

ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS DA DISCIPLINA DE ANÁLISE DE ALIMENTOS

Eliana Janet Sanjinez Argandoña
Iriani Rodrigues Maldonade
Caroline Alves Breda
Priscilla Narciso Justi
Ariana Vieira Alves
Tânia Granzotti da Silva



2017

Equipe EdUFGD/2012
Coordenação editorial: Edvaldo Cesar Moretti
Administração: Givaldo Ramos da Silva Filho
Revisão e normalização bibliográfica:
Raquel Correia de Oliveira
Programação visual: Marise Massen Frainer

CONSELHO EDITORIAL
Edvaldo Cesar Moretti - Presidente
Célia Regina Delácio Fernandes
Luiza Mello Vasconcelos
Marcelo Fossa da Paz
Paulo Roberto Cimó Queiroz
Rozanna Marques Muzzi
Wedson Desidério Fernandes

A presente obra foi aprovada de acordo
com o Edital 04/2012/EdUFGD.
Os dados acima referem-se ao ano de 2012.

Editora filiada à



Gestão 2015/2019
Universidade Federal da Grande Dourados
Reitora: Liane Maria Calarge
Vice-Reitor: Marcio Eduardo de Barros

Equipe EdUFGD
Coordenação editorial:
Rodrigo Garófallo Garcia
Administração: Givaldo Ramos da Silva Filho
Revisão e normalização bibliográfica:
Cynara Almeida Amaral, Raquel Correia
de Oliveira, Wanessa Gonçalves Silva
Programação visual: Marise Massen Frainer
e-mail: editora@ufgd.edu.br

CONSELHO EDITORIAL
Rodrigo Garófallo Garcia - Presidente
Marcio Eduardo de Barros
Thaise da Silva
Clandio Favarini Ruviano
Gicelma da Fonseca Chacarosqui Torchi
Rogério Silva Pereira
Eliane Souza de Carvalho

Diagramação, impressão e acabamento: Triunfal Gráfica e Editora | Assis | SP
Revisão: Tiago Gouveia Faria

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R843 Roteiro de aulas práticas da disciplina de análise de alimentos / Eliana Janet Sanjinez Argandoña... [et al.] -- Dourados, MS: Ed. UFGD, 2017. (Coleção Cadernos Acadêmicos). 105p.

ISBN: 978-85-8147-110-5
Possui referências

1. Composição de alimentos. 2. Manuais de laboratórios.
3. Bromatologia. I. Título.

CDD – 641

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

© Todos os direitos reservados. Conforme lei nº 9.610 de 1998

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	5
AMOSTRAGEM E PREPARO DA AMOSTRA	7
ATIVIDADE DE ÁGUA.....	11
UMIDADE E SÓLIDOS TOTAIS	15
CONTEÚDO MINERAL FIXO OU CINZAS.....	19
LIPÍDEOS	23
MÉTODO BLIGH DYER	23
MÉTODO SOXHLET	27
PROTEÍNAS	31
MÉTODO KJELDAHL	31
MÉTODO LOWRY	37
MÉTODO BIURETO	41
CARBOIDRATOS	45
MÉTODO EYNON–LANE	45
MÉTODO DE ÁCIDO DINITROSSALICÍLICO (DNS)	53
MÉTODO SOMOGYI-NELSON	59
DETERMINAÇÃO DE AMIDO	65
FIBRAS	71

FIBRA INSOLÚVEL.....	71
FIBRA INSOLÚVEL – DIGESTOR SEMI-INDUSTRIAL.....	77
SÓLIDOS SOLÚVEIS	81
ACIDEZ TITULÁVEL	85
MEDIDA DE PH EM ALIMENTOS	91
VITAMINA C	97
MÉTODO TILLMANS	97
MÉTODO COM IODATO DE POTÁSSIO	101

APRESENTAÇÃO

O caderno acadêmico *Roteiro de aulas práticas da disciplina de análise de alimentos* é o resultado da compilação de práticas de análise de composição proximal de alimentos, bem como das análises físicas que contribuem para a avaliação de um alimento ou produto alimentício.

O texto abrange os aspectos básicos da química de alimentos, tendo em vista o importante papel que esta desempenha em muitas áreas da Ciência e da Tecnologia de Alimentos e a necessidade de fornecer uma descrição detalhada dos principais procedimentos técnicos utilizados.

Os procedimentos operacionais e a aplicação dos fundamentos básicos da química e da bioquímica na quantificação dos constituintes dos alimentos, assim como na avaliação dos produtos processados, são fundamentais no controle de qualidade e na escolha por uma ou outra técnica de conservação. Nesse sentido, este caderno surgiu da necessidade de reunir as principais técnicas de análise de alimentos com o objetivo de facilitar o ensino-aprendizagem dos estudantes dos cursos de Engenharia de Alimentos, Agronomia, Biotecnologia, Nutrição e de áreas afins, auxiliando na sua qualificação profissional.

Eliana Janet Sanjinez Argandoña
Iriani Rodrigues Maldonade

AMOSTRAGEM E PREPARO DA AMOSTRA

Experimento: processo de amostragem

1. Introdução

Amostra é definida como “uma porção limitada do material tomada do conjunto — o universo, na terminologia estatística — selecionada de maneira a possuir as características essenciais do conjunto”.

Amostragem é a série sucessiva de etapas operacionais específicas para assegurar que a amostra seja obtida com a necessária condição de representatividade. A amostra é obtida através de incrementos recolhidos segundo critérios adequados.

O preparo de uma amostra é um processo por meio do qual a amostra é convertida em material homogêneo e satisfatório para a análise. Compreende geralmente três etapas principais:

- a) Coleta da amostra bruta;
- b) Preparo da amostra de laboratório;
- c) Preparo da amostra para análise.

A quantidade de material usado para a execução da análise é relativamente pequena em comparação com a totalidade do material em estudo. Portanto, é importante considerar os seguintes fatores na extração de uma amostragem: finalidade da inspeção, natureza do lote, natureza do material em teste e natureza dos procedimentos de teste.

2. Objetivo

Compreender o processo de amostragem, bem como sua relevância para o processo analítico.

3. Material

- Bandejas, béquer, espátulas, facas, pipetas graduadas e peneira.
- Equipamentos: seladora, liquidificador ou micromoinho e balança de precisão.

4. Procedimento

Preparo da amostra:

- **Alimentos secos** (em pó ou granulares): fazer quarteamento.
- **Alimentos líquidos:** retirar porções de líquido de diferentes partes do recipiente (do fundo, do meio e de cima) e misturar as porções no final.
- **Alimentos semissólidos** (queijos duros e chocolates): as amostras devem ser raladas ou trituradas, depois fazer quarteamento, como nas amostras em pó ou granulares.
- **Alimentos úmidos** (carnes, peixes e vegetais): a amostra deve ser picada ou moída e misturada. Em seguida, se necessário, pode passar pelo quarteamento para, somente depois, ser tomada a alíquota para a análise. A estocagem deve ser realizada sob refrigeração.
- **Alimentos pastosos** (pudins, molhos, entre outros) **e alimentos líquidos contendo sólidos** (compotas de frutas, vegetais em salmoura e produtos enlatados em geral): as amostras devem ser trituradas em liquidificador e misturadas, seguindo-se a retirada das alíquotas para análise.

- **Alimentos com emulsão** (manteiga e margarina): as amostras devem ser cuidadosamente aquecidas a 35°C em frasco com tampa e, depois, devem ser homogeneizadas. A partir daí são retiradas alíquotas necessárias para a análise.
- **Frutas e hortaliças:** as frutas grandes devem ser cortadas ao meio, no sentido longitudinal e transversal, de modo que fiquem divididas em quatro partes. Duas partes opostas devem ser descartadas e as outras duas devem ser misturadas e homogeneizadas em liquidificador. As frutas pequenas podem ser homogeneizadas por inteiro no liquidificador.

5. Bibliografia

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** Campinas: Unicamp, 2003.

ATIVIDADE DE ÁGUA

Experimento: determinação da atividade de água em amostras alimentícias

1. Introdução

A água pode estar presente na amostra sob duas formas: 1) **água disponível** (fracamente ligada ao substrato e facilmente eliminada), que atua como solvente e favorece o crescimento microbiano e as reações químicas; 2) **água ligada** (ou fortemente ligada ao substrato), a qual é difícil de ser eliminada, já que não permite o crescimento de micro-organismo e não é utilizada como solvente, retardando as alterações químicas.

A água se liga ao produto por meio de ligações iônicas, grupos hidroxilas (em açúcares), grupo carbonil e amino (em proteínas), força de Van der Waals, entre outros. Assim, a atividade de água (a_a) se diferencia da umidade pelo fato de a umidade determinar o valor quantitativo de água em uma amostra em base seca ou em base úmida. A umidade é uma propriedade que depende da quantidade de amostra. A atividade de água é uma medida (qualitativa) do estado de energia da água em um sistema. É uma propriedade que não depende da quantidade de material.

Os efeitos da atividade de água em um alimento estão relacionados com a velocidade das reações químicas e enzimáticas e do crescimento de micro-organismo, bem como com a alteração de sua aparência e textura. Em função da atividade de água, os alimentos são classificados em três grupos: alimentos com baixa umidade (a_a até 0,60), alimentos com umidade intermediária (a_a entre 0,60 e 0,90) e alimentos com alta umidade

(a_a com valores acima de 0,90). A partir do conhecimento da a_a de um alimento pode-se prever a estabilidade do mesmo.

2. Objetivo

Verificar a atividade de água em alimentos utilizando higrômetro Aqualab.

3. Material

- Cápsulas, espátula, lenço de papel e pipetas.
- Reagentes: soluções saturadas de sais com atividade de água conhecida a 20°C. LiCl (0,113), MgCl₂ (0,331), K₂CO₃ (0,432), Mg(CO₃)₂ (0,544), NaCl (0,755), KCl (0,851), K₂SO₄ (0,976) ou outras e água destilada ou deionizada (1,000).
- Equipamento: higrômetro Aqualab.

4. Procedimento

Calibração do aparelho:

- Ligar o aparelho (pelo menos 15 minutos antes das análises) para estabilização.
- Distribuir em cápsulas água deionizada ou destilada (em triplicata) em quantidade suficiente para preencher metade da cápsula.
- Colocar a cápsula no compartimento do analisador de atividade de água e esperar a estabilização da leitura. O valor da atividade de água é 1,000, sendo aceitáveis as variações de até 0,003. Repetir a operação com as demais cápsulas.
- Realizar o mesmo procedimento utilizando soluções saturadas de sais com atividade de água conhecida e verificar os resultados.

- Quando se conhece a atividade de água teórica do produto, calibrar o aparelho com água e com uma solução saturada de sal com atividade de água inferior ao esperado para o produto.
- Anotar a temperatura em todas as leituras realizadas para fazer a correção, caso seja necessário.

Preparo da amostra:

- Triturar as amostras de modo a se obterem alíquotas homogêneas.

Determinação:

- Colocar uma quantidade de amostra suficiente para distribuir na cápsula, sem excesso (até a metade do recipiente). Evitar que a amostra transborde para não contaminar o aparelho.
- Colocar a cápsula no analisador de atividade de água e esperar até a estabilização, a qual pode ser verificada pelo *display* ou pelo som ou luz emitido pelo aparelho. Efetuar a leitura.

Cálculos:

Calcular a média dos resultados e o desvio padrão.

$$a_a = \frac{a_{a_1} + a_{a_2} + a_{a_3}}{3}$$

Onde a_a é a atividade de água (adimensional)

Desvio padrão:
$$s = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Onde x_1, x_2, x_n são os valores da amostra, \bar{x} é a média da amostra e n é o número de amostras.

5. Bibliografia

BOBBIO, P. A., BOBBIO F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Ed. Varela, 1995.

LABUZA, T. P. **Water relations of foods**. New York: Academic Press, 1975. p. 155-172.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. **Análises de materiais biológicos**. Campinas: Unicamp, 2006. p. 3 e 4.

UMIDADE E SÓLIDOS TOTAIS

Experimento: determinação de umidade em amostras alimentícias

1. Introdução

A umidade ou teor de água presente no alimento é uma das determinações mais importantes na análise de alimentos, principalmente por estar relacionada com a estabilidade e a conservação. Teores de umidade fora das recomendações técnicas podem acarretar alterações indesejáveis do ponto de vista químico, bioquímico e físico. Além disso, favorecem o crescimento microbiano e promovem a deterioração do alimento, impossibilitando o seu consumo.

Existem vários métodos para determinar a umidade em alimentos. A escolha do método vai depender: 1) da natureza da amostra, 2) da quantidade de água e da sua forma de ligação com os outros constituintes, 3) da rapidez que se deseja na determinação e 4) do equipamento disponível.

A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, elementos que podem afetar as características do produto durante a estocagem, a embalagem e o processamento.

Em geral, a determinação de umidade, que parece um método simples, pode se tornar complexa em função da necessidade de exatidão e precisão nos resultados. As dificuldades encontradas geralmente são: separação incompleta de água do produto, decomposição do produto com formação de água além da original e perda das substâncias voláteis do alimento que serão computadas como massa da água presente no alimento.

Os sólidos totais ou a matéria seca são obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo de umidade.

2. Objetivo

Compreender os conceitos de umidade e sólidos totais em alimentos e quantificar o teor de água e de massa seca em produtos alimentícios.

3. Material

- Cadinho previamente seco em estufa, béquer, bastão de vidro, dessecador com sílica gel, espátula e pinça metálica.
- Equipamentos: balança analítica, banho-maria e estufa de secagem com ventilação.

4. Procedimento

Preparo da amostra:

- **Amostras líquidas:** devem ser evaporadas em banho-maria até que apresentem consistência pastosa. Só então podem ser colocadas na estufa.
- **Amostras açucaradas:** formam uma crosta dura na superfície que impede a saída do vapor da água do interior da amostra. Nesse caso, adiciona-se areia ou pedra-pomes em pó misturada à amostra para aumentar a superfície de contato e facilitar a evaporação. Dependendo da amostra, realizar o procedimento a 70°C.
- **Amostras em pó:** devem ser pesadas rapidamente para não absorver a umidade do meio ambiente.

Determinação:

- Pesar em balança analítica de 2 a 5 g de amostra num cadinho previamente seco e tarado.
- Espalhar homogeneamente a amostra no cadinho.
- Colocar o cadinho na estufa previamente aquecida na temperatura de trabalho (60°C a 105°C). A escolha da temperatura dependerá da composição da amostra.

- Pesar o cadinho a cada duas horas ou deixar secar até se obter massa constante (6 a 24 horas, aproximadamente).
- Para realizar a leitura da massa, retirar o cadinho da estufa com uma pinça e colocá-lo no dessecador até atingir a temperatura ambiente.
- Retirar do dessecador com a pinça o conjunto formado pelo cadinho + amostra seca e pesar em balança analítica.
- A massa da amostra úmida é calculada pela diferença entre a massa do conjunto cadinho + amostra úmida e a massa do cadinho vazio. A massa da água evaporada será a diferença entre a massa da amostra úmida e a massa da amostra seca.

Recomendações: A sílica gel deve ser seca a 120-150°C, por uma a duas horas, antes de ser utilizada no dessecador!

Cálculos:

A umidade contida no material pode ser expressa em base úmida ou base seca. A umidade em base úmida (U_{BU}) é mais utilizada em designações comerciais, armazenamento, vida útil, entre outros, enquanto a umidade em base seca (U_{BS}) é utilizada em trabalhos de pesquisa e cinéticas de secagem.

Umidade em base úmida

$$U_{BU} (g_{\text{água}} / g_{\text{am}}) = \frac{M_{\text{am}} - M_{\text{f}}}{M_{\text{am}}} \quad \text{ou} \quad U_{BU} (\%) = \frac{M_{\text{am}} - M_{\text{f}}}{M_{\text{am}}} \times 100 \quad \text{ou}$$

$$U_{BU} (\%) = \frac{M_{\text{água}}}{M_{\text{am}}} \times 100 \quad \text{ou} \quad U_{BU} (\%) = \frac{M_{\text{água}}}{M_{\text{água}} + S_{\text{seco}}} \times 100$$

Umidade em base seca

$$U_{BS} (g_{\text{água}} / g_{\text{am}}) = \frac{M_{\text{am}} - M_f}{M_f} \text{ ou } U_{BS} (g_{\text{água}} / g_{\text{am}}) = \frac{M_{\text{am}} - M_f}{M_f} \times 100 \text{ ou}$$

$$U_{BS} (\%) = \frac{M_{\text{água}}}{S_{\text{seco}}} \times 100$$

Amostra

$$M_{\text{am}} = M_{\text{água}} + S_{\text{seco}}$$

Onde: U_{BU} , umidade em base úmida ($g_{\text{água}}/g_{\text{amostra}}$ ou %). U_{BS} , umidade em base seca ($g_{\text{água}}/S_{\text{seco}}$ ou %), M_{am} , massa da amostra (g). M_f , massa da amostra depois de seca (g). $M_{\text{água}}$, quantidade de água retirada durante a secagem (g) e S_{seco} , matéria seca (ou sólido seco) contida na amostra (g).

Mudança de base

Passar de Base Úmida para Base Seca: Passar de Base Seca para Base Úmida:

$$U_{BS} (\%) = \frac{U_{BU} (\%)}{100 - U_{BU} (\%)} \times 100$$

$$U_{BU} (\%) = \frac{U_{BS} (\%)}{100 + U_{BS} (\%)} \times 100$$

Sólidos totais

Os sólidos totais (denominados também de sólido seco, massa seca ou matéria seca) são a diferença entre a massa total da amostra e a massa de água evaporada.

5. Bibliografia

SALINAS, R.D. **Alimentos e nutrição**: introdução à Bromatologia. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

CECHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. rev. Campinas SP: Editora da UNICAMP, 2003.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. **Análises de materiais biológicos**. Campinas: Unicamp, 2006. p. 3 e 4.

CONTEÚDO MINERAL FIXO OU CINZAS

Experimento: determinação do conteúdo mineral total

1. Introdução

O conteúdo de mineral fixo ou cinza de um alimento é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, a qual é transformada em CO_2 , H_2O e NO_2 .

Os elementos minerais se apresentam na cinza sob a forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos e cloretos, dependendo das condições de incineração e da composição do alimento. Algumas mudanças podem ocorrer, tais como: a transformação de oxalatos de cálcio em carbonatos ou até em óxidos.

A cinza é constituída principalmente de **macronutrientes**, normalmente presentes em grande quantidade nos alimentos (K, Na, Ca, P, S, Cl e Mg), e **micronutrientes**, normalmente presentes em pequenas quantidades, como Al, Fe, Cu, Mn e Zn, além dos chamados **elementos traços**, que se encontram em quantidades muito pequenas nos alimentos. Assim, a determinação dos constituintes minerais nos alimentos pode ser dividida em duas classes: determinação das cinzas (total, solúvel e insolúvel) e determinação dos componentes individuais da cinza.

O teor de cinzas é utilizado como indicativo de várias propriedades. Por exemplo:

- a) no refino de açúcar: teores muito altos no mel de cana-de-açúcar dificultarão a cristalização e a descoloração;
- b) na farinha: a quantidade de cinza influenciará na extração;

- c) na verificação do valor nutricional de alguns alimentos e rações: o alto teor de cinza insolúvel em ácido indica a presença de areia.

Os componentes individuais das cinzas podem ser divididos em:

- a) indispensáveis para o metabolismo normal, constituindo geralmente a dieta essencial;
- b) aqueles que não têm nenhuma função conhecida ou até podem ser prejudiciais à saúde (agrotóxicos resíduos de processos industriais como Pb e Hg). Alguns componentes minerais podem favorecer ou prejudicar o processo de fermentação em produtos fermentados.

2. Objetivo

Determinar o teor de resíduo mineral fixo de um alimento pela técnica de incineração.

3. Material

- Cadinhos de porcelana, dessecador com sílica gel, pinça metálica e espátula.
- Equipamentos: balança analítica, banho-maria, chapa aquecedora ou bico de Bunsen e mufla.

4. Procedimento

Preparo da amostra:

- A massa de amostra varia de acordo com o conteúdo de minerais e de umidade, presentes no produto. Alimentos com alto teor de umidade requerem maior quantidade; aqueles com baixo teor, menor quantidade de massa. Por exemplo:

- Cereais, queijo, leite: 3 - 5 g;

- Açúcar, carne, legumes, vinho: 5 - 10 g;
 - Vinho: 10 mL;
 - Sucos, frutas frescas, frutas enlatadas: 25 g;
 - Geléia, xarope, doces em massa: 10 g.
- **Amostras líquidas ou úmidas:** devem ser secas em estufa antes da determinação de cinzas.
 - **Produtos que contêm grande quantidade de matéria volátil:** condimentos devem ser aquecidos vagarosamente de maneira que comecem a fumar sem pegar fogo.
 - **Produtos ricos em gordura:** devem ser aquecidos cuidadosamente em chapa aquecedora ou bico de Bunsen para evitar excesso de chama, o que poderia causar perdas por arraste.
 - **Peixes e produtos marinhos gordurosos:** deve-se fazer uma incineração prévia a baixa temperatura de modo que a gordura comece a fumar sem incendiar-se.
 - **Produtos com muita gordura:** no caso da manteiga, é necessário fazer a extração da gordura da amostra seca com algum solvente orgânico (éter etílico, éter de petróleo ou outro) antes da incineração da amostra.
 - **Amostras açucaradas:** tendem a formar espuma. Recomenda-se secar as amostras a 100°C, em banho-maria ou em estufa, adicionando-se em seguida pequenas gotas de óleo ou azeite para então o produto ser aquecido vagarosamente.

Determinação:

- Aquecer o cadinho na mufla a 550°C por meia hora. Esfriar em dessecador. Manipular o cadinho com a pinça, evitando o contato com as mãos, para não passar umidade e gordura ao cadinho. Colocar na balança analítica e pesar. Anotar a massa do cadinho vazio e tarar.
- Pesar no cadinho 3 a 10 g de amostra.

- Colocar o cadinho juntamente com a amostra na mufla pré-aquecida a 150°C e fechar a mufla. Programar o aquecimento para 550 – 600°C. Deixar nessa temperatura por quatro horas ou até que o material se torne branco ou cinza-claro. Essa é uma indicação de que a cinza está pronta.
- Se o material ainda apresentar cor escura, deve ser retirado da mufla (previamente desligada e aberta quando a temperatura estiver abaixo dos 150°C), resfriado, molhado com 0,5 mL de água e aquecido novamente, até que resulte numa cinza branca. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até que se obtenha um peso constante.
- Esfriar o material no dessecador por cerca de 20 a 30 minutos. Pesar o material frio na balança analítica.

Cálculos:

$$\text{Resíduo mineral ou Cinzas (\%)} = \frac{M_c}{M_{am}} \times 100$$

Onde: M_c , massa de cinzas que é a diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio (g); M_{am} , massa da amostra (g).

A cinza obtida não tem necessariamente a mesma composição que a matéria mineral presente originalmente no alimento, pois pode haver perda por volatilização ou alguma interação entre os constituintes da amostra.

5. Bibliografia

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 1999. 212 p.

TABELA brasileira de composição de alimentos. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>>. Acesso em: 30 jan. 2013.

LIPÍDEOS

MÉTODO BLIGH DYER

Experimento: quantificar o teor de lipídeos totais pelo método a frio

1. Introdução

A determinação quantitativa de lipídeos em alimentos é um parâmetro importante em estudos bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e de processamento dos mais diversos tipos de alimentos. Na indústria de extração de óleos vegetais, um rígido controle do teor de lipídeos na matéria-prima e nos subprodutos deve ser mantido, tanto com fins econômicos como tecnológicos.

Os métodos rotineiros para determinação quantitativa de lipídeos baseiam-se na extração da fração lipídica por meio de um solvente orgânico adequado. Após a extração e a remoção do solvente, determina-se gravimetricamente a quantidade de lipídeos presente. O resíduo obtido não é constituído unicamente por triglicerídeos, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente, sendo geralmente fosfatídeos, esteróis, vitaminas A e D, carotenóides, óleos essenciais, entre outros. Estes, porém, apresentam-se em quantidades relativamente pequenas, que não representam diferença significativa na determinação. A extração completa de lipídeos se torna difícil em produtos contendo alta proporção de proteínas e carboidratos.

Bligh e Dyer, em 1959, sugeriram um método de extração de gordura a frio que utilizava uma mistura de três solventes: clorofórmio-metanol-água. Inicialmente, a amostra é misturada com metanol e clorofórmio, elementos que, devido à sua proporção, formam uma só fase com a amostra. Em seguida, adiciona-se mais clorofórmio e água, de maneira a formar duas fases distintas: uma de clorofórmio, contendo os lipídeos, e outra de metanol + água, contendo as substâncias não lipídicas. A fase de clorofórmio com a gordura é isolada e, após a evaporação do clorofórmio, obtém-se a quantidade de gordura por pesagem. O método tem uma série de vantagens em relação à extração a quente, por exemplo:

- Extrai todas as classes de lipídeos e não unicamente os compostos neutros;
- Os lipídeos são extraídos sem aquecimento e os extratos podem ser utilizados para avaliação de deterioração dos lipídeos através do índice de peróxidos e ácidos graxos livres, determinações do teor de carotenóides, vitamina E, composição de ácidos graxos e esteróis;
- Pode ser utilizado em produtos com alto teor de umidade como leite e ovos, além dos produtos secos;
- A determinação completa pode ser realizada em tubos de ensaio, não sendo necessário o uso de equipamentos específicos.

2. Objetivo

Determinar a quantidade de lipídeos totais em alimentos por Bligh Dyer.

3. Material

- Béquer de 50, 250 mL, balão volumétrico de 250 mL, dessecador, erlenmeyer de 250 mL, funil, papel de filtro, placas de petri, pipeta volumétrica de 5, 10 e 20 mL, pipeta graduada de 10 mL,

tubos de vidro de 250 x 25 mm de 70 mL, tubos de 150 x 15 mm de 30 mL e vidro relógio 80mm.

- Reagentes: clorofórmio P.A., metanol P.A., solução de sulfato de sódio 1,5% (p/v) em água e sulfato de sódio anidro P.A.
- Equipamentos: centrífuga de baixa rotação e agitador rotativo para tubos (*Vortex*), estufa com circulação de ar e micromoinho.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- Solução de sulfato de sódio 1,5%: pesar 3,75 g de sulfato de sódio e dissolver em 50 mL de água destilada. Completar o volume com água destilada em um balão volumétrico de 250 mL.

Preparo da amostra:

- Moer a amostra e peneirar para se obter granulometria uniforme. Produtos com teores de gordura acima de 20% devem pesar entre 2,0 a 2,5 g, e produtos com teores abaixo de 20% devem pesar entre 3,0 a 3,5 g.

Determinação:

- Pesar 2,5 g de amostra (ou a quantidade escolhida). Anotar a massa. Transferir para um tubo de 70 mL.
- Adicionar exatamente 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. Tampar hermeticamente. Colocar os tubos na centrífuga por 30 minutos.
- Retirar da centrífuga e adicionar exatamente 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução de sulfato de sódio 1,5% (p/v). Tampar e agitar vigorosamente por dois minutos.
- Deixar separar as camadas de óleo dos solventes de forma natural ou centrifugar a 1000 rpm por dois minutos para acelerar a separação. Descartar a camada superior e filtrar rapidamente a

inferior num tubo de 30 mL. Se o filtrado estiver opaco ou com gotículas de água, adicionar aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro, tampar e agitar para remover os traços de água.

- Medir exatamente 5 mL do filtrado e transferir para um béquer de 50 mL previamente tarado e pesado (ou placas de Petri). Colocar na estufa de circulação de ar a 80°C – 100°C até a total evaporação do solvente. Resfriar em dessecador e pesar. Anotar a massa.

Cálculos:

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{M_{\text{óleo}} \times 4}{M_{\text{am}}} \times 100$$

Onde M_{am} é a massa da amostra (g) e $M_{\text{óleo}}$ a massa dos lipídeos (g) contidos em 5 mL.

Recomendações: quando as amostras contiverem água acima de 10% (relação de solventes 1:2:0,8), considerar a água fornecida pela amostra. Para tanto é necessário conhecer a umidade da amostra.

5. Bibliografia

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Método de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem animal e vegetal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

MÉTODO SOXHLET

Experimento: quantificar o teor de lipídeos totais de alimentos utilizando o método de Franz Von Soxhlet

1. Introdução

A extração de lipídeos dos alimentos a quente se faz por lixiviação exaustiva mediante a utilização de solvente orgânico, seguida de remoção por evaporação do solvente utilizado. O resíduo seco obtido é constituído por todos os compostos que, nas condições de determinação, são extraídos pelo solvente, por exemplo, fosfatídeos, esteróides, vitaminas, carotenóides, óleos essenciais, entre outros.

O método está baseado em três etapas:

- a) Extração de gorduras da amostra com solvente;
- b) Eliminação do solvente por evaporação;
- c) Quantificação da gordura por pesagem.

O método de Soxhlet utiliza um equipamento que permite a extração de lipídeos por meio da contínua passagem de um solvente através da amostra.

A escolha do solvente vai depender dos componentes lipídicos existentes no alimento. Em muitos alimentos processados, como em produtos derivados de leite, pão, produtos fermentados, açucarados e produtos de origem animal, a maior parte dos lipídeos está ligada às proteínas e carboidratos, nessa condição a extração direta com solventes não polares é ineficiente. Estes alimentos precisam ser preparados para a extração de gordura

por hidrólise ácida ou básica ou outros métodos, sendo necessário o controle da temperatura e do tempo de exposição do material com o solvente.

A eficiência da extração a quente depende de uma série de fatores:

- natureza do material a ser extraído;
- tamanho das partículas: quanto menor, mais fácil é a penetração do solvente;
- umidade da amostra: a água presente na amostra dificulta a penetração do solvente por imiscibilidade;
- natureza do solvente;
- semelhança entre as polaridades do solvente e da amostra;
- ligação dos lipídeos com outros componentes da amostra;
- circulação do solvente através da amostra;
- a velocidade do refluxo não deve ser nem muito alta nem muito baixa (pode haver pouca penetração do solvente à velocidade muito alta);
- quantidade relativa entre solvente e material a ser extraído: quanto mais solvente, maior é a extração. Porém, devido ao alto custo do solvente, não deve ser utilizado em excesso.

Os solventes mais utilizados na extração de lipídeos são os éteres de petróleo e etílico. No entanto, podem ser utilizados outros solventes como o hexano.

2. Objetivo

Determinar o conteúdo de lipídeos totais por método de extração a quente.

3. Material

- Balão receptor de Soxhlet (*reboiler*) de 250 mL, cartuchos de Soxhlet ou papel de filtro, algodão, vidro de relógio ou placas de petri e dessecador.

- Reagentes: éter de petróleo P.A, éter etílico P.A ou hexano P.A.
- Equipamentos: balança analítica, banho termostaticado, estufa de secagem e sistema de extração de gorduras tipo Soxhlet.

4. Procedimento

Preparo da amostra:

- Secar a amostra previamente em estufa. Pode-se utilizar a amostra que foi usada na determinação de umidade.
- A amostra deve estar finamente dividida para permitir uma melhor penetração do solvente.
- Materiais que se aglomeram facilmente, formando pastas consistentes, devem ser manipulados com sulfato de sódio anidro antes de serem colocados no cartucho.

Determinação:

- Pesar 2,5 g da amostra (amostra seca) em cartucho de Soxhlet (com um pouco de algodão no fundo) ou em papel de filtro.
- Se estiver utilizando cartucho, este pode ser aquecido em estufa a 105°C por mais ou menos 40 minutos para uma maior penetração do solvente. Em seguida, colocar a amostra e preencher o cartucho com algodão até cobrir toda a amostra.
- Se estiver utilizando papel de filtro, faça trouxinhas e amarre com barbante para evitar que a amostra se disperse.
- Colocar o cartucho ou a trouxinha dentro do tubo extrator.
- Pesar o *reboiler*, previamente seco em estufa a 105°C por duas horas e resfriado em dessecador.
- Montar o sistema de extração.
- Colocar 270 mL de éter de petróleo, éter etílico ou hexano no *reboiler*. Conectar o *reboiler* ao extrator. Conectar o conjunto ao condensador, no qual deverá circular água refrigerada. Abrir as válvulas de refluxo.

- Realizar a extração contínua, sob aquecimento, por aproximadamente quatro a seis horas.
- Fechar as válvulas de refluxo e recuperar o solvente até que o balão esteja completamente seco.
- Secar o *reboiler* com o resíduo (óleo) em estufa a 105°C por duas horas ou até se obter um peso constante.
- Esfriar o *reboiler* em dessecador e pesar.

Cálculos:

$$\text{Lipídeos (\%)} = \left(\frac{M_R - M_r}{M_{am}} \right) \times 100$$

Onde M_R é a massa do *reboiler* com lipídeos (g), M_r a massa do *reboiler* (g) e M_{am} , a massa da amostra (g).

Quando a amostra tem alto teor de umidade e é previamente seca, deve-se considerar o teor de umidade. Neste caso o cálculo será:

$$\text{Lipídeos (\%)} = \left(\frac{M_R - M_r}{M_{am\ sec\ a}} \right) \times (100 - U_{BU}(\%))$$

Onde $M_{am\ seca}$ é a massa da amostra seca (g) e U_{BU} é a umidade da amostra em base úmida (%).

5. Bibliografia

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S. ; TIGLEA, P (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analise-dealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2014.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2003.

PROTEÍNAS

MÉTODO KJELDAHL

Experimento: determinação de proteínas pelo método de Kjeldahl

1. Introdução

As proteínas são determinadas avaliando-se o nitrogênio total da amostra pelo método de Kjeldahl. O termo proteína bruta (ou total) envolve um grande grupo de substâncias com estruturas semelhantes, porém com funções fisiológicas diferentes. Baseado no fato de as proteínas terem porcentagem de nitrogênio quase constante, em torno de 16%, o que se faz é determinar o nitrogênio por meio de um fator de conversão (que é calculado tomando-se como base o valor médio de 16% de teor de nitrogênio contido na maioria das substâncias), transformando o resultado em proteína bruta.

No método de Kjeldahl, determina-se o nitrogênio contido na matéria orgânica, incluindo o nitrogênio protéico propriamente dito, e outros compostos nitrogenados não protéicos, tais como: aminas, amidas, lecitina, nitrilas e aminoácidos. Neste caso, o resultado será dado como proteína bruta (ou total).

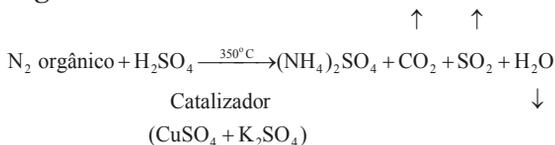
Há uma pequena inexatidão no uso do fator 6,25 nos produtos complexos, visto que os componentes de formulações têm fatores de 5,71 para soja, 5,70 para trigo, 5,95 para arroz, 6,38 para leite e outros. Dependendo da proporção, o uso do fator 6,25 poderá resultar num teor aumentado ou diminuído de proteína. Entretanto, enquanto não houver

acordo entre os pesquisadores, o fator 6,25 continuará a ser usado para qualquer fórmula alimentar.

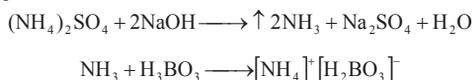
O princípio do método consiste em que proteínas e compostos nitrogenados, decompostos na presença de H_2SO_4 concentrado a quente (o sulfato de potássio aumenta o ponto de ebulição do ácido sulfúrico de 180 para $400^\circ C$), produzem sulfato de amônia. O sulfato de amônia, em presença de solução de hidróxido de sódio, libera amônia (NH_3), que é recebida na solução de ácido bórico. A amônia, na solução de ácido bórico, é titulada com solução de HCl com normalidade conhecida, determinando-se assim o teor de nitrogênio na amostra. Para o cálculo de proteína bruta, basta multiplicar o resultado pelo fator geral (6,25) ou específico (leite, arroz e outros).

Reações básicas:

Digestão:



Destilação:



Titulação:



Indicador vermelho de metila e azul de metileno, ponto de viragem pH 4,2 e 6,3.

2. Objetivo

Determinar proteínas em amostras de alimentos pelo método de Kjeldahl.

3. Material

- Bureta de 25 mL, erlenmeyer de 200 mL, garras, pisseta, pipetador tipo pera ou pipump, suporte universal, tubos de digestão micro-Kjedahl, papel de filtro e luvas de proteção com isolante térmico;
- Reagentes: ácido bórico P.A, ácido sulfúrico P.A, álcool etílico P.A, selenito de sódio P.A, sulfato de cobre P.A, sulfato de sódio P.A, solução de ácido clorídrico ou ácido sulfúrico a 0,1 N, solução de hidróxido de sódio 40%, verde de bromocresol e vermelho de metila P.A.
- Equipamentos: bloco digestor, destilador, balança analítica, estufa e capela de exaustão.

4. Procedimento

Preparo da amostra:

- Amostras úmidas deverão ser previamente secas para evitar a interferência da umidade na reação de digestão. Este procedimento diminui a forma do ácido, o que impede a total destruição da matéria orgânica.
- Amostras em pó podem ser pesadas e embrulhadas em papel de filtro para evitar que grudem na parede do tubo de vidro.

Preparo de reagentes:

- **Mistura digestora:** pesar 2 g de selenito de sódio, 4 g de sulfato de cobre, 21,4 g de sulfato de sódio e dissolver em 175 mL de água destilada. Adicionar levemente 200 mL de ácido sulfúrico em béquer de 1000 mL. O procedimento deve ser realizado em capela de exaustão com banho de gelo.
- **Solução NaOH 40% (p/v):** pesar 80 g de NaOH e adicionar aos poucos em 200 mL de água destilada. O procedimento deve ser realizado em capela de exaustão com banho de gelo.

- **Solução indicadora:** pesar 0,25 g de verde de bromocresol e 0,25 g de vermelho de metila. Dissolver em 250 mL de álcool etílico.
- **Solução de ácido bórico a 4,2%:** pesar 42 g de ácido bórico. Dissolver em um balão volumétrico de 1000 mL.
- **Solução de ácido sulfúrico 0,1 N:** transferir 3 mL de ácido sulfúrico concentrado para um balão volumétrico de 1000 mL, contendo cerca de 100 mL de água destilada. Completar o volume do balão volumétrico com água destilada. Padronização da solução: pesar cerca de 0,1000 g de carbonato de sódio (previamente seco em estufa a 200°C por duas horas), transferir para um erlenmeyer de 250 mL e dissolver com 50 a 75 mL de água destilada. Para a titulação: adicionar de duas a três gotas da solução indicadora vermelho de metila a 0,1%. Anotar o volume gasto. Fazer a titulação em triplicata.

$$V_{(mL)gasto} = \frac{V_1 + V_2 + V_3}{3} \quad Fc = \frac{V_{(mL)teórico}}{V_{(mL)gasto}} \quad [real] = [teórica] \times Fc$$

Determinação:

a) Digestão

- Ligar o bloco digestor a 100°C dentro da capela de exaustão.
- Pesar quantitativamente, em tubo de digestão micro-Kjeldahl, 0,1 g de amostra. Adicionar 7 mL de mistura digestora. Para o branco adicionar apenas 7 ml de solução digestora.
- Colocar o tubo no bloco digestor pré-aquecido a 100°C.
- Aumentar a temperatura em 50°C a cada 15 minutos, até atingir 350 – 400°C, observando sempre o comportamento da amostra em função da sua composição. Fazer este procedimento dentro da capela.
- Digerir até que o conteúdo dos tubos esteja transparente, de cor verde-azulado. Desligar o bloco digestor. A intensidade da coloração irá depender da composição da amostra.

- Deixar esfriar os tubos dentro da capela e adicionar com cuidado cerca de 10 mL de água destilada em cada tubo.

b) Destilação

- Colocar o tubo com a amostra já diluída no destilador. Na outra extremidade, colocar um erlenmeyer contendo 10 mL da solução receptora de ácido bórico + 3 gotas de solução indicadora, de modo que a mangueira do destilador esteja imersa na solução receptora. Neutralizar a amostra com aproximadamente 20 a 30 mL de NaOH 40% (aparecimento de cor escura do óxido de cobre formado).
- Recolher 50 a 100 mL do destilado, dependendo do teor de nitrogênio presente na amostra. O nitrogênio entra em contato com o ácido bórico na forma de gás. Portanto, o tubo de saída do destilador deverá estar imerso na solução receptora.

c) Titulação

- Titular o destilado (borato de amônio) sob agitação com ácido sulfúrico 0,1 N e solução indicadora, até que o indicador altere a sua cor de verde para lilás.

Cálculos:

$$N (\%) = \frac{V_{HCl} \times N_{HCl} \times 0,014 \times f}{M_{am}} \times 100$$

$$\text{Proteínas (\%)} = N(\%) \times F_p$$

Onde **N** é o nitrogênio presente na amostra (%), **V_{HCl}** é o volume de HCl gasto na titulação (mL), **N_{HCl}** é a normalidade do HCl, **f** é o fator de correção da solução de HCl e **F_p** é o fator de conversão da proteína.

A Tabela 01 apresenta valores do fator de conversão para proteínas de alguns alimentos.

Tabela 01. Fatores de conversão para o cálculo de proteínas em alimentos

Alimentos	Fator de conversão (F_p)
Geral	6,25
Leite	6,38
Soja	5,71
Trigo	5,70
Arroz	5,95
Ovos	6,68
Gelatinas	5,55
Carnes	6,25

Observação: Quando se considera o nitrogênio em gramas, usa-se 0,014 g; quando se quantifica em miligramas, usa-se 14 mg, conforme explicação abaixo:

1000 mL de HCl (1N) = 1000 mL de NH_3 (1N);

Sabe-se que o peso molecular da amônia é P.M (NH_3) = 14 + 3 = 17 g

Como queremos determinar o teor de nitrogênio (N), temos que:

1000 mL de HCl = 14 g N

$$1 \text{ mL} = \frac{14\text{g}}{1000} = 0,014\text{g} = 14\text{mg}$$

Assim temos que:

1mL de HCl titula 0,014 g ou 14 mg de nitrogênio.

5. Bibliografia

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 1999. 212 p.

ZENEBO, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analise-dealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2014.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. **Análises de materiais biológicos**. Campinas: Unicamp, 2006. p. 11.

MÉTODO LOWRY

Experimento: determinação de proteínas pelo método de Lowry

1. Introdução

O método de Lowry se baseia na reação do cobre com a proteína em meio alcalino e, posteriormente, na redução do reagente de fosfomolibdato-fosfotungstenato no reagente Folin-Ciocalteu.

Quando o reagente Folin-Ciocalteu é adicionado à proteína tratada com o cobre, ocorre a redução do reagente, resultando numa cor mais intensa, com absorção máxima em 550 nm. A concentração de proteínas é determinada através de uma curva-padrão previamente construída para o soro albumina bovina.

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade e, por isso, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios. Além de ser mais sensível em relação a outras metodologias, o mesmo apresenta melhor exatidão, menor consumo de amostra e, dependendo do caso, é menos suscetível a alguns tipos de interferentes. Sensibilidade do método: 20 a 200 mg/L (0,02 a 0,20 g/L)

2. Objetivo

Determinar proteínas totais por espectrofotometria empregando o método de Lowry.

3. Material

- Balão volumétrico de 100 mL, béquer de 50 e 500 mL e tubos de ensaio.
- Reagentes: água destilada, albumina bovina, carbonato de sódio anidro P.A, clara de ovo, cloreto de sódio P.A, Folin-Ciocalteau P.A, hidróxido de sódio P.A, sulfato de cobre P.A e tartarato duplo de sódio e potássio P.A.
- Equipamentos: balança, espectrofotômetro e suporte para tubos de ensaio.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- **Solução NaOH 0,1N:** pesar 2 g de NaOH em um béquer de 50 mL para 500 mL de solução.
- **Solução A:** dissolver 2 g de carbonato de sódio anidro e 0,02 g de tartarato duplo de Na e K em 100 mL de solução de NaOH 0,1 N em balão volumétrico.
- **Solução B:** dissolver 0,5 g de sulfato de cobre em 100 mL de água destilada. Adicionar duas gotas de ácido sulfúrico.
- **Reagente:** adicionar 50 mL da solução A e 1,0 mL da solução B. Misturar e agitar. Esse reagente só deve ser misturado no dia do experimento. No entanto, as soluções A e B podem ser feitas com antecedência e armazenadas à temperatura ambiente em frascos âmbar.

Curva-padrão:

- Pesar 0,02 g de albumina bovina e dissolver em água destilada completando o volume para 100 mL em balão volumétrico. Fazer as diluições conforme a Tabela 02 e fazer a reação de acordo com o procedimento da análise. Medir a absorbância em espectrofotômetro a 750 nm e construir uma curva-padrão.

Tabela 02. Concentração das soluções para curva-padrão de albumina.

Concentração (g/L)	Volume da solução da albumina (0,20 g/L) em mL	Volume da água destilada (mL)
0,02	1,0	9,0
0,05	2,5	7,5
0,10	5,0	5,0
0,15	7,5	2,5
0,20	10,0	0,0

Preparo da amostra:

- **Solução de proteínas:** preparar uma solução de clara de ovo a 10% (v/v) em solução salina (NaCl 0,9 g/100 mL).

Determinação:

- Adicionar 1,0 mL da amostra e 3,0 mL do reagente, agitar e deixar dez minutos em repouso.
- Adicionar 0,30 mL do reagente Folin-Ciocalteau (previamente diluído em água destilada, 1:1, v/v).
- Agitar o tubo de ensaio e deixar a solução reagir durante 30 minutos. Fazer a leitura da amostra em espectrofotômetro a 750 nm. O aparelho deve ser zerado com água destilada.
- Determinar a concentração de proteínas recorrendo à curva padrão.

5. Bibliografia

PONTES, P. P.; CHERNICHAR, C. A. L., PORTO, M. T. R. Estudo comparativo de metodologias para determinação de proteínas em esgotos brutos e tratados. In: CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 28., 27 oct.-1 nov. 2002, Cancún. México, D.F: FEMISCA, 2002. p. 1-7.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, nov. 1998.

MÉTODO BIURETO

Experimento: determinação de proteína pelo método de Biureto

1. Introdução

O método consiste na adição de hidróxido de sódio e sulfato de cobre à solução que contém proteínas. O excesso de sulfato de cobre é removido por centrifugação. Mede-se a absorvância do sobrenadante, que apresenta cor violeta, em um espectrofotômetro a 310 nm. A intensidade da cor desenvolvida é proporcional à quantidade de proteínas presente na amostra. Determina-se a concentração de proteínas através de uma curva-padrão previamente construída. As análises são realizadas em triplicata, sendo considerada para cálculo da concentração a absorvância média.

Apesar de ser rápido — utiliza reagentes de baixo custo e não apresenta grande variação da absorvância específica para diferentes proteínas — este método não é muito sensível, o que o coloca em grande desvantagem em relação a outras metodologias. Por este motivo tem sido, ao longo dos anos, substituído por métodos mais sensíveis. Sensibilidade do método: 0,5 a 10 g/L

2. Objetivo

Determinar o teor de proteínas totais em alimentos pelo método de biureto.

3. Material

- Balão volumétrico de 100, 500 e 2000 mL, béquer de 250 e 500 mL, suporte para tubos de ensaio e tubos de ensaio;
- Reagentes: albumina bovina, hidróxido de sódio P.A, iodeto de potássio P.A, levedura, sulfato de cobre penta hidratado P.A e tartarato duplo de sódio e potássio P.A.
- Equipamentos: espectrofotômetro e balança analítica.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- Dissolver 1,5 g de sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 6,0 g de tartarato duplo de Na e K em água destilada e ajustar o volume final para 500 mL em balão volumétrico.
- Adicionar a esta solução 300 mL de NaOH 10% (p/v) livre de CO_2 . O NaOH livre de CO_2 consiste em ferver a solução de NaOH a fim de eliminar os gases.
- Agitar bem a solução e adicionar duas gotas de KI (iodeto de potássio) para evitar a oxidação.
- Completar o volume para dois litros de água destilada em balão volumétrico e armazenar a solução em frasco de polietileno.

Curva-padrão:

- Pesar 1,0 g de albumina bovina e dissolver em água destilada completando o volume para 100 mL em balão volumétrico. Fazer as diluições conforme a Tabela 03 e fazer a reação de acordo com o procedimento da análise. Medir a absorbância em espectrofotômetro a 750 nm e construir uma curva-padrão.

Tabela 03 Concentração das soluções para curva-padrão de albumina.

Concentração (g/L)	Volume da solução da albumina (10,0 g/L) em mL	Volume da água destilada (mL)
0,1	1,0	9,0
0,2	2,0	8,0
0,3	3,0	7,0
0,4	4,0	6,0
0,5	5,0	5,0
0,6	6,0	4,0
0,7	7,0	3,0
0,8	8,0	2,0
0,9	9,0	1,0
10,0	10	0,0

Preparo da amostra:

- Solução de proteína (albumina de soro bovino) de concentração desconhecida para os alunos.
- Também é possível utilizar amostras de fermento biológico seco, sendo necessário, porém, realizar a extração das proteínas com NaOH.

Determinação:

- Adicionar 1,0 mL da amostra e 4,0 mL do reagente. Agitar e deixar em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente.
- Fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, que deverá ser zerado com água destilada.
- Determinar a concentração de proteínas recorrendo à curva padrão.

5. Bibliografia

NELSON, D. L.; COX, M. M. LEHNINGER: **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: SARVIER, 2002.

CARNEIRO, D. S. **Bioquímica**. Aulas Práticas. 7. ed. Paraná: Ed. UFPR, 2007.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, nov. 1998.

CARBOIDRATOS

MÉTODO EYNON—LANE

Experimento: determinação de açúcares redutores e açúcares redutores totais

1. Introdução

O termo carboidrato deriva da terminologia “hidratos de carbono”, determinados pela fórmula $C_x (H_2O)_y$, que contém C, H, e O, estes últimos na mesma proporção que na água. Os carboidratos são sintetizados na natureza pelas plantas através do processo de fotossíntese e a partir do dióxido de carbono e da água. Com ajuda da energia solar, os vegetais verdes tomam o anidrido carbônico da atmosfera e a água do solo, produzindo carboidratos através da seguinte reação:



Os carboidratos são os componentes mais abundantes e amplamente distribuídos entre os alimentos (Tabela 04). Constituem três quartos partes do peso seco de todas as plantas terrestres e marinhas e estão presentes nos grãos, verduras, hortaliças, frutas e outras partes de plantas consumidas pelo homem. Sua determinação é importante devido às várias funções que desempenham, sendo a mais relevante a função nutricional. São também adoçantes naturais e matéria-prima para produtos

fermentados. Como principal constituinte dos cereais, influenciam nas propriedades reológicas da maioria dos produtos alimentícios e são responsáveis pela reação de escurecimento em muitos alimentos.

Tabela 04. Conteúdo de carboidratos em alguns alimentos

Alimentos	Carboidratos (%)
Frutas	6 – 12% sacarose
Milho e batata	15% amido
Trigo	60% amido
Farinha de trigo	70% amido
Condimentos	9 – 39% açúcares redutores
Açúcar branco comercial	99,5% sacarose
Açúcar de milho	87,5% glicose
Mel	75% açúcares redutores

Os métodos mais empregados para a quantificação se fundamentam na redução de íons de cobre bivalente pelos açúcares. O método de Eynon-Lane utiliza o reagente de Fehling, que consiste numa solução alcalina de sulfato de cobre em tampão de tartarato duplo de sódio e potássio. O íon cúprico (Cu^{2+}) do reagente, na presença de açúcares redutores em meio alcalino, a quente, é reduzido a íon cuproso (Cu^+), formando um precipitado vermelho de óxido cuproso facilmente percebido durante a análise.

2. Objetivo

Compreender o processo de quantificação de açúcares redutores e totais em uma amostra de alimento usando o método de titulação de oxirredução (Eynon-Lane).

3. Material

- Balão volumétrico de 25, 50, 100, 250 mL, bastão de vidro, béquer de 500 mL, bureta de 50 mL, erlenmeyer de 250 mL, funil, papel de filtro, papel indicador vermelho congo e pipetas volumétricas de 5, 10 e 25 mL.
- Reagentes: ácido clorídrico P.A., glicose P.A., indicador azul de metileno P.A, solução de acetato de zinco 1 M, solução de Fehling A, solução de Fehling B, solução de ferrocianeto de potássio 0,25 M, solução de hidróxido de sódio 0,1 N e solução de hidróxido de sódio 40% (p/v).
- Equipamentos: balança analítica, banho-maria a 70°C, barra magnética, chapa de aquecimento ou bico de Bunsen e incubadora com agitação tipo *shaker*.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- **Solução de ferrocianeto de potássio 0,25 M:** pesar 53,3 g de ferrocianeto de potássio. Transferir para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água destilada.
- **Solução de acetato de zinco 1 M:** dissolver 109,75 g de acetato de zinco em água destilada. Adicionar 10 mL de ácido acético glacial e completar o volume a 500 mL com água destilada.
- **Solução de Fehling A:** dissolver 34,639 g de sulfato cúprico em água destilada, adicionar 0,5 mL de ácido sulfúrico P.A. e completar o volume a 500 mL com água destilada.
- **Solução de Fehling B:** dissolver 172 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 50 g de NaOH em água destilada. Completar o volume a 500 mL com água destilada. Deixar decantar. Filtrar em algodão de vidro.

- **Licor de Fehling:** misturar quantidades iguais das soluções de Fehling A e B em um béquer. Agitar bem com bastão de vidro. A quantidade a ser preparada deve ser suficiente para realizar todas as análises e a solução padrão. Se a quantidade for insuficiente, será necessário preparar novamente o licor e, novamente, fazer a titulação com a solução padrão.
- **Solução de NaOH 0,1N:** pesar 2 g de NaOH em um béquer de 50 mL para 500 mL de solução.
- **Solução de HCl 5N:** adicionar 55 mL de ácido clorídrico em 1 L de água destilada.
- **Solução de NaOH 40%:** pesar 80 g de NaOH e adicionar aos poucos em 200 mL de água destilada. O procedimento deve ser realizado em capela de exaustão com banho de gelo
- **Papel Indicador Vermelho Congo 0,1%:** dissolver 0,1 g do corante vermelho congo em 10 mL de água destilada (Faixa de pH 3,0 a 5,0). Cortar tiras de papel filtro, mergulhar na solução de indicador e secar em estufa.
- **Solução Padrão de glicose:** pesar analiticamente 0,25 g de glicose P.A. (anotar a massa da glicose) e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água destilada e homogeneizar.

Preparo da amostra:

- Para a determinação dos açúcares redutores (**AR**), pesar 10g de amostra analiticamente. Transferir para um béquer de 500 mL, adicionar aproximadamente 100 mL de água destilada e triturar com um *mixer*.
- Colocar a amostra em um agitador entre 100 e 150 rpm por três horas a 30°C. O objetivo desta primeira etapa é extrair todo o açúcar contido no alimento.

- Determinar o pH da amostra e neutralizar com NaOH (0,1N) usando potenciômetro (pH entre 6,8 a 7,2). Transferir para um balão volumétrico de 250 mL, adicionar 10 mL de solução de ferrocianeto de potássio (0,25M) e 10 mL de solução de acetato de zinco (1M). Homogeneizar, evitando fazer espuma.
- Completar o volume com água destilada, agitar bem e filtrar. O objetivo desta segunda etapa é clarificar a amostra. O filtrado é a **solução AR**, usada para determinar açúcares redutores.
- Para a determinação dos açúcares redutores totais (**ART**), pipetar em pipeta volumétrica 50 mL da solução AR e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 5 mL de ácido clorídrico P.A. (fazer este procedimento na capela).
- Levar ao banho-maria a 70°C por dez minutos para facilitar a inversão da sacarose. Depois resfriar em banho de gelo até a solução atingir temperatura ambiente.
- Introduzir no balão um pedaço de papel indicador e neutralizar com NaOH 40% (agitando constantemente para homogeneizar) até que o papel mude da cor azul para rosa-violeta (caso o papel fique rosa-laranja corrigir com HCl 5 N).
- Completar o volume com água destilada e agitar. Essa é a **solução ART** usada para determinar açúcares redutores totais.

Determinação:

- a) Colocar a solução padrão na bureta de 50 mL.
 - Pipetar volumetricamente 5 mL do licor de Fehling em erlenmeyer de 250 mL e adicionar aproximadamente 5 mL de água destilada. A finalidade da adição de água é evitar que o licor evapore durante o procedimento.
 - Aquecer o licor contido no erlenmeyer até levantar fervura, utilizando uma chapa de aquecimento (350°C) ou bico de Bunsen.

- Adicionar duas a três gotas de azul de metileno. Iniciar a titulação com a solução padrão contida na bureta até que se observe mudança de coloração vermelho-tijolo da solução contida no erlenmeyer. Anotar o volume gasto da bureta (**1ª titulação**).
 - Para verificar o volume gasto, reiniciar a titulação em outro erlenmeyer previamente preparado com licor de Fehling, adicionando, no lugar da água destilada, o volume gasto na titulação anterior menos 2 mL (por exemplo, se forem gastos na 1ª titulação 10 mL, despejar no erlenmeyer 8 mL).
 - Esperar entrar em ebulição, adicionar o indicador azul de metileno e, logo depois, realizar a titulação. A solução tem que estar em contínua ebulição durante toda a titulação. Anotar o volume gasto (**2ª titulação**).
 - Se os resultados das duas titulações para a mesma amostra não forem semelhantes, repetir o processo tomando os devidos cuidados. Se forem semelhantes, considerar o menor volume.
- b) Colocar a Solução AR na bureta e efetuar a titulação conforme indicado em (a).
- c) Colocar a Solução ART na bureta e realizar a titulação conforme indicado em (a).

Recomendações: O gotejamento da titulação deverá ser contínuo, mas sem comprometer a ebulição. O ponto de viragem ocorre quando as bolhas de ar não apresentam mais a cor azulada do azul de metileno e a cor vermelho-tijolo é notória. O uso de pérolas de vidro poderá facilitar a ebulição.

O tempo da 2ª titulação não deverá ultrapassar dois minutos! Tempo superior promove a precipitação do cobre presente no licor de Fehling, comprometendo os resultados da titulação. Evite que o azul de metileno escorra pelas paredes do erlenmeyer, já que isso dificultaria a visualização do ponto de viragem.

Cálculos:

Para o Padrão:

$$P_{glic} = \frac{M_{glic} \times V_{pad}}{100}$$

Para Açúcares Redutores (AR):

$$AR(\%) = \frac{P_{glic} \times 250 \times 100}{V_{am} \times M_{am}}$$

Para Açúcares Redutores Totais (ART):

$$ART(\%) = P_{glic} \times \frac{250}{50} \times \frac{100}{V_{am} \times M_{am}} \times 100$$

Onde P_{glic} é o Padrão de glicose (g), M_{glic} e M_{am} são a massa de glicose P.A. e da amostra, respectivamente (g); V_{pad} e V_{am} o volume gasto na titulação do padrão e da amostra, respectivamente (mL); AR Açúcares Redutores (%) e **ART** Açúcares redutores totais (%).

5. Bibliografia

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 1999. 212 p.

ZENEBO, O.; PASCUET, N. S. ; TIGLEA, P (Coord). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analise-dealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2014.

MÉTODO DE ÁCIDO DINITROSSALICÍLICO (DNS)

Experimento: determinação de açúcares redutores pelo método de DNS

1. Introdução

O método consiste na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) em ácido 3-amino-5-nitro salicílico por açúcares redutores, resultando na formação de complexos coloridos. A molécula de glicose quando se encontra na forma de anel cíclico não possui carbonila livre para ser oxidada. No entanto, a forma linear dos açúcares redutores se mantém em equilíbrio com a forma cíclica em solução aquosa, permitindo que a carbonila seja oxidada pelo reagente de de Ácido Dinitrossalicílico (DNS), formando um composto colorido (ácido 3-amino-5-dinitro salicílico) cuja coloração varia em tons de amarelo e vermelho. Quanto mais intensa é a coloração, maior a quantidade dessa substância presente no meio.

2. Objetivo

Determinar a concentração de açúcares redutores pelo método de DNS.

3. Material

- Balão volumétrico de 100 mL, béquer de diversos volumes, cubetas de vidro, frascos âmbar, pipetas graduadas (1 mL, 10 mL e 20 mL) e tubos de ensaio de 16 mL.

- Reagentes: ácido clorídrico (HCl) P.A, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) P.A, fenol P.A, glicose P.A., hidróxido de sódio (NaOH), metabissulfito de sódio P.A e tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) P.A.
- Equipamentos: agitador de tubos de ensaio, balança analítica, banho termostático com circulação de água, cronômetro digital e espectrofotômetro.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- **Solução padrão de glicose ou frutose a 5,0 g/L:** pesar em balança analítica 0,1000 g de glicose ou frutose. Em seguida, dissolver em aproximadamente 20 mL de água destilada sob agitação constante, transferir analiticamente para um balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar vigorosamente. Esta solução deve ser preparada e utilizada no dia da análise.
- **Reagente DNS:** pesar 10,6 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico e 19,8 g de NaOH e dissolver em 1416 mL de água destilada. Adicionar 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio. Agitar e armazenar a solução em frasco âmbar por 30 dias em refrigerador.
- **Solução de tartarato duplo de sódio e potássio:** pesar 15,1 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e dissolver em um litro de água. Armazenar a solução em frasco âmbar até 30 dias à temperatura ambiente.
- **Solução de NaOH 2N.:** pesar 40 g de hidróxido de sódio anidro, diluir em água destilada e ajustar o volume para 500 mL em balão volumétrico.

- **Solução de HCl 2N:** medir 85,0 mL de ácido clorídrico (HCl) em uma capela, diluir em água destilada e ajustar volume para 500 mL em balão volumétrico.

Curva-padrão:

- Fazer diluições da solução padrão de glicose ou frutose (1,0 g/L) com água destilada em tubos de ensaio, conforme demonstrado na Tabela 05. Agitar os tubos para homogeneização, retirar uma alíquota de 1,0 mL e fazer o teste de DNS.

Tabela 05. Preparo das diluições da solução padrão de glicose ou frutose a 1,0 g/L.

Concentração de glicose ou frutose (g/L)	Volume de solução padrão de glicose (mL)	Volume de água destilada (mL)
0,10	1,0	9,0
0,20	2,0	8,0
0,30	3,0	7,0
0,40	4,0	6,0
0,50	5,0	5,0
0,60	6,0	4,0
0,70	7,0	3,0
0,80	8,0	2,0
0,90	9,0	1,0
1,00	10,0	0,0

Plotar, em planilha ou calculadora científica, a concentração de glicose (g/L) no eixo Y e a absorbância obtida com o teste de DNS no eixo X (exemplo mostrado na Figura 01) e calcular a equação da reta.

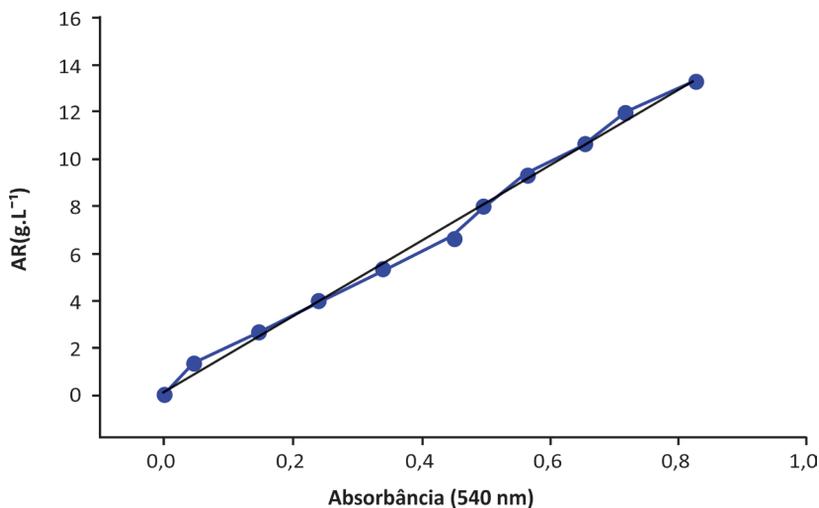


Figura 01. Curva-padrão de açúcar redutor em g/L. Equação da reta: concentração $AR(g/L) = 1,3894*ABS+0,0762$ ($R^2 = 0,997$)

Preparo da amostra:

- Pesar 100 g da amostra e homogeneizar em *mixer* ou liquidificador por três minutos.
- Retirar uma alíquota de 10 g e adicionar água destilada até completar 50 ou 100 mL, em balão volumétrico. A concentração final de açúcares redutores da amostra deve ficar entre 0,1 e 1,0 g/L, conforme a curva de calibração.
- A amostra diluída deverá ser centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos. Retirar 1,0 mL do sobrenadante e fazer o teste de DNS.
- Caso a amostra contenha açúcares não redutores como a sacarose, é necessário fazer hidrólise da amostra. Neste caso, retirar 2,0 mL do sobrenadante, adicionar 2,0 mL de HCl 2N e aquecer em banho-maria em ebulição por 10 minutos.

- Resfriar a amostra em banho de gelo, acrescentar 2,0 mL de NaOH 2N e agitar.
- Retirar 1,0 mL do sobrenadante e fazer o teste de DNS.

Determinação:

- Pipetar 1,0 mL da amostra em um tubo de ensaio e adicionar 1,0 mL do reagente DNS. Agitar e aquecer em banho-maria a 100°C (em ebulição) por cinco minutos.
- Resfriar o tubo em banho de gelo por cinco minutos. Adicionar 16,0 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio.
- Fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro ajustado em 540 nm, após zerar o aparelho com o branco. O branco consiste em substituir o volume de amostra ou solução de glicose por água destilada (1,0 mL) e realizar o teste de DNS.

Recomendação: A amostra deve ser diluída convenientemente de maneira que a sua concentração seja, no máximo, 1,0 g/L.

Cálculos:

- A partir da equação da reta, calcular a concentração de açúcar redutor na amostra. Deve-se considerar nos cálculos as diluições efetuadas na amostra, multiplicando o resultado por esse fator.

5. Bibliografia

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2003. p. 73.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids Yeasts Isolated From The Brazilian Ecosystem. **Food Chemistry**, 107, p. 145-150, 2008.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31, p. 426-428, 1959.

MÉTODO SOMOGYI-NELSON

Experimento: determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson

1. Introdução

A determinação de açúcares pelo método de Somogyi-Nelson é baseada nas propriedades redutoras dos açúcares, por intermédio da reação da hidroxila hemiacetálica dos monossacarídeos. A diferença dessa metodologia em relação a outros métodos de determinação de açúcares redutores é a sensibilidade do método, cuja faixa de determinação situa-se entre 25 e 500 mg/L.

Esta reação não é específica, podendo sofrer interferência de outros componentes redutores. Açúcares redutores contêm um grupo aldeído ou cetônico que, em soluções alcalinas, reduzem íons de cobre, prata, bismuto e mercúrio a compostos de valência menor. O princípio do método de Somogyi-Nelson baseia-se na redução de Cu^{++} a Cu^+ pelo açúcar redutor com formação Cu_2O , que reduz o arsenomolibdato e produz um composto de coloração azul.

2. Objetivo

Determinar açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson.

3. Material

- Balão volumétrico de 100 mL, béqueres de 50, 100 e 250 mL, cubetas de vidro, frascos âmbar, pipetas graduadas de 1, 10 e 20 mL e tubos de ensaio de 16 mL.
- Reagentes: ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A, arseniato dibásico de sódio (Na_2HAsO_4) P.A, bicarbonato de sódio (NaHCO_3) P.A, carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) P.A, glicose P.A., molibdato de amônio P.A, sulfato de cobre anidro (CuSO_4) P.A ou sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) P.A, sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) P.A, tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) P.A.
- Equipamentos: agitador de tubos de ensaio, balança analítica, banho termostático com circulação de água, cronômetro digital e espectrofotômetro.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- Solução padrão de glicose ou frutose 0,50 g/L: pesar em balança analítica 0,050 g de glicose ou frutose. Em seguida, dissolver em aproximadamente 20 mL de água destilada sob agitação constante. Transferir analiticamente para um balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume e homogeneizar vigorosamente. Esta solução deverá ser preparada e utilizada no dia da análise.
- **Reagente de Somogyi-Nelson I (SN-I):** Pesar 4 g de sulfato de cobre anidro (CuSO_4) ou 6,25 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$); 24 g de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3); 16 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3); 12 g de tartarato duplo de potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 18 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Dissolver, na ordem descrita, em 600 mL de água destilada, e completar o volume para um litro em balão vo-

lumétrico. Deixar em repouso por um dia, em ambiente escuro. Filtrar a solução com papel de filtro e colocar em frasco escuro, identificado. Esta solução pode ser armazenada por 30 dias sob refrigeração.

- **Reagente de Somogyi-Nelson II (SN-II). Solução A:** Pesar 50 g de molibdato de amônio anidro ou 53,09 g de molibdato de amônio tetrahidratado em 900 mL de água destilada. Adicionar 42 mL de H_2SO_4 concentrado lentamente. **Solução B:** Pesar 6 g de arseniato dibásico de sódio anidro e dissolver em 50 mL de água destilada. Misturar as soluções A e B e deixar em repouso por 24 horas a $37^\circ C$ em estufa. Armazenar a solução em frasco âmbar por 30 dias a temperatura ambiente ($20 - 25^\circ C$).

Curva-padrão:

- Fazer diluições da solução padrão de glicose ou frutose (500 mg/L) com água destilada em tubos de ensaio, conforme demonstrado na Tabela 06. Agitar os tubos para homogeneização e retirar uma alíquota de 1,0 mL para o teste de SN.
- Plotar, em planilha ou calculadora científica, a concentração de glicose (mg/L) no eixo Y e a absorbância no eixo X. A partir da equação da reta, calcular a concentração. Deve-se considerar nos cálculos as diluições efetuadas na amostra, multiplicando esse fator.

Tabela 06. Preparo das diluições da solução padrão de glicose ou frutose a 500 mg/L.

Concentração de glicose (mg/L)	Volume de solução padrão de glicose (mL)	Volume de água destilada (mL)
50,0	1,0	9,0
100,0	2,0	8,0
150,0	3,0	7,0
200,0	4,0	6,0
250,0	5,0	5,0
300,0	6,0	4,0
350,0	7,0	3,0
400,0	8,0	2,0
450,0	9,0	1,0
500,0	10,0	0,0

Preparo da amostra:

- Pesar 100 g da amostra e homogeneizar em *mixer* ou liquidificador por três minutos. Retirar uma amostra de 10 g e adicionar água destilada até completar 50 ou 100 mL em balão volumétrico. A concentração final de açúcares redutores da amostra deve ficar entre 50 e 500 mg/L, conforme a curva de calibração. Portanto, cada tipo de amostra terá uma massa diferente a ser pesada.
- A amostra diluída deverá ser centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos. Retirar 1,0 mL do sobrenadante e fazer o teste de SN. A amostra deve ser diluída convenientemente, de maneira que a concentração de açúcares seja, no máximo, 0,50 g/L ou seja 500 mg/L.

Determinação:

- Pipetar 1,0 mL da amostra em um tubo de ensaio e adicionar 2,0 mL do reagente SN-I. Agitar e aquecer em banho-maria (em ebulição) por seis minutos.

- Resfriar o tubo em banho de gelo por cinco minutos. Adicionar 2,0 mL de SN-II, agitar e deixar em repouso por cinco minutos à temperatura ambiente.
- Adicionar 25 mL de água destilada e fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco. O branco consiste em substituir 1,0 mL da amostra ou padrão por água destilada e realizar o teste de SN.

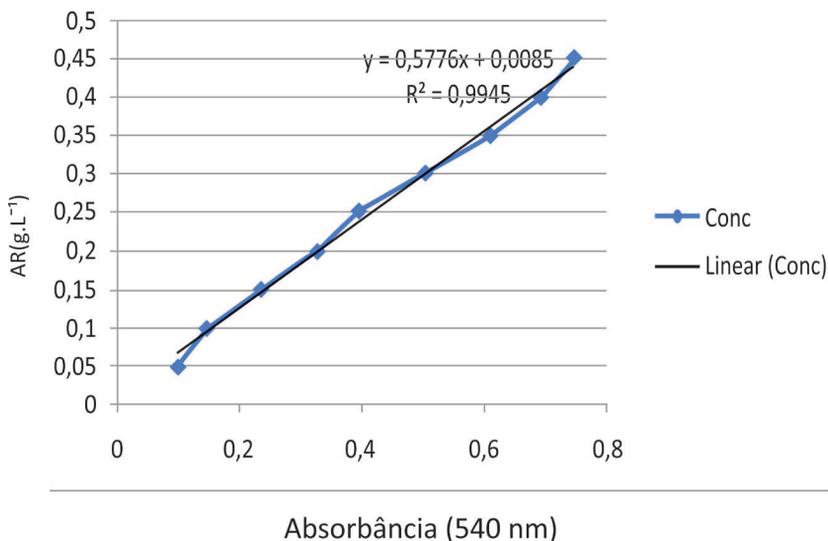


Figura 02. Curva padrão de açúcar redutor em mg/L. Equação da reta: concentração $AR(\text{mg/L}) = 0,5776 \cdot \text{ABS} + 0,0085$ ($R^2 = 0,995$)

Cálculos:

- A partir da equação da reta, calcular a concentração de açúcar redutor na amostra. Deve-se considerar nos cálculos as diluições efetuadas na amostra, multiplicando o resultado por esse fator.

5. Bibliografia

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2003. p. 73.

NELSON, N. A. Photometric Adaptation of Somogyi Method for Determination of Glucose. **Journal of Biological Chemistry**, 153, p. 375, 1960.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. A. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 337-341, set./dez. 2003.

DETERMINAÇÃO DE AMIDO

Experimento: quantificação de amido por hidrólise química e física

1. Introdução

Dentre os componentes dos carboidratos não fibrosos (CNF), o amido seja talvez o mais importante. É ele o principal componente energético dos grãos de cereais e raízes e, devido às suas características de fonte de reserva, apresenta disponibilidade energética superior à dos carboidratos estruturais (ZEOULA e NETO, 2001). Os carboidratos estruturais incluem aqueles encontrados normalmente como parte constituinte da parede celular, representados principalmente pela pectina, hemicelulose e celulose.

A falta de métodos ou problemas com ensaios para carboidratos individuais tornam impraticável a medida individual de CNF. Geralmente o conteúdo de CNF dos alimentos é calculado baseado nas porcentagens de nutrientes subtraídos de 100% da amostra:

$$\text{CNF (\%)} = 100 - (\text{Proteínas (\%)} + \text{Lipídeos (\%)} + \text{Umidade (\%)} + \text{Cinzas (\%)})$$

A maioria das análises de amido é enzimática, confiando na especificidade enzimática para separar o amido de outros carboidratos contendo glicose. Os passos que se seguem para a quantificação do amido são normalmente a gelatinização, a hidrólise e a medição dos produtos finais.

A gelatinização envolve a dissolução das pontes de hidrogênio entre e dentro das moléculas de amido, permitindo a hidratação e a hidrólise enzimática da molécula. Antes da gelatinização, o amido presente nos grãos processados é cristalino. As porções lineares da molécula são ligadas entre si por pontes de hidrogênio, resultando em uma exclusão da água e na resistência à atividade enzimática. Dessa forma, tal estrutura cristalina deve ser rompida para que se consiga uma completa hidrólise enzimática do amido em um intervalo de tempo razoável. O processo de gelatinização é tipicamente realizado por meio do aquecimento com água quente (90 a 100°C) ou, alternativamente, com o uso de uma base (hidróxido de potássio), seguida por uma neutralização. Uma incompleta gelatinização pode provocar uma incompleta hidrólise do amido à glicose.

O amido não apresenta reação redutora. A hidrólise completa em meio fortemente ácido produz exclusivamente unidades de glicose. O método baseia-se na redução de um volume conhecido do reagente de cobre alcalino (Fehling) para óxido cuproso. O ponto final é indicado pelo azul de metileno, que é reduzido por um excesso de açúcar redutor.

2. Objetivo

Determinar a quantidade de amido presente em uma amostra de alimento pelo método de hidrólise química e física.

3. Material

- Papel de filtro qualitativo, papel tornassol e vidraria comum para laboratório.
- Reagentes: ácido clorídrico concentrado (HCl) P.A., solução de acetato de zinco $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30% (p/v), solução de azul de metileno a 1% (p/v), solução de Fehling A e B, solução de ferrocianeto de potássio $(\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6\cdot 3\text{H}_2\text{O})$ a 15% (p/v), solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% (p/v), solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 40% (p/v) e solução padrão de glicose (100 mL) em balão volumétrico de 100 mL.

- Equipamentos: autoclave e chapa aquecedora com regulagem até 350°C.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- **Solução de Fehling:** solução A – pesar 34,639 g de sulfato de cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e transferir para um balão volumétrico de 1000 mL. Completar o volume com água destilada. Solução B – pesar 173 g de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochelle) e 125 g de NaOH. Transferir para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água destilada.
- **Licor de Fehling:** misturar quantidades iguais de solução A e solução B em bquer de 250 mL. Agitar bem com bastão de vidro. A quantidade a ser preparada deve ser suficiente para realizar todas as análises e o padrão. Se a quantidade for insuficiente, o licor terá de ser preparado novamente e a titulação com a solução padrão terá de ser refeita.
- **Solução padrão de glicose:** pesar 0,50 g de glicose pura (seca em estufa a vácuo, regulada a 70°C, durante uma hora) e diluir a 100 mL em balão volumétrico.

Determinação

- Pesar 2 g de amostra (precisão de 0,0001 g) misturar 150 mL de água e transferir a amostra para um erlenmeyer de 500 mL.
- Adicionar 1 mL de NaOH 10% (p/v). Tampar com papel-alumínio e colocar em autoclave a 121°C por uma hora. Deixar esfriar.
- Adicionar 10 mL de HCl concentrado e aquecer novamente em autoclave a 121°C por 30 minutos. Esfriar novamente e neutralizar a solução com NaOH 40% (verificar pela mudança da cor do papel indicador tornassol).

- Adicionar 10 mL da solução de ferrocianeto de potássio e 10 mL da solução de acetato de zinco. Transferir para balão volumétrico de 250 mL. Completar o volume com água destilada. Agitar e deixar sedimentar.
- Filtrar utilizando papel de filtro. Receber o filtrado em um frasco erlenmeyer (amostra).

Titulação

Solução padrão de glicose:

- Colocar numa bureta a solução padrão de glicose. Transferir com pipeta volumétrica 20 mL do licor de Fehling para um erlenmeyer de 250 mL.
- Adicionar 40mL de água destilada, juntamente com algumas pérolas de vidro, aquecendo até a ebulição. Gotejar a solução padrão. Mantendo a ebulição, adicionar uma gota de azul de metileno a 1% e completar a titulação até descoramento do indicador. O final da titulação será em torno de 10mL de glicose.
- O tempo de titulação não deve ultrapassar três minutos. Para verificar o volume gasto, reiniciar a titulação em outro erlenmeyer previamente preparado com licor de Fehling, adicionando o volume gasto na titulação anterior (solução padrão) menos 2 mL.
- Esperar entrar em ebulição, adicionar o indicador azul de metileno e proceder à titulação. Anotar o volume gasto. Se os resultados das duas titulações não forem semelhantes, repetir tomando os devidos cuidados. Se forem semelhantes considerar o menor volume.

Cálculo do padrão:

$$P_{glic} = \frac{M_g \times V_{pad}}{100}$$

Amostra

- Transferir a solução filtrada (amostra) para uma bureta de 25 ou de 50 mL.
- Transferir para um erlenmeyer 20 mL de licor de Fehling. Adicionar água destilada (40 mL) para evitar a evaporação do licor durante a fervura.
- Aquecer até a ebulição. Adicionar três gotas de azul de metileno e realizar a titulação gota a gota com a solução da bureta até a descoloração do indicador (no fundo do frasco deve ficar um resíduo vermelho).
- Titular, no menor tempo possível, após a adição do azul de metileno. Repetir para verificar o volume gasto na titulação.

Cálculos:

$$\text{Amido (\%)} = \frac{P_{\text{glc}}}{2} \times \frac{500}{M_{\text{am}} \times V_{\text{am}}} \times f \times 100$$

Onde: P_{glc} é o Padrão de glicose (g), M_{glc} e M_{am} são a massa de glicose P.A. e da amostra (g), V_{pad} e V_{am} são o volume gasto na titulação do padrão e da amostra (mL) e f é o fator que irá depender da condição a, b ou c, apresentadas abaixo:

- a) quando a amostra só contém amido, multiplicar por 0,90, que é o fator de transformação de glicose em amido (f);
- b) quando a amostra contém sacarose, o cálculo será:
 $\% \text{ amido} = (\text{açúcares totais} - \text{sacarose}) \times 0,90$
- c) quando a amostra contém sacarose e glicose, o cálculo será:
 $\% \text{ amido} = [\text{açúcares totais} - (\text{sacarose} + \text{glicose})] \times 0,90$

O teor de glicose é determinado pela quantificação de açúcares redutores (AR), e o teor de sacarose por açúcares redutores totais (ART), sendo o amido os açúcares totais.

5. Bibliografia

CARVALHO, H. H., JOMG, E. V., BELLÓ, R. M. et al. **Alimentos**: métodos físicos e químicos de análises. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2002. 180 p.

CARVALHO, G. G.; FERNANDES, F. E. P.; PIRES, A. J. V. Métodos de determinação dos teores de amido e pectina em alimentos para animais. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010106.html>>. Acessado em: fev. 2014.

FIBRAS

FIBRA INSOLÚVEL

Experimento: determinação de fibras insolúveis

1. Introdução

O Ministério da Saúde, na portaria nº 41, de 14 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, define **fibras alimentares** como: “Qualquer material comestível de origem vegetal que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano. A determinação de fibras alimentares nos alimentos é realizada segundo o método 985.29 da AOAC 15ªed. 1990 (método enzimático-gravimétrico) ou edição mais atual”.

As **fibras alimentares** pertencem ao grupo dos carboidratos. São polissacarídeos não amiláceos, compostos por moléculas de açúcares com mais de onze unidades, unidas por ligações glicosídicas.

As **Fibras Alimentares Totais (FAT)** podem ser divididas em: Fibras Alimentares Solúveis (FAS) e Fibras Alimentares Insolúveis (FAI). Esta classificação é muito útil para o entendimento das propriedades fisiológicas das **fibras alimentares**, permitindo uma divisão simples entre aquelas que têm efeito, principalmente, sobre a absorção de glicose e lipídeos no intestino delgado — que são facilmente fermentadas por bactérias no cólon (fibras solúveis) — e aquelas que são fermentadas lenta e incompletamente, tendo efeito mais pronunciado nos hábitos

intestinais (fibras insolúveis). Porém, a separação entre as frações solúvel e insolúvel não é quimicamente muito clara, dependendo das condições de extração.

As fibras solúveis tendem a formar géis em contato com a água, aumentando a viscosidade dos alimentos, e são parcialmente digeridas no estômago. Aproximadamente um terço das **fibras alimentares** totais ingeridas com a dieta típica é solúvel. Dentro deste grupo estão as pectinas, algumas hemiceluloses ou pentosanas, gomas e mucilagens. As pectinas dão firmeza às plantas e são usadas como espessantes, emulsificantes e conservantes em alimentos, assim como para formação de géis.

As fibras solúveis são quase completamente fermentadas pelas bactérias presentes no cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta que podem ser absorvidos pelo organismo, podendo inibir a síntese de colesterol no fígado. Efeitos hipocolesterolêmicos são atribuídos particularmente às beta-glucanas que são fibras solúveis. Os alimentos com alto teor de fibras solúveis são os cereais (aveia, cevada, milho, centeio), as frutas (banana, maçã), as leguminosas (feijões, ervilhas), além de couve-flor e cenoura, entre outros.

Fazem parte do grupo das fibras insolúveis a lignina, a celulose e algumas hemiceluloses. Estas fibras permanecem praticamente intactas através de todo o trato gastrointestinal, diminuem o tempo de trânsito no intestino, aumentam o bolo fecal e tornam as fezes menos consistentes, diminuindo a constipação. Estão presentes principalmente nos cereais (farelo de trigo, cereais matinais e pães integrais), frutas maduras e vegetais (brócolis, feijões verdes, brotos), entre outros.

Não existe um método analítico único que determine todos os componentes das **fibras alimentares** em alimentos. Os métodos e as técnicas continuam sendo pesquisados e melhorados, com o propósito de aumentar a precisão, rapidez, robustez e diminuir os custos.

Recomendações para o consumo de fibras:

De acordo com órgãos internacionais, recomenda-se o consumo de fibras para adultos entre 12,5 g fibra/1.000 kcal/dia (*Nordic RDA*, 1996) a 18,0 g/dia (*UK Dept. of Health*, 1991). Para crianças com idade superior a dois anos, recomenda-se o consumo mínimo, considerando o cálculo da idade + 05 g fibra/dia e, como valor máximo, o cálculo da idade + 10 g fibra/dia (*American Health Foundation*, 1995).

2. Objetivo

Determinar o teor de fibra insolúvel em produtos alimentícios.

3. Material

- Bagueta, béquero de 500, 100 e 250 mL, bico de Bunsen, cápsula de porcelana, funil de vidro, papel filtro qualitativo 18,5 cm de diâmetro, pinça metálica, cadinhos de *Gooch* de porcelana tarados, dessecador e pissetar.
- Reagentes: álcool etílico (96 a 98%) P.A, antiespumante (tributil fosfato), éter etílico P.A, solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1,25% (v/v) e solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,25% (p/v).
- Equipamentos: aparelho digestor, balança analítica, estufa de até 100°C e forno mufla de até 550°C.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- **H_2SO_4 1,25% (v/v):** medir 7 mL de ácido sulfúrico concentrado ($d = 1,84$ g/mL) e transferir cuidadosamente para um balão volumétrico de 1000 mL com um pouco de água destilada (cerca de 200 mL). Completar o volume com água.

- **NaOH 1,25% (p/v):** pesar 12,5 g de NaOH, dissolver em 100 mL de água e transferir para um balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água.

Preparo da amostra:

- Amostras com alto teor de gorduras poderão ser previamente desengorduradas e secas.

Determinação:

- Pesar aproximadamente 2 – 3 g de amostra. Colocar a amostra em copo de 600 mL, próprio para ser adaptado ao digestor. Adicionar três a cinco gotas do antiespumante.
- Adicionar 200 mL de solução de H₂SO₄ 1,25%. Colocar no aparelho digestor e deixar em ebulição por 30 minutos. Completar com água o volume do copo, sempre a 200 mL, à medida que a solução for evaporando.
- Após a digestão ácida, realizar a filtração em papel de filtro qualitativo (Whatmann número 42 ou similar), realizando-se a lavagem sucessiva com água destilada em ebulição sobre o resíduo, até a neutralização do material, o que é verificado com o papel de tornassol azul.
- Transferir quantitativamente o material que ficou retido no papel para o copo de digestão. Usar, para essa transferência, 200 mL da solução de NaOH 1,25%. Deixar em ebulição. Realizar, então, a digestão básica, seguindo os mesmos princípios da digestão ácida e lavando o material com água destilada a quente.
- Fazer o teste da neutralidade do material usando papel tornassol.
- Após as digestões, filtrar o resíduo (fibra e minerais) em cadinhos de *Gooch*, previamente secos e pesados, a vácuo. Lavar o material com álcool (20 mL), e, em seguida, com éter etílico

(10 mL), a fim de facilitar a secagem e eliminar compostos provenientes das digestões.

- Fazer a secagem dos cadinhos ou do papel em estufa a 105°C até se obter um peso constante. A pesagem nos fornece o peso do material que é formado por F_{bruta} e minerais. A seguir, fazer a calcinação em mufla a 600°C durante uma hora, quando toda a fibra é oxidada, restando somente minerais.
- A diferença entre o peso do cadinho de *Gooch* seco na estufa a 105°C e o do *Gooch* após a calcinação fornece o peso da fibra bruta real que foi queimada.

Cálculos:

ε

$$Fibra\ bruta(\%) = \frac{\text{Peso do papel com resíduo} - \text{peso do papel}}{M_{am}} \times 100$$

$$fibra\ real(\%) = fibra\ bruta(\%) - cinzas(\%)$$

5. Bibliografia

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Washington: AOAC, 1995.

AACC (American Association of Cereal Chemists). **Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists**. 9th ed. St. Paul, Minnesota: AACC, 1975.

FIBRA INSOLÚVEL – DIGESTOR SEMI-INDUSTRIAL

Experimento: determinação de fibras utilizando digestor semi-industrial

1. Introdução

A quantificação de fibras utilizando o digestor semi-industrial facilita a determinação de grande quantidade de amostras em um único ensaio sem troca ou aspiração manual de líquidos, ácido ou bases. Entretanto, os resultados são menos precisos do que na avaliação individual. Este método é comumente adotado na indústria alimentícia, em fábricas de rações, entre outros.

2. Objetivo

Determinar o teor de fibras em produtos alimentícios sólidos ou semissólidos utilizando o digestor semi-industrial.

3. Material

- Cadinhos, dessecador, espátula, placas de Petri, pinça metálica e sacos extratores.
- Reagentes: acetona P.A, água a 100°C, solução de H_2SO_4 1,5% (v/v) e solução de NaOH 1,5% (p/v).
- Equipamentos: balança analítica, digestor semi-industrial para fibras, estufa de secagem com ventilação e mufla.

4. Procedimento

Preparo da amostra:

- Colocar os sacos extratores em solução de acetona durante cinco minutos e, de seguida, colocar em estufa para secar a 105°C por 90 minutos. Retirar os sacos extratores com o auxílio de uma pinça metálica e colocá-los no dessecador até alcançar a temperatura ambiente.

Determinação:

- Pesar 0,5 a 1,0 g de amostra e colocar no sacos extratores (pode-se pesar diretamente no saco extratore previamente tarado).
- Selar e pesar novamente o conjunto sacos extratores + amostra.
- Utilizando as bandejas necessárias, distribuir os sacos extratores contendo as amostras no aparelho de fibras. Cada bandeja comporta três saquinhos.
- Colocar no aparelho aproximadamente 2,0 L de H₂SO₄ 1,5% (v/v) (ou até cobrir as bandejas com as amostras). Ligar o aquecimento. Quando atingir 98,0 ± 1,0°C, cronometrar 30 minutos. Decorrido este período, drenar a solução ácida e adicionar água quente (aproximadamente 2,0 L) para retirar o resíduo da solução ácida e drenar.
- Colocar 2,0 L da solução de NaOH 1,5% (p/v) e aquecer até a ebulição (98°C), cronometrando 30 minutos. Drenar a solução alcalina e lavar duas vezes com água quente (90 a 100°C) a fim de eliminar todo o resíduo da solução.
- Retirar os sacos contendo as amostras e lavá-los com acetona. Deixar secar à temperatura ambiente até a total volatilização da acetona e colocar em estufa a 70°C por 24 horas.
- Retirar os sacos da estufa com o auxílio de uma pinça metálica e deixar alcançar a temperatura ambiente em dessecador contendo sílica-gel. Pesar e realizar o cálculo.

Cálculos:

$$F_{Bruta} (\%) = \frac{M_{am} - M_f}{M_{am}} \times 100$$

Onde F_{bruta} é o conteúdo de fibra bruta (%), M_{am} , massa da amostra (g) e M_f a massa da amostra depois de seca (g).

A pesagem nos fornece o peso do material que é formado por fibra bruta e minerais. Para obter a fibra insolúvel real, proceder à incineração.

Fazer a calcinação em mufla a 600°C durante uma hora, quando toda a fibra é oxidada, restando somente minerais.

$$fibra\ real\ (\%) = F_{bruta}\ (\%) - cinzas\ (\%)$$

5. Bibliografia

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Washington: AOAC, 1995.

AACC (American Association of Cereal Chemists). **Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists**. 9th ed. St. Paul, Minnesota: AACC, 1975.

SÓLIDOS SOLÚVEIS

Experimento: determinação do percentual de sólidos solúveis totais

1. Introdução

O método refratométrico tem sido utilizado para a medida de sólidos solúveis (açúcares e ácidos orgânicos), principalmente em frutas e produtos de frutas, mas também pode ser usado em ovos, cerveja, vinagre, leite e produtos lácteos. O uso da refratometria é comum em indústrias de bebidas, alimentos, cosméticos, óleos minerais e vegetais, indústrias farmacêuticas e outros. A refração é, normalmente, uma propriedade aditiva, de modo que o índice de refração de um sistema multicomponente será a soma dos índices de refração de cada componente individualmente.

Os índices de refração de soluções aquosas de sacarose P.A. a 20°C podem ser correlacionados com o seu teor de sacarose. Tem-se, assim, uma correlação entre o índice de refração e a percentagem de sacarose. O percentual de sacarose é relacionado com o °Brix. Na prática, usa-se a leitura refratométrica ou o correspondente °Brix para expressar o percentual de sólidos solúveis.

A determinação de sólidos solúveis em materiais biológicos é uma medida muito utilizada no processamento e na conservação de alimentos como, por exemplo, na avaliação da maturação de frutas, na elaboração de caldas e xaropes, na determinação do ponto final do processamento de polpas concentradas, doces em massa e geleias, na qualidade de sucos processados, entre outros.

2. Objetivo

Determinar a quantidade de sólidos solúveis totais presentes em amostras alimentícias líquidas empregando refratômetros.

3. Material

- Algodão ou gaze, bastão de vidro, béquer de 50 e 100 mL, espátula, pipeta de *Pasteur* e termômetro.
- Reagentes: água destilada, álcool etílico 70%.
- Equipamentos: banho termostatzado com circulação de água (de modo a manter a temperatura dos prismas do refratômetro em 20°C) e refratômetros de campo ou refratômetro tipo ABBE, com escala de °Brix e divisões de, no mínimo, 0,2° Brix ou em porcentagem (%).

4. Procedimento

Calibração do aparelho:

- Antes de usar o refratômetro tipo ABBE (Fig. 03), verificar se a superfície dos prismas está limpa. Caso esteja suja, passar algodão embebido em álcool. Secar com algodão.
- Colocar de uma a duas gotas de água destilada entre os prismas do refratômetro e fechar (Fig.03b). Esperar um minuto e ajustar a ocular para sua visão.
- No campo circular visível, ajustar as metades das regiões clara e escura sem nenhuma cor (arco-íris) entre elas, girando o botão de ajuste grosso. Em seguida, deixar a divisão entre estas duas metades do campo bastante nítida, ajustando-a no meio do X (Fig. 04). Para isso, deve-se girar o botão de ajuste fino (Fig. 03a).

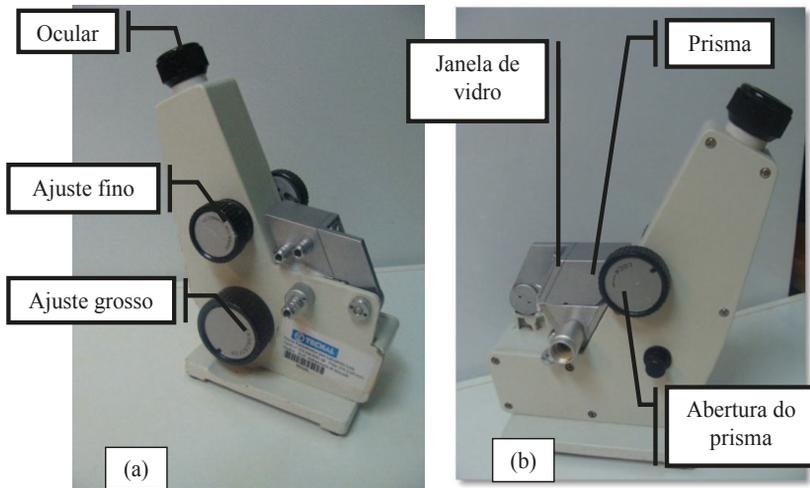


Figura 03. Refratômetro tipo ABBE

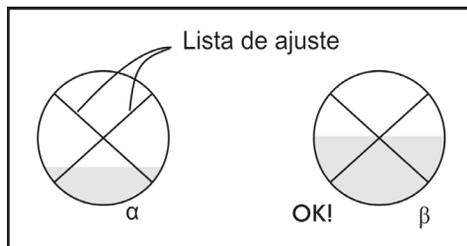


Figura 04. Linhas de ajuste.

Preparo da amostra:

- Amostras muito viscosas ou que apresentam polpa espessa deverão ser filtradas para se extrair o suco. Isto pode ser feito utilizando gaze ou algodão como filtro.

Determinação:

- Colocar de uma a duas gotas de amostra entre os prismas do refratômetro e fechar. Esperar um minuto e ajustar a ocular para sua visão.

- No campo circular visível, ajustar as metades das regiões clara e escura sem nenhuma cor (arco-íris) entre elas, girando o botão de ajuste grosso até observar a região bastante nítida. Acertar o meio do X do campo visual, girando o botão de ajuste fino.
- Depois de acertar a linha de ajuste (Fig. 04), observar a escala e fazer a leitura do percentual de sólidos solúveis ou °Brix.
- Limpar os prismas com algodão embebido em água destilada ou álcool e secar com papel macio. Repetir a leitura da amostra três vezes (triplicata).
- O procedimento do refratômetro de campo é semelhante. Porém, a precisão e a exatidão da leitura pode ser menor que no refratômetro de bancada (tipo ABBE).

Cálculos:

- Caso a leitura seja feita a 20°C — e a acidez total da amostra seja inferior a 1% — o valor do °Brix é a leitura direta. Se a temperatura for diferente de 20°C, anotar o valor e fazer a correção do Brix em função da temperatura, com o auxílio de tabelas de correção de °Brix.
- O valor obtido da leitura é expresso em porcentagem (%) de sólidos solúveis ou °Brix. Apresentar o valor médio e o desvio padrão das repetições.

5. Bibliografia

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. **Análises de materiais biológicos**. Campinas: Unicamp, 2006. p. 14.

ACIDEZ TITULÁVEL

Experimento: determinação da acidez por titulometria

1. Introdução

A determinação de acidez pode fornecer um dado valioso na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons de hidrogênio. Os métodos que avaliam a acidez titulável resumem-se em titular, com soluções de álcali-padrão, a acidez do produto ou de soluções aquosas ou alcoólicas e, em certos casos, os ácidos graxos obtidos dos lipídeos, utilizando indicadores que produzem ou alteram sua coloração em determinadas concentrações de íons de hidrogênio.

Os ácidos orgânicos presentes em alimentos influenciam o sabor, o odor, a cor, a estabilidade e a manutenção de qualidade. Entre os principais ácidos orgânicos encontrados em alimentos estão: o cítrico, o málico, o oxálico, o succínico e o tartárico. Outros ácidos menos conhecidos, mas de igual importância, são: o isocítrico, o fumárico, o oxalacético e o cetoglutárico.

A determinação da acidez titulável em alimentos é uma análise fundamental que pode indicar:

- valor nutritivo: manutenção do balanceamento ácido-base no organismo;
- pureza e qualidade em produtos fermentados, como vinhos;
- deterioração por bactérias com produção de ácido;

- deterioração de óleos e gorduras pela presença de ácidos graxos livres provenientes da hidrólise dos glicerídeos;
- critério de identidade de óleos e gorduras pela caracterização dos ácidos graxos presentes;
- estabilidade do alimento/deterioração. Produtos mais ácidos são naturalmente mais estáveis quanto à deterioração

2. Objetivo

Determinar o teor de acidez em alimentos de origem vegetal e animal.

3. Material

- Bastão de vidro, bureta de 25 mL, erlenmeyer de 150 ou 300 mL, pipetas volumétricas de 1 e 10 mL, pisseta com água destilada e suporte universal.
- Reagentes: solução alcoólica de fenolftaleína (1%) e solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N padronizado.
- Equipamentos: agitadores e barras magnéticas, balança analítica e potenciômetro.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- **Solução de fenolftaleína a 1%:** pesar 1 g de fenolftaleína e dissolver em 100 mL de álcool etílico.
- **Solução de NaOH 0,1N padronizada:** pesar 4 g de hidróxido de sódio e dissolver em 50 mL de água destilada. Transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água destilada.
- **Padronização da solução de NaOH 0,1 N:** pesar cerca de 0,15 g de biftalato de potássio (previamente seco em estufa a

105°C por duas horas), colocar em erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 100 mL de água destilada e misturar. Adicionar três gotas de fenolfetaleína 1%. Titular com a solução de NaOH com agitação constante até ponto de viragem.

Cálculo do fator de correção:

$$Fc = \frac{M_{\text{biftalato}}}{0,20423 \times V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}}} \times 100$$

Onde **Fc** é o fator de correção do NaOH, **M_{biftalato}** é a massa de biftalato de potássio, **V_{NaOH}** é o volume gasto de NaOH e **N_{NaOH}** é a normalidade de NaOH.

Preparo da amostra:

- Amostras sólidas e semissólidas devem ser moídas para facilitar a área de contato. Bebidas carbonatadas devem ser agitadas ou aquecidas para retirar o CO₂.

Determinação:

- Pesar de 1 a 10 g ou pipetar de 1 a 10 mL da amostra em um frasco erlenmeyer de 250mL. Adicionar 9 ou 90 mL de água destilada e agitar para eliminar o CO₂.
- Adicionar de duas a quatro gotas do indicador fenolfetaleína e titular com a solução alcalina de NaOH 0,1N até que se obtenha uma mudança de coloração (rósea) da solução por, no mínimo, 15 segundos. Anotar o volume gasto na titulação.
- No caso de amostras coloridas ou turvas, fazer a titulação utilizando um potenciômetro. Para isto, introduzir o eletrodo no erlenmeyer, titular agitando, e observar o pH da amostra. Proceder à titulação até alcançar pH 8,1. Anotar o volume gasto.

Cálculos:

- Expressar o resultado em gramas de ácido predominante em 100 g ou 100 mL da amostra ou em porcentagem.

$$\frac{g_{\text{ác.pred.}}}{100g_{\text{am}}} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times f_{\text{ac}} \times 100}{P \times 1000}$$

Onde **V** é o volume gasto de NaOH (mL), **N_{NaOH}** é a normalidade da solução de NaOH (0,1), **f_{ac}** é o fator do ácido predominante e **M_{am}** a quantidade da amostra (g ou mL). O valor 1000 refere-se ao conteúdo do ácido predominante em um litro. Exemplo: 64/1000 mL.

Equivalente-grama para ácidos:

Ácido acético: 60 (vinagre);

Ácido cítrico: 64 (frutas cítricas, pêssego);

Ácido láctico: 90 (leite);

Ácido málico: 67 (maçã, caqui);

Ácido tartárico: 75 (uva).

***Relação entre °Brix e acidez titulável.**

A relação entre o °Brix e a acidez titulável é utilizada para indicar o equilíbrio doce-ácido de alimentos, principalmente de sucos, sendo uma avaliação da sua qualidade e uma indicação do grau de maturação da fruta. Valores da relação °Brix/acidez titulável entre 12 a 18 indicam balanceamento sensorial equilibrado.

Cálculos:

$$\text{Relação Brix/ acidez} = \frac{SS_{\text{am}}}{AT_{\text{am}}}$$

Onde **SS_{am}** são os sólidos solúveis (%) ou °Brix e **AT_{am}** é a acidez titulável (%) da amostra.

5. Bibliografia

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 1999. 212 p.

ZENEBO, O.; PASCUET, N. S. ; TIGLEA, P (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analise-dealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2014.

TABELA brasileira de composição de alimentos. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

TABELA brasileira de composição de alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/tabela_nepa.htm>. Acesso em: 30 mai. 2014.

MEDIDA DE pH EM ALIMENTOS

Experimento: determinação da acidez ou alcalinidade de produtos alimentícios utilizando potenciômetro

1. Introdução

O pH é o potencial de hidrogênio livre em uma solução. A acidez ou alcalinidade de uma solução é expressa por seu valor de pH em uma escala de 0 a 14, na qual a neutralidade é pH 7,0. Os valores de pH abaixo de 7,0 são ditos ácidos e aqueles acima de 7,0 são alcalinos. Com base nos valores de pH dos alimentos é possível avaliar o potencial contaminante microbiológico e a provável natureza do processo de deterioração que eles sofrerão.

De acordo com o pH, os alimentos são subdivididos em três grandes grupos: alimentos de baixa acidez, alimentos ácidos e alimentos muito ácidos (Quadro 01).

Quadro 01 - Faixa de pH de alimentos

Alimentos de baixa acidez	pH superior a 4,5
Alimentos ácidos	pH entre 4,0 e 4,5
Alimentos muito ácidos	pH inferior a 4,0

Essa classificação está baseada no pH mínimo para a multiplicação e produção da toxina de *Clostridium botulinum* (pH 4,5) e no pH mínimo para a multiplicação da grande maioria das bactérias.

A avaliação do pH por método potenciométrico baseia-se na medida da força eletromotriz de uma pilha ou célula galvânica constituída

pela associação de dois eletrodos: um de referência e outro indicador ou de medida. O eletrodo de referência é aquele que possui potencial estável e reproduzível em relação à solução. O eletrodo indicador, por outro lado, também denominado de trabalho, é o que apresenta potencial variável, dependendo da atividade da espécie química na solução.

Para a determinação do pH de soluções, água e outros produtos industrializados, utiliza-se frequentemente um sistema com os eletrodos de vidro e de referência combinados num único conjunto, com o primeiro axialmente envolvido pela ponte salina do eletrodo de referência, em geral de prata/cloreto de prata. A combinação entre o eletrodo de vidro e o de referência num mesmo corpo facilita a medida. Alguns fatores químicos que afetam o desempenho do eletrodo são: substâncias muito alcalinas, proteínas, soluções oleosas ou gordurosas que poderão bloquear a membrana com conseqüente diminuição ou, até, perda de resposta do eletrodo. É, portanto, necessária uma limpeza adequada. A cada semana, os bulbos dos eletrodos de vidro devem ser inspecionados, a fim de detectar a presença de filmes ou depósitos de possíveis substâncias contaminantes. Neste caso, proceder à limpeza e remoção dos contaminantes ou à substituição do eletrodo.

2. Objetivo

Utilizando o potenciômetro, realizar medidas de pH em diferentes tipos de alimentos.

3. Material

- Material: balão volumétrico de 250 mL, béquer de 100 mL e 250 mL, erlenmeyer de 250 mL, bastão de vidro e vidro de relógio.
- Reagentes: fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) P.A. fosfato dissódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) P.A., biftalato de potássio ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) P.A.
- Equipamentos: agitadores e barras magnéticas, potenciômetro (pHmetro) e termômetro.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- **Solução tampão pH 7:** (fosfato 0,025 M): pesar 0,8475 g de KH_2PO_4 e 1,6695 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Dissolver em água e completar em balão de 250 mL.
- **Solução tampão pH 4:** (biftalato de potássio 0,05 M): pesar 2,6057 g $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$. Dissolver em água e completar em balão de 250 mL.

Preparo da amostra:

- Bebidas com gás carbônico, como refrigerantes, devem ser submetidas à agitação mecânica ou a vácuo antes de se tomar a medida de pH, pois o CO_2 pode formar ácido carbônico e abaixar o pH.
- Bebidas com polpa em suspensão devem ser agitadas de forma que se possa misturar a polpa decantada e medir o seu pH imediatamente antes de a polpa se separar novamente. É possível também utilizar um agitador magnético para conseguir um resultado homogêneo, já que a polpa e o líquido podem ter valores de pH diferentes.
- Em produtos sólidos e secos, como farinhas, pão, macarrão e biscoitos, deve-se preparar um extrato com suspensão de 10 g do produto em 100 mL de água. A medida do pH é realizada no líquido sobrenadante após decantação dos sólidos. Produtos semissólidos, porém, com alta umidade, como o queijo fresco, devem ser macerados e homogeneizados. O eletrodo deve ser introduzido na massa da amostra em pelo menos três lugares diferentes para a realização da leitura do pH.

Calibração do equipamento:

- Verificar a voltagem do equipamento, conectá-lo à rede elétrica e ligar o pHmetro.

- Colocar cada tampão (4,0 e 7,0) em béqueres de 50 mL devidamente rotulados.
- Tirar o eletrodo da solução de repouso (KCl 3M), lavar com água destilada e secá-lo com papel absorvente.
- Mergulhar o bulbo do eletrodo dentro da solução-tampão pH 4,0 tendo o cuidado de não bater no fundo do béquer para evitar a quebra do eletrodo. Ajustar o primeiro seletor do instrumento para o valor de 4,0.
- Retirar o eletrodo da solução, lavar o bulbo com água destilada, secá-lo com papel absorvente e mergulhar na solução-tampão pH 7,0. Ajustar o segundo seletor do instrumento (“taxa de variação”) para o valor 7,0.
- Retirar o eletrodo da solução-tampão, lavar com água destilada, secá-lo com papel absorvente e recolocá-lo na solução-tampão de pH 4,0. Se não houver confirmação do pH = 4,0, repetir o procedimento de calibração. Se houver confirmação, remover o eletrodo da solução-tampão, lavá-lo com água destilada, secá-lo e deixá-lo submerso em água destilada até iniciar a análise.

Determinação:

- Colocar a amostra em béquer de 50 mL.
- Lavar o eletrodo com água destilada, secá-lo com papel absorvente e mergulhar na amostra.
- Fazer a leitura em triplicata.
- Lavar o eletrodo com água destilada, secá-lo com papel absorvente e mergulhá-lo na solução de repouso (KCl 3M).
- Desligar o equipamento.

Cálculos:

- Calcular o valor médio de, pelo menos, três leituras de pH e o desvio padrão.

5. Bibliografia

BASTOS, M. S. R.. et al. **Ferramentas da ciência e tecnologia para a segurança dos alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical: Banco do Nordeste do Brasil, 2008.

BELLATO, C. R. et al. **Laboratório de química analítica**. Viçosa: UFV, 2000.

JARDIM, W.J. **Construção e avaliação de eletrodos de nióbio/óxido de nióbio para determinações potenciométricas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VITAMINA C

MÉTODO TILLMANS

Experimento: Determinação da vitamina C pelo método de Tillmans

1. Introdução

O ácido ascórbico, ou vitamina C está amplamente distribuído na natureza em altas concentrações, particularmente em frutas cítricas e vegetais verdes. O teor de ácido ascórbico não é uniforme entre as diversas fontes, variando de acordo com a espécie, tipo de tecido, grau de maturação e procedência.

O ácido ascórbico encontra-se em equilíbrio entre as formas reduzidas e oxidadas (ácido L-ascórbico e ácido L-deidroascórbico, respectivamente).

Em alimentos, o ácido ascórbico tem função muito importante devido à sua ação fortemente redutora. É amplamente empregado como agente antioxidante para estabilizar cor, sabor e aroma em alimentos. Além do emprego como conservante, o ácido ascórbico é utilizado para enriquecimento de alimentos ou restauração, a níveis normais, do valor nutricional perdido durante o processamento.

A vitamina C é degradada principalmente pelo contato com o oxigênio e pela exposição ao calor e à luminosidade. Em alimentos congelados, ela se mantém praticamente estável. Entretanto, perdas significativas ocorrem com o cozimento.

Os métodos clássicos para a determinação de vitamina C baseiam-se no seu forte poder redutor. O método de Tillmans é o mais utilizado. Este método consiste numa titulação baseada na redução do 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico. O DCFI em meio básico ou neutro é azul; em meio ácido é rosa, e sua forma reduzida é incolor. O ponto final da titulação é detectado pela mudança de coloração da solução, de incolor para rosa.

2. Objetivo

Determinar o teor de ácido ascórbico em produtos alimentícios utilizando DCFI.

3. Material

- Espátula, balão volumétrico de 25, 50, 100, 1000 mL, béquer de 100 mL, bureta de 25 mL, erlenmeyer de 300 mL, pipeta volumétrica de 1, 10 e de 50 mL, funil de vidro e papel de filtro.
- Reagentes: bicarbonato de sódio P.A, solução de ácido oxálico 2% (p/v), solução de 2,6-diclorofeno-indofenol-sódio (DCFI) e solução padrão de ácido ascórbico
- Equipamentos: balança analítica e balança semianalítica.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- **Solução de Ácido Oxálico a 2%:** pesar, em balança semianalítica, 20 g de ácido oxálico P.A. Diluir em água destilada, transferir para balão volumétrico de 1 litro e completar.
- **Solução Padrão de Ácido Ascórbico:** pesar 125 mg de ácido ascórbico P.A. em balança analítica, diluir com solução de ácido oxálico 2%, transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar com ácido oxálico 2%. O balão volumétrico deve ser

envolto em papel-alumínio a fim de evitar incidência de luz. A solução deve ser utilizada o quanto antes.

- **Solução de 2,6-Diclorofeno-indofenol-Sódio (DCFI):** pesar em balança analítica 100 mg de DCFI e 210 mg de bicarbonato de sódio P.A. Diluir em 50 mL de água destilada quente, transferir para balão volumétrico de 1000 mL, juntamente com o bicarbonato de sódio, e completar com água destilada (e filtrar, se necessário). Padronizar com solução padrão de ácido ascórbico.

Determinação:

a) Padronização da solução titulante DCFI:

- Pipetar 1 mL de solução padrão de ácido ascórbico em um balão de 25 mL e completar o volume com ácido oxálico 2% (p/v).
- Dessa mistura, extrair uma alíquota de 10 mL e, em seguida, titular com solução de DCFI até se obter uma coloração rosada persistente durante 15 segundos (DCFI padrão). Anotar o volume gasto durante a titulação.

b) Titulação da Amostra:

- Pesar em balança semianalítica 25 g de amostra num béquer.
- Pesar 50 g de solução de ácido oxálico (2%).
- Misturar a amostra com a solução e homogeneizar a mistura (extrato) com o auxílio de um *mixer*.
- Pesar 20 g desse extrato e transferir para um balão de 50 mL. Completar o volume com solução de ácido oxálico a 2%. Filtrar.
- Transferir 10 mL (pipeta volumétrica) do filtrado para erlenmeyer e titular com solução de DCFI previamente padronizada até o desenvolvimento de uma coloração rosada persistente durante 15 segundos ($DCFI_{amostra}$).
- Fazer em triplicata.

Cálculos:

$$\frac{\text{mgVit.C}}{100\text{g}_{am}} = \frac{\text{DCFI}_{am}}{\text{DCFI}_{pad}} \times \frac{100}{M_{am}} \times \frac{(M_{solvente} + M_{am})}{M_{solução}} \times \frac{50\text{mL}}{10\text{mL}} \times F_{AA}$$

$$F_{AA} = \frac{M_{AA}}{50} \times \frac{1}{25} \times 10$$

Onde DCFI_{am} e DCFI_{pad} são o volume gasto na titulação da amostra e do padrão (mL); M_{am} , $M_{solvente}$ e $M_{solução}$ são a quantidade em massa de amostra, de solvente adicionado para a trituração da amostra e de alíquota da amostra (g); F_{AA} é a quantidade de ácido ascórbico necessária para reduzir o DCFI (mg) e M_{AA} é a quantidade em massa de ácido ascórbico P.A. da solução padrão (mg).

5. Bibliografia

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC International, 1996. 1141 p.

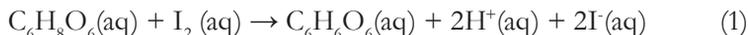
BENASSI, M. T.; ANTUNES, A. J. A. Comparisson of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. v. 31, n. 4, p. 507-513, nov. 1998.

MÉTODO COM IODATO DE POTÁSSIO

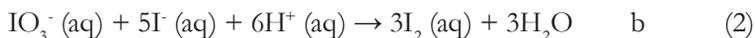
Experimento: Determinação do teor de vitamina C utilizando iodo

1. Introdução

Este método é aplicado para a determinação de vitamina C, ou ácido L-ascórbico, em alimentos *in natura* ou enriquecidos — quando a quantidade de vitamina for maior que 5 mg — e baseia-se na oxidação do ácido ascórbico pelo iodato de potássio. O ácido ascórbico consegue reduzir o iodo, I_2 , a iodeto, I^- . Neste método utiliza-se o caráter redutor do ácido ascórbico para quantificar através da reação, em meio ácido, com o iodo:



O iodo é formado pela reação do iodato com iodeto:



Uma solução de iodato, de concentração conhecida, é adicionada à solução acidificada de vitamina C contendo iodeto. O iodo formado a partir do iodato (reação 2) reage com o ácido ascórbico (reação 1) formando íon I^- , uma espécie incolor. Quando todo o ácido tiver sido consumido, o iodo formado permanece em solução, conferindo-lhe uma coloração acastanhada. Para aumentar a intensidade da cor, adiciona-se uma solução de amido, que forma com o I_2 uma substância de cor azul escura muito intensa.

O método é adequado para uso com comprimidos de vitamina C, sumos de fruta frescos ou embalados, frutas e vegetais sólidos. Devido a esta reação, o iodo formado é reduzido a iodeto imediatamente, enquanto houver ácido ascórbico presente. Depois de que todo o ácido ascórbico tenha sido oxidado, o iodo em excesso passa a reagir com o amido, formando o complexo amido-iodo azul-escuro. Este é o ponto final da titulação.

2. Objetivo

Determinar a quantidade de ácido ascórbico presente em uma amostra utilizando iodato de potássio.

3. Material

- Espátula, balão volumétrico de 50, 100, 200 e 1000 mL, bureta de 25 mL, erlenmeyer de 300 mL, béquer de 50 e 250 mL, pipeta volumétrica de 1, 5, 10 e 20 mL, pipeta graduada de 1 e 10 mL, papel de filtro qualitativo, funil de vidro, bastão de vidro e proveta de 50 mL
- Reagentes: ácido clorídrico diluído: (1 mol/L), solução de amido 0,5% (p/v), solução de iodato de potássio: (0,002 mol/L) e solução de iodeto de potássio: (0,6 mol/L)
- Equipamentos: balança analítica, dessecador, estufa e peneira fina.

4. Procedimento

Preparo das soluções:

- **Solução de iodato de potássio** (0,002 mol/L): secar 1 g de iodato de potássio por várias horas ou durante a noite a 100°C. Deixar esfriar e pesar 0,43 g de iodato de potássio e dissolver em 1 L de água destilada num balão volumétrico.

- **Solução de amido (0,5%):** pesar 0,25 g de amido solúvel e adicionar 50 mL de água fervente em um erlenmeyer de 100 mL. Dissolver e deixar esfriar.
- **Solução de iodeto de potássio (0,6 mol/L):** dissolver 10 g de iodeto de potássio (KI) P.A. em 50 mL de água destilada. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar com água destilada.
- **Solução de ácido clorídrico (1 mol/L):** 1mol HCl tem 36,5g e densidade de 1,19g/mL. Considerando que 1,19g equivale a 1 mL, calcular o volume para 36,5g, que nesse caso é 31 mL. Assim, transferir para um balão volumétrico 31 mL de HCl e completar o volume (1L) com água destilada.

Preparo da amostra:

- **Comprimidos de vitamina C:** dissolver um comprimido em aproximadamente 100 mL de água destilada, transferir para um balão volumétrico de 200 mL e completar o volume com água destilada.
- **Suco de frutas frescas:** coar o suco com uma peneira para remover as sementes e a fibra, de modo a evitar o entupimento das pipetas.
- **Frutas e legumes:** cortar 100 g em pedaços pequenos e triturar em processador com 50 mL de água destilada. Filtrar em peneira fina, lavando o resíduo com algumas porções de 10 mL de água destilada. Transferir o filtrado para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada.

Determinação:

- Pipetar 20 mL da amostra (solução preparada), colocar em erlenmeyer de 250 mL e adicionar cerca de 150 mL de água desti-

lada, 5 mL de solução de iodeto de potássio, 5 mL de solução de ácido clorídrico e 1 mL de solução de amido.

- Titular a amostra com solução de iodato de potássio (0,002 mol/L). O ponto final da titulação é o primeiro traço permanente da cor azul-escuro, formada devido ao complexo amido-iodo.
- Repetir a titulação com alíquotas de amostra até obter três repetições com variações de 0,1 mL.

Recomendações: O iodo mancha tanto a pele quanto a roupa. Tenha cuidado. Se necessário, utilize álcool pode remover eventuais manchas. O ácido ascórbico é suscetível à oxidação ao longo do tempo. Por esta razão, as amostras devem ser preparadas imediatamente antes da titulação. No entanto, se as amostras forem preparadas algumas horas antes, a oxidação pode ser minimizada pela adição de uma pequena quantidade de ácido oxálico (por exemplo, 1 g de ácido oxálico por 100 mL da solução da amostra).

Cálculos:

$$\frac{mgVit.C}{100g_{am}} = \left(\frac{V_{iod} \times F_{AA}}{M_{am}} \right) \times 100$$

Onde: V_{iod} é o volume de iodato de potássio gasto na titulação da amostra (mL); M_{am} é a quantidade em massa ou volume da amostra (g ou mL) e F_{AA} é a quantidade de ácido ascórbico necessária para reduzir o KIO_3 (0,002 M), equivalente a 0,8806.

5. Bibliografia

DETERMINATION of vitamin C concentration by titration. **College of Science University of Canterbury**. Nova Zelândia. Disponível em: <http://www.outreach.canterbury.ac.nz/chemistry/documents/vitaminc_iodate.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2011.

BOAL, I.; DIAS, J. T. **Caderno de aulas práticas de Química II**. Aveiro, Portugal: Universidade de Aveiro, [2003?].

Diagramação, Impressão e Acabamento



Rua Fagundes Varela, 967
Cep 19802 150 • Assis • SP

Fone: (18) 3322-5775

Fone/Fax: (18) 3324-3614

vendas@graficatriunfal.com.br

www.graficatriunfal.com.br