

Foto: Selma N. Koakuzu



Procedimento para Determinação do Teor de Amilose em Arroz por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC)

Selma Nakamoto Koakuzu¹
Priscila Zaczuk Bassinello²
Rosângela Nunes Carvalho³

Introdução

O amido é o maior constituinte dos grãos de arroz polido e é formado por dois grandes polímeros de glicose: a amilopectina, altamente ramificada, constituída por cadeias curtas de (α -1,4)-D-glicosil com 5% a 6% de ligações α -1,6 distribuídas; e a amilose, basicamente linear, formada por unidades (α -1,4)-D-glicopiranosil (VANDEPUTTE et al., 2003). A proporção entre as duas frações, amilose e amilopectina, o comprimento das cadeias e a distribuição espacial das moléculas dos polissacarídeos, influenciam profundamente as propriedades físico-químicas do amido e, por consequência, a qualidade de cocção e/ou palatabilidade (textura) do arroz cozido (RAMESH et al., 1999). Devido a esse aspecto, o conteúdo de amilose é um dos parâmetros mais utilizados no desenvolvimento de novas cultivares de arroz para predizer suas características após a cocção.

Muitos métodos têm sido indicados para se determinar o conteúdo de amilose do amido. Um dos mais utilizados é o colorimétrico, que mede a absorbância do complexo formado entre o iodo e a amilose. Entretanto, existem variações no padrão

utilizado, como: amilose de batata (JULIANO, 1971; MARTÍNEZ; CUEVAS, 1989), mistura de amilose e amilopectina (JULIANO et al., 1981) e, mais recentemente, cultivares de arroz com teores de amilose conhecidos (FITZGERALD et al., 2009). Essas variações do método colorimétrico são tentativas de se eliminar interferentes, como os ácidos graxos e os complexos de amilopectina e iodo, que influenciam na quantificação da amilose. Por esses fatores, define-se que o teor de amilose obtido é “aparente”.

A Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC – Size Exclusion Chromatography) é uma técnica que separa moléculas de tamanhos diferentes pelo seu volume hidrodinâmico, pelo fracionamento em colunas de gel, composta de polímeros sintéticos porosos (ultra-hidrogéis). Estas colunas permitem que moléculas maiores eluam mais rapidamente que moléculas pequenas, que ficam temporariamente retidas no interior das cavidades do ultra-hidrogel. A desramificação de moléculas inteiras de amido nas ligações α -1,6 por enzimas hidrolíticas (isoamilases) produz cadeias lineares de α -glicanos. Moléculas inteiras de amido e cadeias desramificadas podem ser analisadas por SEC para

¹ Química, mestre em Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Arroz e Feijão.

² Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão.

³ Engenheira de alimentos, mestre em Ciência Animal, analista da Embrapa Arroz e Feijão.

se obter a distribuição de volume hidrodinâmico e, para o amido desramificado, a distribuição de peso molecular das cadeias de α -glicanos. Proporcionalmente, a partir dos dados obtidos na separação por SEC das cadeias desramificadas do amido é possível calcular a percentagem de amilose relativa à amilopectina presente neste amido (BATEY; CURTIN, 1996; INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, 2007; LISLE et al., 2000). Embora a Cromatografia de Exclusão por Tamanho seja uma técnica mais onerosa e demorada que a colorimétrica, este método apresenta a vantagem de determinar a fração amilose diretamente a partir do cromatograma, sem o uso de curva de calibração, eliminando interferentes como lipídeos ou a falta de um padrão comercialmente adequado de amilose (CHEN; BERGMAN, 2007; FITZGERALD et al., 2009).

Neste trabalho, descrevemos o procedimento para determinação do conteúdo de amilose relativo à amilopectina em amostras de arroz polido, por meio da separação dos dois biopolímeros de amido por SEC, previamente gelatinizado e desramificado. O método é baseado no procedimento estabelecido pelo International Rice Research Institute (2007), com algumas modificações feitas pela equipe do Laboratório de Grãos e Subprodutos da Embrapa Arroz e Feijão, visando a redução do tempo no preparo das amostras e adaptações necessárias para a eficiente detecção por índice de refração no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência dos dois polímeros. Além disso, foi realizado um estudo de correlação entre a determinação de amilose por SEC e pelo método tradicional colorimétrico medido por espectrofotometria, utilizado como rotina no Laboratório de Grãos e Subprodutos.

Materiais e Equipamentos

Reagentes

Reagentes de grau analítico e água ultrapura (Milli-Q).

Etapa de gelatinização e desramificação do amido:

- Álcool etílico 95% (v/v);
- Hidróxido de sódio 0,25 mol L⁻¹;
- Solução tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹, pH 4,0 (mistura de 10 mL da solução acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ com 360 μ L de ácido acético glacial, preparada imediatamente antes do uso);

- Isoamilase (1.000 U/mL; 260 U/mg em sulfato de amônio 3,2 M + 0,02% Na-Azida), Megazyme, cat. E-ISAMY;
- Resina de troca iônica com dopante que muda de azul para amarelo, indicando capacidade de deionização, BioRad AG 501-X8 (D), 20-50 mesh.

Etapa de separação cromatográfica:

- Fase móvel acetato de amônio 0,05 mol L⁻¹ + azida sódica 0,05% (p/v), pH 4,75;
- Fase móvel solução aquosa de azida sódica 0,05% (p/v) para armazenar a coluna cromatográfica.

Equipamentos e utensílios

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) com forno de colunas, detector de Índice de Refração (IR) e amostrador automático com aquecimento (opcional);
- Coluna cromatográfica UH250 (Ultrahydrogel™ SEC 250), 7.8 mm I.D. x 300 mm, Waters (cat. WAT011525) ou similar;
- Balança analítica, capaz de pesar com aproximação de 0,0001 g;
- Placa de agitação e aquecimento a 150 °C;
- Banho-maria a 50 °C e 100 °C (ebulição);
- Microcentrífuga com capacidade de rotação de 12.500 rpm;
- Microtubos tipo eppendorf de 2,0 mL;
- Barras magnéticas de 6 mm x 3 mm;
- Frascos de cintilação de 7 mL ou semelhantes;
- Micropipetas com capacidade de pipetar volumes de 10, 180, 206, 794, 500 e 1000 μ L;
- Filtros para amostras tipo millex (unidade filtrante em polietileno com membrana DURAPORE (PVDF) de 0,45 micras de porosidade, 13 mm diâmetro, não estéril);
- Membrana filtrante HV em PVDF, 0,45 μ m de poro, 47 mm de diâmetro, branca, lisa, para filtrar fase móvel;
- Sistema de filtração para fase móvel cromatográfica e bomba de vácuo;
- Moinho com abertura de peneira de 1,0 mm.

Preparo da amostra e análise cromatográfica

Etapa de gelatinização e desramificação do amido

Pesar 50,0 mg (\pm 0,1 mg) de farinha de arroz e colocar em frasco de cintilação, adicionar uma barra magnética e anotar o peso do frasco com todo o conteúdo. Adicionar 500 μ L de etanol 95%, agitar suavemente (certificando-se de que a farinha ficou saturada com etanol para evitar a formação de grumos) e adicionar 1.000 μ L de NaOH 0,25 mol L⁻¹.

Colocar o frasco sobre uma placa previamente aquecida a 150 °C, deixar agitar (300 rpm a 340 rpm) e aquecer por aproximadamente seis minutos (Figura 1). Neste intervalo, adicionar cerca de 200 µL de água ultrapura (Milli-Q) quente, quando houver forte ebulição e produção de espuma.

NOTA: O tempo para a gelatinização do amido da amostra pode variar, dependendo da quantidade de amilose presente. A gelatinização é observada quando a amostra passa de opaca para quase translúcida (Figura 2).

Foto: Selma N. Koakuzu



Figura 1. Gelatinização das amostras.

Foto: Selma N. Koakuzu



Figura 2. Amostras gelatinizadas.

Ajustar o peso da amostra gelatinizada para 4,00 g com água quente e homogeneizar.

Transferir 794 µL da amostra gelatinizada para um microtubo de 2 mL. Adicionar 206 µL da solução tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,0) e 10 µL de isoamilase, verter o microtubo várias vezes para misturar o conteúdo.

Incubar em banho-maria a 50 °C por duas horas. Agitar cuidadosamente o conteúdo do microtubo a cada 15 minutos.

Colocar os microtubos em banho-maria, com água em ebulição, durante cinco minutos para desnaturar a isoamilase.

Centrifugar a 12.500 rpm, a 27 °C, durante dez minutos.

Verter cuidadosamente o sobrenadante para um novo microtubo contendo aproximadamente 500 mg de resina de troca iônica. Incubar em banho-maria a 50 °C durante 30 minutos. Misturar suavemente o conteúdo do microtubo a cada dez minutos.

NOTA: Se grande parte da resina contida no microtubo tornar-se amarela, é necessário adicionar resina nova.

Com o auxílio de uma seringa, retirar a amostra preparada do microtubo, filtrar com filtro tipo millex e transferir para um vial do HPLC.

OBSERVAÇÃO: As amostras já desramificadas devem ser mantidas a 40 °C até o momento da injeção no HPLC, seja por acondicionamento no amostrador automático do HPLC ou em um banho-maria. Isto é necessário porque pode ocorrer a retrogradação do amido.

Separação cromatográfica

Realizar todos os pré-requisitos e procedimentos de operação exigidos para o funcionamento adequado do sistema HPLC;

Utilizar como fase móvel a solução de acetato de amônio 0,05 mol L⁻¹ + 0,05% azida sódica, pH 4,75, previamente filtrada;

Utilizar como fase estacionária a coluna UH250 da Waters, ou similar, com a guarda coluna, se possuir;

Elevar o fluxo do HPLC até atingir o fluxo de trabalho de 0,5 mL/min. A pressão na coluna não deve ultrapassar 29 Kgf cm²;

NOTA: As colunas de permeação em gel, como no caso da UH250, são muito sensíveis a aumentos de pressão, portanto a elevação do fluxo das bombas deve ser feita lentamente, em intervalos de 0,02 mL/min.

Elevar a temperatura do forno de colunas até 60 °C (temperatura de trabalho);

Após estabilizar a pressão e a temperatura do forno de colunas, efetuar o condicionamento da célula do detector de Índice de Refração (IR) e, após alguns minutos, o balanço de energia. A linha base deverá ficar próxima de 0 (zero) mV;

NOTA: A célula do Detector IR deverá estar na temperatura de trabalho, a 60 °C.

Aguardar até obter uma linha base bem estável;

Injetar cerca de 40 μL de cada amostra, previamente tratada e aquecida a 40 $^{\circ}\text{C}$;

O tempo de corrida é de 40 minutos e o cromatograma obtido deve ter o perfil apresentado na Figura 3;

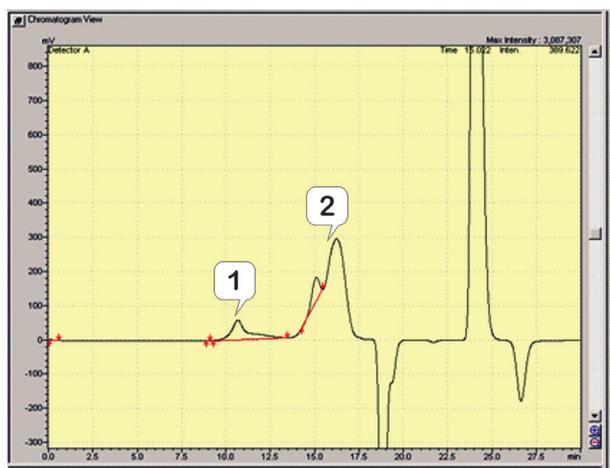


Figura 3. Cromatograma de uma amostra de arroz. O pico 1 corresponde à amilose e o pico 2 à amilopectina.

OBSERVAÇÃO: Em amostras com teores de amilose muito baixos, o pico 1 pode quase “desaparecer”.

Após o término das injeções das amostras, iniciar os procedimentos adequados para o desligamento do Sistema HPLC, conforme o fabricante.

NOTA: Nunca desligar o fluxo da coluna cromatográfica enquanto a temperatura do forno estiver alta e não armazenar a coluna com solução tampão, pois isto pode danificar os polímeros que compõem o gel. Sempre efetuar procedimentos de lavagem da coluna com água ultrapura (Milli-Q), quando não for realizada a análise por mais de um dia, e armazenar a coluna com solução aquosa de azida sódica 0,05% para intervalos de análises mais prolongados.

Cálculo da percentagem de amilose

A partir do software do HPLC, exportar os dados de intensidade em milivolts (mV) da região dos picos de interesse do cromatograma da amostra para uma planilha Excel. Em geral, o software do cromatógrafo registra a intensidade do sinal em intervalos de 500 milissegundos; resultando, portanto, em cerca de 130 dados de intensidade no intervalo de interesse. Exemplo: no cromatograma apresentado na Figura 3, os dados exportados

estariam entre 8 a 19 minutos de tempo de retenção;

Na planilha de cálculo do Excel, com os dados de intensidade, normalizar a linha base, ou seja, recalcular valores muito negativos ou positivos, aproximando-os de zero, efetuando subtração ou soma de valores de intensidade, dependendo do encontrado no cromatograma, para todos os dados;

Depois, zerar os dados de intensidade até próximo do início do pico da amilose e após o término do pico da amilopectina (Figura 3);

Em seguida, somar todas as intensidades; a soma corresponderá a 100%;

Recalcular cada valor de intensidade em percentagem com relação ao valor da soma calculada anteriormente (100%);

Exemplo:

(soma de todas as intensidades dos picos) 87232295 -----100%
 (valor de intensidade no tempo de retenção 9,0 min) 37 ----- X %
 $X = 4,24 \times 10^{-5} \%$

Plotar o gráfico para visualizar o perfil dos picos já normalizados (Figura 4);

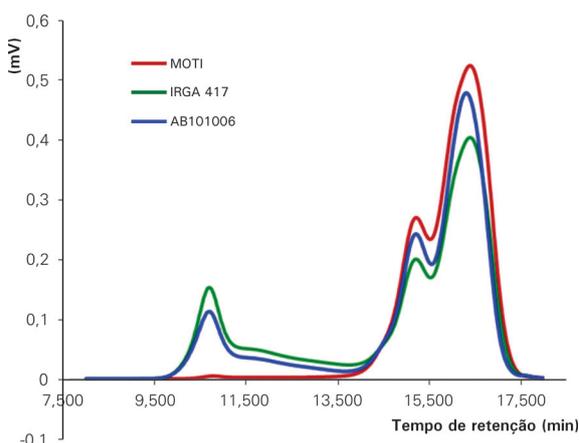


Figura 4. Gráfico dos picos cromatográficos de amilose e amilopectina após normalização.

Identificar, pelo cromatograma ou gráfico plotado, o tempo de retenção do início ao fim do pico da amilose (pico 1);

Somar todos os valores dos dados em percentagem calculados anteriormente entre o início e o fim do pico de interesse (amilose);

O resultado será a percentagem (%) de amilose na amostra.

Correlação entre métodos para determinação de amilose

Foram avaliados 12 genótipos de arroz de terras altas, nas safras de 2013 e 2014, plantados em Santo Antônio de Goiás, GO e Sinop, MT, e 13 genótipos de arroz irrigado, nas mesmas safras, plantados em Alegrete, RS e Brazabrantes, GO. Todos os genótipos foram submetidos à análise para determinação do teor de amilose “aparente”, conforme metodologia rotineiramente utilizada pelo Laboratório de Grãos e Subprodutos da Embrapa Arroz e Feijão (MARTÍNEZ; CUEVAS, 1989; FITZGERALD et al., 2009) e os dados foram comparados com as determinações de amilose por SEC/HPLC. O coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os dois métodos apresentou alta correlação positiva ($r=0,9770$), indicando a possibilidade de substituição na rotina de análise de amilose em grãos de arroz por SEC/HPLC.

Considerações finais

O procedimento para determinação de amilose em arroz, utilizando a técnica de exclusão por tamanho (SEC) em HPLC, apresenta diversas vantagens como a exatidão dos resultados e a boa repetibilidade, além de ser um protocolo de poucas e simples etapas e, principalmente, por dispensar o uso de padrão de calibração. Entretanto, o custo elevado do método cromatográfico pode inviabilizar a análise de grandes quantidades de amostras, como geralmente é necessário em programas de melhoramento genético de arroz. Sendo assim, pode-se concluir que o método para determinação de amilose por SEC/HPLC não é viável como análise de rotina, mas é uma ferramenta importante na validação dos teores de amilose em cultivares de arroz, principalmente em genótipos que apresentam teores muito próximos de amilose mas diferem no comportamento culinário, pois possibilita o estudo mais detalhado da proporção amilose/amilopectina.

Referências

BATEY, L.; CURTIN, B. M. Measurement of amylose/amylopectin ratio by high-performance liquid chromatography. *Starche/Starke*, Weinheim, v. 48, n. 9, p. 338-344, 1996.

CHEN, M. H.; BERGMAN, C. J. Method for determining the amylose content, molecular weights, and weight and molar-based distributions of degree of polymerization of amylose and fine-structure of amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 69, n. 3, p. 562-578, June 2007.

FITZGERALD, M. A.; BERGMAN, C. J.; RESURRECCION, A. P.; MÖLLER, J.; JIMENEZ, R.; REINKE, R. F.; MARTIN, M.; BLANCO, P.; MOLINA, F.; CHEN, M. H.; KURI, V.; ROMERO, M. V.; HABIBI, F.; UMEMOTO, T.; JONGDEE, S.; GRATEROL, E.; REDDY, K. R.; BASSINELLO, P. Z.; SIVAKAMNI, R.; RANI, N. S.; DAS, S.; WANG, Y. J.; INDRASARI, S. D.; RAMLI, A.; AHMAD, R.; DIPTI, S. S.; XIE, L.; LANG, N. T.; SINGH, P.; TORO, D. C.; TAVASOLI, F.; MESTRES, C. Addressing the dilemmas of measuring amylose in rice. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v. 86, n. 5, p. 492-498, Sept./Oct. 2009.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. Grain Quality, Nutrition and Post Harvest Center. **Method 16**: analysis of rice starch by Size Exclusion Chromatography (SEC). [Los Bãnos], 2007. 14 p. Não publicado.

JULIANO, B. O. A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Science Today*, St. Paul, v. 16, n. 10, p. 334-340, 360, Oct. 1971.

JULIANO, B. O.; PEREZ, C. M.; BLANKENEY, A. B.; CASTILLO, T.; KONGSEREE, N.; LAIGNELET, B.; LAPIS, E. T.; MURTY, V. V. S.; PAULE, C. M.; WEBB, B. D. International cooperative testing on the amylose content of milled rice. *Starche/Starke*, Weinheim, v. 33, n. 5, p. 157-162, 1981.

LISLE, A. J.; MARTIN, M.; FITZGERALD, M. A. Chalky and translucent rice grains differ in starch composition and structure and cooking properties. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v. 77, n. 5, p. 627-632, Sept. 2000.

MARTÍNEZ, C.; CUEVAS, F. **Evaluación de la calidad culinaria y molinera del arroz**: guía de estudio. 3. ed. Cali: CIAT, 1989. 75 p. (CIAT. Serie O4SR-07.01).

RAMESH, M.; ZAKIYUDDIN, A.; BHATTACHARYA, K. R. Structure of rice starch and its relation to cooked-rice texture. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 38, n. 4, p. 337-347, Apr. 1999.

VANDEPUTTE, G. E.; VERMEYLEN, R.; GEEROMS, J.; DELCOUR, J. A. Rice starches. I. Structural aspects provide insight into crystallinity characteristics and gelatinization behavior of granular starch. **Journal of Cereal Science**, London, v. 38, n. 1, p. 43-52, July 2003.

Comunicado Técnico, 226

Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Arroz e Feijão
Endereço: Rod. GO 462 Km 12 Zona Rural, Caixa Postal 179 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (62) 3533 2110
Fax: (62) 3533 2100
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
On-line (2015)

Comitê de publicações

Presidente: *Pedro Marques da Silveira*
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto R. da Silva*
Membros: *Camilla Souza de Oliveira, Luciene Frões Camarano de Oliveira, Flávia Rabelo Barbosa Moreira, Ana Lúcia Delalibera de Faria, Heloisa Célis Breseghello, Márcia Gonzaga de Castro Oliveira, Fábio Fernandes Nolêto*

Expediente

Supervisão editorial: *Luiz Roberto R. da Silva*
Revisão de texto: *Aline Pereira de Oliveira*
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*