



COMUNICADO
TÉCNICO

238

Sete Lagoas, MG
Outubro, 2019



Metodologia de Determinação da Extratibilidade e Isolamento de Amido de Grãos de Milho por Via Úmida em Escala Laboratorial

Maria Cristina Dias Paes
Natália Alves Barbosa

Metodologia de Determinação da Extratibilidade e Isolamento de Amido de Grãos de Milho por Via Úmida em Escala Laboratorial¹

Introdução

O amido é o principal componente do grão de milho, sendo na sua forma isolada um polímero de grande importância econômica para as indústrias alimentícias e não alimentícias (Paes et al., 2011). A concentração nos grãos (Belyea et al., 2004; Gumienna et al., 2016; Paes et al., 2016), a composição em amilose e amilopectina (Jenkins; Donald, 1995), a organização do grânulo de amido e a sua relação com as proteínas do endosperma (Mu-Forster; Wasserman, 1998; Xu et al., 2019) podem diferir entre genótipos de milho, influenciando as propriedades físicas do amido de milho, como o rendimento de extração (Paes et al., 2010) e funcionais, a exemplo da gelatinização (Chen et al., 2011) e do rendimento de conversão a etanol (Gumienna et al., 2016). Um atributo de grande importância para determinar a aptidão de cultivares de milho aos processos industriais é a extratibilidade do amido, especialmente na moagem via úmida para produção de

amido e de etanol combustível. A metodologia para uso laboratorial descrita neste documento foi desenvolvida seguindo o protocolo usualmente aplicado industrialmente neste tipo de moagem, porém utilizando pequeno número de grãos para determinar este atributo, diferentemente de outros métodos já publicados (Eckhoff et al., 1996; Krieger et al., 1997), além de permitir volume suficiente de amido extraído para uso em outras avaliações de qualidade tecnológica deste polímero, como propriedades térmicas e reológicas. Os outros métodos laboratoriais citados utilizam massa de grãos superior a 15 grãos e maior volume de reagentes, inviabilizando a fenotipagem de genótipos em etapas do melhoramento genético em que há pequena disponibilidade de amostra ou ainda o uso por laboratórios de qualidade em indústrias e em instituições de pesquisa por causa do custo de reagentes e dos resíduos gerados. Somente replicando o processo industrial em escala laboratorial é possível selecionar materiais e gerar novas cultivares com real aptidão para o uso em larga escala.

¹Nutricionista, Ph.D em Ciências de Alimentos e Nutrição Humana, Analista da Embrapa Milho e Sorgo; Bióloga, Doutora em Ciências de Alimentos, Sete Lagoas, MG.

Materiais / Reagentes/ Equipamentos

Materiais

- Balão volumétrico (1000 mL)
- Barca de pesagem de amostras
- Bastão de vidro
- Béquer de vidro borossilicato (500 mL, modelo alto)
- Béquer de vidro borossilicato (250 mL)
- Espátula de aço inoxidável
- Estilete ou lâmina de bisturi
- Grau e pistilo de porcelana
- Filme de PVC
- Filme de vedação para uso em laboratório (Parafilm M®)
- Frascos de vidro para reagentes graduado com tampa rosqueada e antigotas (250 e 1000 mL)
- Funil de vidro
- Peneiras de aço inoxidável com malha de 65 µm
- Pipeta automática (5000 µL)
- Ponteira para pipeta de 5000 µL
- Placa de petri de vidro
- Provetas de vidro (100 e 1000 mL)
- Suporte para tubos de 50 mL
- Tubos de fundo cônico para centrífuga de volume 50 mL com tampa rosqueável
- Tubos de fundo redondo com tampa para centrífuga de volume 150 mL

Reagentes

- Metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) P.A.
- Álcool absoluto P.A.

Equipamentos

- Ar-condicionado
- Balança analítica
- Agitador de tubos tipo Vortex
- Banho termostatzado
- Cronômetro digital
- Centrífuga
- Homogeneizador de tecidos Ultra Stirrer, modelo ultra 380
- Estufa de circulação de ar
- Cronômetro digital

Equipamentos de segurança

- Jaleco
- Calçado fechado
- Luvas de látex
- Óculos de segurança
- Capela de exaustão de gases

Descrição dos Procedimentos

Preparo de soluções

Solução de metabissulfito de sódio 1% (m/v)

Pesar 1 g de metabissulfito de sódio, transferir a um béquer de 250 mL e adicionar 40 mL de água deionizada, realizando a homogeneização com bastão de vidro ou com agitador magnético e barra magnética em baixa rotação. Transferir a solução homogeneizada para um balão volumétrico de 100 mL, tomando o cuidado de recuperar todo o conteúdo de reagente na vidraria usada para homogeneizar, lavando o béquer com pequenos volumes de água e transferindo ao balão. Completar o volume para 100 mL com água deionizada. Homogeneizar a solução e transferir a um frasco de vidro para reagentes de 250 mL, devidamente identificado com nome da solução, data de preparo e o responsável pelo preparo. A solução não deve ser armazenada, sendo sua validade o dia do preparo.

Solução de etanol 70% (v/v)

Medir 700 mL de etanol absoluto em proveta de 1000 mL e transferir a balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água deionizada. Homogeneizar a solução e transferir a um frasco de vidro para reagentes de volume 1000 mL, devidamente identificado

com dados mencionados anteriormente, incluindo data de validade. Armazenar em temperatura ambiente por até duas semanas.

Preparo da amostra

Quartear a amostra para garantir homogeneidade e adequada redução de volume. Para correção de resultados, determinar a umidade de uma alíquota seguindo o método 44-15 A para amostra de grãos inteiros ou método 44-19 para amostra de grãos moídos (American Association of Cereal Chemists, 1999) ou ainda outro recomendado para a matriz, incluindo métodos instrumentais como NIR e determinador de umidade.

Separar 15 grãos em triplicata da amostra quarteada a ser analisada. Nesta não poderá haver grãos mofados, quebrados, presença de insetos ou matéria estranha.

Ensaio

Pré-aquecer banho-maria a 45 °C. Para cada amostra montar uma peneira de inox sobre um béquer de 500 mL e vedar com parafilme o encontro das duas peças.

Pesar os 15 grãos de milho e anotar a massa. Colocar estes grãos pesados em tubo de centrifuga de fundo cônico de capacidade 50mL e acrescentar 7 ml de solução de metabissulfito de sódio 1% (m/v). Rosquear levemente a tampa do tubo. Se estiver totalmente fechado poderá ocorrer a quebra do tubo por

causa do aquecimento e da liberação de gases da próxima etapa. Incubar o tubo em banho-maria a 45 °C por 48 h. Após este tempo, drenar o líquido com cuidado para evitar perda da amostra, secar os grãos em papel toalha disposto sobre placa de petri e pesar, anotando a massa. Manualmente separar as frações anatômicas dos grãos (ponta, germe, pericarpo e endosperma) (**Figura 1**) usando estilete ou lâmina de aço inoxidável. Os endospermas isolados dos 15 grãos deverão ser colocados em barca de pesagem devidamente identificada e pesados, anotando a massa. Descartar o germe e o pericarpo.



Figura 1. Separação das frações dos grãos.

Identificar um tubo de centrifuga de fundo cônico de 50 mL limpo com os dados da amostra e dispor dentro de um béquer como apoio. Talar a balança com o tubo no béquer e transferir o endosperma obtido dos 15 grãos ao tubo. Anotar a massa para controle de alteração de umidade da amostra durante o período de dissecação. Acrescentar 10 mL de água deionizada ao tubo contendo os endospermas e triturar o material dentro do tubo em homogeneizador de tecidos a 22000 rpm por 40 segundos (**Figura 2**).



Figura 2. Trituração e homogeneização do endosperma.

Filtrar o endosperma triturado em filtro de inox sobre agitação de tal modo que a suspensão não movimente além da linha do volume inicial (**Figura 3**), lavando a massa retida na peneira com 200 mL de água deionizada.



Figura 3. Filtração em peneira sob agitação do material triturado e homogeneizado.

Com auxílio de espátula de inox, recolher o material retido na peneira no mesmo tubo utilizado para triturar o endosperma. Adicionar 10 mL de água deionizada e repetir o processo de trituração por 40 segundos. Filtrar o homogenato no mesmo filtro de inox e

transferir todo o filtrado para um tubo para centrifuga de fundo redondo limpo, identificado e pesado, tampando os tubos a seguir. Equilibrar o peso no rotor com os demais tubos (**Figura 4**). Se necessário, corrigir o peso dos tubos adicionando água deionizada. Centrifugar o material a 1500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente e em seguida descartar o sobrenadante.



Figura 4. Centrifugação do filtrado.

Adicionar ao pellet no fundo do tubo 30 mL de etanol 70% (v/v). Tampar o tubo e agitar em agitador de tubos por 10 segundos. Centrifugar a suspensão a 1500 rpm por 15 min, descartando o sobrenadante cuidadosamente para evitar perda de amido. Repetir por cinco vezes a etapa de adição de etanol seguida de centrifugação, descartando o sobrenadante a cada etapa. Se necessário retirar cuidadosamente com auxílio de espátula a camada amarela de proteína e carotenoides formada sobre o decantado. O material retirado deve se pesado para correção do cálculo.

Manter o tubo em suporte ou béquer, sem a tampa, deixando dentro de capela

de exaustão ligada por 1 hora para a evaporação do resíduo de etanol. Secar o amido isolado dentro do tubo em estufa a 40 °C por 16 horas (**Figura 5**).



Figura 5. Tubos contendo amido isolado em secagem dentro da estufa de circulação de ar.

Retirar os tubos contendo o amido da estufa, deixar esfriar, transferir todos os tubos a dessecador e determinar a massa do amido resultante por peso em balança. O amido isolado deverá ser homogeneizado em grau com pistilo de porcelana e transferido para vidros com tampa, lacrados com filme parafinado. O material seco poderá ser armazenado em freezer a -18 °C a -20 °C até realização de outras análises quando o tempo for superior a 5 dias de armazenamento, ou mantidos em dessecador, caso as outras análises sejam realizadas imediatamente ou em até 5 dias após a extração.

Cálculo

$$\% \text{ rendimento de endosperma} = \frac{\text{massa (g) de endosperma isolado de 15 grãos}}{\text{massa (g) dos 15 grãos hidratados drenados}} \times 100$$

$$\% \text{ amido no endosperma} = \frac{\text{massa (g) do amido seco extraído}}{\text{massa (g) do endosperma}} \times 100$$

$$\% \text{ extratibilidade do amido} = \frac{\text{massa (g) de amido extraído seco}}{\text{massa (g) dos 15 grãos (base seca)}} \times 100$$

Utilizar as médias das triplicatas analíticas para avaliação de resultados.

Resultados Esperados

A extratibilidade média do amido deve estar no intervalo de 60 a 75% do total da massa de grãos de milho secos.

O amido extraído deverá apresentar cor branca e poderá ser utilizado para determinar propriedades de gelatinização, térmicas e composição (amilose/ amilopectina).

Informações Relevantes

Utilizar jaleco, luvas e óculos de segurança durante a realização da análise.

Realizar o ensaio em temperatura ambiente de 22 °C.

Manusear os solventes voláteis na capela.

Referências

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of analysis**. 11th ed. St. Paul, 1999.

BELYEA, R. L.; RAUSCH, K. D.; TUMBLESON, M. E. Composition of corn and distillers dried grains with solubles from dry grind ethanol processing. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 3, p. 293-308, 2004.

CHEN, P.; YU, L.; SIMON, G. P.; LIU, X.; DEAN, K.; CHEN, L. Internal structures and phase-transitions of starch granules during gelatinization. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1975-1983, 2011.

ECKHOFF, S R.; SINGH, S K.; ZEHR, B E. A 100-g laboratory corn wet-milling procedure. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 54-57, 1996.

- GUMIENNA, M.; SZWENGIEL, A.; LASIK, M.; SZAMBELAN, K.; MAJCHRZYCKI, D.; ADAMCZYK, J.; NOWAK, J.; CZARNECKI, Z. Effect of corn grain variety on the bioethanol production efficiency. **Fuel**, v. 164, p. 386-392, 2016.
- 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.
- KRIEGER, K. M.; DUVICK, S. A.; POLLAK, L. M.; WHITE, P. J. Thermal properties of corn starch extracted with different blending methods: microblender and homogenizer. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 553-555, 1997.
- MU-FORSTER, C.; WASSERMAN, B. P. Surface localization of zein storage proteins in starch granules from maize endosperm. Proteolytic removal by thermolysin and in vitro cross-linking of granule-associated polypeptides. **Plant Physiology**, v. 116, n. 4, p. 1563-1571, 1998.
- PAES, M. C. D.; TEIXEIRA, F. F.; BARBOSA, N. A.; VOLPI, B. D.; SANT'ANA, R. de C. O. Rendimento de extração de amido em germoplasma de milho tropical. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 4., 2010, Goiânia. **Potencialidades, desafios e sustentabilidade**: resumos expandidos... Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010.
- PAES, M. C. D.; SANT'ANA, R. de C. O.; VOLPI, B. D. Características físicas e químicas do grão de milho. In: BORÉM, A.; RIOS, S. de A. (Org.). **Milho bio-fortificado**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. p. 45-86.
- PAES, M. C. D.; GONTIJO NETO, M. M.; SILVA, A. F. da; KARAM, D. Atributos de qualidade de híbridos de milho produzidos em safrinha relacionados à produção de etanol. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., 2016, Bento Gonçalves. **Milho e sorgo**: inovações, mercados e segurança alimentar: anais. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016.
- XU, N.; WANG, D.; LIU, J. Variance of zein protein and starch granule morphology between corn and steam flaked products determined starch ruminal degradability through altering starch hydrolyzing bacteria attachment. **Animals**, v. 9, n. 9, E626, 2019.
- MUSSOLINI, R. C.; LOPES FILHO, J. F.; DUARTE, A. P. Physical-chemical characterization and wet milling yield of four maize hybrids. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 3, p. 523-529, 2014.

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
 Caixa Postal 151
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
 Fone: (31) 3027-1100
 Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Formato digital (2018)



Comitê Local de Publicações
 da Unidade Responsável

Presidente

Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo

Elena Charlotte Landau

Membros

Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria
 Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira
 Simeone, Roberto dos Santos Trindade e
 Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto

Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica

Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações

Tânia Mara Assunção Barbosa

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Tânia Mara Assunção Barbosa

Fotos da capa

Leonardo Rocha e Sandra Maria Brito