 10 *spots* com MW na faixa de 22 a 27 kDa e com pI entre 4,6 a 6,3 e o outro conjunto de proteínas foram 4 *spots* com MW entre 14 e 15 kDa e pI entre 5,3 e 6,2 (Tabela 2). Este perfil protéico é semelhante ao observado no gel 2D (Figura 36) os quais se encontram assinalados em círculos (Figura 36 preto e azul). A eletroforese 2D do P2 apresentou um perfil semelhante ao P3 (Figura 37B e Tabela 7), este conjunto de dados poderia indicar uma possível isoforma da proteína isolada, mas deverão ser confirmados com o sequenciamento destes *spots* que estão em andamento.

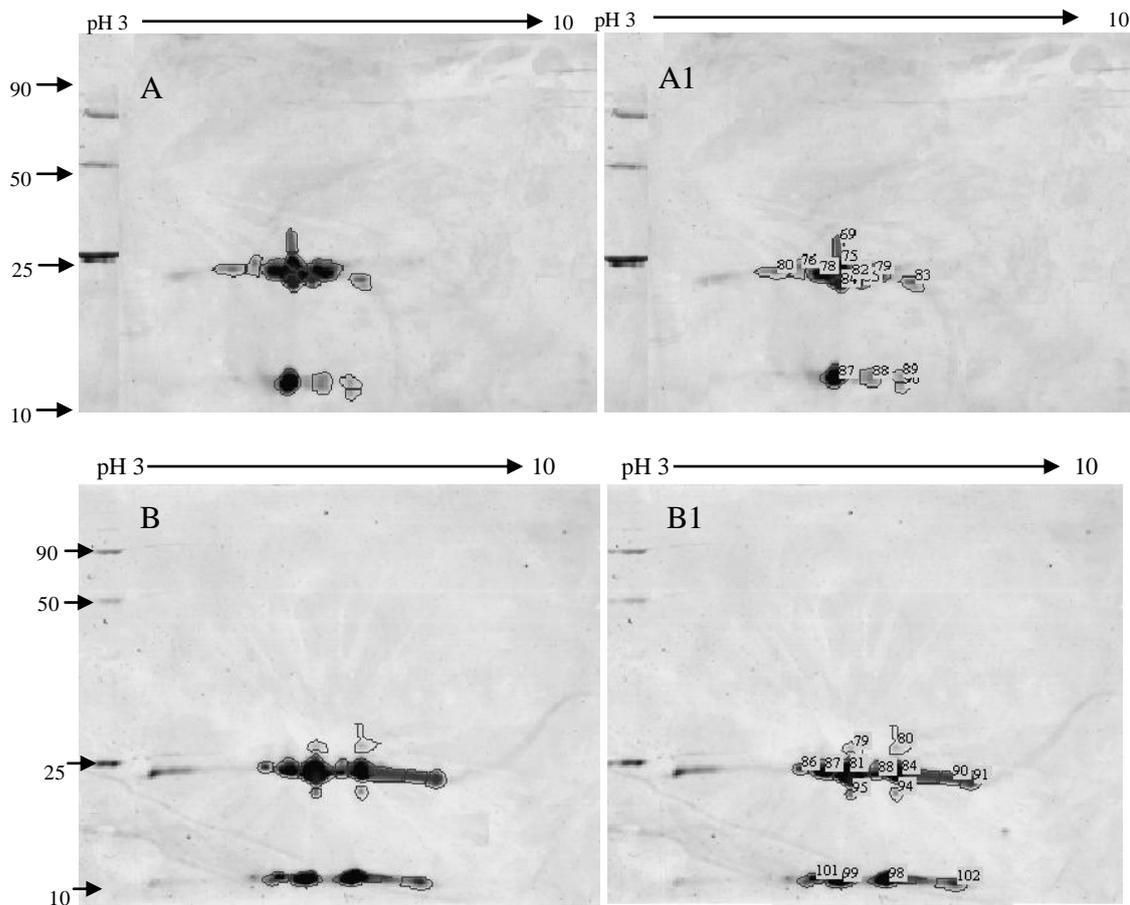


Figura 37 - Gel bidimensional (15% de poliacrilamida) de proteínas fracionadas por CLAE, coradas com prata. (A, A1) pico 3; (B, B1) pico 2.

Tabela 7 – *Spots* identificados de acordo a seu pI e massa molecular dos picos 3 e 2 coletados por CLAE.

Pico 3			Pico 2		
Spots	pI	MW	Spots	pI	MW
69	5,41	27	79	5,55	27
75	5,43	25	80	6,21	27
76	4,88	24	81	5,50	24
78	5,15	23	84	6,26	24
79	5,86	23	86	4,80	24
80	4,60	24	87	5,14	24
82	5,58	23	88	5,92	24
83	6,39	23	90	7,02	23
84	5,43	22	91	7,33	23
85	5,72	22	94	6,21	22
			95	5,53	22
Segundo grupo de spots			Segundo grupo de spots		
87	5,38	14	98	6,08	15
88	5,84	14	99	5,40	15
89	6,22	15	101	5,01	15
90	6,24	14	102	7,07	15

3.4.4 Identificação das bandas para o seqüenciamento

A técnica empregada para a revelação dos géis deve ser reprodutível e de alta sensibilidade, permitindo a visualização do maior número possível de proteínas e ao mesmo tempo ser compatível com o método de identificação usado na espectrometria de massas (MS) (CANDIANO ET AL., 2004).

O método usado para a coloração dos géis unidimensionais, das amostras coletadas da CLAE foi o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, a qual é reprodutível e compatível com a

identificação por MS. Segundo CANDIANO et al. (2004), o método apresenta uma sensibilidade que permite detectar proteínas de até 1 ng.

Para a remoção das bandas do gel de poliacrilamida, inicialmente foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE com várias repetições (Figura 38), as bandas selecionadas foram removidas do gel e juntadas em um único tubo para a reação, aumentando deste modo a possibilidade de aumentar a concentração protéica para permitir a identificação por espectrometria de massas.

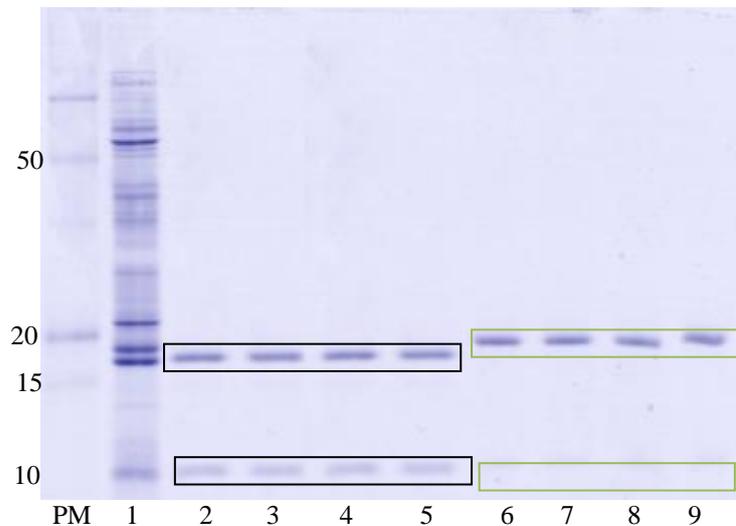


Figura 38 – Eletroforese SDS-PAGE em 15% de poliacrilamida, dos picos coletados por CLAE. 1) 30 – 90% sulfato de amônio; 2-5) P2; 6-9) P3. O gel foi corado com Commassie Blue G-250. As elipses indicam as bandas que foram removidas e juntadas em um único tubo para a digestão.

3.5 CONCLUSÕES

- Entre as enzimas amilolíticas de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) foi possível isolar uma fração protéica com atividade β -amilásica;
- A fração protéica isolada pode conter duas isoformas constituintes da β -amilase;
- Na eletroforese bidimensional das proteínas isoladas foram identificadas varias subunidades protéicas com massas moleculares semelhantes, as quais diferem somente no pI.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL, C. J. et al. Changes in biochemical constituents and induction of early sprouting by triadimefon treatment in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) tubers during storage. Jaleel et al. *J Zhejiang Univ Sci B*, v.8, n.4, p.283-288, 2007.

AGUANBIADE, S. O.; LONGE, O. G. The physico-functional characteristics of starches from cowpea (*Vigna unguiculata*), pigeon pea (*Cajanus cajan*) and yambean (*Sphenostylis stenocarpa*). **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 469 – 474, 1999.

AHAMED, N.T. et al. Studies on *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus paniculatas* starch as biodegradable fillers in LDPE films. **Carbohydrate Polymers**, v.31, p.157-160, 1996.

ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1161-1166, 2006.

APINANA, S. et al. Visual Observation of Hydrolyzed Potato Starch Granules by α -Amylase with Confocal Laser Scanning Microscopy. **Starch/Stärke**, v. 59, p. 543–548, 2007.

AREAS, J. A. G., LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: I-The phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. **Journal of Food Biochemistry**, v.5, p.19-37, 1981.

ARPENTIER, S. C. et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p.2497-2507, 2005.

ASCHERI, J. R. L.; RAMÍREZ-ASQUIERI, E.; CARVALHO, C. W. P. Elaboración de harina integral instantánea de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) por extrusión termoplástica. **Revista Alimentaria**, v.292, n.5, p.93-98, maio, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the AOAC. 15^a, Arlington, USA, v.2, p.1095-1098, 1998.

BARKER, D. J.; KEATINGE, J. D. H. ASIEDU, R. Yam dormancy: potential mechanisms for its manipulation. **Tropical Science**, v. 39, p. 168-177, 1999.

BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 95-117, 1989.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. Química de los Alimentos. Segunda edición. Editora Acríbia, S. A. Zaragoza – España, 1997, 1088p.

BEMMILLER, J.N., WHISTLER, R.L. CARBOHYDRATES. In. Fennema, O.R. **Food Chemistry**, 3a ed., Marcel Dekker, New York, USA, 1996, 1069p.

BERNFELD, P. Enzymes of starch degradation and synthesis. **Advances in Enzymology**, v. 12, p. 379-428, 1951.

BETANCUR-ANCONA, D. A., et al. Physicochemical and functional characterization of baby lima bean (*Phaseolus lunatus*) starch. **Starch/Stärke**, v. 53, p. 219-226, 2001.

BILIADERIS, C. G. et al. Thermal characterization of rice starches: a polymeric approach to phase transitions of granular starch. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.34, p. 6-14, 1986

BILIADERIS, C. G.; TONOGAI, J. R. Influence of lipids on the thermal and mechanical properties of concentrated starch gels. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 39, p. 833-840, 1991.

BULÉON, A. et al. Mini review. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CÁNOVAS, F.M. et al. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, p. 285-298, 2004.

CARPENTIER, S.C. et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CELEDON, P. A. F. et al. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, v. 7, p. 2258–2274, 2007.

CEREDA, M. P. Propriedades Gerais do Amido. In: Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, São Paulo: Fundação Cargill, v. 4, cap. 1, p. 13-20, 2002.

CHARLES, L. A. et al. Influence of amylopectin structure and amylose content on the gelling properties of five cultivars of Cassava starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2717-2725, 2005.

CHAUHAN, G.S.; ESKIN, .N.A.M.; TKACHUK, R. Nutrients and antinutrients in quinoa seed. **Cereal Chemistry**, v.69, n.1, p.85-88, 1992.

CÍCERO, A. F. G., BANDIERI, E., ARLETTI, R. *Lepidium meyenii* Walp. Improves sexual behavior in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 225-229, 2001.

DAISUKE, T.; MOTOKI, K. Analytical method for detection of β -mylase isozymes in dehydrated cucumber cotyledons by using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 365, p. 277–279, 2007.

DAS, G., SEN-MANDI, S. Scutellar amylase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. **Annals of Botany**, v. 69, p. 497-501, 1992.

DAUSSANT, J. et al. Cereal β -amylase: immunochemical study on two enzyme-descent inbred lines of rye. **Planta**, v. 151, p. 176-179, 1981.

DINI, A. Chemical composition of *L. meyenii*. **Food Chemistry**, v. 49, p. 347–349(1994).

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1959.

ELIASSON, A. C., RYANG, H.K. Changes in rheological properties of hydroxipropyl potato starch paste during freeze-thaw treatments. **Journal Texture Studies**, v. 23, p. 279-296, 1992.

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

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

EVANS, I. D.; HAISMAN, D. R. Rheological of gelatinized starch suspensions. **Journal of Texture Studies**, 28, 253–257, 1997.

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 5–51, 2001.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 172-177, 1994.

FLORES, H. E. et al. Andean root and tuber crops: Underground rainbows. **Hortiscience**, 38(2), 161–167, 2003.

FRANCO, C.M. L. et al. Propriedades gerais do amido /[Coordenadora: Marney Pascoli Cereda] – Campinas: Fundação Cargill, 2001, v. 1, p.:i1 – **Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**.

FRENCH, D. Chemical and biochemistry of starch. In: WHELAN, W. L. **Biochemistry: chemistry of carbohydrates**. London: Academic Press, v. 5, p. 269 – 326, 1975.

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 1048-1061, 1973.

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

GANA, J.A. et al. Expression of β -amylase from alfalfa taproots. **Plant Physiology**, v.118, p. 1495-1505, 1998.

GANZERA, M. et al. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 7, p. 988–991, 2002.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology** (2nd ed.). London: MacMillan Press Ltd. p. 341–35, 1996.

GONZALES G. F. et al., Cordova A., Gonzales C., Chung A., Vega, K., Villena, A. (2001). *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men, *Asian Journal of Andrology*. 3, 301 – 303.

GONZALES, C. et al. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 103, 448–454, 2006.

GONZALES, G. F. et al. *Lepidium meyenii* (maca) improved semen parameters in adult men. **Asian Journal of Andrology**, v. 3, p. 301–304, 2001a.

GUNARATNE, A.; HOOVER, R. Effect of heat moisture on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. **Carbohydrate Polymers**, v.49, p.425-437, 2002.

GUPTA, R. et al. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, p. 1- 18, 2003.

HAJDUCH, M. et al. A Systematic Proteomic Study of Seed Filling in Soybean. Establishment of High-Resolution Two-Dimensional Reference Maps, Expression Profiles, and an Interactive Proteome Database. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1397-1419, 2005.

HAMES, B. D. One dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. In: HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2.ed. Oxford University, p. 1-147, 1990

HARIPRAKASH, C. S.; NAMBISAN, B. Carbohydrate Metabolism during ormancy and Sprouting in Yam (*Dioscorea*) Tubers: Changes in Carbohydrate Constituents in Yam (*Dioscorea*) Tubers during Dormancy and Sprouting. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 3066-3069, 1996.

HERNANDEZ-MEDINA, M. et al. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 28, n. 3, p. 718-726, 2008.

HINRICHS, R.; GOTZ, J.; WEISSER, H. Water-holding capacity and structure of hydrocolloid-gels, WPC-gels and yogurts characterized by means NMR. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 234-237, 2003.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physico–chemical properties of tuber and root starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 253–267, 2001.

HUANG, J. et al. Physicochemical properties and amylopectin chain profiles of cowpea, chickpea and yellow pea starches. **Food chemistry**, v. 101, p. 1338-1345, 2007.

IKEDI OBI, C. O.; OTI, E. Some biochemical changes associated with post harvest storage of yam (*Dioscorea rotundata*) tubers. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 34, p. 1123–1130, 1983.

IMBERTY, A. et al. Recent Advances in knowledge of starch structure. **Starch/Stärke**, v. 43, n. 10, p. 375-384, 1991.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.1, 533p.,1985.

JACOBS, H. DELCOUR, J. A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46. n. 8, p. 2895-2905, 1998.

JACOBSEN, S.E.; MUJICA, A.; ORTIZ, R. The global potential for quinoa and other andean crops. **Food Reviews International**, v.19, n.1-2, p.139-148, 2003.

JAYAKODY, J. A. L. P. **The effect of acid hydrolysis on granular morphology and physicochemical properties of native cereal starch granules**. Newfoundland. Canada, 2001. 141p. Thesis (master of science). Department of biochemistry. Memorial University of Newfoundland, 2001.

JAYAKODY, L. et al. Studies on tuber starches. II molecular structure, composition and physicochemical properties of yam (*Dioscorea sp*) starches grow in Sri Lanka. **Carbohydrate Polymer**, v. 69, n. 1, p. 148 – 163, 2007.

JENKINS, P. J.; DONALD A. M. The influence of amylose on starch granule structure. **International Journal of biological macromolecules**, v. 17, n. 6, p. 315-321, 1995.

KALVIAINEM, N.; ROININEN K.; TUTORILA, H. Sensory characterization of texture and flavor of high viscosity gels made with different thickeners. **Journal of Texture Studies**, v. 31, n. 4, p. 407 – 420, 2000.

KAPLAN, F.; SUNG, D. Y. GUY, C. L. Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiology Plantarum*, v. 126, p. 120-128, 2006.

KAR, A. et al. Influence of Lipid extraction process on the rheological characteristics, swelling power, and granule size of rice starches in excess water. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 8259-8264, 2005.

KARRER, E. E.; LITTS, J. C.; RODRIGUEZ, R. L. Differential expression of α -amylase genes in germinating rice and barley seed. **Plant Molecular Biology**, v. 16, p. 797-805, 1991.

KAUR, L.; SINGH, N., SHODI, N. S. Some properties of potato and their starches. II. Morphological, thermal and rheological properties of starches. **Food Chemistry**, v. 79, p. 183-192, 2002.

KIM, J.H.; MAEDA, T.; MORITA, N. Effect of fungal α -amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours. **Food Research International**, v. 39, p. 117-126, 2006.

KISLENKO, V., OLIYNYK, L., GOLACHOWSKI, A. The model of the rheological behavior of gelatinized starch at low concentrations. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 294, p. 79-86, 2006.

KOHNO, A., NANMORI, T., SHINKE, R. Purification of β -amylase from alfafa (*Medicago sativa* L.) seeds. **Journal of Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 231-233, 1989.

LACERDA, L. G. et al. Thermal behavior of corn starch granules under action of fungal α -amilase. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, p. 445-449, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 1, p. 680-685, 1970.

LAJOLO. F. M.; MENEZES, E. W. **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. São Paulo: universidade de são Paulo, 648p., 2006.

LEACH, H. W.; MCCOWEN, L. D., SCHOCH, T. J. Structure of the starch granule. Swelling and solubility patterns of various patterns of various starches. **Cereal Chemistry**, v. 36, p. 534-544, 1959.

LI, J. H. et al. Starch from hull-less barley: V. In vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidases. **Food Chemistry**, v.84, p. 621-632, 2004.

LI, J.; BERKE, T. G.; GLOVER, D. V. Variation for thermal properties of starch in tropical maize germplasm. **Cereal Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 87-90, 1994.

LII, C. Y.; TSAI, M. L.; TSENG, K. H. Effect of amylose content of the rheological properties of rice starch. **Cereal Chemistry**, v. 73, p. 415-420, 1996.

LEONEL, M.; CEREDA, P. M. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2002.

LINDEBOOM, N.; CHANG, R. P.; TYLER, R. T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch/Stärke**, v. 56, p. 89-99, 2004.

LU, T. J. et al. Maize starch fine structures affected by ear developmental temperature. **Carbohydrate Research**, v. 282, p. 157-170, 1996.

MACGREGOR, A. W., LABERGE, D. E., MEREDITH, W. O. S. Separation of α -amylase and β -amylase enzymes from barley malt by ion-exchange chromatography. **Cereal Chemistry**, v. 48, p.490 - 498, 1971.

MADHUSUDHAN, B., SUSHEELEMMMA, N. S., THARANATHAN, R. N. Studies on sweet potato. Part II: isolation and characterization of starch. **Starch/Stärke**, v. 44, p. 163-166, 1992.

MALI, S. et al. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p. 379-386, 2002.

MAMO, G., GESSESSE, A. Purification and characterization of two raw starch-digesting thermostable alpha-amylase from thermophilic Bacillus. **Enzyme and microbial technology**, v. 25, p. 433-438, 1999.

MANO, J.F.; KONIAROVA, D.; REIS, R.L. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. **Journal of Material Science**, v.14, p.127-135, 2003.

MATSUGUMA, L. S. **Caracterização do amido de mandioca salsa (*Arracacia xanthoriza*) nativo e modificado por oxidação**. Ponta grossa, 112p. Tese de Mestrado em ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Ponta Grossa, 2006.

MC KNIGHT, I.; MAZZIEIRO, G. Aplicação das enzimas amilolíticas em panificação. **Higiene Alimentar**, v.14, n.72, p.35 – 45, 2000.

MCCLEARY, B. V., CODD, R. Measurement of β -amylase in cereal flours and commercial enzyme preparation. **Journal of Cereal Science**, v.9, p.17-33, 1989.

MCCLEARY, B. V., SHEEHAN, H. Measurement of α -amylase: A new assay procedure. **Journal of Cereal Science**, v. 6, p. 237-251, 1987.

MILES, M. J. et al. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. **Carbohydrate Research**, v. 135, p. 271–278, 1985.

MITIDIERI, S. et al. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217-1224, 2006.

MIZUKAMI, H.; TAKEDA, Y.; HIZUKIRI, S. The structure of the hot-water soluble components in the starch granules of new Japanese rice cultivars. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 4, p. 329-335, 1999.

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Caracterização de propriedades mecânicas e óticas de biofilmes à base de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo usando uma metodologia de superfície-resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p.294-301, 1999.

MOORTHY, N. S. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: A Review. **Starch/Stärke**, v. 54, p. 559-592, 2002.

MORRISON, W.; LAIGNELET, L. An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. **Journal of Cereal Science**, v. 1, p. 19–35, 1983.

MUA, J. P.; JACKSON, D. S. Relationships between functional attributes and molecular structures of amylose and amylopectin fractions of corn starch. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 3848-3854, 1997.

MURALIKRISHNA, G. NIRMALA, M. Cereal α -amylase-an overview. **Carbohydrate polymers**, p.1-11, 2005.

NATARAJAN, S. et al. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 342, p. 214-220, 2005.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 770-778, 1995.

NIRMALA, M.; MURALIKRISHNA, G. Three α -amylases from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15)—purification and partial characterization. **Phytochemistry**, v. 62, p. 21–30, 2003.

NODA, T.; KOBAYAS, T.; SUDA, I. Effect of soil and temperature on starch properties of sweet potatoes. **Carbohydrate Polymers**, v. 22, p. 239-246, 2001.

Noda, T. et al. The effect of harvest dates on the starch properties of various potato cultivars. **Food Chemistry**, v. 86, p. 119–125, 2004.

NÚÑES-SANTIAGO, M. C.; BELLO-PÉREZ, L. A.; TECANTE, A. Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behavior of banana (*Musa paradisiaca*) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n.1, p. 65–75, 2004.

O'FARREL, P. H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OATES, C.G. Towards and understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science Technology**, v. 8, p. 375-382, 1997.

OATES, C.G. Towards and understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science & Technology*, v.8, p.375-382, 1997.

OCHOA, C.; UGENT, D. Maca (*Lepidium meyenii* walp; Brassicaceae):A nutritious root crop of the central Andes. **Economic Botany**, v. 55, n. 3, p. 344–345, 2001.

OSUNDAHUNSI, F. O. et al. Comparison of the physicochemical properties and pasting characteristics of flour and starch from red and white sweet potato. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 2232-2236, 2003.

OTTE, J. et al. Effect of partial hydrolysis with an differential scanning calorimetry of oat starch pastes. **Cereal Chemistry**, v. 64, p. 394-399, 2000.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837 – 846, 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000b.

PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. 1ªed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005, 760 p.

PANNEERSELVAM, R. et al. Carbohydrate metabolism in *Dioscorea esculenta* (Lour.) Burk. tubers and *Curcuma longa* L. rhizomes during two phases of dormancy. **Colloids and Surfaces**, v. 59, p. 59–66, 2007.

PARK, Y.K. ; SANTI, M.S.S. Induction of High Amyloglucosidase Producing Mutant from *Aspergillus awamori*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 55. p. 193-195, 1977.

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

PENGI, J.; GYGI, S. P. Proteomic: the move to mixtures. **Journal of mass spectrometry**, v. 36, p. 1083 – 1091, 2001.

PERERA, C., HOOVER, R. Influence of hidroxypopylation on retrogradation properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. **Food Chemistry**, 64, 361-375, 1999.

PÉREZ, E. E., BREENE, W. M., BAHNASSEY, Y. A. Variation in the gelatinization profiles of cassava, sagú and arrowroot native starches as measured with different thermal and mechanical methods. **Starch/Stärke**, v. 50, p. 70-72, 1998.

PERONI, F. H. G.; ROCHA, T. S.; FRANCO C. M. L. Some Structural and Physicochemical Characteristics of Tuber and Root Starches. **Food Science and Technology International**, v. 12(6), p. 505–513, 2006.

PIACENTE, S. et al. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* walp). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5621–5625, 2002.

PIRES, T. C. P.; VEIGA, E. M.; FINARDI FILHO, F. Enzimas amilolíticas de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 278-284, 2002.

PIRES, T.C.R.; FINARDI-FILHO, F. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). **Food Chemistry**, v. 89, p. 85-92, 2005.

PROSKY, L. et al. Determination on insoluble and soluble dietary fiber in foods and products: Collaborative study. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 75, n. 2, p. 360 -367, 1992.

QUIRÓS, C. F.; CÁRDENAS, R. A. Maca. In. Hermann, M. Heller, J. **Andean roots and tubers: Ahípa arracacha, maca and yacon**, 1992.

QUIROZ, C; ALIAGA. **Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). Andean roots and tubers: ahípa, arracacha, maca and yacon**. Promoting the conservation and use of underutilized neglected crops 21. Hermann. M. and Hellers, J. editors. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 173 -179, 1997.

REA, J. **Andean roots**. In J. E. Hernando Bermejo; J. Leon (Eds.), *Neglected crops: 1492 from a different perspective*, p. 165–179. Rome, Italy: Plant Production and Protection Series No.26, FAO, 1994.

RESIO, A. N. C.; TOLABA, M. P.; SUAREZ, C. Algunas propiedades físicas y térmicas del almidón de amaranto. **Food Science and Technology International**, v. 6, n. 5, p. 371-378, 2000.

RIVIER, J.; MCCLINTOCK, R. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of insulins from Different Species. **Journal of Chromatography**, v. 268, p. 112-119, 1983.

ROBIN, J. P. et al. Gel filtration and studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 389 -406, 1974.

ROBINSON, J. M. A simple method for ultrastructural enzyme cytochemistry on small volumes and numbers of isolated cells. **The Histochemical Journal**, v. 23, p. 10-12, 1991.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I M.; FRANCO, C. M. L. características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e tecnologia de alimentos**, v.28, n.3, p. 620 – 628. 2008.

ROY, F., HEGDE, V. Rapid procedure for purification of β -amylase from *Ipomea batata*. **Journal of Chromatography**, v. 324, p. 489 - 494, 1985.

SANABRIA, R. G. G. Caracterização parcial de carboidrases, morfologia do grão de amido e composição centesimal de raízes de maca (*Lepidium meyenii* Walpers). São Paulo, 2005. 81p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2005.

SANABRIA-RONDÁN, G. G.; PIRES, C. T.; FINARDI-FILHO, F. Preliminary approach to detect amylolytic and pectinolytic activities from maca (*Lepidium meyenii* Walp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, 2006.

SANDHU, S. K.; SINGH, N. Some properties of corn starches II. Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1499–1507, 2007.

SANTACRUZ, S. Characterization of starches isolated from *Arracacha xanthorrhiza*, *Canna edulis* and *Oxalis tuberosa* and extracted from potato leaf. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, 2004.

SANTACRUZ, S. et al. Three underutilized starches from the Andean region in Ecuador Part I. Physico-chemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 63-70, 2002.

SARAVANAN, R.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v. 4, p. 2522-2532, 2004.

SHEVCHENKO, A. et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 14440 – 14445, 1996.

SHI, Y. C.; SEIB, P. A.; BERNARDIN, J. E. Effects of temperature during grain-filling on starches from six wheat cultivars. **Cereal Chemistry**, v. 71, p. 369 – 383, 1994.

SHIN S.; BYUN J.; HWA PARK K; WHA MOON T. Effect of Partial Acid Hydrolysis and Heat – Moisture Treatment on Formation of Resistant Tuber Starch. **Cereal Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 194-198, 2004.

SILVA, J. R. V. et al. Brotação de mini-tubérculos de sete cultivares de batata em função de concentrações de bissulfureto de carbono. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v. 22, n. 4, p. 677-680, 2004.

SIMONE-PASCUAL, I. C. S. C. **Caracterização físico-química e purificação de enzimas amilolíticas de mandioca (Manihot esculenta Crantz) cv. Zolhudinha**. São Paulo, 2005. 73p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2005.

SINGH, J. A. et al. Physico-chemical and morphological characteristics of New Zealand Taewa (Maori potato) starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 569–581, 2006.

SINGH, J.; SINGH, N. Studies on the morphological, thermal and rheological properties of starch separated from some Indian potato cultivars. **Food Chemistry**, v. 75, p. 67–77, 2001.

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

SRICHUWONG, S. et al. Starches from different botanical sources II: Contribution of amilopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 529 -538, 2005.

STREET, H. V. **Glycoside hydrolases - amylases: measurement of starchiodine complex**. In: Bergmeyer, H. *Methods of Enzyme Analyses*, v.2, second edition, Academic Press, New York, 1974.

TAKEDA, Y.; SHITAOZONO, A.; HIZUKURI, O. Structure of subfractions of corn amylose. **Carbohydrate Research**, v. 199, p. 207-214, 1990.

TANG, H. et al. Physicochemical properties and structure of large, medium and small granule starches in fractions of normal barley endosperm. **Carbohydrate research**, v.330, p.241-248, 2001.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X.. Review: Starch Composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v. 39, p. 151 – 165, 2004.

THEBAUDIN, J.Y., LEFEBRVE, A.C. e DOUBLIER, J.L. Rheology of starch pastes from starch of different origins: applications to starch-based sauces. **Lebensm.-Wiss Technology**, v. 31, p. 354-360, 1998.

THOMA, J., SPRADLIN, J., DYGERT, S. **Plant and animal amylases** In: Boyer, P. - The enzymes – v. 5, 3rd edition, New York: Ed Academic Press, p. 115-182. 1971.

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. **Starches: practical Guides for the Food Industry**. Minnesota: Eagan Press, 94p, 1999.

TODAKA, D.; KANEKATSU, M. Analytical method for detection of b-amylase isozymes in dehydrated cucumber cotyledons by using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 365, p. 277–279, 2007.

TORRUCO-UCO, J.; BETANCUR-ANCONA, D. Physicochemical and functional properties of makal (*Xanthosoma yucatanensis*) starch. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1319–1326, 2007.

VALENTOVÁ, K. et al. The in vitro biological activity of *Lepidium meyenii* extracts. *Cell Biology and Toxicology*, 22, 91–99, 2006.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C. et al. Applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2001.

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

VIKSO-NIELSEN, A. et al. Purification and characterization of β -amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). **Physiologia Plantarum**, v.99, p.190-196, 1997

VILES, F. J.; SILVERMAN, L. Determination of starch and cellulose with anthrone. **Analytical Chemistry**, v. 21, p. 950 – 953, 1949.

VOLZ, H. P.; GLEITER, C. H. Monoamine oxidase inhibitors, a perspective on their use in the elderly. **Drug Aging**, v. 13, n.5, p. 341–355, 1998.

WANG, L. Z.; WHITE, P. J. Structure and physicochemical properties of starches from oats with different lipid content. **Cereal Chemistry**, v. 71, p. 443–450, 1994.

WIESENBORN, D. et al. Potato starch paste behavior as related to some physical/chemical properties. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 644, 1994.

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

YAMASAKI, Y. β -Amylase in germinating millet seeds. **Phytochemistry**, v. 64, p. 935–939, 2003.

YAMIM, F. F. et al. Thermal properties of starch in corn variants isolated after chemical mutagenesis of inbred line B 73. **Cereal Chemistry**, v. 76, p. 81-89, 1999.

YU, L. J.; JIN, W. W. Study on nutritional components and the anti-fatigue effects of dry powder of maca (*Lepidium meyenii*). **Food Science**, v. 25, n. 2, p. 164–166, 2004.

ZEEMAN C. et al. A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. **The Plant Journal**, v. 15, n. 3, p. 357-365, 1998.

ZEEMAN, S. C. et al. The breakdown of starch in leaves. **New Phytologist**, v. 163, p. 247–261, 2004.

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

ZHENG, B. L. et al. Effect of lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. **Urology**, v. 55, n. 4, p. 598–602, 2000.

ZHOU, M. et al. Structure and pasting properties of oat starch. **Cereal Chemistry**, v.75, p. 273-281, 1998.

ZIEGLER, P. Cereal β -amylases. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 195-204, 1999.

ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch/Stärke**, v. 40, n. 2, p. 44 – 50, 1998.