

# Análise de alimentos:

## caracterização físico-química

@Ana Luisa Almaça da Cruz Fernando, FCT/UNL, 2015

### Métodos Experimentais

#### 1) Determinação de humidade das amostras

O método utilizado para a determinação de humidade para as diversas amostras é semelhante para todas (AOAC, 1990).

- 1) Numa balança analítica (Mettler Toledo AB204), pesou-se num pesa filtro, previamente seco em estufa (WTB binder E28) a  $103\pm 2^{\circ}\text{C}$  e tarado, cerca de 1g de amostra. Secou-se em estufa a  $103\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante duas horas;
- 2) Seguidamente retirou-se o pesa filtros da estufa e deixou-se arrefecer num exsiccador durante uma hora e pesou-se novamente o pesa filtro;
- 3) Repetiu-se o procedimento 2) até peso constante.

#### *Expressão dos resultados:*

O teor em humidade será dado por:

$$\% \text{ Humidade (\%H)} = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_3} * 100$$

em que

$P_1$  é o peso da amostra juntamente com o pesa-filtro (g)

$P_2$  é o peso da amostra seca juntamente com o pesa-filtro (g)

$P_3$  é a tara do pesa-filtro (g)

## 2) Determinação da proteína bruta

A proteína bruta foi determinada por quantificação do azoto total pelo método de Kjeldahl (Watts e Halliwell, 1996) e convertendo este valor em proteína bruta considerando que a totalidade do azoto está na forma proteica.

A estimação do teor em proteína bruta é obtida através da multiplicação da percentagem de azoto total por um factor de conversão baseado na percentagem de azoto na proteína. Neste caso, e dado não haver informação específica relativa a cada uma das espécies em estudo, utilizou-se o factor de 6,25, porque muitos dos factores contêm cerca de 16% de azoto (Adrian *et al.*, 2000)

- 1) Pesou-se rigorosamente, numa balança analítica (Mettler Toledo AB204), cerca de 0.2g de amostra, num tubo de digestão;
- 2) Adicionou-se 10mL de Ácido Sulfúrico (95-97%) e uma porção de mistura catalisadora, composta por Selénio e Sulfato de Potássio, assim como reguladores de ebulição;
- 3) Levou-se a aquecer numa placa de aquecimento a 360°C até a amostra ficar transparente;
- 4) Transferiu-se a amostra digerida para um balão volumétrico de 100ml e aferiu-se com a água destilada. Filtrou-se para um frasco e reservou-se.
- 5) Colocou-se 50mL de amostra digerida e 50mL de Água destilada num tubo de reacção e foram adicionadas 3 gotas de Fenolftaleína;
- 6) Seguidamente procedeu-se à alcalinização do meio, adicionando uma solução de Hidróxido de Sódio (6M), até a solução adquirir uma coloração rosa;
- 7) Colocou-se, num erlenmeyer de 250ml, 50mL de Ácido Bórico (20g/L) e 0.5mL de solução indicadora de Ácido Bórico ( 0,2g de vermelho de metilo em 100ml de solução alcoólica 95% + 0,1g de azul de metileno em 50ml de solução alcoólica 95%);
- 8) Em seguida, efectuou-se uma destilação por arrastamento de vapor da solução em análise numa unidade destiladora (Kjeltec System 1002 Distilling Unit Tecator), sendo recolhido o destilado na solução de ácido bórico;
- 9) Após a destilação, efectuou-se uma titulação da solução com Ácido Sulfúrico (0.02N).

### ***Expressão dos resultados:***

O modo de cálculo do conteúdo proteico encontra-se em anexo I.

$$\% \text{ Proteína bruta} = \frac{V_1 \cdot N \cdot b_1}{V_2 \cdot m_1} \times 1,4 \times 6,25$$

em que

V<sub>1</sub>- volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02N gasto na titulação(ml)

V<sub>2</sub>- volume de amostra digerida utilizado na destilação (ml)

b<sub>1</sub>- volume do balão volumétrico onde ficou reservado o digerido (ml)

N- normalidade do titulante

m<sub>1</sub>- massa de amostra seca utilizada na digestão (g)

### 3) Determinação do fósforo total

Digestão a quente com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (modificação do método de Watts e Halliwell, 1996). Determinação dos fosfatos no digerido, por espectrofotometria de absorção molecular, através da formação de um complexo corado com uma solução de molibdato de amónio, na presença de ácido ascórbico e de tartarato de potássio e antimónio (Watanabe e Olsen, 1965).

- 1) Pesou-se rigorosamente, numa balança analítica (Mettler Toledo AB204), cerca de 0.2g de amostra, num tubo de digestão;
- 2) Adicionou-se 10mL de Ácido Sulfúrico (95-97%) e uma porção de mistura catalisadora, composta por Selénio e Sulfato de Potássio, assim como reguladores de ebulição;
- 3) Levou-se a aquecer numa placa de aquecimento a 360°C até a amostra ficar transparente;
- 4) Transferiu-se a amostra digerida para um balão volumétrico de 100ml e aferiu-se com a água destilada. Filtrou-se para um frasco e reservou-se.
- 5) Em balões volumétricos de 100ml, colocou-se um determinado volume de amostra, adicionando-se seguidamente uma gota de fenolftaleína e NaOH 6N, até a solução ficar rosa.

- 6) Adicionou-se 8ml de agente redutor ( 250ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N + 75ml molibdato de amónio 40g/L + 2,6g ácido ascórbico + 25ml tartarato de potássio e antimónio 2,8 g/L, em 500ml) e aferiu-se com água destilada.
- 7) Esperou-se cerca de 20 minutos antes de se proceder à medição da absorvância no espectrofotómetro ( Cecil 9000 Series) a 880nm.
- 8) A partir de uma solução padrão de fósforo (1mg(P)/L) prepararam-se diversas soluções de diferentes concentrações de P (0; 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 mg/L P), às quais se adicionou também 8 ml de agente redutor. A medição da absorvância destas soluções, após 20 minutos, e a 880nm, permitiu a construção de uma curva de calibração abs(880nm) vs mg/L (P).

***Expressão dos resultados:***

$$\% \text{ Fósforo} = \left( \frac{x_1 \cdot v_1 \cdot b_1}{v_2 \cdot p_1} \right) : 10^4$$

em que

v<sub>1</sub> = volume do balão volumétrico utilizado na medição da absorvância (ml)

v<sub>2</sub> = volume da amostra digerida e reservada (ml), utilizada na reacção com o agente redutor

x<sub>1</sub> = valor em mg/L (P) retirado da curva de calibração, utilizando o valor da absorvância (880nm) medido

b<sub>1</sub> = volume do balão volumétrico onde ficou reservado o digerido (ml)

p<sub>1</sub> = massa de amostra seca utilizada na digestão (g)

O modo de cálculo do teor em fósforo encontra-se no anexo I.

4) Determinação da fibra através do Método de Weende (Adrian *et al*, 2000)

- 1) Pesou-se rigorosamente, numa balança analítica (Mettler Toledo AB204), 1g de amostra, num erlenmeyer de 500 mL
- 2) Adicionou-se 150 mL de Ácido Sulfúrico (0.128M) e colocou-se um funil no topo do erlenmeyer;

- 3) Colocou-se o erlenmeyer numa placa de aquecimento, ajustando a temperatura, para controlar melhor a ebulição. Levou-se a solução à ebulição durante 30 minutos;
- 4) Seguidamente, procedeu-se à filtração do sobrenadante num cadinho de Goosh (P2);
- 5) A fibra restante foi lavada com água destilada morna e filtrada no cadinho de Goosh;
- 6) Recolheu-se a fibra que permaneceu no cadinho e colocou-se no erlenmeyer, com o auxílio de uma espátula;
- 7) Adicionou-se 150 mL de Hidróxido de Potássio (0.223M) e colocou-se novamente na placa de aquecimento, levando à ebulição durante 30 minutos, controlando o aquecimento;
- 8) Filtrou-se e lavou-se novamente como no passo 4) e 5), todo o material contido no erlenmeyer;
- 9) Secou-se o cadinho de Goosh a 130°C, durante 2 horas, em estufa (WTB binder E28). Posteriormente arrefeceu-se o cadinho num exsiccador e pesou-se numa balança analítica;
- 10) O cadinho foi introduzido na mufla ( Heraeus Electronic) fria, e a amostra foi incinerada a 550±50°C durante 3 horas. A mufla foi desligada, deixou-se arrefecer o cadinho lentamente até 100°C, colocou-se no exsiccador para arrefecer à temperatura ambiente, e pesou-se numa balança analítica.

***Expressão dos resultados:***

$$\% \text{ fibra} = \frac{P_1 - P_2}{P_3} * 100$$

Em que

P<sub>1</sub> é o peso do cadinho após estufa (g)

P<sub>2</sub> é o peso do cadinho após mufla (g)

P<sub>3</sub> é o peso da amostra (g)

## 5) Determinação de cinzas (AOAC, 1990)

- 1) Colocou-se numa Mufla (Heraeus Electronic) uma cápsula de porcelana a  $550\pm 50^{\circ}\text{C}$  durante uma hora e arrefeceu-se a mesma num exsiccador.
- 2) Seguidamente pesou-se a cápsula numa balança analítica (Mettler Toledo AB204) e colocou-se cerca de 1g da amostra a analisar. Procedeu-se à sua pesagem na mesma balança analítica.
- 3) Posteriormente colocou-se a cápsula contendo a amostra a analisar, na mufla a  $550\pm 50^{\circ}\text{C}$ , durante duas horas.
- 4) Após este período, arrefeceu-se a amostra num exsiccador e pesou-se a cápsula contendo as cinzas obtidas na balança analítica.

### ***Expressão dos resultados:***

A quantidade de cinzas presentes na amostra é determinada do seguinte modo:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{P_1 - P_2}{P_3} * 100$$

Em que

$P_1$  é o peso da cápsula com cinza (g)

$P_2$  é a tara da cápsula (g)

$P_3$  é o peso da amostra (g)

## 6) Determinação dos açúcares totais, dos açúcares redutores e dos açúcares não redutores através da Técnica de Munson e Walker (NP 1419, 1987)

### 1) Preparação do cadinho filtrante (P3)

Lavou-se o cadinho filtrante com ácido nítrico diluído, passou-se cuidadosamente com água quente até eliminar todo o ácido e por último com 10ml de álcool etílico; secou-se em estufa (WTB binder E28) a  $103\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, arrefeceu-se em exsiccador e pesou-se em balança analítica (Mettler Toledo AB204).

### 2) Toma para análise

Pesou-se uma massa de amostra. Transferiu-se a toma para um balão marcado de precisão de 200ml, adicionando cerca de 50ml de água.

### 3) Defecação

Adicionaram-se 12,5ml da solução de Carrez I (150g  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ ) e 12,5ml da solução de Carrez II (300g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ ) e agitou-se. Perfez-se o volume do balão com água, agitou-se e filtrou-se após a formação de um precipitado branco. Uma parte do filtrado foi submetida à inversão para determinar os açúcares totais e a outra foi utilizada directamente para a determinação dos açúcares redutores.

### 4) Determinação de açúcares redutores

Para um copo de precipitação de 400ml, mediram-se, por pipeta de precisão: 25ml da solução de sulfato de cobre (69,278g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ ), 25ml ((346g  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + 100\text{g NaOH}/\text{L}$ ) da solução alcalina tartárica e um volume  $V_1$  da solução defecada, igual ou inferior a 50ml, de modo a que não houvesse subsequente redução de todo o cobre (se a quantidade total de líquido no copo fosse inferior a 100ml, perfazia-se esse volume com água).

Colocou-se o copo, coberto com um vidro de relógio, sobre uma placa de aquecimento, de modo que o líquido entre em ebulição decorridos  $4\text{min} \pm 5\text{s}$ , mantendo-se esta durante 2min.. Deixou-se repousar o precipitado e filtrou-se com o líquido ainda quente, com o auxílio da trompa e de um frasco de Kitasato, através do cadinho de fundo filtrante preparado no ponto 1).

Lavou-se o copo e o precipitado de óxido cuproso com água aquecida a  $60^\circ\text{C}$ . Em seguida, lavou-se só o precipitado de óxido cuproso com 10ml de álcool etílico e com 10ml de éter etílico. Secou-se o cadinho em estufa a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 30min, arrefeceu-se no exsiccador e pesou-se.

### 5) Determinação de açúcares totais

#### 5.1) Inversão

Para um balão de 100ml, mediram-se 50ml do filtrado obtido em 3) e 3,5ml de ácido clorídico concentrado a 37%. Agitou-se e colocou-se em banho de água a  $69 \pm 1^\circ\text{C}$ , mantendo o balão exactamente 5min. após o líquido nele contido tivesse atingido aquela temperatura. Arrefeceu-se de imediato e, em seguida, neutralizou-se com a solução de

hidróxido de sódio (30g/100ml) em presença do indicador de fenolftaleína. Adicionaram-se umas gotas de ácido clorídico diluído (HCL 3,7%) até o meio ficar ligeiramente acidificado. Agitou-se e perpez-se o volume do balão com água.

#### 5.2) Doseamento

Procedeu-se como em 4), substituindo o volume  $V_1$  da solução defecada por um volume  $V_2$  da solução obtida em 5.1).

#### ***Expressão dos resultados:***

Sendo:

$m$ - a massa, em gramas, da toma para análise

$m_r$ - a massa, em miligramas, de açúcar invertido, que na tabela no anexo II, corresponde à massa de óxido cuproso obtido na determinação 4).

$m_t$ - a massa, em miligramas, de açúcar invertido, que na tabela no anexo II, corresponde à massa de óxido cuproso obtido na determinação 5.2)

$V_1$ - o volume, em ml, do filtrado obtido após defecação e utilizado em 4)

$V_2$ - o volume, em ml, do filtrado obtido após a defecação e inversão e utilizado em 5.2)

o teor de açúcares redutores, expresso em açúcar invertido, em % em massa é:  $\frac{20.m_r}{V_1.m}$

o teor de açúcares totais, expresso em açúcar invertido, em % em massa é:  $\frac{40.m_t}{V_2.m}$

o teor de açúcares não redutores, expresso em sacarose, em % em massa é:

$$\left( \frac{40.m_t}{V_2.m} - \frac{20.m_r}{V_1.m} \right) \times 0,95$$

#### 7) Determinação de metais (Vandecasteele e Block, 1993)

A determinação é efectuada a partir da digestão das cinzas.

- 1) As cinzas obtidas foram digeridas com 10ml de  $\text{HNO}_3$  1:1, em banho-maria a  $95^\circ\text{C}$ , durante 1 hora. Retirou-se a cápsula do banho e deixou-se arrefecer.
- 2) Filtrou-se a amostra para um balão volumétrico de 100ml, lavando a cápsula com água desionizada. Aferiu-se o balão com água desionizada.

3) Os metais foram determinados nas soluções digeridas num espectrofotómetro de absorção atómica (Unicam, modelo 939).

***Expressão dos resultados:***

Os resultados obtidos foram determinados da seguinte forma:

$$[\text{metal (mg/l)}] = \frac{x(\text{mg/l}) \cdot 100}{\text{amostra(g)}} \quad \text{ou} \quad [\text{metal (\%)}] = \frac{x(\text{mg/l})}{\text{amostra(g)} \cdot 100}$$

em que

x(mg/l) é a leitura obtida pelo espectrofotómetro

**8) Determinação da gordura bruta (AOAC, 1990)**

- 1) Prepararam-se cartuxos em papel de filtro, com cerca de 1-5g de amostra (consoante a amostra).
- 2) Cada cartuxo foi colocado num Soxhlet de 250ml. Procedeu-se à extracção em Soxhlet, utilizando hexano como solução extractante, para um balão de 500ml previamente tarado e seco em estufa (WTB binder E28) a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante pelo menos 8 horas.
- 3) Após extracção, o hexano foi evaporado e o resíduo obtido seco a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  durante uma hora. O balão foi colocado num exsiccador para arrefecimento e pesado numa balança analítica (Mettler Toledo AB 204).

***Expressão dos resultados:***

O conteúdo em gordura bruta é determinado do seguinte modo:

$$\% \text{ gordura} = \frac{\text{gordura(g)}}{\text{amostra(g)}} \times 100$$

em que

gordura(g) = peso do balão com gordura (g) - peso do balão tarado (g)

## Referências

Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A. e Dauvillier, P. (2000) *Análisis nutricional de los alimentos*. Tradução espanhola. Editorial Acribia, S.A., Saragoça, Espanha

AOAC (1990) *Official Methods of Analysis. Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs*. Volume I, 15<sup>th</sup> Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, EUA

NP 1419 (1988), *Frutos, produtos hortícolas e seus derivados- determinação dos açúcares totais, dos açúcares redutores e dos açúcares não redutores(sacarose). Técnica de Munson e Walker. Processo de referência; 2ª edição 1988; Instituto Português da Qualidade, 9p.*

Vandecasteele, C. e Block, C.B. (1993) *Modern Methods for Trace Element Determination*, John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido

Watanabe, F.S. e Olsen, S.R. (1965) Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from the soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **29**, 677-78

Watts, S. e Halliwell, L. (1996) Appendix 3 – Detailed field and chemical methods for soil. In: Watts, S. and Halliwell, L. (eds), *Essential Environmental Science, Methods & Techniques*, Routledge, Londres, Reino Unido, pp.475-505