**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**
**CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL**
**DEPARTAMENTO DE GASTRONOMIA**
**CURSO DE BACHARELADO EM GASTRONOMIA**

# MANUAL DAS PRÁTICAS DE ANÁLISES DE ALIMENTOS

**JOÃO PESSOA**
**2020**

# SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO ..... 3**

**2 MATERIAIS USADOS NO LABORATÓRIO ..... 5**

2.1 VIDRARIAS ..... 5
2.2 EQUIPAMENTOS ..... 7

**3 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL ..... 8**

3.1 UMIDADE POR AQUECIMENTO DIRETO (SECAGEM EM ESTUFA A 105°C) ..... 8
3.2 RESÍDUO MINERAL FIXO (CINZAS) ..... 10
3.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS (MÉTODO DE KJELDAHL) ..... 12
3.4 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS ..... 16
*3.4.1 Método de Soxhlet ..... 16*
*3.4.2 Método de Bligh &Dyer ..... 18*
*3.4.3 Método de Folch ..... 20*
*3.4.4 Método de Gerber ..... 22*
3.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES ..... 23
*3.5.1 Método de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos (Lane-Eynon) ..... 23*
*3.5.2 Método de Antrona ..... 27*
*3.5.3 Método de Fenol Sulfúrico ..... 29*
3.6 DETERMINAÇÃO DE AMIDO ..... 31
3.7 DETERMINAÇÃO DE LACTOSE ..... 33
3.8 DETERMINAÇÃO DO VALOR CALÓRICO TOTAL ..... 34

**4 ANÁLISES FÍSICAS ..... 35**

4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA ..... 35
4.2 DETERMINAÇÃO DO PH ..... 36
4.3 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ ..... 38
4.4 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA ..... 40

# 1 INTRODUÇÃO

Em um laboratório, as condições de limpeza e organização devem ser adequadas para um bom desempenho das atividades realizadas e para evitar riscos físicos, químicos, ergonômicos e de acidentes, aos quais todos os usuários estão sujeitos. Para melhor utilização do Laboratório, foram descritas abaixo algumas orientações, tais como:

- Apenas é permitida a entrada de pessoas **autorizadas** no laboratório;
- A solicitação de uso do Laboratório será feita mediante agendamento, seguindo os passos a seguir: Consulta da disponibilidade de data conforme agenda disponibilizada no sítio http://www.ctdr.ufpb.br/ctdr/contents/menu/reserva/agenda-reserva-de-laboratorios. Após consulta e comprovada a disponibilidade de datas, o agendamento é solicitado via e-mail do laboratório, sendo necessário preenchimento de formulário disposto nas Normas de Funcionamento de Laboratórios do CTDR/UFPB;
- Nunca trabalhar sozinho no laboratório. A utilização do Laboratório está condicionada a presença de um servidor (técnico e/ou docente) de forma a garantir a segurança do discente e do patrimônio da universidade. A autorização de permanência de aluno sem a presença de um servidor poderá ser concedida em casos excepcionais, no entanto, o professor orientador deverá enviar uma declaração ao coordenador do Laboratório se responsabilizando pelo feito e/ou quaisquer danos a estrutura do Laboratório;
- Utilizar roupas e calçados adequados que proporcionem maior segurança, tais como: calça comprida; sapato fechado (não sendo permitido o uso de sapatilhas); dólmã ou jaleco, com botões protegidos, sem bolsos, de mangas longas e em tecidos 100% algodão;
- Usar os equipamentos de proteção individual (luvas, touca, máscara, óculos de proteção), de acordo com a orientação do professor ou técnico;
- Manter os cabelos sempre presos e/ou uso de touca;
- Não é permitido beber, comer, fumar ou aplicar cosméticos dentro do laboratório;
- Antes de iniciar as análises, verificar se todos os materiais necessários estão disponíveis no laboratório e averiguar os horários disponíveis;
- Ler sempre o procedimento experimental com a certeza de ter entendido todas as instruções. Em caso de dúvidas ou se algo anormal acontecer, chamar imediatamente o professor ou o técnico;
- Não armazenar soluções e amostras em vidrarias;
- Todo material a ser armazenado deve ser identificado com: o nome da amostra ou solução, nome do responsável, data e nome do professor orientador;
- Cada aluno é responsável pelo seu material, portanto, ao término da análise**, tudo o que você usou deverá ser limpo** e guardado em seus devidos lugares;
- Qualquer acidente, quebra ou dano de material e/ou equipamentos deve ser comunicado imediatamente aos responsáveis (professor ou técnico) para que sejam adotadas as medidas cabíveis;
- Nos casos que houver necessidade de atendimento médico ou de emergência a vítimas, avaliar a situação e proceder da seguinte forma: Em casos graves, chamar imediatamente:

SAMU – 192 ; Corpo de Bombeiros – 193; Polícia Militar – 190. Forneça o endereço correto do CTDR/ Campus I: Rua dos Escoteiros, s/nº, Mangabeira VII, Distrito Industrial de Mangabeira (Quadramares). Telefone: 83-3216-7947 (Secretaria do CTDR). Em casos menos graves, se a vítima estiver consciente e puder ser movida, proceda com seu deslocamento até o Pronto Socorro do Hospital de Emergência mais próximo (Hospital de Trauma – 3216-5736 ou Hospital Universitário – 3216-7042).

# 2 MATERIAIS USADOS NO LABORATÓRIO

## 2.1 VIDRARIAS

Essenciais para o funcionamento de um laboratório, pois são utilizadas para realizar reações, armazenar líquidos, solubilizar soluções, fazer medições, entre outros. As vidrarias variam de tamanho, capacidade, função e por essa razão, sempre há uma específica para cada utilidade.

São fabricadas para serem resistentes ao calor, ao choque térmico e a maioria dos produtos químico, sendo ao mesmo tempo menos densa e leve (mistura de vidro cristal ou temperado e vidro borossilicato).

As principais vidrarias usadas no laboratório são:

- **Almofariz com pistilo –** pode ser confeccionado em material cerâmico, vidro ou plástico e é utilizado para trituração e maceração de sólidos em pequena escala, a fim de diminuir o tamanho das partículas, facilitando sua dissolução em meio aquoso.
- **Balões de fundo chato** – muito utilizado para destilações químicas, pode ter diversos tamanhos e suporta volumes variados. Sua base chata, possibilita o apoio em superfícies planas. Pode ser aquecido, sobre tela de amianto em um tripé e também é bastante utilizado para armazenamento de líquidos.
- **Balão de fundo redondo –** possui as mesmas finalidades que o balão de fundo chato, porém, devido ao fundo arredondado, é muito utilizado em processos de destilação, sistemas de refluxo e evaporação a vácuo, acoplado a um evaporador rotativo (rotaevaporador). Pode também ser usado em uma manta aquecedora, o que permite um aquecimento da solução por igual em toda a sua extensão.
- **Balão volumétrico –** possui uma graduação volumétrica, que lhe confere maior precisão para fazer soluções e medições de líquidos. Seu volume é único e fixo, sendo descrito na parte externa do balão.
- **Bastão de vidro** – tem aspecto de uma haste e é utilizado para auxiliar na mistura, diluição e transferência de soluções.
- **Béquer** – amplamente usados para conter líquidos e misturas com ou sem ocorrência de reação; para dissolver sólidos em líquidos e aquecer as substâncias. Apesar de possuírem graduação, não são tão precisos como outras vidrarias para realizar a medição de líquidos.
- **Bureta** – vidraria muito precisa e específica para realizar a dosagem volumétrica de um reagente em titulações. Na parte inferior, possui uma espécie de torneira que permite sua abertura e fechamento, com escoamento do líquido de forma rápida ou gota a gota, de modo que o volume transferido seja exatamente o desejado. Na titulação, o líquido colocado na bureta é o titulante e seu gotejamento é feito sobre a solução titulada, que se deseja descobrir a concentração e que está adicionada com um indicador ácido-base.
- **Condensador -** usado para condensar ou liquefazer vapores. É muito utilizado em destilações para separar misturas homogêneas dos tipos sólido-líquido ou líquido-líquido. A mistura é aquecida e o líquido com menor ponto de ebulição passa para o estado de vapor, subindo pelo condensador, que possui uma mangueira acoplada, para

que a água passe por suas paredes e o resfrie. Assim, quando o vapor atinge o condensador resfriado, ele volta para o estado líquido e é coletado em outra extremidade. Os condensadores mais comuns são os de Liebig (retos), os de bolas e os de serpentina.

- **Dessecador** – é um recipiente fechado que contém um agente de secagem (desecante, geralmente sílica-gel) e que possui a tampa lubrificada com graxa de silicone para que seja hermeticamente fechada. Usado para guardar substâncias em ambientes com baixo teor de umidade.
- **Erlenmeyer** – usado para misturas e soluções, mas a sua utilização mais comum é para a titulação.
- **Funil de vidro** – vidraria usada para realizar filtrações simples com o auxílio de um filtro de papel e também para transferir soluções sem perda de material.
- **Funil de separação** – usado para realizar a separação de misturas heterogêneas do tipo líquido-líquido. Após agitar a mistura dentro do funil e deixá-la em repouso, os líquidos se separam: o mais denso, na parte inferior e o menos denso, na parte superior. A vidraria possui uma espécie de torneira na parte de baixo, que ao ser aberta, escoa lentamente o líquido mais denso para um béquer ou erlenmeyer que está posicionado na abertura inferior. A torneira é aberta com o funil destampado e sua abertura deve ser controlada, para que o líquido menos denso também escoe. O líquido menos denso, que ficou no funil, deve ser retirado pela parte superior para evitar contaminação.
- **Kitassato** – é usado em filtrações a vácuo, sendo acoplado por uma mangueira a uma bomba à vácuo, que provoca um processo de sucção e acelera a filtração.
- **Pipetas graduadas** – serve para medir e transferir pequenos volumes de líquidos. Sua vantagem sobre a pipeta volumétrica (veja a seguir) é que ela possui várias graduações ao longo do seu tubo, podendo medir volumes variáveis, enquanto a pipeta volumétrica possui somente um volume único e fixo.
- **Pipeta volumétrica** – tem a mesma finalidade que a pipeta graduada, sua precisão é maior. O líquido é puxado para dentro delas por meio de sucção provocada por um equipamento acoplado a elas denominado de "pêra" ou por um pipetador. Todos os tipos de pipeta não podem ser aquecidos, para não perder sua precisão.
- **Pipetas de Pasteur** – são tubos de vidro ou polipropileno, não graduados, estirados em capilar. Servem para transferência de pequenos volumes de líquidos. Podem ser usadas com uma pequena pêra de borracha na extremidade superior.
- **Proveta** – também é utilizada para medir o volume de líquidos e soluções líquidas, além de realizar transferências com mais fácil manuseio que as pipetas. Porém, a sua graduação volumétrica é menos precisa que a das pipetas.
- **Tubo de ensaio -** São tubos de vidro, sem borda ou com tampa de plástico rosqueável. Seu tamanho pode variar de acordo com o trabalho a ser realizado. São utilizados para testar ou realizar reações e aquecer substâncias em pequena escala.
- **Vidro de relógio -** é usado para pesar pequenas quantidades de substâncias, evaporar soluções e cobrir béqueres ou outros recipientes para não deixar o líquido ou a solução evaporar ou ser contaminada. Essa vidraria não pode ser aquecida diretamente.

## 2.2 EQUIPAMENTOS

- **Agitador Magnético** – equipamento que possui plataforma metálica onde é colocado o recipiente contendo o meio líquido e uma barra magnética, revestida de material inerte. O mesmo pode aquecer a solução e girar a barra magnética de modo circular, agitando o meio continuamente durante a incubação.
- **Balança** – destinada a pesagens das diferentes amostras e substâncias usadas no preparo de diversas soluções. Pode ser analógica ou digital, analítica ou semi-analítica. As balanças devem ser mantidas sobre uma base sólida, protegidas de vibrações, de umidade e mudanças bruscas de temperatura.
- **Deionizador de água –** é utilizado para remover cátions e ânions, metais pesados, entre outros componentes químicos que podem influenciar as análises e produção de compostos químicos.
- **Digestor** – usado para digerir os mais diversos tipos de amostras, para posterior análise de nitrogênio/proteína. Trata-se de uma espécie de câmara, que possuiu uma placa aquecedora com encaixe para os tubos de Kjeldahl contendo as amostras.
- **Espectrofotômetro –** instrumento analítico que mede a intensidade de radiação para cada comprimento de onda do espectro visível de uma determinada substância (amostra). Utilizado em análises biológicas e químicas. Pode ser de dois tipos: Feixe Simples e Duplo Feixe.
- **Estufa de Secagem** – equipamento que apresenta um sistema de aquecimento controlado por resistência elétrica, é munida de termostato e termômetro para o controle de temperatura. Em geral, este equipamento é utilizado para secar vidrarias e/ ou para fazer análise de umidade nas amostras.
- **Estufa com Circulação e Renovação de Ar** – também utilizada para análise de umidade, bem como, para a realização de testes que necessitem de uma secagem mais homogênea com troca constante do ar, que é executada por meio de aeradores situados na parte inferior e superior do gabinete.
- **Forno Mufla –** utilizado quando há necessidade de temperaturas muito elevadas para incineração/ calcinação de substâncias, possibilitando uma variação de temperatura entre 200°C a 1200°C. Frequentemente usado na análise de cinzas.
- **Potenciômetro –** equipamento utilizado para determinar o pH dos diferentes tipos de amostras e soluções tampão. É constituído por eletrodos, botões para calibração e de um sistema eletrônico capaz de fornecer leituras diretas com exatidão de ±0,1 unidades de pH. Antes de sua utilização é imprescindível sua calibração, com no mínimo 2 das soluções-padrão tamponadas (ácida – 4,0, neutra – 7,0 e alcalina – 10,0).
- **Refratômetro** – equipamento analítico que mede o índice de refração da luz de uma amostra translúcida, determinando sua pureza ou sua concentração quando dissolvida em outra. Comumente usado para determinar a concentração de açúcar em frutas, mel, geleias e outros. Pode ser de digital ou analógico, de bancada ou portátil.
- **Suporte universal** – utilizado para sustentar outros utensílios tais como garras, argolas, anéis, entre outros.

# 3 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

## 3.1 UMIDADE POR AQUECIMENTO DIRETO (Secagem em Estufa a 105°C)

**PRINCÍPIO:** A determinação da umidade se fundamenta na propriedade físico-química da água de se volatilizar a temperatura de 105˚C. O ponto de ebulição da água é de 100˚C e nesta temperatura ocorrem perdas mínimas, por volatilização, de alguns minerais e vitaminas termolábeis, o que faz com que esta técnica seja aplicada para a determinação da umidade. A técnica gravimétrica com emprego de calor é a mais utilizada e baseia-se na remoção da água por aquecimento, onde o ar quente tem contato com uma fina camada do alimento e é conduzido para o seu interior por condução. Após esse aquecimento direto, o resíduo obtido é chamado de resíduo seco.

**A. <u>Material utilizado</u>:**

- Cápsulas de alumínio
- Espátula
- Pinça
- Dessecador com sílica gel
- Balança analítica
- Estufa a 105-110ºC

**B. <u>Preparo, higienização e preservação da amostra</u>:**

- **Vegetais**

As frutas e hortaliças podem ser cortadas ou separadas ao meio no sentido longitudinal e transversal, de modo a reparti-las em quatro partes. Duas partes opostas devem ser descartadas, e as outras duas devem ser reunidas e homogeneizadas em processador ou liquidificador. Frutas e vegetais pequenos podem ser simplesmente homogeneizados inteiros.

A higienização da amostra deve ser realizada, inicialmente com água corrente, para retirar todas as sujidades, deixar de molho em solução clorada a 1%, sendo recomendada de hipoclorito de sódio (preparar quantidade adequada v:v), por no mínimo 15 minutos, em seguida, enxaguar em água corrente e depois água destilada e secar em papel toalha.

- **Amostras líquidas**

Devem ser evaporadas em banho-maria até a consistência pastosa para então serem colocadas na estufa.

- **Amostras açucaradas**

Formam uma crosta dura na superfície, que impede a saída da água do interior. Neste caso, costuma-se adicionar areia, asbesto ou pedra pome em pó misturada na amostra, para aumentar a superfície de evaporação.

**C. <u>Procedimento</u>:**

Colocar uma cápsula de alumínio, previamente tarada em estufa a 105 ºC, para esfriar em dessecador por 30 minutos. Em seguida, pesar de 2 a 5g da amostra na cápsula de alumínio previamente tarada. Aqueça por 3 horas em estufa estabilizada a 105°C (±5°C). Em seguida, resfrie o material (Cápsula + Amostra) em dessecador por 30 minutos e efetuar a primeira pesagem. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

**Atenção:** A manipulação das cápsulas deve ser feita sempre com pinça ou papel para não passar a umidade ou gordura das mãos às mesmas.

**D. Cálculo:**

$$\textbf{\% Umidade} = \frac{(P_2 - P_1)}{P} \times 100$$

$P_1$ = peso da cápsula mais a amostra seca
$P_2$ = peso da cápsula mais a amostra úmida
P = número de g da amostra

**Referências**:

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. São Paulo. 2003.

GONÇALVES, E.C.B.A. **Análise de alimentos: uma visão química da nutrição**. São Paulo: Livraria Varela, 2ª edição, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos Para Análise de Alimentos**. 1 ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

## 3.2 RESÍDUO MINERAL FIXO (CINZAS)

**PRINCÍPIO:** É o resíduo inorgânico que é transformado em $CO_2$, $H_2O$ e $NO_2$. Também chamado de cinzas, este resíduo é proveniente da destruição da matéria orgânica, a temperatura de 550 a 570°C, e é constituído por óxidos de metais, sulfatos não voláteis, fosfatos, silicatos e outros. Essa análise permite medir a quantidade total de minerais de um determinado alimento, não especificando qual o tipo. No entanto, a partir deste método podem ser determinados os seguintes elementos: K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, B, Mo, Al.

**A. Material utilizado:**

- Cadinho de porcelana
- Espátula
- Pinça
- Dessecador com sílica gel
- Balança analítica
- Mufla a 550ºC

**B. Preparo da amostra:**

Geralmente, pesa-se 5 g da amostra, mas esse valor pode variar com o conteúdo de cinzas do produto a ser analisado, como:

- cereais, queijo e leite: 3 - 5 g
- açúcar, carne, legumes, vinho: 5 - 10 g
- sucos, frutas frescas, frutas enlatadas: 25 g
- geléia, xarope, doces em massa: 10 g.

Os produtos que contém grande quantidade de matéria volátil, como condimentos, e produtos ricos em gordura, devem ser aquecidos vagarosamente, de maneira que comece a fumegar sem pegar fogo, para evitar excesso de chama, que poderia causar perdas por arraste e por respingos fora do cadinho.

Para produtos açucarados, a recomendação é secar a 100°C em banho-maria ou estufa e depois adicionar vaselina ou azeite de oliva, em pequena quantidade (possuem 0% de cinzas), para evitar a formação de espuma e aquecer vagarosamente.

**C. Procedimento:**

Pesar a amostra em cadinho de porcelana tarado (previamente aquecido em estufa a 105ºC, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado). Carbonizar a amostra e incinerar, elevando a temperatura da mufla gradativamente até 550ºC. Quando o resíduo ficar branco ou cinza claro, a amostra deverá ser resfriada e, em seguida, ser colocada no dessecador até temperatura ambiente e pesada.

**D. Cálculo:**

$$\textbf{\% Cinzas} = \frac{(P_2 - P_1)}{P} \times 100$$

$P_1$ = peso da cápsula (tara)
$P_2$ = peso da cápsula mais cinzas
P = número de g da amostra

**Referências**:

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. São Paulo. 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos Para Análise de Alimentos**. 1 ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

NOGUEIRA, A. R. de A.; SOUZA, G. B. de. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos.** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 334p.

## 3.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS (MÉTODO DE KJELDAHL)

**PRINCÍPIO:** Quantificar o nitrogênio total da amostra, e em seguida, transformá-lo por cálculo em nitrogênio proteico. Para isso, considera-se que cada 100 g de proteína contém em média 16 g de nitrogênio, obtendo-se o fator 6,25 (100/16), que multiplicado pelo percentual de nitrogênio total da amostra, dará o percentual da fração proteica na mesma. O teor médio de nitrogênio pode variar com o tipo de proteína, o que ocasiona variações nos valores do fator.

O método de Kjeldahl baseia-se na combustão úmida da amostra, pelo seu aquecimento com ácido sulfúrico concentrado, na presença de catalisadores, resultando na redução do nitrogênio orgânico da amostra a amônia, formando sulfato de amônia. Após neutralização, a amônia destilada é recepcionada em uma solução de ácido bórico a 4%, seguida de titulação direta da amônia com solução padrão de ácido clorídrico.

- **DIGESTÃO:**

- Material:

- Tubos de Kjeldahl
- Papel manteiga
- Espátula
- Digestor de Kjeldahl
- Pipeta de 10 mL

- Reagentes:

- Ácido sulfúrico PA
- Mistura catalítica (dióxido de selênio, sulfato de cobre, sulfato de sódio ou potássio – 1:10:100)

- Procedimento:

Pesar entre 0,5 - 1,0 g da amostra em papel livre de nitrogênio (papel seda ou papel manteiga). Em seguida, transferí-los para um tubo de Kjeldahl e adicionar 0,5 g da mistura catalítica (aproximadamente uma pitada) e 7 mL de ácido sulfúrico concentrado. Colocar a amostra e os reagentes no fundo do tubo, sem tocar as paredes. **Observação:** Fazer com que a amostra e os reagentes caiam no fundo do tubo, sem tocar suas paredes.

Em seguida, colocar o tubo no digestor e aumentar a temperatura gradativamente até atingir a temperatura de 350ºC. Finaliza-se a digestão quando a solução estiver incolor ou levemente azulada. Quando houver precipitado no fundo do frasco, este deverá ser branco ou levemente cinza. As paredes do tubo não deverão apresentar resíduos carbonizados. Quando a digestão estiver terminada, desliga-se o aquecedor e deixa-se o tubo e a solução resfriarem completamente.

**Observação: durante o processo de digestão alguns cuidados devem ser tomados:**

* O aquecimento deve ser feito sempre em capela, pois há desprendimentos de vapores e gases tóxicos.

* O fato de o líquido ficar incolor ou levemente colorido não significa que a digestão da matéria orgânica tenha sido completa, por isso, recomenda-se aquecer por mais tempo (1 hora), depois de atingir esse ponto.

- **Destilação**

- Material:

- Destilador de Nitrogênio
- Erlenmeyer (125 mL)
- Pipeta volumétrica de 25 mL
- Pipeta graduada de 1mL
- Becker de 100 mL
- Pinça de madeira
- Luvas de Kevlar

- Reagentes:

- Solução de hidróxido de sódio 40% (NaOH 40%)
- Solução de ácido bórico 4%
- Solução alcoólica de fenolftaleína a 1%
- Solução alcoólica de indicador misto 3:2 (30 mL de solução de verde de bromocresol a 0,1% e 20 mL de solução alcoólica de vermelho de metila a 0,1%)

**Observação:** A solução de ácido bórico 4% pode ser adicionada de 30 mL de solução de verde bromocresol 0,2% e 20 mL de solução alcoólica de vermelho de metila 0,2%.

- Procedimento:

Quando o tubo estiver em temperatura ambiente, acrescentar 3 gotas de fenolftaleína a 1% e acoplá-lo ao destilador de nitrogênio. Verificar se o tubo ficou bem fixo, evitando qualquer vazamento.

Transferir para um erlenmeyer (125 ml), 25 ml de solução de ácido bórico 4% e 3 gotas indicador misto. Mergulhe a saída do condensador do equipamento no erlenmeyer.

Em seguida, ligar o destilador na tomada e verificar o nível da água da caldeira, que deverá encostar ao sensor (esse procedimento pode alterar em cada aparelho de destilação). Abrir a torneira de água do laboratório para que haja fluxo de água no condensador. Ligar o aparelho e fazer um pré-aquecimento da água da caldeira até ebulição. Depois diminuir a temperatura do equipamento até a escala 2 e adicionar a solução de NaOH 40% ao copo superior do destilador, que deve estar com a torneira fechada. Abrir a torneira do copo, adicionando lentamente a solução de NaOH 40% ao tubo de Kjeldahl, até atingir pH alcalino (observe a mudança da cor alaranjada para o roxo ou marrom).

Após a "viragem" da cor no tubo de Kjedahl, aumentar a temperatura do destilador para 8 a 10, a fim de promover a destilação até atingir o volume inicial de 75 ml no erlenmeyer, acoplado ao condensador. Quando este volume for atingido, retirar primeiramente o erlenmeyer (para evitar refluxo da solução), diminuir a temperatura para 2 e desligar o aquecedor.

Reservar a solução do ácido bórico contendo a proteína destilada para a titulação. Retirar o tubo de Kjedahl do destilador e descartar seu conteúdo.

- **Titulação**

- Material:

- Bureta de 25 mL ou 50 mL

- Suporte com garra para bureta
- Becker de 50 mL

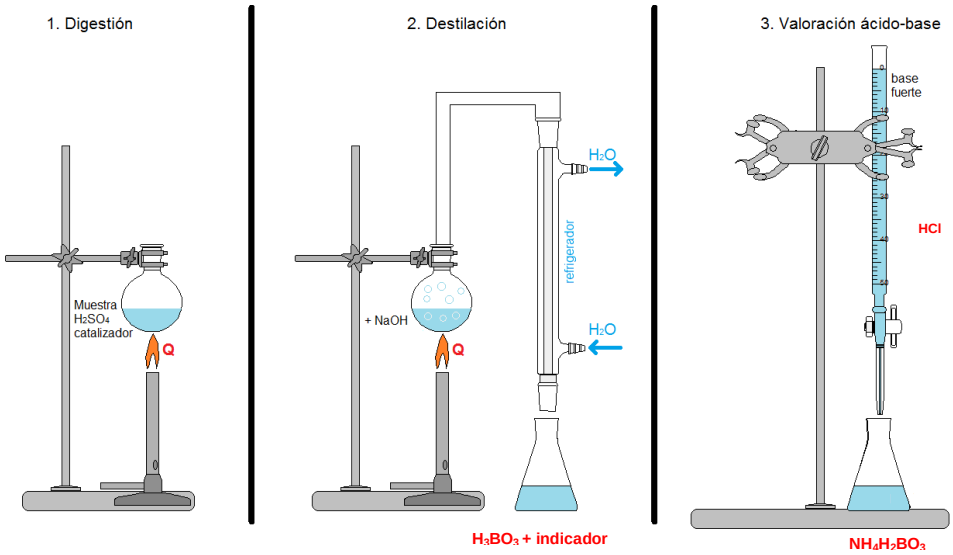
- Reagentes:

- Solução de ácido clorídrico 0,1 N (padronizada)

- Procedimento:

Titular a solução do erlenmeyer com ácido clorídrico 0,1N padronizado, até o aparecimento da coloração avermelhada. Um ensaio em branco, utilizando na digestão o papel de pesagem idêntico ao utilizado para a amostra, deverá acompanhar a análise. A contribuição do branco deverá ser subtraída dos resultados das amostras.

- **Etapas da Análise e Reações**




$$\text{Amostra} \xrightarrow[H_2SO_4]{\text{digestão}} (NH_4)_2SO_4 / H_2SO_4$$

$$\Delta \downarrow \text{destilar com excesso de NaOH (40\%)}$$

$$NH_3 / \text{ácido bórico} \vee NH_4H_2BO_3$$

$$\downarrow$$

$$\text{titular com solução padrão HCl 0,1N}$$

$$(NH_4H_2BO_3 + HCl \longrightarrow H_3BO_3 + NH_4Cl)$$

- **Cálculo:**

$$Proteínas\ totais\ em\ g/100g = \frac{(V_A - V_B) \times f_a \times F \times 0{,}14}{P}$$

VA = volume de ácido clorídrico 0,1N padronizado gasto na titulação da amostra.
VB = volume de ácido clorídrico 0,1N padronizado gasto na titulação do branco.
fa = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1N.
F = fator de correspondência nitrogênio (F = 6,25 para carnes ou misturas de proteínas, e proteínas de soja e de milho - ANVISA, 2003);

Valor de F para os diversos alimentos:

| F | Tipos de alimentos |
|---|---|
| 6,25 | Para proteínas animais, de soja e de milho |
| 6,68 | Para ovos |
| 6,38 | Para produtos lácteos |
| 5,83 | Para biscoitos, cevada, aveia e pão integral |
| 5,75 | Para proteínas vegetais |
| 5,74 | Para pão doce, pão caseiro e pão de leite |
| 5,70 | Para pão francês |
| 5,55 | Para gelatina |

Fonte: ANVISA, 2003.

**Referências:**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. In: **Diário Oficial da União**. Brasília: Diário Oficial da União, 2003.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. São Paulo. 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos Para Análise de Alimentos**. 1 ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

## 3.4 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS

### 3.4.1 Método de Soxhlet

**PRINCÍPIO:** Processo gravimétrico, baseado na perda de peso da amostra submetida à extração com éter de petróleo, hexano ou éter etílico, na quantidade de material dissolvido e extraído pelo solvente. O éter de petróleo, entre outros solventes tem como propriedade a grande capacidade de solubilizar gorduras e outras substâncias, tais como fosfatídeos, esteróis (colesterol), carotenóides e clorofila. A escolha do solvente vai depender dos componentes líquidos existentes no alimento. A extração com solventes é mais eficiente quando o alimento é seco antes da análise, pois existe maior penetração do solvente na amostra. Pode-se utilizar a amostra usada na determinação de umidade. Em muitos alimentos processados, como em produtos derivados do leite, pão, produtos fermentados, açucarados e produtos animais, a maior parte dos lipídeos está ligada a proteína e carboidratos, e 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. É necessário um controle da temperatura e tempo de exposição do material no solvente.

**A. <u>Material utilizado</u>:**

- Aparelho extrator de Soxhlet
- Balança analítica
- Estufa (105°C)
- Cartucho de Soxhlet ou papel de filtro de 12 cm de diâmetro
- Balão chato de 250 mL com boca esmerilhada
- Algodão desengordurado
- Espátula
- Dessecador com sílica gel

**B. <u>Reagente</u>:**

- Hexano

**C. <u>Procedimento:</u>**

Inicialmente, escolher e identificar os balões volumétricos, que serão pesados e colocados por 1h na estufa até peso constante (fazer procedimento de umidade). Em seguida, os balões devem ser resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados (anote tudo).

Pesar entre 2g e 5g da amostra em cartucho de celulose ou em cartucho de papel de filtro, sendo recomendado cobrir o fundo do cartucho com algodão. Transferir o cartucho para o aparelho extrator tipo Soxhlet que, em seguida, é acoplado ao balão de fundo chato, previamente tarado a 105°C. Adicionar hexano em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Manter, sob aquecimento em chapa elétrica, a extração contínua por 6 horas. Retirar o cartucho, destilar o hexano e transferir o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora.

Após resfriado em dessecador até a temperatura ambiente, pesar e repetir as operações de aquecimento por 30 minutos na estufa e resfriamento até peso constante.

**D. <u>Cálculo:</u>**

$$\textbf{\% Extrato etéreo} = \frac{100 \times N}{P}$$

N = Gramas de lipídios
P = peso da amostra

**Referências**:

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 920.39,C). Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 33. p. 10-12

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. São Paulo. 2003.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. Versão eletrônica. São Paulo: IAL, v.1, 2008. 1020 p.

### 3.4.2 Método de Bligh &Dyer

**PRINCÍPIO:** Consiste na extração a frio dos lipídios totais, com mistura de clorofórmio-metanol-água, na proporção de 1:2:0,8, respectivamente. Pode ser utilizado na determinação do teor lipídico de amostras com altas proporções de açúcares, proteínas e umidade. Após dissolução de clorofórmio e água, ocorre a separação em duas camadas: a de clorofórmio, que contém os lipídios e a metanólica, contendo os compostos não lipídicos. A quantidade de lipídios nas amostras será determinada a partir de uma alíquota do extrato de clorofórmio.

**A. <u>Material utilizado</u>:**

- Balança analítica
- Estufa (90°C)
- Agitador orbital
- Erlenmeyer (125 mL)
- Béquer (50 mL)
- Funil
- Funil de Separação (250 mL)
- Pipeta volumétrica de 5 ml
- Espátula
- Dessecador com sílica gel
- Papel de filtro

**B. <u>Reagentes</u>:**

- Clorofórmio P.A
- Metanol P.A
- Solução de sulfato de sódio anidro a 1,5% ($NaSO_3$ a 1,5%)

**C. <u>Procedimento</u>:**

Inicialmente, colocar os béqueres (50 mL) na estufa a 105°C, por uma hora. A seguir deixar esfriar e pesar (tara).

Pesar entre 2 g e 2,5 g da amostra em erlenmeyer (125 mL). Adicionar 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água. Colocar o erlenmeyer em agitador rotativo para homogeneizar por 30 minutos. Posteriormente, acrescentar 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução de sulfato de sódio anidro 1,5% e agitar por mais 2 minutos.

Em seguida, colocar o conteúdo no funil de separação para separação das camadas. Após separação, filtrar a camada inferior, com auxílio do funil e do papel de filtro, em outro erlenmeyer. Pipetar 5 mL do filtrado em béquer de 50 mL previamente tarado.

Evaporar o solvente em estufa a 90°C por 30 minutos. Depois de resfriar no dessecador até temperatura ambiente, os béqueres devem ser pesados.

**D. <u>Cálculo</u>:**

$$\textbf{\% Lipídios} = \frac{\text{Peso dos lipídios (peso final – peso do béquer) x 4 x 100}}{\text{Peso da amostra}}$$

**Referências:**

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos Para Análise de Alimentos**. 1 ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

### 3.4.3 Método de Folch

**PRINCÍPIO:** Consiste na extração a frio dos lipídios totais, com mistura de clorofórmio-metanol (2:1). O método de Folch tem sido recomendado por ser exato e reprodutível para a determinação de lipídios totais em alimentos com alto teor de água e proteínas, como carne e peixes.

**A. Material utilizado:**

- Balança analítica
- Estufa a 90°C
- Béquer de 50 mL
- Funil
- Proveta de 50 mL
- Provetas de 100 mL, com boca esmerilhada e tampa
- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Dessecador com sílica gel
- Papel de filtro

**B. Reagente:**

- Solução de clorofórmio-metanol 2:1 v/v
- Solução de sulfato de sódio anidro a 1,5%
- Clorofórmio

**C. Procedimento:**

Inicialmente, colocar os béqueres (50 mL) na estufa a 105°C, por uma hora. A seguir deixar esfriar e pesar (tara).

Em outro béquer (50 mL), pesar 2 g de amostra (seca ou úmida) e transferi-la para um recipiente de vidro fundo, que deverá ter suas paredes cobertas com papel alumínio. Adicionar 30mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1), medida com proveta, ao béquer para lavá-lo e transferir também o conteúdo para o recipiente. Tampar imediatamente (o volume da mistura clorofórmio:metanol deverá ser 17X o peso inicial da amostra quando esta for > 2g. Para cada 1g de amostra usar 20 mL da mistura clorofórmio:metanol).

Agitar a mistura (amostra + solvente) contida no recipiente, por 2 a 3 minutos, em triturador (BIOMATIC) e tampar em seguida. Filtrar a mistura triturada em papel de filtro qualitativo em proveta com boca esmerilhada (100 mL) e adicionar 10mL da mistura do solvente, medido em proveta, para lavar as paredes do frasco, que também deve ser filtrado juntamente com o filtrado da mistura. Anotar o volume final do extrato filtrado na proveta com boca esmerilhada.

Adicionar 20% do volume final do extrato filtrado (lido na proveta) de sulfato de sódio a 1,5%, agitar e deixar separar as fases mantendo a proveta fechada. A fase superior deve ficar com 40% e a inferior com 60%. Anotar o volume da fase inferior e descartar a fase superior succionando com pipeta graduada.

Retirar uma alíquota de 5 mL do extrato (fase inferior) com pipeta volumétrica e transferir para o béquer (50 mL) tarado anteriormente. Colocar o béquer em estufa a ± 90ºC para evaporar a mistura de solventes, com cuidado para não queimar. Após isso, aguardar o resfriamento em dessecador e pesar o béquer com o resíduo de gordura.

**D. Cálculo:**

$$\textbf{\% Lipídios} = \frac{P_1 \times Vb \times 100}{Va \times P_2}$$

$P_1$ = peso final do béquer – peso inicial do béquer)
$P_2$ = peso da amostra
Va = 5 mL
Vb = volume da porcentagem do filtrado

**Referências:**

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 497- 509,1957.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos Para Análise de Alimentos**. 1 ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

### 3.4.4 Método de Gerber

**PRINCÍPIO:** Processo volumétrico para a determinação da gordura, que está ligada às proteínas e carboidratos, em alimentos como pães, leite e produtos lácteos. A gordura, deve ser inicialmente liberada para sua quantificação, após digestão ácida e posterior centrifugação.

**A. Material utilizado:**

- Lactobutirômetro de Gerber com rolha
- Balança analítica
- Pipetas de 1 e 10 mL)
- Pipeta volumétrica de 11 mL
- Termômetro
- Centrífuga de Gerber
- Banho-maria

**B. Reagente:**

- Solução de ácido sulfúrico (D = 1,820 a 1,825)
- Ácido isoamílico (D = 0,815)

**C. Procedimento:**

Transferir 10 mL de ácido sulfúrico para um butirômetro de Gerber. Adicione, lentamente, 11 mL da amostra de leite, em seguida lentamente mais 1 mL de álcool amílico (estas adições devem ser feitas sem molhar internamente o gargalo do butirômetro). Tampar e verter até completa dissolução. Centrifugar a 1.200 rpm, durante 5 minutos e levar para o banho de água a 70°C por 5 minutos, com a rolha voltada para baixo. Retirar o butirômetro do banho, mantendo a posição vertical (rolha para baixo). Manejando a rolha, colocar a camada amarelo-clara, transparente (lipídios) dentro da haste graduada do butirômetro. O número de mL ocupado pela camada oleosa dará diretamente a porcentagem de lipídios contida na amostra (a leitura deve ser feita no menisco inferior).

**D. Cálculo:**

Ler a porcentagem de gordura diretamente na escala do aparelho e na base do menisco formado pela camada de gordura, imediatamente após retirar o aparelho do banho-maria. Se a coluna não estiver bem delineada, misturar novamente o conteúdo do aparelho e repetir os procedimentos de centrifugação e aquecimento.

**Referências:**

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos Para Análise de Alimentos**. 1 ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

## 3.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

### 3.5.1 Método de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos (Lane-Eynon)

**PRINCÍPIO:** Baseado nas propriedades físicas das suas soluções ou no poder redutor dos glicídios mais simples (obtidos por hidrólise, no caso dos mais complexos). Uma solução de $Cu^{2+}$ na forma de um complexo tartarato é titulada com a solução do açúcar redutor, formando $Cu_2O$ e o ácido de açúcar.

O azul de metileno é o indicador oxirredutor e a solução fervente é usada para aumentar a reação de oxirredução e prevenir a entrada de oxigênio. Na primeira titulação é obtido o conteúdo de açúcares redutores, calculado em glicose. Na segunda, há a hidrólise prévia dos não-redutores, feita pela adição de ácidos ou enzimas, e o resultado é calculado em sacarose.

**A. <u>Material utilizado</u>:**

- Erlenmeyer de 250 mL e 125 ml
- Balões volumétricos de 250 mL e 100 mL
- Pipetas de 5, 10 e 25 mL
- Agitador magnético com aquecimento
- Bureta de 50 mL
- Suporte universal
- Banho-maria (68 -70ºC)
- Proveta de 10 mL
- Funil
- Papel de filtro ou Algodão

**B. <u>Preparo das Soluções de Fehling A e B:</u>**

- ***Solução A de Fehling*** (Sulfato cúprico + $H_2SO_4$): Dissolver 34,639g de $CuSO_4.5H_2O$ em água destilada, adicionar 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e completar o volume a 500 mL com água destilada.

- ***Solução B de Fehling*** (Tartarato de sódio e potássio. $10H_2O$ + NaOH): Dissolver 172 g de tartarato e 50 g de NaOH em água e completar o volume a 500 mL com água destilada. Deixar em repouso, decantar e filtrar em algodão de vidro.

- ***Solução de Glicose a 1% e Solução de Azul de Metileno a 1%***

- **<u>Padronização das Soluções de Fehling:</u>**

Preparar a solução de glicose a 1% e transferir para uma bureta de 50 mL. Transferir para um erlenmeyer de 250 mL com auxílio de pipetas volumétricas, 5 mL de cada uma das soluções de Fehling. Adicionar 20 mL de água destilada e agitar bem.

Usando um agitador magnético com aquecimento, aquecer as soluções de Fehling até a fervura e titular com a solução de glicose 1% (cerca de 2 mL). Deixar ferver novamente e adicionar 3 a 4 gotas da solução de azul de metileno 1%. Titular rapidamente com a solução de

glicose 1%. O tempo limite de titulação não deve ultrapassar 3 minutos. Quando o ponto final estiver próximo, a cor azul da espuma sobrenadante começa a desaparecer, deixando ver mais claramente o precipitado vermelho tijolo do óxido cuproso. Deste ponto em diante, continuar a titulação gota a gota. O ponto final é atingido quando a solução sobrenadante estiver totalmente incolor, ou seja, quando a cor azul de metileno desaparecer.

Repetir a titulação com a solução de glicose 1%, mas juntando de uma vez o volume gasto na primeira titulação, menos 1 mL. Quando a fervura recomeçar, adicionar 3 ou 4 gotas de azul de metileno 1% e continuar a titulação gota a gota, vagarosamente, até o desaparecimento da cor azul do indicador.

- Cálculo:

1g de glicose → 100 mL
**x** g de glicose → volume gasto na titulação

**C. Preparo para Açúcares Redutores:**

- Reagentes:

- Solução de Hidróxido de sódio 0,1N
- Solução de Ácido clorídrico 0,1N
- Solução de Acetato de zinco 1M
- Solução de Ferrocianeto de potássio 0,25M
- Azul de metileno 1%
- Solução de Fehling A e B

- Procedimento:

Pesar cerca de 10g da amostra, previamente homogeneizada, transfira para um balão volumétrico de 250 mL e complete com água destilada. Em seguida filtre para um frasco seco. Caso a amostra esteja com pH abaixo de 6,0, neutralize com NaOH ou HCl 0,1N, usando potenciômetro ou papel tornassol.

Para clarificar amostras com cor intensa, adicionar a amostra 10 ml de solução de acetato de zinco 1,0 M e, em seguida, retire seu excesso adicionando 10 ml de ferrocianeto de potássio a 0,25 M e posteriormente, filtrar.

Transferir o filtrado para uma bureta (25 ou 50 mL) e com o auxílio de pipetas, transferir 5 mL de cada uma das soluções de Fehling para um erlenmeyer de 250 mL e adicionar 20 mL de água destilada. Aquecer até ebulição. Mantendo a ebulição, gotejar a solução contida na bureta até a descoloração total e formação de um precipitado vermelho tijolo no fundo do erlenmeyer, usando o azul de metileno 1% como indicador. Anotar o volume gasto e calcular a quantidade de açúcares redutores.

- Cálculo:

$$\textbf{\% Açúcares redutores} = \frac{(F \times C \times 100)}{(P \times V)}$$

F – fator do licor de Fehling (F/2 quando usar 5 ml)
C – capacidade volumétrica do balão utilizado (250 ml)

P – peso da amostra
V – volume gasto na titulação

**D. Preparo para Açúcares Totais:**

- Reagentes:

- Solução de Hidróxido de sódio a 40%
- Ácido clorídrico
- Azul de metileno 1%
- Solução de Fehling A e B

- Procedimento:

Transferir 50 mL do filtrado obtido anteriormente (para açúcares redutores), para um balão volumétrico de 100 mL. Acrescentar 1 mL (2,5 mL) de ácido clorídrico concentrado e levar ao banho-maria durante 30 minutos (70 a 80°C). Deixar esfriar, adicionar fenolftaleína 1% e neutralizar a solução com NaOH 40% (pH 7,0 - até aparecer coloração rósea) e completar o volume com água destilada.

No filtrado obtido anteriormente (açúcares redutores), adicionar 10 mL de HCl concentrado e levar e levar ao banho-maria durante 30 minutos (70 a 80°C). Deixar esfriar, adicionar fenolftaleína 1% e neutralizar a solução com NaOH 40% (pH 7,0 - até aparecer coloração rósea).

**OBSERVAÇÃO:** testar as 4 possibilidades acima: 50 mL com 1ml de HCl; 50 mL com 2,5 mL e pegar todo o restante do filtrado de redutores com 5 e 10 mL de HCl.

Transferir a solução para uma bureta de 50 mL. Com o auxílio de pipetas, transferir 5 mL de cada uma das soluções de Fehling para um erlenmeyer de 250 mL e adicionar 20 mL de água destilada. Gotejar a solução contida na bureta até o descoloração total e formação de um precipitado vermelho tijolo no fundo do erlenmeyer, utilizando azul de metileno a 1% como indicador. Anotar o volume gasto e proceder com o cálculo dos açúcares não redutores e os totais.

- Cálculo:

$$\textbf{\% Açúcares totais} = \frac{(F \times C \times 100)}{(P \times V)}$$

F – fator do licor de Fehling (F/2 quando usar 5 ml)
C – capacidade volumétrica do balão utilizado (250 ml)
P – peso da amostra
V – volume gasto na titulação

**% Açúcares não redutores** = Açúcares totais - Açúcares redutores

**Referências**:

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. São Paulo. 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos Para Análise de Alimentos**. 1 ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

### 3.5.2 Método de Antrona

**PRINCÍPIO:** consiste na hidrólise com ácido sulfúrico concentrado, que quando aquecido com as hexoses sofre uma reação de condensação, formando um produto de coloração verde, que pode ser lida em espectrofotômetro a 620 nm. A antrona é um método específico para hexoses e seus polímeros.

**A. Material utilizado:**

- Banho-maria
- Espectrofotômetro
- Balança analítica
- Balão volumétrico de 1000 mL
- Balão volumétrico de 100 mL
- Béquer de 50 mL
- Bastão de vidro
- Pipeta volumétrica de 2 mL
- Pipeta automática de 100 -1000 μL
- Espátula
- Tubos de ensaio

**B. Reagentes:**

- Antrona (9,10-dihidro-9-oxoanthracena)
- Ácido sulfúrico P.A.
- Solução padrão de glicose

**C. Preparo das Soluções:**

- ***Solução padrão de glicose****:* Dissolver 100 mg de glicose P.A. em 1000 mL de água destilada.
- ***Reagente de antrona****:* Pesar 200 mg de antrona e passar para o balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com ácido sulfúrico concentrado. Manter essa solução refrigerada e ao abrigo da luz. Estável durante 3 semanas.

**D. Procedimento**:

- Extração da Amostra:

Pesar 1 g da amostra e anotar o peso. Em seguida, dissolver a amostra em 100 mL de etanol a 80%, dependendo da quantidade de amido presente na amostra.
**Observação: Caso a amostra não tenha amido, dissolver somente com água destilada.**

- Preparo da Curva Padrão e da Amostra:

Para a curva padrão, preparar 11 tubos de ensaio: 1 tubo para o branco e 10 tubos com solução padrão de glicose + água. Em outro tubo, acrescentar a amostra. Este preparo deve seguir as quantidades descritas na Tabela abaixo. Colocar os tubos em banho de gelo, onde devem permanecer enquanto se coloca o reagente de antrona. Agitar os tubos e colocá-los

novamente no banho de gelo. Em seguida, levar os tubos ao banho-maria fervente por 8 minutos. Esfriar em água gelada e ler a absorbância em espectrofotômetro a 620 nm.

| TUBOS | SOL. PADRÃO DE GLICOSE | Volume (mL) | ÁGUA (mL) | AMOSTRA (mL) | ANTRONA (mL) |
|---|---|---|---|---|---|
| Branco | - | | 1,0 | - | 2,0 |
| P1 | 05 μg | 0,05 | 0,95 | - | 2,0 |
| P2 | 10 μg | 0,10 | 0,90 | - | 2,0 |
| P3 | 15 μg | 0,15 | 0,85 | - | 2,0 |
| P4 | 20 μg | 0,20 | 0,80 | - | 2,0 |
| P5 | 25 μg | 0,25 | 0,75 | - | 2,0 |
| P6 | 30 μg | 0,30 | 0,70 | - | 2,0 |
| P7 | 35 μg | 0,35 | 0,65 | - | 2,0 |
| P8 | 40 μg | 0,40 | 0,60 | - | 2,0 |
| P9 | 45 μg | 0,45 | 0,55 | - | 2,0 |
| P10 | 50 μg | 0,50 | 0,50 | - | 2,0 |
| Amostra | - | | | 1,0 | 2,0 |

**Referências**:

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. São Paulo. 2003.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, p. 508-514, 1954.

### 3.5.3 Método de Fenol Sulfúrico

**PRINCÍPIO:** Consiste em um método simples, rápido, sensível, exato e largamente aplicado aos carboidratos, que utiliza ácido sulfúrico e fenol na quebra e para determinação das classes de glicídios, incluindo os derivados de açúcares, oligossacarídeos e polissacarídeos.

**A. Material utilizado:**

- Banho-maria
- Agitador de tubos (Vortex)
- Centrífuga
- Balão volumétrico de 100 mL
- Béquer de 100 mL
- Erlenmeyer
- Bastão de vidro
- Pipeta volumétrica de 2 mL
- Pipeta automática de 100 -1000 µL
- Espátula
- Tubos de ensaio
- Papel filtro Whatman n° 2
- Espectrofotômetro calibrado a 490nm

**B. Reagentes:**

- Ácido Sulfúrico concentrado
- Solução padrão de glicose a 100µg/mL
- Solução de Fenol a 5%
- Etanol a 80%
- Acetato de chumbo 10%
- Carbonato de sódio

**C. Preparo das soluções:**

- ***Solução padrão de glicose a 100µg/mL***: pesar 0,01g de glicose e diluir em 100 mL de água destilada;
- ***Solução de Fenol a 5%***: Dissolver 5g do reagente fenol em 100 mL de água destilada. O Fenol é cristalino, é recomendado aquecer em banho-maria e conservar sob refrigeração. Após o uso, deve-se estocá-lo imediatamente sob refrigeração.
- ***Ácido Sulfúrico concentrado****:* Recomenda-se adicionar o ácido sulfúrico concentrado em capela de exaustão e usar banho de gelo, pois provoca liberação de gases tóxicos e promove uma reação exotérmica.
- ***Etanol a 80%***: Diluir 80 mL de etanol em 100 mL de água;
- **Acetato de chumbo 10%**: pesar 10 g de acetato de chumbo e diluir para 100 mL de água.

**D. Procedimento:**

**-** Preparo da Curva Padrão e da Amostra:

Para a curva de calibração, distribuir em 11 tubos de ensaio alíquotas contendo de 0 a 100 µg/mL de solução padrão de glicose. Completar o volume com água destilada até 1 mL. Acrescentar 1 mL de solução de fenol a 5%. Adicionar "rapidamente" 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, em banho de água fria. Agitar e depois deixar em repouso a temperatura ambiente por 20 minuto, até atingir coloração salmão. Em seguida, ler em espectrofotômetro calibrado no comprimento de onda de 490 nm.

| TUBOS | SOL. PADRÃO DE GLICOSE A 100 µg/mL (mL) | ÁGUA (mL) | AMOSTRA (mL) | FENOL A 5% (mL) | ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO* (mL) |
|---|---|---|---|---|---|
| Branco | - | 1,0 | - | 1,0 | 5,0 |
| 1 | 0,1 | 0,9 | - | 1,0 | 5,0 |
| 2 | 0,2 | 0,8 | - | 1,0 | 5,0 |
| 3 | 0,3 | 0,7 | - | 1,0 | 5,0 |
| 4 | 0,4 | 0,6 | - | 1,0 | 5,0 |
| 5 | 0,5 | 0,5 | - | 1,0 | 5,0 |
| 6 | 0,6 | 0,4 | - | 1,0 | 5,0 |
| 7 | 0,7 | 0,3 | - | 1,0 | 5,0 |
| 8 | 0,8 | 0,2 | - | 1,0 | 5,0 |
| 9 | 0,9 | 0,1 | - | 1,0 | 5,0 |
| 10 | 1,0 | - | - | 1,0 | 5,0 |
| Amostra | - | 1,00 | 1,0 | 1,0 | 5,0 |

*Após a adição do $H_2SO_4$, deve-se agitar imediatamente por 10 segundos e manter em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente (25°C - 30°C).

Traçar o gráfico lançando as concentrações de glicose ([ ] glicose) na abscissa contra os valores de absorbância (A) na ordenada.

- Preparo e Leitura da Amostra:

Pesar 1g de amostra em erlenmeyer de 125 mL, adicionar 40 mL de etanol 80% e levar ao banho-maria (80°C) com agitação frequente (a cada 5 minutos), durante 1 hora. Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos. Filtrar em papel filtro Whatman n° 2. Diluir a amostra, se necessário. Calcular a concentração dos carboidratos na amostra levando em conta a diluição. Em seguida, ler em espectrofotômetro calibrado no comprimento de onda de 490nm.

**Referências**:

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. São Paulo. 2003.

MICHEL DUBOIS, K.A.; GILLES,J.K.; HAMILTON,P.A.; REBERS; FRED SMITH. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28,n.3, 1956.

## 3.6 DETERMINAÇÃO DE AMIDO

**PRINCÍPIO:** O amido é um polissacarídeo de elevado peso molecular que não apresenta reação redutora. Uma hidrólise enérgica em meio fortemente ácido produz exclusivamente glicose, sendo determinada pelo método de Lane-Eynon.

**A. Material utilizado:**

- Erlenmeyer de 250 ml
- Proveta de 100 mL
- Pipeta graduadas de 2 mL
- Pipeta volumétrica de 5 e 10 mL
- pHmetro
- Funil
- Papel de filtro
- Bureta de 50 mL

**B. Reagentes:**

- Hidróxido de sódio a 40%
- Ácido clorídrico concentrado
- Solução de Acetato ou sulfato de zinco a 30%
- Solução de Ferrocianeto de potássio a 15%
- Azul de metileno a 1%
- Solução de Fehling A e B

**C. Procedimento:**

Pesar 10 g de amostra homogeneizada em erlenmeyer de 250 ml (Anotar o peso da amostra), adicionar 50mL de água destilada e dissolver a amostra. Acrescentar 10mL de ácido clorídrico concentrado (na capela) e deixe em autoclave a 120ºC por 20 minutos. Esfrie e neutralize com NaOH 40%, usando o pHmetro.
Transfira para um balão volumétrico de 250 ml, lavando o frasco em que foi feita a hidrólise.

Para amostra que tenham cor intensa, clarificar a amostra adicionando 2 ml solução acetato de zinco a 30%. Em seguida, retirar o excesso com 2 ml de ferrocianeto de potássio a 15% e filtrar.

Completar o volume a 250 ml com água destilada e agitar. Filtrar em papel de filtro seco para um frasco seco. Transferir o filtrado para uma bureta (50ml), pipetar 5 ml das soluções A e B de Fehling em um erlenmeyer de 250 ml, adicionar aproximadamente 20 ml de água destilada e aquecer até ebulição. Mantendo a ebulição, titular com a amostra até o aparecimento da coloração vermelho tijolo, usando azul de metileno 1% como indicador.

**D. Cálculo:**

$$\textbf{\% Amido} = \frac{(F \times C \times 100)}{(P \times V)} \times 0{,}9$$

F – fator do licor de Fehling (F/2 quando usar 5 ml)
C – capacidade volumétrica do balão utilizado (200 ml)
P – peso da amostra
V – volume gasto na titulação
0,90 – fator de transformação de glicose em amido. Quando a amostra contém açúcares, estes devem ser subtraídos, antes de multiplicar por 0,9.

**Referências:**

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos Para Análise de Alimentos**. 1 ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

## 3.7 DETERMINAÇÃO DE LACTOSE

**A. Material utilizado:**

- Balão volumétrico de 500 ml
- Erlenmeyer de 250 mL
- Proveta de 500 mL
- Pipeta graduadas de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Filtro
- Papel de filtro
- Bureta de 50 mL

**B. Reagentes:**

- Hidróxido de sódio 0,5N
- Sulfato de cobre 6,925%
- Solução alcoolica de azul de metileno a 1%
- Solução de Fehling A e B

**C. Procedimento:**

Transferir 25 mL da amostra (*) para um balão volumétrico de 500 ml. Adicionar 400 mL de água destilada, 8 mL de solução de hidróxido de sódio a 0,5N e 10 ml de solução de sulfato de cobre 6,925%. Agitar e completar o volume. Deixar sedimentar e filtrar. Colocar o filtrado em bureta de 50 mL.

Em um erlenmeyer de 250 ml, adicionar 5 ml de cada solução de Fehling (A e B), 20 ml de água destilada e aquecer até a ebulição. Titular com o filtrado até o aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, usando o azul de metileno 1% como indicador. Anote o volume gasto.

(*) Preparo da amostra para leite em pó – dissolva 10g de leite em pó em 50g de água destilada, ou seja, uma parte do leite para cinco partes de água (o fator de diluição é 6).

**D. Cálculo:**

$$\textbf{\% Glicidios Redutores em Lactose} = \frac{a \times 500 \times 100}{V \times L}$$

a – nº de gramas de lactose que corresponde a 100 ml da solução de Fehling (fator da solução de Fehling para lactose)
L – nº de ml da amostra
V – volume gasto na titulação

**Observação**: caso a amostra seja de leite em pó multiplique o resultado por 6 (fator de correção).

## 3.8 DETERMINAÇÃO DO VALOR CALÓRICO TOTAL

**PRINCÍPIO:** O valor energético fornecido pelos nutrientes dos alimentos, segundo o Sistema determinado pôr ATWATER, é:

- ➔ 1g de carboidratos fornece, em média, 4 calorias
- ➔ 1g de proteína fornece, em média, 4 calorias
- ➔ 1g de gordura fornece, em média, 9 calorias

O valor calórico calculado do alimento será a soma das calorias fornecidas por esses nutrientes. As vitaminas, os minerais e a água não fornecem calorias ao organismo, mas influenciam no aproveitamento dos outros três nutrientes. Comportam-se como reguladores das várias reações que ocorrem no organismo.

**A. <u>Cálculo</u>:**

$$\textbf{Valor Calórico Total}\left(\frac{\textbf{Kcal}}{\textbf{100g}}\right) = (E \times 4) + (C \times 4) + (D \times 9)$$

E – carboidratos
C – proteínas
D – lipídeos

**Referências:**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. In: **Diário Oficial da União**. Brasília: Diário Oficial da União, 2003.

# 4 ANÁLISES FÍSICAS

## 4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA

**PRINCÍPIO:** É a medida qualitativa que possibilita avaliar a disponibilidade de água livre, que é suscetível a diversas reações, ao passo que o teor de umidade é uma medida meramente quantitativa, medindo o percentual em peso, de toda a água presente no alimento, tanto livre, quanto ligada.

**A. Material utilizado:**

- Analisador da atividade de água - AQUALAB 4TEV
- Cápsulas (recipiente para leitura)
- Espátula

**B. Preparo da amostra:**

A amostra a ser analisada deve ser homogênea. Amostras sólidas devem ter seu tamanho reduzido a espessuras menores para facilitar a leitura pelo aparelho.

Amostras com muitos componentes (exemplo, muffins com passas) ou com revestimentos (exemplo, frituras e empanados) podem ser medidos, mas necessitam de um longo tempo para que ocorra o equilíbrio. Essas amostras podem requerer um preparo adicional como moagem para obtenção de amostra representativa.

Amostras congeladas devem ser descongeladas para que se faça a leitura.

**C. Procedimento:**

A análise é realizada em um equipamento especifico para atividade de água, que antes de iniciar a análise deve estar calibrado.

Ao ligar o analisador de atividade de água, esperar o equipamento estabilizar. Em seguida, colocar a cápsula para leitura, contendo sílica ou água destilada, e esperar estabilizar até calibrar o equipamento. Posteriormente, colocar uma quantidade de amostra até a marca indicada na cápsula (metade da capacidade da cápsula), que deve está limpa e seca.

O resultado da análise aparecerá no visor do equipamento.

**Referências**:

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. São Paulo. 2003.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, método 978.18, Washington, 2000.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DO pH

**PRINCÍPIO:** Técnica usada para determinação do pH nos alimentos, ou seja, medida inversamente proporcional à atividade dos íons hidrogênio, que são os $H^+$ efetivamente dissociados.

**A. Material utilizado:**

- pHmetro
- Béqueres de 50 mL e 150 mL
- Proveta de 100 mL
- Espátula
- Balança analítica

**B. Reagentes:**

- Soluções – tampão pH 4 e pH 7

**C. Preparo da amostra:**

O preparo da amostra para a determinação do pH é diferente segundo a matéria-prima a ser analisada:

- A leitura deve ser direta em produtos líquidos como xaropes, sucos, vinhos e bebidas em geral que são claros e não contêm gás.

- Bebidas com gás carbônico, como refrigerante, devem ser submetidas à agitação mecânica ou a vácuo antes de se tomar à medida de pH, pois o $CO_2$ pode formar ácido carbônico e abaixar o pH.

- Bebidas com polpa em suspensão devem ser agitadas para misturar a polpa decantada e medir o pH imediatamente, antes de a polpa se separar novamente, ou utilizar um agitador magnético para conseguir um resultado homogêneo, já que a polpa e o líquido podem ter pHs diferentes.

- Em bebidas alcoólicas, deve-se tomar cuidado com a uniformidade do álcool no produto.

- Em leite, o pH pode variar entre 6,6 – 6,8 com média de 6,7 a 20°C ou 6,6 a 25°C . Leites provenientes de animais com infecções no úbere (mamite), apresentam o pH alcalino, podendo atingir pH 7,5.

- Em produtos sólidos e secos, como farinhas, pão, macarrão e biscoitos, é necessário preparar um extrato com suspensão em água e medir o pH do líquido sobrenadante após a decantação.

- Produtos sólidos e muito úmidos, como queijo fresco, devem ser macerados e homogeneizados, e os eletrodos são enfiados dentro da massa da amostra em pelo menos três lugares diferentes para se tirar uma medida média do pH.

**D. <u>Procedimento</u>:**

Ligar o pHmetro e esperar estabilizar. Calibrar o aparelho, colocando o eletrodo nos tampões 7 (solução padrão básica) e 4 (solução padrão ácida). Usar água destilada para lavar o eletrodo, após a calibração e antes de fazer qualquer medida. Secar com papel absorvente macio.

Pesar 5 g da amostra em um béquer e dilua com auxílio de 50 mL de água. Agite o conteúdo até que as partículas, caso haja, fiquem uniformemente suspensas. Determinar o pH da amostra fazendo a leitura com precisão até 0,01 unidades de pH.

**Referências**:

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 27.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos Para Análise de Alimentos**. 1 ed. Online. São Paulo: IAL, 2008.

## 4.3 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ

**PRINCÍPIO:** Determinar o estado de conservação de um produto alimentício, uma vez que 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 do produto e, em certos casos, os ácidos graxos obtidos dos lipídios. Pode ser expressa em mL de solução molar por cento ou em gramas do componente ácido principal.

**A. Material utilizado:**

- Balança analítica
- Erlenmeyer de 125 mL
- Proveta de 50 mL
- Espátula
- Pipetas volumétricas de 1 e 10 mL
- Bureta de 50 mL

**B. Reagentes:**

- Solução de NaOH 0,1N ou **0,01N** (diluir 10 mL de solução 0,1 N para 100 mL de água destilada)
- Solução de fenolftaleína a 1% (indicador)

**C. Preparo da amostra:**

- Em produtos sólidos e secos, como farinhas, pão, macarrão e biscoitos, é necessário preparar um extrato com suspensão em água e filtrar para posterior análise.

- No caso de amostras coloridas ou turvas, para a determinação do ponto de viragem, utilizar método potenciométrico.

- No caso de amostras líquidas, transfira, com auxílio de uma pipeta, 1ml da amostra para o erlenmeyer de 125ml, continuando o procedimento descrito abaixo.

**D. Procedimento:**

Pesar de 5 g da amostra ou pipetar de 1 a 10 mL da amostra, transferir para um erlenmeyer de 125 mL, com o auxílio de 50 mL de água. Adicione de 2 a 4 gotas da solução fenolftaleína e titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 N, até coloração rósea.

**E. Cálculo:**

$$\textbf{Acidez em solução normal (\%)} = \frac{(V \times f \times 100)}{C \times P}$$

V - ml da solução de NaOH 0,1N ou 0,01N gasto na titulação

f - fator da solução de NaOH 0,1N ou 0,01N

P – peso em gramas da amostra

C – correção para solução de NaOH 1 M: 10 para solução NaOH 0,1 M e 100 para solução NaOH 0,01 M.

**Referências**:

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25-26.

## 4.4 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA

**PRINCÍPIO:** Técnica usada para determinar a quantidade de água perdida por meio de aplicação de força externa, como corte, aquecimento, trituração ou prensagem da amostra. Procedimento imprescindível para atestar a qualidade de amostras, em especial, as de origem animal.

**A. Material utilizado:**

- Estufa a 105°C
- Balança analítica
- Placas Flexiglass (placas de acrílico)
- Papel de filtro (Whatman)
- Espátula

**B. Procedimento:**

Em balança analítica, pesar 2 unidades de papel filtro, previamente secos em estufa a 105°C e anotar o peso. Pesar sobre um deles, cerca de 5 g da amostra. Anotar o peso e colocar o outro papel de filtro, por cima da amostra. O conjunto deve ser colocado entre duas placas Flexiglass e, em seguida, sob um peso de 5 kg, por 5 minutos.

Retirar a amostra e pesar novamente os papéis de filtro. Pela diferença de peso inicial (PI) e peso final (PF), em ralação ao peso da amostra, é possível obter a capacidade de retenção de água da amostra.

**C. Cálculo:**

$$\% \text{ CRA} = \frac{100 - (PF - PI)}{S \times 100}$$

PI – peso inicial dos papéis de filtro
PF – peso inicial dos papéis de filtro
S – peso em gramas da amostra

**Referências**:

ALFRANCA, I. S.; **Aportación al estudio del cruce Blanco Belga x Landrace: Caracteres productivos, calidad de la canal y de la carne**. Instituto de Economía y Producciones Ganaderas del Ebro, 1973.