



Universidade Federal do Rio de Janeiro
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



QUÍMICA DE ALIMENTOS

(IQB351)

CADERNO DE PROTOCOLOS DE AULAS PRÁTICAS



Fonte: Institute of Food Technologists (Chicago, IL)

Elaboração dos roteiros de práticas:

- Professores (DBq-IQ/ UFRJ):

Alexandre Guedes Torres
Carmen Marino Donangelo
Daniel Perrone Moreira
Luiz Carlos Trugo
Nádia Maria Frizzo Trugo

- Alunos de Pós-Graduação (IQ/ UFRJ):

Giselle da Silva Duarte (prática de Estabilidade e lixiviação de ácido ascórbico)
Juliana Côrtes Nunes (prática de Fitatos)
Nívea Dias da Fonseca (prática de Estabilidade e lixiviação de ácido ascórbico)
Vanessa Naciuk Castelo Branco (práticas de Oxidação de óleos)
André Mesquita Magalhães Costa (prática de fibra bruta)

Organização:

Prof. Alexandre Guedes Torres; Carlos Augusto de Lima Oliveira (Técnico Administrativo; Depto. de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ).

Este Caderno de Protocolos de Química de Alimentos é resultado do trabalho de diversos professores do Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos (LBNA), com a colaboração de alunos de pós-graduação, que se dedicaram a ministrar aulas nessa disciplina, desde sua criação. A disciplina foi criada no Departamento de Bioquímica, em 1989, pelo professor Luiz Carlos Trugo, juntamente com as professoras Carmen Marino Donangelo e Nádia Maria Frizzo Trugo. Esses professores elaboraram a maior parte dos protocolos de prática incluídos neste caderno, que ao longo dos anos sofreram algumas adaptações. O Prof. L.C. Trugo veio a falecer em 2004 e as professoras C.M. Donangelo e N.M.F. Trugo aposentaram-se, mas esperamos que esse documento colabore para que suas contribuições para o ensino da química dos alimentos perdurem. A partir de 2006 o Prof. Alexandre Guedes Torres assumiu a responsabilidade pela disciplina de Química de Alimentos e suas aulas práticas. Desde então, a organização dos protocolos foi harmonizada, por inspiração na Apostila de Práticas em Bioquímica do nosso Departamento, e novas práticas foram introduzidas no programa da disciplina. Atualmente, a parte prática da disciplina está sob responsabilidade do Prof. Daniel Perrone, que contribuiu com novos roteiros de práticas. Nessa trajetória, contamos com a participação de alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos na elaboração de protocolos de práticas. A versão atual desses roteiros reflete uma evolução contínua de mais de vinte anos. Espera-se que esse documento contribua para a formação de futuros Químicos, Engenheiros de Alimentos, Engenheiros Químicos, entre outros, com uma sólida visão de princípios básicos do laboratório de química de alimentos.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Química
Departamento de Bioquímica

Química de Alimentos - (IQB351)
Caderno de Protocolos de Aulas Práticas

Sumário

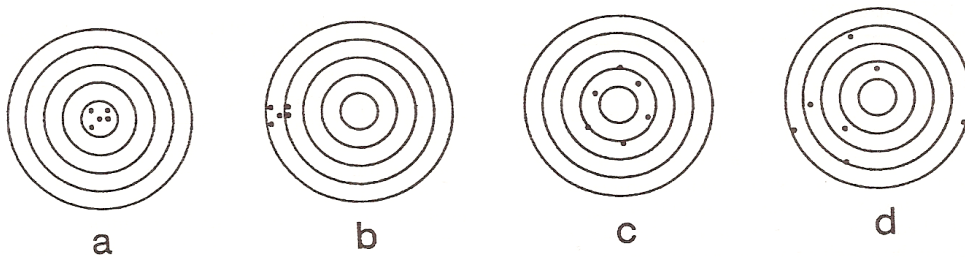
	Pág.
Introdução à Análise de Alimentos	5
Umidade (Resíduo Seco) de Alimentos	10
Lipídeos (Extrato Etéreo) de Alimentos	12
Cinzas (Resíduo Mineral Fixo) de Alimentos	14
Proteína (Nitrogênio Total) de Alimentos	16
Glicídios Totais (Método de Dubois)	20
Fibra Bruta de Alimentos	24
Açúcares em Xaropes por CLAE	28
Metilxantinas em Bebidas por CLAE	30
Ferro em Grãos	34
Ácido Ascórbico: estabilidade química e lixiviação em sucos de frutas e hortaliças	38
Ácido Fítico em Grãos	42
Pigmentos de Carnes Frescas e Curadas	48
Pigmentos Vegetais por Cromatografia em Papel	54
Corantes Orgânicos Artificiais – Prova Qualitativa	60
Corantes Orgânicos Artificiais – Prova Quantitativa	64
Nitritos em Alimentos (Método de Griess)	68
Índice de Peróxido de Óleos (Titulação Iodométrica)	72
Índice de <i>p</i> -Anisidina (<i>Ip</i> -A) de Óleos	76
Índice do Ácido Tiobarbitúrico de Óleos	80
Lactose em Leite e Derivados (Método do Ácido Pícrico)	84

INTRODUÇÃO À ANÁLISE DE ALIMENTOS

Finalidades da análise de alimentos:

- Contribuir para bases de dados de composição de alimentos: possibilitam estudos de nutrição e epidemiologia nutricional e o planejamento de políticas públicas de alimentação e nutrição. Rotulagem nutricional de alimentos industrializados (nutrientes e energia – CHO, 4 kcal/g; PTN, 4 kcal/g; LIP, 9 kcal/g).
- Controle de qualidade na indústria de alimentos.
- Vigilância sanitária, segurança e qualidade de alimentos.

Precisão e Exatidão na análise de componentes de alimentos:



- Precisão: intra-ensaio (repetibilidade); inter-ensaio (intermediária); inter-laboratorial, instrumentos e analistas diferentes, etc (reprodutibilidade e robustez) – expressa como desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV%).
- Exatidão: recuperação de padrão, análise de amostras certificadas, ensaios inter-laboratoriais – expressa como Erro relativo.

Obs: importância de uso de medidas de centralidade (média aritmética) e de dispersão (DP e CV%) dos dados.

Fontes de erro em análises químicas:

1. Erro sistemático:

- Resultados anormais, sempre no mesmo sentido: método sobrestima ou subestima sistematicamente os resultados.
- É de difícil identificação, especialmente quando as diferenças são inferiores a 30%. Especialmente nestes casos é necessária avaliação da exatidão para confirmação dos resultados.
- Normalmente o erro sistemático é causado por instrumento analítico ou de medição (qualquer!) descalibrado. Pode também ser causado por má aplicação do método (sistematicamente).

2. Erro aleatório:

- Sempre presente. Virtualmente inevitável.
- Resultante de limitações humanas naturais do processo de medição e do ruído dos instrumentos de medição. Deve ser mantido em baixos níveis; normalmente $CV \leq 5\%$.

Identificação de resultados discrepantes (aberrantes):

- Na curva de calibração: descartar valores fora do intervalo de confiança de 95% da curva de regressão.
- Nas amostras:
A) Abordagem estatística (teste-Q) - $Q = (x_2 - x_1) / W$

Onde, x_1 é o valor questionável; x_2 é o valor mais próximo de x_1 ; W é o espalhamento total dos valores ($x_{\text{máx}} - x_{\text{min}}$).

Resultados com valores de Q maiores do que os esperados (consultar tabela) devem ser descartados.

Número de observações ou resultados experimentais	Valor de Q para rejeição (nível de confiança de 90%)
3	0,94
4	0,76
5	0,64
6	0,56
7	0,51
8	0,47
9	0,44
10	0,41

- B) Abordagem empírica: descartar resultados individuais com diferenças maiores do que $\pm 10\%$ da mediana dos valores.

Abordagens sistemáticas para a análise de alimentos:

1. Amostragem: deseja-se que a amostra seja representativa e homogênea. Número e quantidade (massa ou volume) das amostras dependem da dimensão do universo amostral e da finalidade da análise.
 - Não-probabilística: arbitrária, por conveniência.
 - Probabilística: aleatória, sistemática, de compósitas, entre outras.
2. Preparo das amostras (para torná-las passíveis de análise):
 - Extração: líquido:líquido, líquido:sólido (SPE), gás-sólido (SPME); Concentração: evaporação acelerada (evaporador rotativo, jato de N₂), sublimação (liofilização);
 - Isolamento: filtração, clarificação, separação prévia (cromatografia, centrifugação, destilação);
 - Entre outros...

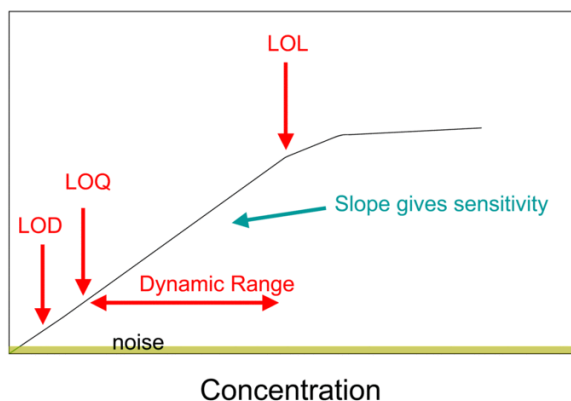
Obs: O preparo das amostras normalmente é complexo e constitui a principal fonte de erro (variabilidade) analítico nas análises.

3. Sensibilidade e Limites:

- Sensibilidade: magnitude de variação da resposta em função da variação na quantidade do analito. Relacionada com o instrumento de detecção. Limite de detecção: menor quantidade ou concentração do analito passível de detecção nas condições de análise. Em geral considerado como sinal que corresponde a 3 vezes o nível de ruído. Sinal inferior ao LD é duvidoso (sinal ou ruído?).
- Limite de quantificação: menor quantidade ou concentração do analito passível de quantificação nas condições de análise. Considerado como sinal que corresponde a 10 vezes o nível de ruído ou à quantidade mínima de analito cuja análise apresenta coeficiente de variação (CV%) intra-ensaio aceitável (em geral $\leq 15\%$). Sinal inferior ao LQ → quantificação imprecisa.

4. Calibração e linearidade:

- Calibração da resposta por análise de regressão; normalmente regressão linear. Qualidade da regressão: coeficiente de correlação (r) ou coeficiente de determinação (R^2). Observar distribuição dos resíduos e intervalo de confiança da curva. A curva de calibração deve apresentar faixa de linearidade que considere toda a amplitude de concentrações do analito na amostra $\pm 20\%$.



Legenda

LOD: Limite de detecção

LOQ: Limite de quantificação

LOL: Limite de linearidade

'Método apropriado' de análise depende da finalidade da análise:

- Controle de qualidade na indústria: análises de rotina (baixo custo, rapidez);
- Fiscalização e rotulagem: alta precisão (robustez) e exatidão. Necessidade de certificação de laboratórios.
- Pesquisa: características do método dependem do resultado desejado → Uso de diferentes métodos → Dificuldade de universalização e comparação de resultados.

Cuidados na interpretação de resultados de análises de alimentos:

A) Para alimentos com composição química conhecida:

- Comparação com dados publicados: tabelas de composição de alimentos, artigos e livros publicados e indexados.

E no caso de diferenças entre dados publicados e os resultados experimentais?

- É possível afirmar que existe diferença significativa ou verdadeira?
- Existe critério que possibilita supor que haja diferenças aparentes?
- É possível afirmar que o método não é válido, ou apresenta baixa exatidão?

B) Para alimentos com composição química desconhecida ou ainda não descrita:

- Ensaio inter-laboratoriais, análises de amostras certificadas de composição química ou origem similar e recuperação de padrão para determinar a exatidão.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE (RESÍDUO SECO) DE ALIMENTOS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Amostra (previamente moída)
- Pesa-filtro de alumínio
- Balança analítica
- Estufa regulada a 105°C
- Dessecador com sílica
- Pinça

II- PROCEDIMENTO

1. Anotar a tara de 2 pesa-filtros previamente aquecidos a 105°C por 1 hora em estufa e resfriados em dessecador com vácuo;
2. Pesar 2g da amostra moída no pesa-filtro, em duplicata;
3. Aquecer as amostras a 105°C por 6 horas, com os pesa-filtros abertos.
4. Resfriar as amostras em dessecador com vácuo e pesá-las.
5. Aquecer novamente por 1 hora a 105°C, resfriar em dessecador com vácuo e pesar novamente, para verificar se o peso ficou constante. Caso necessário, repetir esta operação até obter peso constante.

III- RESULTADOS

Amostra: _____

Identificação do pesa-filtro	Tara do pesa-filtro ()	Massa da amostra ()	Massa do resíduo seco + pesa-filtro ()

IV- CÁLCULOS

Calcular o teor de umidade (g%, p/p) baseado na diferença de pesagens do pesa-filtro contendo a amostra antes e depois do aquecimento. A umidade corresponde à massa “perdida” por evaporação.

V- REFERÊNCIAS

1. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4ª ed., 2005.
2. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 14th ed. 1984, p 249.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDEOS (EXTRATO ETÉREO) DE ALIMENTOS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Amostra (previamente moída)
- Balão de fundo chato e boca esmerilhada (250 mL)
- Cartucho de celulose para extração
- Aparelho extrator de Soxhlet com condensador
- Éter de petróleo
- Funil de vidro
- Balança analítica
- Banho a 100°C ou placa de aquecimento
- Dessecador com sílica
- Pinça e papel toalha ou higiênico

II- PROCEDIMENTO

1. Anotar a tara do balão previamente aquecido (105°C/ 1hora) e resfriado em dessecador com vácuo. Obs: manusear o balão e o cartucho com pinça ou papel.
2. Pesar 5g da amostra no cartucho de extração e tampá-lo com algodão.
3. Colocar o cartucho contendo a amostra no extrator de Soxhlet.
4. Transferir cerca de 150 mL de éter de petróleo para o balão e montar o aparelho extrator no banho-maria, acoplado ao balão e ao condensador.
5. Ligar a água para resfriamento do condensador e o banho-maria (90-100°C).
6. Efetuar a extração por 6 horas.
7. Evaporar todo o solvente contido no balão, em banho-maria.
8. Secar completamente o extrato em estufa (105°C/ 1hora), resfriar em dessecador com vácuo e pesar os balões.

III- RESULTADOS

Amostra: _____

Identificação do balão	Tara do balão ()	Massa da amostra ()	Massa do extrato etéreo + balão ()

IV- CÁLCULOS

Calcular o teor de lipídeos (g%, p/p). A massa de lipídios da amostra corresponde à diferença entre a massa do balão contendo o extrato etéreo e a do balão vazio.

V- REFERÊNCIAS

1. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4ª ed., 2005.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS (RESÍDUO MINERAL FIXO) DE ALIMENTOS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Amostra (previamente moída)
- Cadinho de porcelana
- Balança analítica
- Mufla a 550°C
- Dessecador com sílica
- Pinça

II- PROCEDIMENTO

1. Anotar a tara de 2 cadinhos de porcelana, previamente aquecidos a (550°C/ 1 hora) e resfriados em dessecador com vácuo.
2. Pesar 1g da amostra moída no cadinho, em duplicata.
3. Carbonizar a amostra lentamente em chapa de aquecimento ou em bico de Bunsen sobre tela de amianto.
4. Mineralizar as amostras em mufla (550°C/ 6 horas); em seguida, resfriá-las em dessecador com vácuo e pesar.
5. Aquecer novamente por 1 hora a 550°C, resfriar em dessecador com vácuo e pesar novamente, para verificar se o peso ficou constante. Caso necessário, repetir esta operação até obter peso constante.

III- RESULTADOS

Amostra: _____

Identificação do cadinho	Tara do cadinho ()	Massa da amostra ()	Massa do resíduo mineral + cadinho ()

IV- CÁLCULOS

Calcular o teor de cinzas (g%, p/p). A massa de cinzas da amostra corresponde à diferença entre a massa do cadinho contendo o resíduo mineral e a do cadinho vazio.

OBS.: Reservar as cinzas em dessecador para posterior determinação de minerais específicos (aula prática de Determinação do teor de Ferro).

V- REFERÊNCIAS

1. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4^a ed., 2005.
2. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 14th ed., 1984, p 249.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA (NITROGÊNIO TOTAL) DE ALIMENTOS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTO

- Amostra moída
- Tubos de Kjeldahl
- Destilador de Amônia
- Bloco digestor
- Pipetas, espátula, pinças, becher, pérolas de vidro

II- REAGENTES E SOLUÇÕES

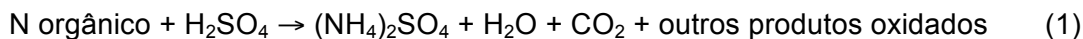
- Ác. sulfúrico concentrado
- Solução de ácido bórico 2% (p/v)
- Solução de hidróxido de sódio 60% (p/v)
- Solução padrão de ác. clorídrico (0,04 __N)
- Mistura catalizadora (1,5 g de K_2SO_4 / 0,0018 g de Se por ½ tablete)
- Mistura de indicadores: soluções alcoólicas de vermelho de metila 0,1% (p/v; A) e verde de bromocresol 0,1% (p/v; B). Preparar 10 mL de A e 25 mL de B (em etanol 95%) em separado e misturá-las. Armazenar a mistura de indicadores ao abrigo da luz.

III- PROCEDIMENTO

1) DIGESTÃO

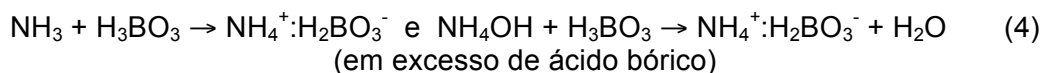
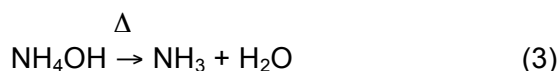
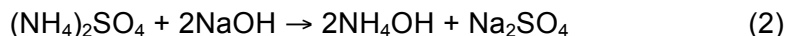
- Pesar cerca de 0,2g de amostra direto no tubo de vidro, com a ajuda de um bastão de vidro fino e comprido adaptado ou de uma espátula longa, sem deixar cair amostra nas paredes internas do tubo. Adicionar o catalizador (1/2 tablete) + 5mL de H_2SO_4 concentrado. Colocar no digestor a $370^\circ C$ até ficar incolor (+ 1 hora). Deixar resfriar.

OBS.: Fazer um branco em paralelo sem amostra.



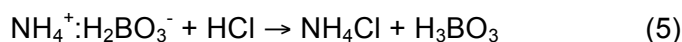
2) DESTILAÇÃO

- Aquecer as amostras digeridas no bloco digestor a $120^\circ C$ por alguns minutos. Adicionar 10mL de água destilada à amostra digerida e agitar em vórtex logo em seguida. Adaptar um frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 60 mL da solução de ácido bórico à saída do destilador e o tubo de amostra ao aparato. Adicionar, através do recipiente de soda do destilador, 17mL de NaOH 60%. Adicionar cerca de 2 mL de água destilada para lavagem. Ligar o aquecimento da caldeira e destilar até duplicar o volume no erlenmeyer. Retirar o erlenmeyer, lavando o tubo que ficou nele mergulhado com água destilada. Desligar a caldeira.



3) TITULAÇÃO

Adicionar 3 gotas da mistura de indicadores e titular com solução de HCl 0,04 N
 A coloração muda de verde para incolor e com excesso de ácido fica rosa.



IV- RESULTADOS

Amostra: _____

Identificação do tubo	Massa da amostra ()	Volume de HCl 0,04 N ()

V- CÁLCULOS

Calcular a quantidade de N (g%, p/p) na amostra e depois converter para proteína (g%, p/p), usando o fator adequado para o tipo de alimento (tabela abaixo).

Identificação do tubo	Nº Eq de HCl	Nº Eq de N	Nº de g de N em _____ g de Am	Teor de N na Am (g/100g)	Teor de Ptn na Am (g/100g)

Alimento	Fator de conversão N → Proteína
Leite e derivados	6,38
Arroz	5,95
Soja	6,25
Farinha de Trigo	5,83
Macarrão	5,70
Trigo	5,70
Outros grãos	6,25

VI- REFERÊNCIAS

1. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4ª ed., 2005.
2. Pearson, P. The Chemical Analysis of Foods, 7th ed. Churchill Livingstone. 1976, p 9-11.

DETERMINAÇÃO DE GLICÍDIOS TOTAIS EM CEREAIS E LEGUMINOSAS

Método do Fenol-Sulfúrico ou de Dubois

I- MATERIAL E EQUIPAMENTO

- Erlenmeyers de 125mL
- Balões volumétricos de 250mL
- Funis e papel de filtro
- Tubos de ensaio de vidro pirex (16 a 20mm d.i.)
- Pipetas graduadas de 1, 2 e 5 mL
- Espectrofotômetro
- Banho de gelo
- Luvas de proteção
- Dispensador
- Agitador de tubos (vórtex)

II- REAGENTES E SOLUÇÕES

- Ácido sulfúrico concentrado (96%, p/p)
- Ácido sulfúrico 74% (p/p)
- Soluções de Carrez: Carrez 1, ferrocianeto de potássio ($K_4Fe(CN)_6$; 15%, p/v);
- Carrez 2, sulfato de zinco, (30%, p/v)
- Solução de fenol 5% (v/v)
- Solução padrão estoque de glicose em água bi-destilada: 0,10 mg/mL.

III- PROCEDIMENTO

A. Hidrólise de Polissacarídeos (amido, quantitativa; pectinas e hemiceluloses, parcial)

1. Pesar 0,05g de amostra em pedaço de papel alumínio e transferi-la para erlenmeyer de 125 mL.
2. Adicionar 2,0mL de água destilada, lavando eventuais resíduos de amostra do papel alumínio; umedecer bem a amostra.
3. Adicionar, aos poucos e em banho de gelo, 20,0 mL de H_2SO_4 74%.
4. Cobrir os erlenmeyers com papel alumínio e proceder com a hidrólise, em banho de água (50°C/ 30 minutos) com agitação constante ou regular. Resfriar em água.
5. Transferir a amostra quantitativamente para balão volumétrico de 250mL, lavando o erlenmeyer 4 vezes com 10-20mL de água destilada.
6. Acrescentar 1,0 mL de cada uma das soluções de Carrez. Deixar descansar por 10 minutos.
7. Completar o volume, homogeneizar bem e filtrar através de dois papéis de filtro, desprezando as primeiras porções (5-10mL). Utilizar o filtrado para determinação colorimétrica de glicídios.

B. Determinação Colorimétrica

Curva Padrão

1. Adicionar a uma série de tubos: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0mL de solução estoque de glicose.
2. Completar o volume até 1,0mL com água e homogeneizar em vórtex. No branco, adicionar 1,0mL de água.
3. Adicionar 1,0mL da solução de fenol 5% e homogeneizar em vórtex imediatamente após cada adição.

- Adicionar 5,0mL de H₂SO₄ concentrado, em jato (Dispensador). Em até 20s após a adição de H₂SO₄, agitar os tubos em vórtex, padronizando o tempo de agitação (contar até 10).
- Resfriar por 10min em temperatura ambiente e por mais 10 min em banho de água.
- Ler a Absorbância ($\lambda = 490\text{nm}$).

Tubo	V sol. padrão Gli ()	V H ₂ O d ()	[Gli] (/)	Abs ()	K (/)
B	—				
P1					
P2					
P3					
P4					
P5					

Amostras

- Utilizar, em duplicata, 0,5mL do filtrado obtido em A, ou se necessário um volume menor, e completar o volume a 1,0mL com água. Proceder como para os passos 3 a 6 da curva padrão.

IV- RESULTADOS

Amostra: _____

Identificação do tubo	Abs ()	[Gli] _{TUBO} (/)	[Gli] _{Am dil} (/)	nº mg CHO na amostra	CHO _{Am} (g/100g; em glicose)

V- CÁLCULOS

Calcular o teor de glicídios totais da amostra (g/ 100g) expresso em glicose.

VI- REFERÊNCIAS

- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem* **28**: 350-356, 1956.
- Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4ª ed., 2005.

DETERMINAÇÃO DE FIBRA BRUTA EM CEREAIS E LEGUMINOSAS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTO

- Cadinhos com fundo de vidro sinterizado
- Unidade filtrante
- Placa de aquecimento

II- REAGENTES E SOLUÇÕES

- Ácido sulfúrico 1,25%, p/v
- Hidróxido de potássio 1,25%, p/v
- *n*-Octanol
- Acetona

III- PROCEDIMENTO

A. Pré-preparo da amostra

1. Para a realização da análise de fibra bruta, a amostra deve ser previamente moída, desengordurada (extração com éter de petróleo em Soxhlet) e seca (estufa a 105 °C)

B. Preparo dos cadinhos

1. Adicionar aproximadamente 0,5 g de areia de diatomácea em cada cadinho. Deixar em estufa a 130 °C por 3 horas, esfriar em dessecador e anotar o peso dos cadinhos com areia.

C. Análise

1. Pesar aproximadamente 1,0 g de amostra no cadinho.
2. Acoplar o cadinho na unidade filtrante.
3. Pré-aquecer a solução de ácido sulfúrico e adicionar 150 mL na unidade filtrante. O pré-aquecimento da solução reduz o tempo necessário para a ebulição da mesma no interior da unidade filtrante.
4. Adicionar de 3 a 4 gotas de *n*-octanol na unidade filtrante para evitar a formação de espuma.
5. Ligar o aquecimento e manter a solução de ácido sulfúrico sob ebulição por 30 minutos.
6. Ligar o vácuo e drenar a solução de ácido sulfúrico.
7. Lavar 3 vezes com 30 mL de água deionizada aquecida, ligar e desligar a pressão para misturar o conteúdo do cadinho.
8. Adicionar 150 mL de hidróxido de potássio pré-aquecido e 3 a 4 gotas de *n*-octanol.
9. Ligar o aquecimento e manter a solução de hidróxido de potássio sob ebulição por 30 minutos.
10. Repetir a etapa de lavagem descrita no item 7.
11. Adicionar 150 mL de água deionizada fria e esperar 10 min até que o sistema esfrie.
12. Lavar com 30 mL de água deionizada fria e, em seguida, 3 vezes com 25 mL de acetona, ligando e desligando a pressão para misturar o conteúdo do cadinho;
13. Retirar os cadinhos da unidade filtrante e determinar o peso seco após secagem em estufa a 105 °C durante 1 hora ou até peso constante.
14. Após a secagem, transferir o conteúdo dos cadinhos de vidro para cadinhos de porcelana e determinar o conteúdo de fibras após calcinação em mufla a 550 °C durante 3 horas.

IV- RESULTADOS

Amostra: _____

Identificação do cadinho	Massa amostra ()	Massa cadinho + areia ()	Massa cadinho + resíduo ()	Teor de cinzas ()	Teor de fibra bruta (g/ 100g)

V- CÁLCULOS

Calcular o teor de fibra bruta da amostra (g/ 100g).

VI- REFERÊNCIAS

1. AOAC (1990) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15ª edição. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.

ANÁLISE DE AÇÚCARES EM MEL E MELADO DE CANA POR CLAE

Método: Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), isocrática

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Acetonitrila
- Água ultra-pura (Milliq ou similar)
- Frutose, glicose, sacarose e maltose
- Mel, xarope de malte, xarope de glicose e melado de cana
- Cromatógrafo líquido Knauer
- Detector de índice de refração diferencial Waters 410
- Registrador de sinal Knauer
- Coluna Zorbax-NH₂ aminopropil-silica, 5µm (250 × 4.6 mm d.i.)

II- SOLUÇÕES

- Fase móvel: acetonitrila:água, 80:20 (v/v)
- Soluções de padrões de açúcares (mistura): 5,0 mg de cada padrão em 1,0 mL de acetonitrila:água (1:1, v/v).
- Soluções das amostras: 10 mg/mL em acetonitrila:água (1:1, v/v)

Obs: Os padrões e amostras devem ser dissolvidos completamente em água Milliq e em seguida adicionados de igual volume de acetonitrila, para obtenção da concentração final desejada.

III- PROCEDIMENTO

1. Preparar a mistura de solventes usada como fase móvel e degaseificá-la com vácuo.
2. Ligar o sistema e deixá-lo equilibrando até estabilizar a linha de base. Ajustar o fluxo do solvente em 1,0 mL/min.
3. Injetar 20µL das soluções dos padrões e das amostras, através de válvula Rheodyne. Caso necessário, ajustar a sensibilidade do detector após a injeção do padrão.
4. Identificar os açúcares presentes no mel, a partir da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com os tempos de retenção dos picos de padrões.
5. Analisar e interpretar a retenção dos açúcares com base em sua estrutura química.
6. Medir as alturas dos picos cromatográficos, entre a base e a altura máxima, com paquímetro ou régua.
7. Quantificar os açúcares das amostras, a partir da comparação entre as alturas dos picos cromatográficos dos padrões e das amostras (por associação direta).

IV- RESULTADOS E CÁLCULOS

PADRÕES: t _R Gli(min)=		t _R Fru(min)=		t _R Sac(min)=		t _R Mal(min)=			
Amostra	t _R 1 (min)	Id. 1	[1] (mg/mL)	t _R 2 (min)	Id. 2	[2] (mg/mL)	t _R 3 (min)	Id. 3	[3] (mg/mL)

Calcular o teor de açúcares (g/100g) individuais e totais, nas amostras.

VI- REFERÊNCIA

Macrae, R. HPLC in Food Analysis, Academic Press, Londres, 1982.

ANÁLISE DE METILXANTINAS EM BEBIDAS

Método: Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), isocrática

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Metanol;
- Água ultra-pura (Milli-Q ou similar);
- Padrões de cafeína, teofilina e teobromina;
- Café, chá verde, chá preto, mate verde, mate tostado, cacau, Coca-cola, Guaraná, bebida energética;
- Soluções de Carrez 1 (acetato de zinco e ácido acético glacial) e Carrez 2 (hexacianoferrato (II) de potássio);
- Cromatógrafo líquido Knauer;
- Detector de ultravioleta Shimadzu (operado em $\lambda = 272 \text{ nm}$);
- Integrador HP;
- Coluna Kromasil-C18, $5\mu\text{m}$ ($150 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$).

II- SOLUÇÕES

- Fase móvel: metanol:água, 40:60 (v/v)
- Soluções de padrões de metilxantinas (mistura): $10,0 \mu\text{g}$ de cada padrão em $1,0 \text{ mL}$ de água.
- Soluções das amostras: 10 mg/mL em acetonitrila:água (1:1, v/v)

III- PROCEDIMENTO

1. Preparar a mistura de solventes usada como fase móvel e degaseificá-la com ultrassom.
2. Ligar o sistema e deixá-lo equilibrando até estabilizar a linha de base. Ajustar o fluxo do solvente em $1,0 \text{ mL/min}$.
3. Preparar as bebidas:
 - a. Café: Preparar a bebida de café a 10% (20g do pó para 200mL de água destilada a aproximadamente 90°C). Adicionar em balão volumétrico de 50mL : 1 mL da bebida de café; 20mL de água Milli-Q e $500\mu\text{L}$ de cada solução de Carrez. Avolumar com água Milli-Q, agitar e deixar descansar por 10min . Filtrar em filtro de papel Whatman n°1 e injetar o filtrado.
 - b. Chás: Preparar a bebida conforme as indicações do fabricante (1 saquinho em 200 mL de água destilada fervente). Adicionar em balão volumétrico de 50mL : 1 mL da bebida; 20mL de água Milli-Q e $500\mu\text{L}$ de cada solução de Carrez. Avolumar com água Milli-Q, agitar e deixar descansar por 10min . Filtrar em filtro de papel Whatman n°1 e injetar o filtrado.
 - c. Mates: Preparar a bebida conforme as indicações do fabricante. Adicionar em balão volumétrico de 50mL : 1 mL da bebida; 20mL de água Milli-Q e $500\mu\text{L}$ de cada solução de Carrez. Avolumar com água Milli-Q, agitar e deixar descansar por 10min . Filtrar em filtro de papel Whatman n°1 e injetar o filtrado.
 - d. Cacau: Preparar a bebida de cacau em um Erlenmayer ($0,8\text{g}$ do pó para 100mL de água destilada a aproximadamente 90°C). Adicionar em balão volumétrico de 25mL : 5 mL da bebida e $250\mu\text{L}$ de cada solução de Carrez. Avolumar com água Milli-Q, agitar e deixar descansar por 10min . Filtrar em filtro de papel Whatman n°1 e injetar.
 - e. Refrigerantes e bebida energética: Adicionar em balão volumétrico de 25mL : 5mL do refrigerante sem gás e $250\mu\text{L}$ de cada solução de Carrez. Avolumar com água Milli-Q, agitar e deixar descansar por 10min . Filtrar em filtro de papel Whatman n°1 e injetar o filtrado.
4. Injetar $20\mu\text{L}$ das soluções dos padrões e das amostras, através de válvula Rheodyne.
5. Identificar as metilxantinas presentes nas bebidas, a partir da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com os tempos de retenção dos picos de padrões.
6. Analisar e interpretar a retenção das metilxantinas com base em sua estrutura química.

7. Quantificar as metilxantinas das amostras, a partir da comparação entre as áreas dos picos cromatográficos dos padrões e das amostras (por associação direta).

IV- RESULTADOS E CÁLCULOS

PADRÕES: t_R Cafeína(min)= t_R Teofilina(min)= t_R Teobromina(min)=									
Amostra	t_R1 (min)	Id. 1	[1] (μ g/mL)	t_R2 (min)	Id. 2	[2] (μ g/mL)	t_R3 (min)	Id. 3	[3] (μ g/mL)

Calcular o teor de metilxantinas (mg/100 mL) individuais e totais, nas bebidas. Avaliar consumo médio de metilxantinas pela população brasileira através dessas bebidas.

Dados de consumo médio das bebidas analisadas: café (90 mL/dia), chás (200 mL/dia), mates (400 mL/dia), cacau (200 mL/dia), refrigerantes (250 mL/dia).

VI- REFERÊNCIA

Macrae, R. HPLC in Food Analysis, Academic Press, Londres, 1982.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FERRO EM CEREAIS E LEGUMINOSAS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Balões volumétricos de 25mL
- Tubos de ensaio
- Vidros de relógio
- Funis e bastões de vidro
- Pipetas
- Espectrofotômetro (Vis; $\lambda = 520\text{nm}$)
- Pinça
- Pêra

II- REAGENTES E SOLUÇÕES

- Cinzas relativas a 1g de amostra
- Solução de HCl 6N
- Solução de ferro padrão (FeCl_3), $10\mu\text{g Fe/ mL}$
- Cloridrato de hidroxilamina, 10% (p/v)
- Acetato de sódio, 27,2% (p/v)
- 2,2'-bipiridina, 0,1% (p/v)

III- PROCEDIMENTO

A) Curva padrão

1. Pipetar alíquotas da solução padrão de ferro de 200; 400; 600; 800 e 1000 μL para tubos de ensaio. Fazer branco sem adição de solução padrão.
2. Adicionar 250 μL da solução de cloridrato de hidroxilamina e agitar.
3. Adicionar 2,0mL da solução de acetato de sódio e agitar.
4. Adicionar 400 μL da solução de 2,2'-bipiridina. Completar o volume a 5,0mL com água deionizada. Agitar e deixar repousar por 10min. Ler absorbância a 520nm contra o branco.

Tubo	V sol. padrão Fe ()	V H ₂ O d ()	n° $\mu\text{g Fe}_{\text{TUBO}}$	Abs ()	K (/)
B	—				
P1					
P2					
P3					
P4					
P5					

B) Amostras

1. Dissolução das cinzas: adicionar 2,5 mL de HCl 6N em cada cadinho e cobri-los com vidro de relógio. Aquecer sobre placa aquecedora (em baixo nível de temperatura) por 15 min, em capela. Resfriar.
2. Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 25mL, por filtração através de papel de filtro e lavagens com água deionizada. Completar o volume e homogeneizar.
3. Transferir 2,0mL da solução de cinzas da amostra para tubo de ensaio e proceder como para os passos 2 a 4 da curva padrão (A).

IV- RESULTADOS E CÁLCULOS

Calcular o teor de ferro da amostra expresso em mg/100g de amostra.

Amostra: _____

Identificação do tubo	Abs ()	n° $\mu\text{g Fe}_{\text{TUBO}}$	n° $\mu\text{g Fe}_{\text{CADINHO}}$	Fe_{Am} (mg/100g)

V- REFERÊNCIAS

1. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4^a ed., 2005.
2. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 14th ed., 1984, p 250.

ÁCIDO ASCÓRBICO: ESTABILIDADE QUÍMICA E LIXIVIAÇÃO EM SUCOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Gaze e papel de filtro;
- Funis;
- Pipeta volumétrica de 10mL;
- Tubos Falcon de 15mL;
- Proveta de 100mL;
- Frascos erlenmeyer de 125mL;
- Buretas de 25mL;
- Centrifuga;
- Banho-maria a 80°C;
- Agitador de tubos (vórtex);
- Mixer vertical com copo de medida

II- REAGENTES E SOLUÇÕES

- Ácido oxálico 0,4% (p/v)
- Solução padrão de ácido ascórbico (AA), 0,2 mg/mL em solução de ácido oxálico 0,4% (preparar na hora, pesando 0,05g de AA para um volume final de 250mL).
- 2,6-Diclorofenolindofenol (DCFIF) 0,05g% (p/v).
- Tampão de glicina 0,1M, pH=2
- Tampão de carbonato de sódio 0,1M, pH=10
- Solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v)

III- PROCEDIMENTO

A) Padronização da solução de 2,6-Diclorofenolindofenol

1. Pipetar exatamente 10 mL da solução padrão de AA em erlenmeyer e titular com a solução de DCFIF até obter uma coloração ligeiramente rosada e estável por 15 segundos com agitação vigorosa. Obs: Titular sobre superfície branca.
2. Fazer um branco pipetando 10 mL de ácido oxálico 0,4%.
3. Expressar o resultado da padronização como mg de ácido ascórbico por mL da solução de diclorofenolindofenol descontando previamente o valor do branco.

B) Efeito do pH, da temperatura e da presença de Cu^{2+} sobre a estabilidade do ácido ascórbico em sucos de frutas

1. Preparar em tubos Falcon cada uma das seguintes misturas (em duplicata):
 - a) 5mL de suco da fruta + 5mL de tampão glicina
 - b) 5mL de suco da fruta + 5mL de tampão de carbonato
 - c) 5mL de suco da fruta + 5mL de tampão glicina
 - d) 5mL de suco da fruta + 4,5mL de tampão glicina + 0,5mL de CuSO_4
 - e) 5mL de suco da fruta + 4,5mL de tampão de carbonato + 0,5mL de CuSO_4
 2. Homogeneizar todas as misturas em agitador “vortex”.
 3. Transferir as misturas c e e para banho-maria à 80°C por 15 minutos. Deixar esfriar.
 4. Centrifugar por 10 min a 3000rpm.
 5. Pipetar 5 mL de cada uma das misturas para erlenmeyer.
 6. Acrescentar 5 mL de ácido oxálico 0,4% e proceder a titulação como para a solução padrão.
- Obs.: Comparar a amostra titulada com igual amostra não titulada para facilitar a visualização da virada de cor.

C) Efeito do cozimento sobre o teor de ácido ascórbico em repolho

1. Colocar 640 mL de água destilada em um bécher de 1000 mL e levar à fervura. Em seguida, adicionar 50 g de repolho branco cru fatiado e 1 g de sal de cozinha. Cozinhar o repolho por 15 minutos. Retirá-lo da água de cozimento e secá-lo em papel toalha. Medir em proveta o volume de água de cozimento remanescente.
2. Transferir 50g de repolho cru para um copo de medida. Adicionar 100 mL de solução de ácido oxálico 0,4%. Triturar completamente o repolho com mixer por 3 minutos até obter um extrato homogêneo. Filtrar o extrato obtido através de gaze e, se necessário, papel de filtro. Coletar o filtrado em uma proveta graduada de 250mL e anotar o volume do mesmo.
3. Repetir o procedimento anterior para a amostra de repolho cozido.
4. Pipetar 10 mL dos filtrados para erlenmeyer de 125 mL. Adicionar 5 mL de solução de ácido oxálico 0,4%. Titular em duplicata para determinar a concentração de ácido ascórbico nas amostras de repolho cru e cozido.
5. Pipetar 10 mL da água de cozimento para um erlenmeyer de 125 mL. Adicionar 5 mL de solução de ácido oxálico 0,4%. Titular em duplicata para determinar a concentração de ácido ascórbico na água de cozimento.

IV- RESULTADOS E CÁLCULOS

A) Padronização da solução de 2,6-Diclorofenolindofenol

n° mg AA	V DCFIF ()	V branco ()	V DCFIF corr. ()	n° mg de AA/ mL DCFIF

B) Amostras

Identificação da replicata	V DCFIF ()	V DCFIF corr. ()	n°mg AA frasco	Teor de AA Am*

* mg/100mL ou mg/100g

Calcular:

Sucos de fruta:

1. Perda percentual de ácido ascórbico em consequência do pH, da temperatura e da presença de Cu^{2+} .

Repolho:

1. Percentual de retenção de AA (teor de AA remanescente no alimento após o cozimento em relação ao teor inicial);
2. Perda total de AA (teor total de AA perdido após o cozimento do alimento);
3. Perda percentual de AA por lixiviação (teor de AA que foi carregado para água de cozimento em relação ao teor inicial);
4. Perda percentual de AA por termo-oxidação (teor de AA que foi perdido em decorrência do aquecimento em relação ao teor inicial).

V- REFERÊNCIA

Pearson, D. The Chemical Analysis of Food. 7th ed. Churchill Livingstone, 1976. pp 160-161 e p 183.

Miller, D. D. Food Chemistry: a laboratory manual. Wiley-Interscience, 1998. pp 68-76.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO EM GRÃOS GERMINADOS E NÃO-GERMINADOS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Tubos de plástico para centrifuga (“Falcon”) de 15 e 50 mL
- Algodão
- Colunas de vidro de 10-18 × 0,7-1,0 cm
- Pipetas de 5 e 10mL
- Pipetas volumétricas de 1 e 5 mL
- Funil e papel de filtro
- Balões volumétricos de 50 mL
- Papel-toalha
- Provetas de 50mL
- Tubos de ensaio
- Agitador de tubos “vortex”
- Água destilada (H_2O_d) e água deionizada (H_2O_{dd})
- Amostras de grãos, germinados e não germinados, moídas.

II- REAGENTES E SOLUÇÕES

- Soluções de NaCl a 0,1 e 0,7 M em H_2O_{dd} .
- Suspensão de resina de troca aniônica AG 1-X8 (25%, p/v) em NaCl 0,7 M.
- Solução de HCl 2,4% (0,65N) em H_2O_{dd} .
- Reagente de Wade: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,03% p/v) e ácido sulfosalicílico (0,3% p/v) em H_2O_{dd} .
- Soluções de padrão de ácido fítico em água deionizada: solução concentrada (1,2 mg/mL), dissolver 12,0 mg de ácido fítico em água até 10,0mL, em balão volumétrico. Soluções diluídas de padrão: 6 μ g/mL (200x); 12 μ g/mL (100x); 16 μ g/mL (75x); 24 μ g/mL (50x); 48 μ g/mL (25x).

III- PROCEDIMENTO

A) Preparo das amostras (realizado previamente)

1. Molhar bem os grãos em H_2O_d . Escorrer a água e espalhar uma camada dos grãos sobre uma camada dupla de papel-toalha umedecido com H_2O_d , sobre tabuleiro metálico, e deixá-los em estufa a 30°C por 18h, em atmosfera umidificada. Secar o excesso de H_2O_d com papel-toalha, caso necessário.
2. Liofilizar todos os grãos.
3. Moer todos os grãos, germinados e não-germinados, congelados em N_2 líquido.

Primeiro dia

B) Extração dos fitatos

1. Pesar 1,5g da amostra moída em tubo “Falcon” de 50 mL e acrescentar 30mL de HCl 0,65N.
2. Extrair os fitatos por 1 hora em temperatura ambiente, com agitação periódica em agitador “vortex”.
3. Centrifugar o tubo (2500 rpm/ 15min) e filtrar o sobrenadante através de papel de filtro. Descartar os primeiros 5 mL e coletar volume apropriado do filtrado em tubo de ensaio.
4. Diluir o filtrado com água deionizada adequadamente, de acordo com o teor esperado de fitato na amostra: $f_{dil} = 5$ quando fitato <1% (far. trigo, lentilhas, grãos germinados, etc.); $f_{dil} = 10$, quando fitato >1% (soja, feijões, ervilha, etc.). Diluir em balão volumétrico de 25mL.

C) Preparo das colunas de troca iônica e isolamento do fitato

1. Acrescentar pequeno pedaço de algodão à extremidade mais fina da coluna e umedecê-lo com a solução de NaCl 0,7 M.
2. Acrescentar, com uma pipeta, 4,0 mL da suspensão da resina AG1X-8 à coluna de vidro e controlar a descida da coluna de líquido, de modo a deixá-la até a altura da coluna de resina. Obs: não deixar a resina secar. Caso isso aconteça, umedecê-la com NaCl 0,7M.
3. Condicionar (ativar) a coluna pela passagem de 40mL de H₂O_{dd}.
4. Adicionar 10,0 mL da amostra diluída e deixar a coluna de líquido descer de forma controlada.
5. Adicionar 20 mL de NaCl 0,1M e descartar o eluato que contém fosfato inorgânico e outros interferentes.
6. Adicionar 25 mL de NaCl 0,7M, coletar o eluato em balão volumétrico de 50 mL e avolumar. Obs: para re-utilizar a coluna, recondicioná-la com 30 mL de NaCl 0,7M seguido de 40 mL de H₂O_{dd}.
7. Homogeneizar o eluato coletado e transferir cerca de 10 mL para tubo “Falcon” de 15 mL. Armazená-lo fechado em freezer (-20°C) até a próxima aula, para determinação colorimétrica do teor de fitatos.

Segundo dia

D) Preparo da curva de calibração

1. Pipetar 4,5mL de cada solução padrão diluída (6, 12, 16, 24 e 48 µg/mL) para uma série de tubos “Corning” de 15 mL. Usar 4,5mL de H₂O_{dd} para o branco dos reagentes.
2. Adicionar 1,5 mL do reagente de Wade e agitar em “vortex” e deixar reagir por 10 min ao abrigo da luz.
3. Centrifugar (2.500rpm/ 10min) e ler absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro ($\lambda=500\text{nm}$), contra água deionizada. Leia e anote a absorbância do branco dos reagentes.

Tubo	[fitato] (µg/mL)	n° mg fitato _{TUBO}	Leitura _{Abs} ()	Abs _P [*]	Abs _P	k ()
B	—	0,0				
P1						
P2						
P3						
P4						
P5						

* Abs_P = Leitura_{Abs} de P – Leitura_{Abs} do branco.

D) Preparo das amostras

1. Em duplicata, transferir 4,5mL do eluato da coluna para tubos de ensaio e em seguida proceder como nos itens 2 e 3 da curva de calibração.

IV- RESULTADOS E CÁLCULOS

Amostra: _____

Tubo	Leitura _{Abs} ()	Abs _{Am} [*]	nº mg fitato tubo _{Am}	nº mg fitato eluato	nº mg fitato solução dil.	nº mg fitato extrato
Branco						

*Abs_{Am} = Leitura_{Abs} da Am – Leitura_{Abs} do branco

Preparar curva de calibração de |Abs| vs. nº mg ácido fítico_{TUBO}. Calcular o teor de ácido fítico (% p/p, base seca) das amostras. Comparar os resultados dos grãos entre si e das sementes germinadas e não-germinadas. Comparar com resultados da literatura.

V- REFERÊNCIA

Latta, M. & Eskin, M. (1980) A simple and rapid method for phytate determination, *J. Agric. Food Chem.*, 28(6): 1313-1315.

DETERMINAÇÃO DE PIGMENTOS E COR EM CARNES FRESCAS E CURADAS

I – MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Balança analítica
- Liquidificador
- Tubos de vidro com tampa de rosca
- Pipetas de 10 mL
- Proveta de 250 mL
- Papel de filtro
- Funis
- Espectrofotômetro

II – REAGENTES E SOLUÇÕES

- Solução de acetona em água: Adicione 9 mL de água destilada e um balão volumétrico de 100 mL. Adicione acetona de grau espectrofotométrico, misture e avolume com acetona. Estocar por até 6 meses a 3 °C.
- Acetona acidificada: Em um cilindro graduado, adicione 2 mL de água, seguidos de 2 mL de HCl concentrado, complete o volume com água até 10 mL e misture. Transfira o HCl diluído para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com acetona de grau espectrofotométrico. Estocar por até 1 mês a 3 °C
- Tampão fosfato de sódio 40 mM, pH 6,8: Dissolver 5,52g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 900 mL de água destilada. Ajustar o pH com NaOH até o valor de 6,8 e avolumar até 1.000 mL com água destilada.

III – PROCEDIMENTO

A) Pigmentos em carnes curadas

A.1) Nitrosil-hemocromo

1. Pesar 2 g da amostra homogeneizada (moída) em tubo de vidro com tampa de rosca.
2. Adicionar 9 mL de solução aquosa de acetona. Tampar os tubos e homogeneizar o material em vortex por 1 min. Deixar em repouso por 10 minutos ao abrigo de luz.
3. Filtrar através de papel de filtro para um novo tubo e tampar.
4. Efetuar a leitura da absorbância a 540nm em espectrofotômetro.

A.2) Heme total

1. Pesar 2g da amostra homogeneizada (moída) em tubo de vidro com tampa de rosca.
2. Adicionar 9mL de acetona acidificada. Tampar os tubos e homogeneizar o material em vortex por 1 min. Deixar em repouso por 1 hora ao abrigo de luz.
3. Filtrar através de papel de filtro para um novo tubo e tampar.
4. Efetuar a leitura da absorbância a 640nm em espectrofotômetro.

B) Pigmentos em carne fresca: metamioglobina

1. Pesar 25 g da amostra em um pedaço de papel-alumínio.
2. Homogeneizar a amostra com 250 mL de tampão fosfato 40 mM gelado, em liquidificador, por 45 segundos em velocidade máxima.
3. Filtrar o extrato através de gaze e papel de filtro, em seqüência ou sobrepostos no funil.
4. Efetuar a varredura do espectro do extrato entre 650 e 450 nm, com intervalos de 5 nm.
5. Efetuar a leitura da absorbância do extrato em 572 nm.

IV – RESULTADOS E CÁLCULOS

A) Pigmentos de carnes curadas

A.1) Nitrosil-hemocromo

- Calcular o teor de nitrosil-hemocromo, ou hemina solúvel em acetona:água, a partir da absorbância a 540nm e da absortividade molar.

$$E_{540\text{nm}}^{\text{mM}} \text{ nitrosil-hemocromo (acetona 80\%)} = 11,3 \text{ L. mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Para o cálculo, é necessário considerar o fator de conversão para expressar o resultado final em ppm ($\mu\text{g/g}$) (PM hemina = 652 g/ mol) e o fator de diluição. O fator de diluição é calculado a partir do volume total de líquido presente, ou seja, o volume de solução de acetona adicionado mais a água presente na carne. Considerando que amostras de carne contém ~70% de água, o volume de água presente em 2,0 g de amostra é de 1,4 mL. O volume total é, então, 9,0 + 1,4 mL = 10,4 mL. O fator de diluição é igual a 10,4 mL/ 2g de amostra = 5,2. Considerando ambos os fatores, pode-se calcular a concentração de nitrosil-hemocromo utilizando-se a seguinte equação:

$$[\text{nitrosil-hemocromo}] \text{ (ppm)} = \text{Abs}_{540\text{nm}} \times 5,2 \times 652 \times 11,3^{-1} = \text{Abs}_{540\text{nm}} \times 300$$

Obs: O fator de diluição deve ser corrigido apropriadamente, de acordo com o teor de umidade da amostra de carne, ou uma melhor aproximação.

A.2) Heme total

- Calcular o teor total de heme a partir da absorbância a 640nm e da absortividade molar.

$$E_{640\text{nm}}^{\text{mM}} \text{ heme (acetona 90\% acidificada)} = 4,8 \text{ L. mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Considerando-se que a acetona acidificada extrai todas as formas de pigmentos da carne e considerando os fatores já discutidos no cálculo anterior, podemos calcular o teor total de heme utilizando a seguinte equação:

$$[\text{heme}]_{\text{total}} \text{ (ppm)} = \text{Abs}_{640\text{nm}} \times 5,2 \times 652 \times 4,8^{-1} = \text{Abs}_{640\text{nm}} \times 706$$

A.3) Eficiência do processo de cura

A partir dos teores de heme total e de nitrosil-hemocromo, calcular a eficiência do processo de cura para as amostras:

$$\text{Eficiência de cura (\%)} = (\text{ppm NO-heme/ppm heme total}) \times 100$$

B) Pigmentos em carne fresca: metamioglobina

Estimar a concentração total de mioglobina nas amostras a partir do valor de absorvância a 525nm, usando o coeficiente de extinção de $7,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$:

$$[\text{Mioglobina}] (\text{mM}) = [\text{Abs}_{525\text{nm}} / (7,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 1\text{cm})]$$

Calcular a concentração relativa de metamioglobina (MetMb) usando a seguinte equação:

$$\% \text{ MetMb} = -2,541R_1 + 0,777R_2 + 0,800R_3 + 1,098$$

onde, R_1 é $\text{Abs}_{572\text{nm}}/\text{Abs}_{525\text{nm}}$, R_2 é $\text{Abs}_{565\text{nm}}/\text{Abs}_{525\text{nm}}$, e R_3 é $\text{Abs}_{545\text{nm}}/\text{Abs}_{525\text{nm}}$ (Krzywicki, 1982).

V – REFERÊNCIAS

- Current Protocols in Food Analytical Chemistry. F: Pigments and Colorants. Wrolstad, R. E., Ed. John Wiley & Sons, Inc., 2001

ANÁLISE QUALITATIVA DE PIGMENTOS VEGETAIS: CLOROFILAS E CAROTENÓIDES

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Folhas verdes, p.ex: espinafre e agrião
- Papel para cromatografia nº1, cortado em tiras de 1 × 10 cm
- Acetona
- Benzina leve (P.E. 40-60°C)
- Soluções de tampão citrato; ácido cítrico e citrato 0,1 M, pH= 5,4
- Frascos Erlenmeyer de 50 mL
- Proveta de 50 mL
- Funis e papel de filtro
- Pipetas de 1 e 2 mL
- Tubos de ensaio de 18 a 20 mm d.i. com tampa de rosca (usados como cubas cromatográficas) e tubo de ensaio comum
- Banho de água ajustado a 55°C
- Placa aquecedora, becker de 100mL, vidros de relógio e pérolas de vidro
- Areia lavada
- Tesoura e filme plástico (PVC) ou Parafilm®
- Vidro de relógio

II- PROCEDIMENTO

1. Saturação das cubas cromatográficas: Transferir para os 5 tubos de 18-20mm d.i. os solventes que serão usados como fase móvel para a cromatografia (acetona e benzina), da seguinte maneira: Tubo1, 2mL de acetona; Tubo 2, 0,6 mL de acetona + 1,4 mL de benzina (3:7, v/v); Tubo 3, 0,4 mL de acetona + 1,6 mL de benzina (2:8, v/v); Tubo 4, 0,2 mL de acetona + 1,8 mL de benzina (1:9, v/v); Tubo 5, 2mL de benzina. Fechar os tubos com as rolhas de borracha.
2. Para as folhas cruas: amassar as folhas com pistilo em gral com areia (pouca areia), pesar 5g das folhas amassadas com areia em erlenmeyer de 50mL. Para o preparo das amostras aquecidas: pesar 10g de folhas picadas em becker de 100mL, adicionar 2 pérolas de vidro e 15mL de solução-tampão de citrato (pH= 5,4). Tampar o becher com vidro de relógio e deixar ferver em placa aquecedora (10min). Em seguida drenar muito bem as amostras (amassá-las com o dedo para remover todo o excesso de água) e em seguida macerá-las com pistilo em gral com areia. Pesar 7g da amostra com areia em erlenmeyer de 50mL.
3. Adicionar 10 mL de acetona aos Erlenmeyers com as amostras e cobri-los com folha de papel alumínio.
4. Fechar os erlenmeyers com filme plástico e proceder com a extração dos pigmentos em banho (55°C), com agitação intermitente até que a solução adquira coloração intensa.
5. Filtrar o extrato, através de papel de filtro, para outro Erlenmeyer (também coberto com folha de alumínio) e concentrá-lo no banho de água até que a coloração fique intensa.
6. Aplicar o extrato, ainda morno, nas cinco tiras de papel, a 2 cm de uma das extremidades longitudinais da tira e centralizado no sentido transversal. Use capilares de vidro para as aplicações. Aplicar diversas vezes (8-10) no mesmo ponto, deixando secar completamente o solvente entre uma e outra aplicação. Certificar-se de que o ponto de aplicação da amostra está completamente seco, antes de colocar as tiras de papel nas cubas cromatográficas.

7. Colocar os papéis para cromatografia nas cubas, certificando-se de que a fase móvel não está encostando diretamente nos pontos de aplicação das amostras e de que as tiras de papel não estão encostadas nas paredes internas das cubas. Fechar as cubas logo em seguida e acompanhar a corrida cromatográfica e a migração dos pigmentos.

8. Quando a frente do solvente estiver a ~1cm da borda superior da tira de papel, retirá-la da cuba e marcar imediatamente a distância de migração do solvente (frente do solvente, F_S) com grafite. Observar a migração dos pigmentos e anotar os resultados na tabela abaixo.

9. Medir com régua as distâncias migradas pelos pigmentos e calcular os fatores de retenção (R_f) dos pigmentos para cada um dos sistemas de solventes e anotar os resultados na tabela. R_{f_x} = distância de migração de x (cm) / F_S (cm).

III- RESULTADOS

Amostra: _____

	AcO* 100%	AcO:Bz* (3:7, v/v)	AcO:Bz* (2:8, v/v)	AcO:Bz* (1:9, v/v)	Bz* 100%
Descrição 1ª banda (cor/ tonalidade)					
Identificação tentativa e R_f 1ª banda**					
Descrição 2ª banda (cor/ tonalidade)					
Identificação tentativa e R_f 2ª banda**					
Descrição 3ª banda (cor/ tonalidade)					
Identificação tentativa e R_f 3ª banda**					
Descrição 4ª banda (cor/ tonalidade)					
Identificação tentativa e R_f 4ª banda**					

* AcO= acetona; Bz= benzina.

** β -Caroteno (β -Car) apresenta cor amarelo-alaranjada intensa e xantofilas (Xan) apresentam coloração amarela bastante pálida; Clorofila *a* (Cloa) apresenta cor verde-azulado brilhante e clorofila *b* (Clob) coloração verde-oliva. Produtos da degradação das clorofilas: feofitinas, formadas pela perda do átomo de magnésio, apresentam coloração de verde-musgo-marrom ou cinza-chumbo e clorofilinas, formadas pela perda da cauda fitil, apresentam coloração verde-vivo.

Comparar os solventes usados na cromatografia: de acordo com os valores de Rf dos pigmentos, avalie qual(is) fases móvel(is) resultou(aram) em melhores resoluções entre as bandas cromatográficas. Analise seus resultados e considere a respeito da polaridade dos pigmentos investigados.

Observações: _____

Comparar seus resultados com os das outras duplas: Observe as diferenças entre as hortaliças analisadas para a presença e quantidade aparente de pigmentos. Observe as diferenças qualitativas entre as hortaliças cruas e aquecidas.

Observações: _____

IV- REFERÊNCIAS

1. Faculty of Environmental Sciences and Process Engineering, Brandenburg Technical University at Cottbus. *Investigation of leaf pigments*, disponível através do sítio: <http://www.zal.tu-cottbus.de/zal/prakt/chromuvis.htm#chromUV1>, acessado em Janeiro de 2007.
2. Marsden, S. *Separation of plant pigments by paper chromatography*, disponível através do sítio: <http://www.chemtopics.com/unit06/pchrom.pdf>, acessado em Janeiro de 2007.
3. Tomkins, S.J. & Miller, M.B. (1994) A rapid extraction and fast separation of leaf pigments using thin layer chromatography, *School Science Review*, 75(273): 69-72.

DETERMINAÇÃO DE CORANTES ORGÂNICOS ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS PROVA QUALITATIVA

O método é aplicável a amostras de alimentos coloridos artificialmente e baseia-se na separação dos corantes por cromatografia ascendente em papel.

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Banho-maria (100°C)
- Capela para solventes
- Lã natural branca de 20 cm
- Papel Whatman nº 1, em tiras de aproximadamente 20x2 cm, régua de 20 cm e cuba de vidro
- Béquero de 25, erlenmeyer de 125 mL, bastão de vidro, capilar de vidro

II- REAGENTES

- Ácido clorídrico 6 N
- Solução de hidróxido de amônio em água 1:4 (v/v)
- Solvente para a cromatografia (fase móvel): dissolver 2g de citrato de sódio em 20 mL de hidróxido de amônio e adicionar água até 100 mL, em cilindro graduado.
- Padrões de corantes orgânicos artificiais a 0,1% (p/v)

III- PROCEDIMENTO

A) Extração:

1. Transferir para um erlenmeyer 100 mL aproximadamente 20 g da amostra, adicionar 50 mL de água e cerca de 20 cm de um fio de lã natural branca. Homogeneizar bem;
2. Acidificar com algumas gotas de HCl (aproximadamente 0,5 mL) aquecer em banho-maria (100°C) até que o corante fique impregnado na lã;
3. Lavar a lã com água destilada em abundância e transferir o pedaço de lã com os corantes impregnados para um béquer de 25 mL;
4. Acrescentar 10 mL de solução de hidróxido de amônio (1:4, v/v) e aquecer em banho-maria (100°C) até que a solução adquira uma coloração igual à da lã.

B) Concentração e análise:

1. Retirar a lã do extrato e reduzir o volume do líquido à metade, por evaporação em banho-maria a 100°C.
2. Aplicar a amostra e as soluções dos padrões de corantes, com auxílio de capilar de vidro, em duas tiras de papel Whatman nº 1 para cromatografia, a 2 cm da extremidade inferior. Ajustar as tiras de papel na cuba cromatográfica, previamente saturada com o solvente (fase móvel).
3. Acompanhar a migração da frente do solvente por 45 min ou até que esteja a 3-4 cm da extremidade superior da tira de papel. Retirar as tiras de papel da cuba cromatográfica e marcar a frente do solvente imediatamente, com grafite.
4. Calcular os fatores de retenção (R_f) das manchas e observar/ descrever suas cores. Comparar o aparecimento das manchas da amostra quanto a sua cor e R_f , com os respectivos padrões de corantes orgânicos artificiais.

IV- RESULTADOS

Padrões

Frente do solvente (cm): _____

Padrão	Descrição da cor	Migração ()	$R_{f \text{ exp}}^*$	$R_{f \text{ tab}}^{**}$ (Tab. 1)	F_c^{***}

* R_f experimental = migração do corante (cm) / frente do solvente (cm); ** R_f tabulado; *** $F_c = R_{f \text{ tab}} / R_{f \text{ exp}}$

Amostra: _____ Frente do solvente (cm): _____

Banda Cromatográfica	Descrição da cor	Migração ()	$R_{f \text{ exp}}^*$	$R_{f \text{ corr}}^{**}$	Identificação do Corante

* R_f experimental = migração do corante (cm) / frente do solvente (cm); ** R_f experimental corrigido = $R_{f \text{ exp}} \times F_c$

Tabela 1: Resultados esperados de migração de corantes artificiais selecionados

Corante	Classe	Cor	R_f esperado*
Eritrosina	Xanteno	Vermelha, intensa	0,21
Indigotina	Indigóide	Azul, índigo	0,52
Bordeaux ou Amarantho	Azo	Vermelha	0,62
Amarelo crepúsculo	Azo	Amarela-laranja	0,73
Tartrazina	Pirazola	Amarela	0,91

* Cromatografia ascendente em papel, com fase móvel de citrato de sódio 2% (p/v) e hidróxido de amônio 20% (v/v) em água.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4ª ed., 2005.

DETERMINAÇÃO DE CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS PROVA QUANTITATIVA POR ESPECTROFOTOMETRIA (Vis)

I- MATERIAL

- Espectrofotômetro (Vis)
- Balança analítica
- Balão volumétrico de 50 mL
- Béquer de 50 mL
- Funil e papel de filtro

II- REAGENTES E AMOSTRAS

- Metanol com 5% de hidróxido de amônio
- Amostras: Pós para sobremesa e pós para refresco. Este método também pode ser aplicado para balas de goma, balas duras, gomas de mascar, entre outras amostras.

III- PROCEDIMENTO

1. Em um béquer de 50 mL, pesar com precisão cerca de 1,5 g de pós para sobremesas, 1,5 g de pós para refresco ou 3,5 g de balas ou gomas de mascar devidamente trituradas ou fracionadas.
2. Adicionar 15 mL de metanol amoniacal e agitar com auxílio de bastão de vidro. Deixar extraindo por 10 min. Transferir o extrato colorido para um balão volumétrico de 50 mL, filtrando através de papel de filtro.
3. Repetir a extração com sucessivas porções de 10 mL de metanol amoniacal até que a amostra fique incolor. Caso as bordas do papel de filtro adquiram a coloração da amostra, recorte-o e junte ao resíduo da amostra no béquer. Repetir a extração com metanol amoniacal.
4. Completar o volume do balão com a mesma solução. Centrifugar, se necessário.
5. Ler a absorbância em espectrofotômetro no(s) comprimento(s) de onda do(s) corante(s) identificado(s) na prova qualitativa de cromatografia, usando como branco a solução de metanol amoniacal.

IV- RESULTADOS E CÁLCULOS

- a) Amostra com um só corante: calcular o teor do corante usando seu valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Características espectrofotométricas dos corantes artificiais

Corante	λ (nm)	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$
Tartrazina	426	536,0
Amarelo crepúsculo	481	564,1
Vermelho sólido E	505	447,9
Vermelho 40	505	536,0
Ponceau 4R	507	442,5
Bordeaux S	519	436,0
Eritrosina	524	1130,0
Azul indigotina	610	449,3
Azul brilhante	630	1840,0

- b) Amostras com dois corantes cujas absorções máximas são bem distantes entre si: fazer as leituras das absorbâncias nos dois comprimentos de onda respectivos na mesma solução. Como os corantes absorvem em regiões distintas, a absorção de um não interfere na absorção do outro. Calcular o teor de corante usando seus respectivos valores de $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ (Tabela 1). P.ex: tartrazina e azul indigotina ou azul brilhante.
- c) Amostras com dois corantes cujas absorções máximas são bem próximas uma da outra: faça as leituras das absorbâncias nos comprimentos de onda apropriados para cada corante ($\lambda_{\text{máx}}$) na mesma solução. Como as regiões de absorções máximas são bem próximas, a absorbância relativa a um dos corantes interfere na absorbância relativa ao outro. Por exemplo, em amostras contendo tartrazina e amarelo crepúsculo, ao fazer a leitura a 426 nm, na realidade, estamos considerando a absorbância da tartrazina mais a do amarelo crepúsculo neste λ ; a 481nm, estamos considerando a absorbância do amarelo-crepúsculo mais a da tartrazina neste λ , pois ocorre a adição das absorbâncias. Para a devida correção, estabelecemos valores de $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ a 426 nm e a 481 nm com o padrão do corante tartrazina com 96,4% de pureza (mínima) e com o padrão do corante amarelo-crepúsculo com 90,3 % de pureza (mínima), conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Características espectrofotométricas dos corantes artificiais

Corante	λ (nm)	$E^{1\%}_{1\text{cm}}$
Tartrazina	426	535
Tartrazina	481	170
Amarelo-crepúsculo	426	221
Amarelo-crepúsculo	481	592

Substituindo esses valores de $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ na equação de Lambert-Beer, a concentração do corante é obtida com a resolução do sistema de equação com duas incógnitas.

$$A_{426\text{nm}} = 535 \times [\text{Tartrazina}] (\text{g}/100\text{mL}) + 221 \times [\text{Amarelo-crepúsculo}] (\text{g}/100\text{mL})$$

$$A_{481\text{nm}} = 170 \times [\text{Tartrazina}] (\text{g}/100\text{mL}) + 592 \times [\text{Amarelo-crepúsculo}] (\text{g}/100\text{mL})$$

A_{426} = absorbância da solução a 426 nm

A_{481} = absorbância da solução a 481 nm

V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4ª ed., 2005.
2. TAKAHASHI, M.Y.; YABIKU, H.Y.; MARSIGLIA, D.A.P. Determinação quantitativa de corantes artificiais em alimentos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 48 (1/2) p. 7-15, 1988.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITRITOS EM ALIMENTOS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Balões volumétricos de 250, 500 e 1000 mL
- Erlenmeyer de 500 mL
- Tubos de ensaio
- Pipetas de 5 e 10 mL
- Provetas de 25, 50 e 250 mL
- Espectrofotômetro a 540 nm
- Banho a 80°C
- Lã de vidro e papel de filtro
- Funis

II- REAGENTES E SOLUÇÕES

- Solução padrão de nitrito de sódio. Solução 2,0 µg/ mL, a partir de uma solução estoque a 0,2 mg/ mL.
- Reagente de Griess:
 - Reagente de Griess 1 – sol. cloridrato de alfa-naftilamina 0,03%: dissolver 30 mg do reagente em 20 mL de água destilada quente. Resfriar e completar o volume a 100 mL com água destilada.
 - Reagente de Griess 2 – sol. de ácido sulfanílico 0,6%: dissolver 600 mg de ácido sulfanílico em 50 mL de água destilada quente. Resfriar e adicionar 20 mL de ácido acético glacial e completar o volume a 100 mL com água destilada.
- Obs: Misturar partes iguais dos reagentes de Griess 1 e 2 na hora do uso.
- Soluções de Carrez : 1- ferrocianeto de potássio (K₄Fe(CN)₆) 15%; 2- sulfato de zinco 30%.
- Solução de bórax – sol. saturada de tetraborato de sódio: dissolver 50 g em 1 L de água quente. Ajustar o volume em temperatura ambiente.

III- PROCEDIMENTO

A) Curva de calibração

1. Transferir alíquotas de 0,5, 1, 2 e 3 mL da solução padrão de nitrito de sódio diluída (2µg/mL) para tubos de ensaio.
2. As alíquotas são completadas a 5 mL com água destilada e então adicionadas de 5 mL do reagente de Griess (1 + 2, previamente misturados).
3. Preparar um branco com 5 mL de água destilada + 5 mL do Reagente de Griess.
4. Deixar em repouso por 15 min e efetuar a leitura a 540nm.

Tubo	Vol sol. padrão ()	n° µg NO ₂ ⁻ FR.	Abs ()	k ()
P1				
P2				
P3				
P4				

$$k = \text{Abs (540nm)} / \text{massa NO}_2 \text{ (}\mu\text{g)}$$

B) Preparo das amostras

1. Pesar 25 g da amostra homogeneizada (moída) em erlenmeyer de 500 mL.
2. Adicionar 250 mL de água destilada quente (70-80 °C) e 25 mL de solução de bórax. Deixar em banho de água a 80 °C por 15min, agitando periodicamente.
3. Filtrar quantitativamente, através de lã de vidro, para balão volumétrico de 500 mL, usando aproximadamente 50 mL de água destilada para as lavagens.
4. Adicionar 5 mL de cada uma das soluções de Carrez, agitando após cada adição.
5. Completar o volume, deixar em repouso por 10 min e filtrar através de papel de filtro. Utilizar o filtrado para a reação colorimétrica.

C) Determinação do nitrito

1. Transferir 5 mL do filtrado da amostra para tubo de ensaio.
2. Adicionar 5 mL do reagente de Griess (1 + 2, previamente misturados)
3. Deixar em repouso por 15min e efetuar a leitura a 540nm.
4. Realizar a reação colorimétrica em duplicata para cada amostra.

IV- RESULTADOS E CÁLCULOS

Amostra: _____

Frasco	Abs ()	n° $\mu\text{g NO}_2^-$ erlenmeyer _{f_{Am}}	n° $\mu\text{g NO}_2^-$ extrato	n° mg NO_2^- extrato	NO_2^- Am (p.p.m.)

- Calcular o teor de nitrito de sódio e expressar o resultado em p.p.m. (mg/kg). Comparar o teor de nitrito entre as diferentes amostras.

V- REFERÊNCIAS

- Follet, M.J. & Ratcliff, P.W. Determination of nitrite and nitrate in meat products. J. Sci. Food Agric. 14: 138-144, 1963.

DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO DE ÓLEOS VEGETAIS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Balança analítica
- Banho de ultra-som
- Becher de 50 mL
- Bureta de 25 mL
- Erlenmeyer de 125 mL
- Micropipeta de 1000 µL
- Pipetas graduadas de 1 mL
- Proveta de 50 mL

II- REAGENTES

- Solução de tiosulfato de sódio 0,01 N: secar o tiosulfato anidro em dessecador com sílica e vácuo por pelo menos 3 dias. Para preparar 250 mL da solução, pesar em Becher 0,3953g de tiosulfato de sódio anidro seco, dissolver em água deionizada fervida, transferir quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL e avolumar.
- Solução de amido solúvel 1% (p/v), indicador de ponto de viragem na titulação: amassar 0,25 g de amido com pequena quantidade de água destilada. Acrescentar 27 mL de água destilada em ebulição e deixar ferver por 5 minutos e deixá-la resfriar. Filtrar a solução através de algodão.
- Solução ác. acético:clorofórmio (3:2, v/v).
- Solução saturada de iodeto de potássio, a ser preparada no dia da análise: 130 g/ 100 mL em água deionizada fervida.

III- AMOSTRAS

- Óleo vegetal refinado novo (não-oxidado)
 - Óleo vegetal refinado aquecido a 60° C por 72 horas
 - Óleo vegetal refinado aquecido a 180° C 60 minutos
- Obs: Usar óleos vegetais de mesma marca comercial para evitar que o eventual uso de antioxidantes sintéticos interfira nos resultados e atrapalhe sua interpretação. Óleos vegetais sugeridos: soja, girassol, milho.

IV- PROCEDIMENTO

1. Pesar 5g da amostra em um frasco de Erlenmeyer de 125 mL;
2. Adicionar 30 mL da solução de ác. Acético:clorofórmio (3:2, v/v) e agitar até dissolver a amostra;
3. Adicionar 0,5 mL da solução saturada de iodeto de potássio, agitar e deixar em repouso em um local com baixa ou nenhuma luminosidade por exatamente 1 min;
4. Adicionar 30 mL de água deionizada e agitar;
5. Titular com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N em constante agitação. Continuar a titulação até que a coloração amarela da fase superior (aquosa) tenha quase desaparecido;
6. Adicionar 0,5 mL da solução de amido indicadora e continuar a titulação até o completo desaparecimento da coloração violeta;
7. Preparar um branco nas mesmas condições e titular.

V- CÁLCULOS

Índice de Peróxido (meq O₂/ kg amostra)= (A-B) x N x f x 1000 / m

Onde:

A = volume de tiosulfato de sódio 0,01 N utilizado na titulação da amostra

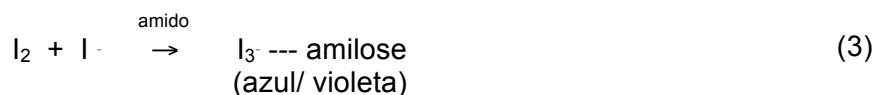
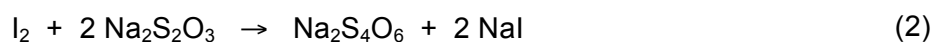
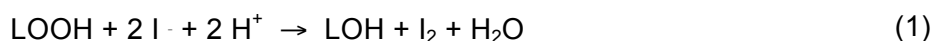
B = volume de tiosulfato de sódio 0,01 N utilizado na titulação do branco

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

f = fator de correção da concentração da solução de tiosulfato de sódio (concentração experimental/ 0,01N)

m = massa da amostra (g)

Esquema das reações na titulação:



Obs: Solução de I₂ (fase superior; equação 2) é amarela-marrom.

VI- RESULTADOS

Amostra	Massa ()	Vol. Titulante ()	Índice de Peróxido

VII- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Instituto Adolfo Lutz (2005). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4ª edição. São Paulo: Editora da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Adolfo Lutz, 593-94.

DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE *p*-ANISIDINA (*Ip-A*) EM ÓLEOS VEGETAIS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Balança analítica
- Balão volumétrico de 10 mL e 100 mL
- Banho de ultra-som
- Espectrofotômetro (UV/Vis), λ ajustado em 350 nm
- Cubetas de quartzo (caminho óptico= 1 cm)
- Papel alumínio
- Pipeta volumétrica de 1 mL e 5 mL
- Tubos de ensaio
- Vórtex

II- REAGENTES

- *n*-Hexano
- Ácido acético glacial seco, com sulfato de magnésio anidro
- Carbono ativado
- Sulfito de sódio
- *p*-anisidina – 0,25 g/100 mL em Ac. Acético – a ser preparada conforme descrito abaixo

Preparo dos cristais de *p*-anisidina (iniciar preparo dois dias antes do uso)

- Em balão volumétrico de 100 mL, dissolver 4,0 g de *p*-anisidina em 90 mL de água ultrapura previamente aquecida a 75°C.
- Adicionar 0,2 g de sulfito de sódio e 2,0 g de carbono ativado e avolumar para 100 mL. Agitar em banho de ultra-som por 5 minutos.
- Filtrar através de papel de filtro duplo (se o carbono atravessar, filtrar novamente).
- Resfriar a solução filtrada a 0°C, deixando no mínimo por 4 horas e preferivelmente durante a noite.
- Descongelar a solução e filtrar os cristais através de um papel filtro. Lavar os cristais com pequena quantidade de água a 0°C.
- Transferir os cristais de *p*-anisidina para vidro de relógio ou placa de Petri (descartar o papel de filtro), cobrir com folha de papel alumínio (com diversos furos) e secá-los em dessecador (com sílica e vácuo).
- Transferir os cristais secos para frasco de vidro âmbar e armazená-los no escuro e em baixas temperaturas (refrigeração; validade de 1 ano).
- Os cristais de *p*-anisidina devem ter uma coloração esbranquiçada e devem ser armazenados em frasco âmbar em temperaturas de 0-4°C. Os cristais não devem ser expostos à luz e ao sinal de qualquer mudança da coloração dos cristais, eles devem ser descartados. Validade dos cristais: 1 ano

Solução de *p*-anisidina (preparar no mesmo dia de uso)

- Em balão volumétrico de 100 mL, pesar 0,25 g de *p*-anisidina e avolumar com ácido acético glacial seco.

III- AMOSTRAS

- Óleo vegetal refinado novo (não-oxidado)
- Óleo vegetal refinado aquecido a 60° C por 72 horas
- Óleo vegetal refinado aquecido a 180° C por 60 minutos

Obs: Usar óleos vegetais de mesma marca comercial para evitar que o eventual uso de antioxidantes sintéticos interfira nos resultados e atrapalhe sua interpretação. Óleos vegetais sugeridos: soja, girassol, milho.

IV- PROCEDIMENTO

Proteger as amostras da luz direta com papel alumínio

1. Pesar **4 g** da amostra (**se fresca**) ou **2 g (se oxidada)** em balão volumétrico de 25 mL. Dissolver e completar o volume com *n*-hexano, homogeneizar;
2. Ler a absorbância em $\lambda = 350$ nm em espectrofotômetro enchendo a cubeta de quartzo com a solução preparada, tendo como referência (branco) o solvente (*n*-hexano), anotar a leitura;
3. Transferir, para tubo de ensaio 1, exatamente 5,0 mL da solução da amostra em hexano;
4. Transferir, para o tubo de ensaio 2, exatamente 5,0 mL de solvente puro;
5. Adicionar, exatamente, 1,0 mL da solução de *p*-anisidina, em cada tubo. Agitar em vórtex até a solução ficar completamente homogênea;
6. Aguardar 10 minutos, ler a absorbância da amostra em $\lambda = 350$ nm, tendo como referência o branco da reação (5 mL de hexano + 1 mL de *p*-anisidina).

V- CÁLCULOS

$$I_{p-A} = 25 \times (1,2 A_a - A_b) / m$$

Onde:

A_a = absorbância da solução da amostra que reagiu com a *p*-anisidina

A_b = absorbância da solução da amostra que não reagiu com a *p*-anisidina

m = massa da amostra (g)

VI- RESULTADOS

Amostra	Massa ()	Abs a ()	Abs b ()	Índice de <i>p</i> -A

VII- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

American Oil Chemists Society / AOCS (2004). *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 5ª edição. American Oil Chemists Society: Champaign, Illinois. [Cd 19-90].

DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA) EM ÓLEOS VEGETAIS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Balança analítica
- Balão volumétrico de 10 mL
- Banho de ultra-som
- Banho-maria a 95°C
- Becher de 10 mL
- Espectrofotômetro a 530 nm
- Micropipeta de 1000 µL
- Pipetas graduadas de 1 mL e de 2 mL
- Tubos de vidro com tampa de rosca
- Vórtex

II- REAGENTES

- 1-butanol
- Solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) em butanol: dissolver 200,0 mg de TBA em 60 mL de 1-butanol com ajuda de banho de ultrassom; filtrar quantitativamente a solução para balão volumétrico de 100 mL. A solução pode ser armazenada em refrigerador por até 1 semana, em frasco âmbar.

III- AMOSTRAS

- Óleo vegetal refinado novo (não-oxidado)
 - Óleo vegetal refinado aquecido a 60° C por 72 horas
 - Óleo vegetal refinado aquecido a 180° C por 60 minutos
- Obs: Usar óleos vegetais de mesma marca comercial para evitar que o eventual uso de antioxidantes sintéticos interfira nos resultados e atrapalhe sua interpretação. Óleos vegetais sugeridos: soja, girassol, milho.

IV- PROCEDIMENTO

Proteger as amostras da luz direta durante todo o tempo com o uso do papel alumínio.

1. Pesar 20-80 mg da amostra diretamente em balão volumétrico de 10 mL, com ajuda de micropipeta automática. Completar o volume com 1-butanol e homogeneizar;
2. Transferir 2 mL desta solução para tubo de ensaio e adicionar 2 mL da solução de TBA. Preparar paralelamente um branco com 2 mL de 1-butanol e 2 mL de TBA;
3. Fechar todos os tubos de ensaio e agitar em vórtex por 30 seg;
4. Aquecer os tubos fechados em banho-maria a 95 °C por 2 h e, em seguida, resfriá-los em água até atingir a temperatura ambiente (~10 min);
5. Ler a absorbância (Abs) a 530 nm em espectrofotômetro, em cubetas de vidro. Ler o branco e a amostra contra água destilada. A absorbância do branco não deve ultrapassar 0,1.

V- CÁLCULOS

Índice de TBA= $50 \times (A-B) / m$

Onde:

A = absorvância da solução da amostra

B = absorvância da solução do branco

m = massa da amostra (mg)

VI- RESULTADOS

Amostra	Massa ()	Abs ()	Índice de TBA

VII- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

American Oil Chemists Society / AOCS (2004). *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 5ª edição. American Oil Chemists Society: Champaign, Illinois. [Cd 19-90].

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LACTOSE EM LEITE E DERIVADOS

I- MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Placa de agitação e aquecimento
- Agitador de tubos (vórtex)
- Banho de água a 100°C
- Espectrofotômetro (Vis; $\lambda = 520\text{nm}$)
- Balança analítica
- Centrífuga
- Micropipetas automáticas: 200 e 1000 μL
- Becher: 2L, 100mL e 50mL
- Pipetas graduadas: 5 e 10 mL
- Cilindro graduado de 100mL e balão volumétrico de 50mL
- Estantes de tubos
- Barras magnéticas

II- REAGENTES E SOLUÇÕES

1. Ácido Pícrico Saturado. Solução comprada pronta ou preparada no laboratório, da seguinte maneira: dissolver 16g de ac. Pícrico em 1,0L de água destilada, em placa de aquecimento com agitação. Cuidado para não aquecer o ácido pícrico seco, pois pode explodir! Deixar a solução resfriar em um frasco de vidro âmbar em temperatura ambiente por alguns dias (2-3) até que se formem cristais no fundo do frasco. Não agitar, pois o resíduo sólido é muito leve. Usar a solução com cuidado para não acrescentar os cristais nas amostras.
2. Carbonato de sódio 25% (p/v): dissolver 25g de Na_2CO_3 anidro em H_2O e completar o volume a 100mL em cilindro graduado.
3. Solução padrão de lactose (50mg/mL): dissolver 2,5g de lactose a 50mL em balão volumétrico com H_2O .

III- PROCEDIMENTO

A) Curva de calibração:

1. Preparar 5 tubos de ensaio, como no quadro abaixo.

TUBO	V sol. Lactose ()	V H_2O ()	[Lac] (/)	Abs ()	K (/)
B	—	250			
P1	50	200			
P2	100	150			
P3	150	100			
P4	200	50			

2. Adicionar 4,75mL da solução saturada de ac. pícrico, homogeneizar e centrifugar a 3000 rpm por 30 minutos.
3. Transferir 1,0mL da solução para outro tubo de ensaio e adicionar 0,5mL de Na_2CO_3 25% (p/v). Homogeneizar e aquecer em banho de água a 100°C por 20 minutos. Tampar os tubos com “bolas de gude”.
4. Resfriar os tubos, adicionar 8,5mL de H_2O e homogeneizar. Ler a absorbância das amostras em $\lambda = 520\text{ nm}$, em até 25 minutos. Ajustar o zero com o branco de reação.

B) Preparo das amostras:

1. Transferir 100 μ L de leite, em duplicata (ou quantidade de laticínio que contenha 5 a 10 mg de lactose), + 150 μ L de H₂O para tubos de centrifuga e homogeneizar.
2. Adicionar 4,75mL da solução saturada de ac. pícrico, homogeneizar e centrifugar a 3000 rpm por 30 minutos.
3. Proceder como nos passos 3 e 4 do item A.

IV- RESULTADOS

Amostra: _____

Identificação do tubo	Abs ()	[Lac] _{TUBO} (/)	[Lac] _{Am} (g/ dL)

V- CÁLCULOS

Calcular a concentração de lactose nas amostras (líquidas, g/dL; sólidas ou semi-sólidas, g/100g).

VI- REFERÊNCIA

Perry, N.A. & Doan, F.J. (1950). A picric acid method for the simultaneous determination of lactose and sucrose in dairy products. *Journal of Dairy Science*, **33**(3): 176-85

