

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECÍFICO PARA AVALIAÇÃO DE AMIDO
DANIFICADO EM FÉCULA DE MANDIOCA**

THATIANE C. C. MARINI¹; DANIELA MATSUMOTO²; CÁSSIA R. L. CARVALHO³

Nº 11157

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um dos vegetais mais cultivados no mundo, sendo o Brasil o segundo produtor mundial. O amido extraído dessa planta é empregado pela sociedade moderna como matéria-prima em vários processos industriais alimentícios e não alimentícios. Durante a extração do amido, a estrutura semicristalina dos grânulos pode ser danificada pelas operações mecânicas, como também pode ocorrer gelatinização parcial dos grânulos pelo aumento de temperatura nas várias etapas de extração do produto. A indústria extratora de amido nativo de mandioca emprega para avaliar o controle de qualidade do produto um método adaptado do setor de milho. O tempo de análise do método é longo (24 horas) e sofre grande influência da temperatura ambiente e do processo de agitação da fécula, o que leva a resultados geralmente não reprodutivos. Visando auxiliar o setor de extração de amido de mandioca, foi desenvolvido e validado um método simples e rápido para a dosagem de amido danificado em fécula, empregando a técnica de polarimetria.

ABSTRACT

The Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most commonly grown vegetables in the world and Brazil is the worldwide second largest producer. The starch extracted from this plant is used by modern society as raw material in several industrial processes, whether they are food related or not. During the extraction of the starch, the semicrystalline structure of the granules can be damaged by mechanical operations, also it may occur partial gelatinization through temperature rise in the various stages of the product's extraction. To assess the quality control of the cassava starch, the extractive industry uses a method similar to the corn starch quality control method. The time of analysis is lengthy (24 hours) and is greatly influenced by ambient temperature and the stirring of the cassava starch, which generally leads to non-reproductive results. In order to assist this sector, it has been developed and validated a simple and fast method for the dosage of damaged starch, employing the polarimetry technique.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Química, PUC-Campinas, Campinas-SP, thaty_cristine@msn.com.

² Colaboradora: Química, Centro de Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agrônomo, Campinas-SP.

³ Orientadora: Pesquisadora, Centro de Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agrônomo, Campinas-SP, climonta@iac.sp.gov.br.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um dos vegetais mais cultivados no mundo, sendo o Brasil um dos principais países produtores. O volume de amido extraído dessa planta é empregado pela sociedade atual como matéria-prima em uma considerável variedade de processos industriais, alimentícios e não alimentícios. É usado em sua forma nativa, modificada ou hidrolisada; as alterações em sua estrutura molecular são realizadas de acordo com a aplicabilidade, empregando-se processos físicos, químicos ou biológicos (PEREIRA, 2008).

Durante a extração do amido, a estrutura semicristalina dos grânulos pode ser danificada pelas operações mecânicas (forças de compressão, impactos, atritos), como também pode ocorrer gelatinização parcial dos grânulos pelo aumento de temperatura que sucede nas várias etapas de extração e principalmente na etapa de secagem do produto (aproximadamente a 150°C). Os grânulos mecanicamente deformados, ou que sofreram cortes superficiais e mesmo os parcialmente gelificados, ao serem hidratados, intumescem na temperatura ambiente, absorvendo de 2 a 4 vezes o seu peso em água quando comparados aos amidos nativos, que são insolúveis em água (KARKALAS et al., 1992).

Como estratégia para agregar maior valor e novas aplicabilidades ao produto gerado, algumas das fecularias brasileiras passaram a produzir amidos modificados, o que está proporcionando novas perspectivas de crescimento à cadeia produtiva da mandioca. Alguns dos processos de produção de amidos modificados requerem que as féculas extraídas tenham baixas concentrações de amido danificado.

Visando auxiliar o setor de extração de amido de mandioca, foi desenvolvido um método simples e rápido para a dosagem de amido danificado em fécula, empregando a técnica de polarimetria, o qual após passar por processo de validação poderá ser transferido ao setor produtivo de amido.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição do método proposto para avaliação de amido danificado:

O método proposto consiste em pesar 5g do amido a ser analisado em tubo de centrifuga de 50 mL, adicionar 0,2 mL de enzima α -amilase fúngica de 120 U/mL (StarMax TG120, Prozyn) e aproximadamente 40 mL de solução tampão fosfato de sódio, pH = 5,8. A solução, após agitação, é incubada por exatamente 15 minutos a 30°C. Após esse período, 1 mL de solução de NaOH 5% é rapidamente adicionada para interromper a reação enzimática. O volume de 50 mL é completado com solução tampão e centrifugado a 2000 g por 5-10 minutos, para obtenção de uma solução límpida. Em seguida, leitura polarimétrica do sobrenadante é realizada, usando tubo de 20 dm. A

quantificação é determinada por meio de construção de uma curva de calibração de amido danificado, numa faixa de concentração de 2 a 20%, fortificado sobre 5 g de uma matriz de amido regular (não gelatinizado e não danificado). Determinações de branco da amostra e branco dos reagentes devem ser também conduzidas.

Material usado no desenvolvimento do método proposto:

A quantidade de enzima aplicada foi determinada por meio de ensaios de incubação, usando os procedimentos descritos no método proposto. Assim, volumes crescentes da enzima foram utilizados sobre 5 g de uma fécula, com teor de amido danificado previamente conhecido. O tempo e a temperatura de incubação empregados (15 min., 30°C) foram baseados em dados da literatura (AACC, 1984; KARKALAS et al., 1992).

Na construção da curva de calibração do método interno foi utilizado polvilho doce, da marca Yoki, adquirido em supermercado de Campinas, SP. O polvilho foi caracterizado, determinando-se os teores de umidade, resíduo mineral fixo, amido (CARVALHO et al., 1990), açúcares redutores e amido danificado por colorimetria (NELSON, 1944).

Nos ensaios de validação foram empregadas amostras de féculas produzidas no Brasil (Halotek-Fadel Industrial Ltda, Corn Products Brasil) e importadas da Tailândia, fornecidas por indústrias, como também uma amostra de origem e processo desconhecidos. Os teores de umidade das féculas foram quantificados segundo CARVALHO et al. (1990).

Validação do método proposto:

Os ensaios para a validação do método foram realizados seguindo orientações da norma DOQ-CGCRE-008/INMETRO (2003) e de outras referências complementares (HORWITZ, 1982; QUATTROCCHI, et al., 1992). Desse modo, foram avaliados os seguintes parâmetros de desempenho do método:

1. Linearidade - representa a capacidade que o método tem de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, em uma determinada faixa de concentração. Para a determinação da linearidade, foram construídas, em dias diferentes, três curvas de calibração de massa de amido danificado/50 mL solução tampão *versus* leitura polarimétrica. Com a obtenção do gráfico médio foram obtidos os coeficientes de regressão linear e de correlação linear e, a partir deles, foi calculado o valor de *t*, a 95% de confiança.

2. Sensibilidade - representa o quanto o método é capaz de discriminar a quantidade mínima do analito em uma amostra, com resultados significativos. Para a determinação da sensibilidade, foram realizados três ensaios, em triplicata, com porcentagens de

amido danificado abaixo do primeiro ponto da curva de calibração, ou seja, nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0%. A partir das leituras polarimétricas desses novos pontos adicionais foram construídos gráficos da “concentração de amido danificado *versus* leitura polarimétrica” e “concentração de amido danificado *versus* desvio padrão” dos resultados. Com os gráficos foi possível calcular o limite de detecção do método (LDM) e o limite de quantificação do método (LQM).

3. Exatidão - é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão do método proposto foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, realizados em triplicata, em três níveis de concentração. Assim, foram repetidos os pontos 6%, 10% e 14% da curva de calibração, utilizando-se como base de amido a amostra Halotek-Fadel Industrial. Estimou-se a exatidão do método por meio do Coeficiente de Student.

4. Precisão do método - está relacionada com a dispersão de resultados de ensaios independentes de uma mesma amostra em condições definidas. Para tal, foram realizadas cinco determinações do teor de amido danificado em cada uma das féculas industriais. Em seguida, determinou-se o coeficiente de variação máximo aceitável (CV%) entre as repetições analíticas e o comparou com CV% teórico, determinando assim a repetitividade entre as médias.

5. Robustez - mede a sensibilidade que o método apresenta em relação a variações ao ser executado. Para determinar a robustez do método, portanto, a influência dos diversos fatores envolvidos no desenvolvimento analítico, utilizou-se o teste de *Youden*, segundo a norma DOQ-CGCRE-008/INMETRO (2003).

6. Comparação de métodos – os resultados do método proposto foram comparados com os resultados do método 76-30A da AACC (1984) usando análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste enzimático e caracterização do polvilho:

Para a aplicação do método proposto foram avaliadas enzimas α -amilase disponíveis no mercado. Dentre várias, a escolhida foi a StarMax TG120 da Prozyn devido a facilidade de acesso, não sendo necessário a sua importação e ao fato de ser encontrada em solução. A enzima apresentou densidade igual a $1,09 \pm 0,01$ (média e s de 10 repetições), 27,87% de matéria seca e se mostrou mais eficiente quando utilizada pura do que quando diluída. A partir dos resultados obtidos por meio dos ensaios de incubação (Figura 1), utilizando-se a fécula Halotek Industrial com 4,1% de amido danificado, foi estimada a quantidade de 0,2 mL de enzima para ser usada no método.

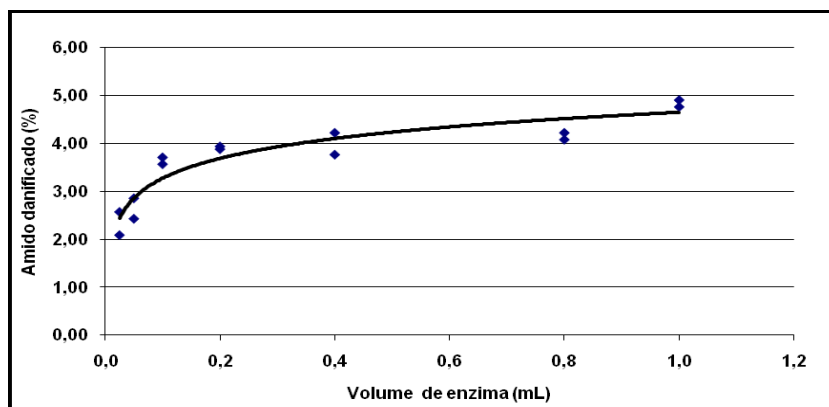


Figura 1. Volume de enzima α -amilase *versus* porcentagem de amido danificado obtido ao incubar a fécula Halotek Industrial, por 15 min. e a 30°C.

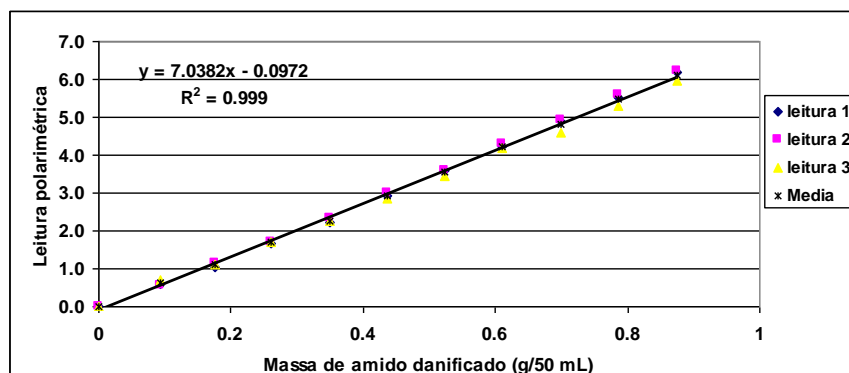
O polvilho doce apresentou como composição química: 11,50% de umidade e, portanto, 88,50% de matéria seca, 87,18% de amido, 0,13% de resíduo mineral fixo, 0,007% de açúcar redutor e 0,057% de amido danificado. O polvilho foi usado como amido regular e como fonte de amido danificado nas curvas de calibração. Uma solução de 3% foi intumescida, a 65-70°C, sendo usada para fortificar e, assim, construir os pontos da curva de calibração nas concentrações de 2 a 20%. As massas dessas concentrações foram corrigidas levando em consideração o valor real de amido encontrado no polvilho (87,18%).

Validação do método proposto:

A análise da linearidade do método foi determinada por meio da curva de calibração média de amido danificado, demonstrada na Figura 2, com aplicação da Equação 1, na qual, n é o número de pontos utilizados na construção da curva média e r (0.9995) corresponde ao coeficiente de correlação linear do conjunto de dados gerados.

O valor de t_r obtido foi de 94,820 que é significativamente maior que o t tabelado (2,306) para 95% de confiança, portanto, o método apresenta correlação significativa na faixa de concentração avaliada.

Na determinação da sensibilidade do método obtiveram-se as seguintes equações das curvas adicionais, construídas com as concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0% de amido danificado: $y = 8,4686x - 0,033$, referente às concentrações x leituras polarimétricas e $y = 0,595x + 0,0081$, às concentrações x desvios-padrão das leituras, com respectivos coeficientes de correlação (r) iguais a 0,9525 e 0,7043. Baseado nesses resultados o LDM e o LQM foram iguais a 0,03% e 0,13%, respectivamente com 3 e 10 desvios-padrões.



$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

(Eq. 1)

Figura 2. Curva de calibração média e respectivo coeficiente de regressão da curva.

A Tabela 1 demonstra os resultados encontrados ao se aplicar os ensaios de recuperação do método, determinados em três níveis de concentração (6, 10 e 14%). Ao resultado médio da recuperação aplicou-se o teste t para compará-lo com o valor teórico. O cálculo realizado revelou um valor de $t_{\text{observado}}$ igual a 1,51, que é significativamente menor do que o $t_{\text{tabelado}(95\%,8)}$, igual a 2,306. Portanto, não existe diferença significativa entre a recuperação média e o valor teórico de 100%, considerando, desse modo, que o método tem a exatidão necessária a 95% de confiança.

Tabela 1. Recuperações do método interno, em três níveis, em que foram adicionadas porcentagens de amido danificado sobre 5g de uma fécula.

Amido danificado adicionado (%)	Massa adicionada de amido danificado (g)			Massa recuperada de amido danificado (g)			Recuperação (%)		
6	0,264	0,263	0,263	0,248	0,245	0,253	94,2	93,4	96,1
10	0,436	0,436	0,437	0,439	0,449	0,447	100,6	102,9	102,3
14	0,611	0,610	0,610	0,622	0,615	0,626	101,8	100,7	102,6
Recuperação média = 99,4%				s = 1,19			CV = 1,19%		

Na Tabela 2 estão expostas as porcentagens de amido danificado das féculas industriais, quantificadas aplicando-se o método polarimétrico desenvolvido. O coeficiente de variação máximo aceitável para cada um dos resultados foi calculado pela Equação 2 - $CV(\%) = 2^{(1-0,5\log C)}$. Portanto, observando-se os valores encontrados na tabela, é possível concluir que o método apresenta nível de precisão aceitável, uma vez que os coeficientes de variação das amostras analisadas foram menores de 4 %, sendo este valor correspondente ao CV% teórico, uma vez que os valores estão expressos em g/100g. Os valores de umidade determinados foram semelhantes para todas as féculas analisadas. Salienta-se que as amostras Halotek e Corn 2 são féculas que não passaram no teste de sensibilidade alcalina, aplicado pelas indústrias antes de serem submetidas ao processo de produção de amidos modificados. Tailândia 1 e Corn 1 são consideradas féculas de boa qualidade.

Tabela 2. Porcentagens de amido danificado das féculas industriais, determinadas pelo método proposto, e desvios-padrão e coeficiente de variação das médias encontradas.

Féculas	Umidade (%)	Amido danificado (%)	Desvio Padrão (s)	Coeficiente Variação (%)
Halotek Industrial	12,63	4,01	0,11	2,70
Tailândia 1	12,29	1,93	0,07	3,87
Tailândia 2	12,52	2,23	0,08	3,68
Corn 1	12,45	1,87	0,05	2,92
Corn 2	12,72	4,44	0,09	2,02
Desconhecida	12,55	16,18	0,10	0,60

A análise da robustez do método proposto foi determinada aplicando um planejamento fatorial de oito ensaios, com seis fatores estudados (Tabela 3), usando a fécula Halotek-Fadel Industrial.

Tabela 3. (a) Planejamento fatorial empregado para determinar a robustez do método proposto, no qual (+) representa o valor máximo e (–) o valor mínimo dos fatores usados nos ensaios; (b) Fatores do método interno que foram alterados e quantidades máximas e mínimas avaliadas.

(a)								(b)		
Ensaios	A	B	C	D	E	F	Resultados	Fatores estudados	-	+
1	+	+	+	+	+	+	4.91			
2	+	+	-	+	-	-	2.95	A	Massa de amostra (g)	2,5 5,0
3	+	-	+	-	+	-	2.75	B	pH do tampão fosfato	5,0 6,0
4	+	-	-	-	-	+	1.70	C	Volume de enzima (mL)	0,1 0,2
5	-	+	+	-	-	+	2.43	D	Temp. de incubação (°C)	25 35
6	-	+	-	-	+	-	2.77	E	Tempo de incubação (min.)	10 20
7	-	-	+	+	-	-	3.68	F	Volume de NaOH 5% (mL)	0,5 1,5
8	-	-	-	+	+	+	4.42			

Considerando a estimativa do desvio padrão do método para a amostra ($s=0.11$), aplicando-o na Equação 3 ($s.\sqrt{2} = 0,16$) e os resultados do planejamento fatorial ($IAI=0,25$; $IBI=0,13$; $ICI=0,48$; $IDI=1,58$; $IEI=1,02$ e $IFI=0,33$) pode-se verificar que todos os fatores, exceto o pH do tampão fosfato (IBI), devem ser controlados durante a execução do método proposto, pois pequenas alterações dos fatores avaliados podem influenciar significativamente nos resultados gerados.

O método da AACC é um dos métodos enzimáticos largamente utilizados para a dosagem de amidos danificados em farinhas ou em preparações de amidos (AACC, 1984). A Figura 3 compara os resultados encontrados de amido danificado pelo método proposto com o método da AACC 76-30, por meio de análise de regressão. O coeficiente de correlação entre o conjunto de medidas foi de 0.98%. Embora os dois métodos tenha alta correlação, o novo método desenvolvido proporcionou resultados mais elevados. Segundo KARKALAS et al. (1992), a reação enzimática dos amidos danificados produz glicose, maltose, maltotriose e outras dextrinas de maior massa molecular. Porém, tem sido demonstrado por HPLC que o método da AACC quantifica apenas cerca de 77% do amido hidrolisado.

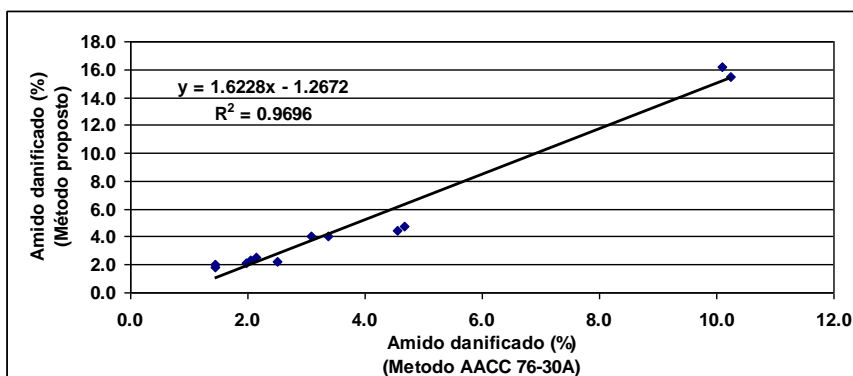


Figura 3. Regressão linear dos resultados médios obtidos usando o método desenvolvido e o método da AACC.

CONCLUSÃO

O método proposto mostrou-se eficiente para a quantificação de amido danificado, nas concentrações de 2 a 20%, em fécula de mandioca; e nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBITI, pela bolsa concedida. Ao IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- AACC Method 76-30A, Approved Methods of the AACC. American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, 1984.
- CARVALHO, C. R. L.; MANTOVANI, D.M.B.; CARVALHO, P. R. N.; MORAES, R.M. **Análises Químicas de Alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 1990, 121p. (Manual Técnico).
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DQOCGCRE-008, Revisão 01, março 2003.
- KARKALAS, J.; TESTER, R.F.; MORRISON, W.R. Properties of damaged starch granules. I. Comparison of a micromethod for the enzymic determination of damaged starch with the standard AACC and Farrand methods. **Journal of Cereal Science**, vol. 16, p. 237-251, 1992.
- NELSON, N. A. **Photometric Adaptation of the Somogy Method for the Determination of Glucose**. *Journal Biol. Chemical*, 153: 375-380, 1944.
- PEREIRA, L.H.G. **Obtenção e estudo das propriedades físico-químicas de amidos de mandioca (*Manihot esculenta*) oxidados e ácido-modificados**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.