

# METODOLOGIAS EM CINÉTICA E MODELAGEM DE PROCESSOS

Mariana Alencar da Macena Viana  
Glêndara Aparecida de Souza Martins



LABORATÓRIO DE CINÉTICA E  
MODELAGEM DE PROCESSOS

Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos  
Universidade Federal do Tocantins

# MÉTODOS ANALÍTICOS DE PESQUISA DO LACIMP

Organizadoras

Mariana Alencar da Macena Viana  
Glêndara Aparecida de Souza Martins

Palmas – TO  
2026

# Universidade Federal do Tocantins

## Editora da Universidade Federal do Tocantins - EDUFT

Reitora  
Maria Santana Ferreira dos Santos Milhomem

Vice-reitor  
Marcelo Leineker Costa

Pró-Reitor de Administração e Finanças (PROAD)  
Carlos Alberto Moreira de Araújo

Pró-Reitor de Avaliação e Planejamento  
(PROAP)  
Eduardo Andrea Lemus Erasmo

Pró-Reitor de Assuntos Estudantis  
(PROEST)  
Kherley Caxias Batista Barbosa

Pró-Reitor de Extensão, Cultura e Assuntos  
Comunitários (PROEX)  
Bruno Barreto Amorim Campos

Pró-Reitora de Gestão e Desenvolvimento de Pessoas  
(PROGEDEP)  
Michelle Matilde Semiguem  
Lima Trombini Duarte

Pró-ReitorA de Graduação (PROGRAD)  
Valdirene Gomes dos Santos de Jesus

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ)  
Marcos Vinicius Giongo Alves

Pró-Reitor de Tecnologia e Comunicação (PROTIC)  
Olívia Tozzi Bittencourt

Conselho Editorial  
Presidente  
Ruhena Kelber Abrão

Membros do Conselho por Área

*Ciências Biológicas e da Saúde*  
Ruhena Kelber Abrão

*Ciências Humanas, Letras e Artes*  
Fernando José Ludwig

*Ciências Sociais Aplicadas*  
Ingrid Pereira de Assis

*Interdisciplinar*  
Wilson Rogério dos Santos



<http://www.abecbrasil.org.br>



<http://www.abeu.org.br>

O padrão ortográfico e o sistema de citações e referências bibliográficas são prerrogativas de cada autor. Da mesma forma, o conteúdo de cada capítulo é de inteira e exclusiva responsabilidade de seu respectivo autor.

Copyright © 2026 – Universidade Federal do Tocantins – Todos direitos reservados  
[www.uft.edu.br](http://www.uft.edu.br)

Universidade Federal do Tocantins (UFT) | Câmpus de Palmas Avenida NS 15, Quadra 109 Norte |  
Plano Diretor Norte Bloco IV, Reitoria  
Palmas/TO | 77001-090



Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Métodos analíticos de pesquisa do LACIMP [livro eletrônico] / organização Mariana Alencar da Macena Viana, Glêndara Aparecida de Souza Martins. -- Palmas, TO : Editora Universitária - EdUFT, 2026.  
PDF

Vários autores.  
Bibliografia.  
ISBN 978-65-5390-238-1

1. Alimentos 2. Alimentação - Obras de divulgação  
3. Pesquisa - Metodologia 4. Pesquisa científica  
5. Tecnologia de alimentos I. Viana, Mariana Alencar da Macena. II. Martins, Glêndara Aparecida de Souza.

26-350224.0

CDD-664

Índices para catálogo sistemático:

1. Tecnologia de alimentos 664

Eliane de Freitas Leite - Bibliotecária - CRB 8/8415

# *Apresentação*

A ciência dos alimentos é, antes de tudo, uma forma de cuidar da vida e da saúde das pessoas. Este livro foi elaborado com o propósito de reunir metodologias e conhecimentos utilizados na avaliação dos compostos bioativos e propriedades funcionais presentes nas matrizes vegetais. Ao longo das páginas, o leitor encontrará protocolos detalhados, explicações claras e referências fundamentais para a execução de análises *in vitro* relacionadas à atividade antioxidante, antidiabética, anti-hipertensiva e outras abordagens de interesse na área de alimentos e saúde.

O objetivo é oferecer um material didático e prático, que sirva como apoio a estudantes, técnicos e pesquisadores que utilizam metodologias laboratoriais no estudo dos alimentos. Que esse material contribua para o aprendizado, a padronização de análises e no desenvolvimento de artigos científicos de alto impacto na área da ciência dos alimentos.



## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Fatores de conversão de nitrogênio em proteína

Tabela 2 - Preparo de curva padrão para análise de Taninos

Tabela 3 - Preparo de curva padrão para análise de Taninos Condensados

Tabela 4 - Preparo de curva padrão para inibição do radical DPPH

Tabela 5 - Preparo de curva padrão para inibição do radical FRAP

Tabela 6 - Dados médios para curva padrão para inibição do radical ABTS<sup>+</sup>

Tabela 7- Dados para preparo da curva padrão de Vitamina C

Tabela 8 - Dados para preparo da curva de amostra de Vitamina C

Tabela 9 - Dados para construção da curva de calibração para determinação de ortodifenóis

Tabela 10 - Dados para curva padrão para o método de Folin-Ciocalteu

Tabela 11- Dados para preparo da curva para compostos fenólicos

Tabela 12 - Dados para construção da curva analítica para o método de Folin-Ciocalteu

Tabela 13 - Dados para construção da curva analítica do método do Azul da Prússia

Tabela 14 - Preparo da curva da amostra para análise de Flavonoides

Tabela 15 - Dados para o preparo da curva de quecertina

Tabela 16 - Concentração de solução estoque para preparo de fluidos (salivar, gástrico e intestinal)

Tabela 17- Solução estoque (mL) para preparação de fluidos (salivar, gástrico e intestinal)

Tabela 18 - Informações necessárias para as equações 1 e 2

Tabela 19 - Reagentes da fase oral

Tabela 20 - Reagentes da fase gástrica

Tabela 21- Reagentes da fase intestinal

## Sumário

Capítulo 01	8
1.1. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE (PERDA POR DESSECAÇÃO EM ESTUFA A 105°C)	9
1.2. DETERMINAÇÃO DE CINZAS	11
1.3. FIBRA BRUTA	13
1.4. PROTÍDIOS (PROTEÍNA BRUTA) MÉTODO DE KJELDAHL CLÁSSICO	16
1.5. LIPÍDIOS OU EXTRATO ETÉREO – EXTRAÇÃO DIRETA POR SOXHLET	19
1.6. CARBOIDRATOS (POR DIFERENÇA)	22
1.7. POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH)	23
1.8. ACIDEZ TITULÁVEL	25
1.9. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS	29
1.10. EXTRAÇÃO DE AMIDO	31
1.11. DETERMINAÇÃO DE PECTINA	34
1.12. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ	37
1.13. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO	39
1.14. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO	41
1.15. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO	43
Capítulo 02	45
2.1. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS CIANOGENÍOS (TESTE DE GUIGNARD – QUALITATIVO)	45
2.2. DETERMINAÇÃO DE TANINOS (TESTE QUALITATIVO COM CLORETO FÉRRICO)	47
2.3. DETERMINAÇÃO DE TANINOS (MÉTODO QUANTITATIVO – FOLIN-DENIS)	49
2.4. DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS PELO ENSAIO DE VANILINA/ÁCIDO SULFÚRICO	54
2.5. DETERMINAÇÃO DE INIBIDOR DE TRIPSINA	57
Capítulo 03	60
3.1. PREPARO DE EXTRATOS E AMOSTRAS	60
3.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA CAPTURA DE RADICAIS LIVRES DPPH	61
3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA CAPTURA DE RADICAIS LIVRES - DPPH MODIFICADO	64
3.4. MEDIÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO DE FERRO (FRAP)	68
3.5. MEDIÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS+	73
3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM FRUTAS NO SISTEMA B-CARÓTENO/ÁCIDO LINOLÉICO	77
3.7. DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS	82
3.8. DETERMINAÇÃO DE ORTODIFENÓIS	86

3.9. CAPACIDADE REDUTORA TOTAL DE EXTRATOS VEGETAIS	89
Capítulo 04	92
4.1. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	92
4.2. COMPOSTOS FENÓLICOS - MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU - QUANTITATIVO	96
4.3. COMPOSTOS FENÓLICOS - MÉTODO AZUL DA PRÚSSIA - QUANTITATIVO	98
4.4. ANTOCIANINAS TOTAIS	101
4.5. ANTOCIANINAS POR PH DIFERENCIAL	104
4.6. CAROTENOIDES TOTAIS	107
4.7. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS	109
4.8. DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS	111
4.9. DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIS EM EXTRATOS	114
Capítulo 05	117
5.1. SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL IN VITRO	117
5.2. MÉTODO DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE GEMA DE OVO TAMPONADA POR EXTRATOS	124
5.3. ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA (INIBIÇÃO DA A-AMILASE E DA A-GLUCOSIDASE)	126
5.4. INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE	126
5.5. INIBIÇÃO DA ALFA-GLUCOSIDASE	128
5.6. ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA (INIBIÇÃO DA ECA)	129
Capítulo 06	136
6.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

**Importante**

**Observação para a preparação das amostras fresca e seca**

As análises de umidade, sólidos solúveis totais, pH e acidez devem ser realizadas e expressas em base úmida, quando determinadas em amostras *in natura*, considerando a composição original do material sem remoção prévia de água.

As demais análises deverão ser conduzidas e expressas em base seca, sendo necessária a correção dos resultados com base no teor de umidade da amostra. Essa padronização permite maior comparabilidade entre os resultados e evita interferências causadas pela variação no conteúdo de água das amostras.

Quando a amostra analisada estiver na forma de farinha ou material previamente seco, todas as determinações podem ser realizadas diretamente em base seca.

**Observação para a preparação das amostras de óleos e gorduras**

Para as análises de índice de refração, índice de acidez, índice de saponificação e índice de peróxido, as amostras de óleos e gorduras devem estar homogêneas, isentas de umidade e de impurezas sólidas, a fim de evitar interferências nos resultados analíticos.

Quando se tratar de gorduras sólidas ou semissólidas, estas devem ser previamente fundidas em banho-maria a temperatura moderada, suficiente apenas para promover a completa liquefação, evitando aquecimento excessivo que possa provocar alterações químicas, como oxidação ou degradação dos lipídios.

## 1.1. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE (PERDA POR DESSECAÇÃO EM ESTUFA A 105°C)

### Objetivo

Determinar o teor de umidade de alimentos por meio da perda de massa obtida após secagem em estufa a 105°C até peso constante.

### Princípio do Método

Todos os alimentos contêm certa quantidade de água, variando conforme o tipo e o grau de processamento. A umidade pode estar presente na superfície (água livre) ou no interior do alimento (água adsorvida). O método de secagem direta em estufa baseia-se na remoção da água pela evaporação, determinando-se a umidade pela diferença de peso antes e após o aquecimento.

### Materiais e Equipamentos

- Estufa com controle de temperatura (105°C)
- Balança analítica
- Dessecador com sílica gel
- Cápsulas de porcelana ou metal ou placas de Petri (diâmetro de aproximadamente 8,5 cm)
  - Pinça metálica
  - Espátula de metal

### Procedimento

- Pesar de 2 a 10 g da amostra *in natura* em cápsula de porcelana previamente tarada
  - Levar à estufa a 105°C por 3 horas
  - Retirar a cápsula e resfriar em dessecador até a temperatura ambiente
    - Pesar novamente
    - Repetir o ciclo de aquecimento e resfriamento até que o peso se mantenha constante.

## Cálculo

$$Umidade(\%) = \frac{N}{P} * 100 \text{ (umidade a } 105^{\circ}\text{C por cento m/m)}$$

Onde:

N: Perda de massa (g)

P: Massa inicial da amostra (g).

## Observações

- A amostra deve estar em temperatura ambiente
- Evitar que a amostra fique exposta por longos períodos, pois pode ocorrer perda ou ganho de umidade antes da análise
- A amostra na cápsula deve ser uniforme e fina, para favorecer a secagem completa
- Após a secagem, a cápsula deve ser levada imediatamente para o dessecador, até atingir a temperatura ambiente, antes da pesagem final.
- O controle do tempo de secagem deve ser rigoroso, realizando pesagens sucessivas até peso constante
- Evitar abrir a estufa repetidamente durante o processo, pois isso pode causar variações de temperatura, podendo afetar a secagem
- A temperatura de 105°C é comumente utilizada em procedimentos de secagem, no entanto, em alguns casos, essa condição pode provocar a degradação ou queima da amostra, especialmente quando se trata de matrizes ricas em compostos sensíveis ao calor. Dessa forma, recomenda-se ter atenção ao processo, avaliando a natureza da amostra, e se necessário, adotar temperaturas mais baixas ou tempo de exposição reduzidos para evitar perdas ou alterações indesejadas.

## Referência Bibliográfica

(Instituto Adolfo Lutz, 2008).

## 1.2. DETERMINAÇÃO DE CINZAS

### Objetivo

Determinar o teor de cinzas totais presentes em alimentos, correspondendo ao resíduo mineral obtido após a incineração da amostra a alta temperatura (550–570°C).

### Princípio do Método

O resíduo por incineração ou cinzas, é o resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a (550 - 570) °C.

Durante a incineração, alguns sais podem sofrer volatilização ou redução, resultando em perdas parciais. Para amostras com sais de metais alcalinos que retêm dióxido de carbono, utiliza-se tratamento prévio com solução diluída de ácido sulfúrico, seguido de secagem e nova incineração, o resíduo obtido é denominado “cinzas sulfatizadas”. Muitas vezes, é vantajoso combinar a determinação direta de umidade e a determinação de cinzas, incinerando o resíduo obtido na determinação da umidade.

A incineração completa produz um resíduo branco ou ligeiramente acinzentado, representando o conteúdo mineral estável do alimento.

### Materiais e Equipamentos

- Cápsula de porcelana ou platina (capacidade de 50 mL)
- Mufla (550 – 570) °C
- Banho-maria
- Dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro
- Chapa elétrica
- Balança analítica
- Espátula e pinça metálica

## Procedimento

- Pesar 5 a 10 g da amostra seca em cápsula previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriada em dessecador e tarada. Caso a amostra for líquida, evaporar previamente em banho-maria.
- Secar a amostra em chapa elétrica e, em seguida, carbonizar em baixa temperatura até cessar a fumaça.
- Transferir a cápsula para a mufla a 550°C e incinerar até eliminação completa do carvão (cinzas brancas ou ligeiramente acinzentadas). Caso contrário, esfrie, adicione 0,5 mL de água, seque e incinere novamente.
- Após incineração completa, resfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesar.
- Repetir o ciclo de aquecimento e resfriamento até atingir peso constante.

## Observações

- A mufla deve estar previamente estabilizada na temperatura de 550 – 570°C antes de colocar as amostras
- Podem ser utilizadas cápsulas de outros metais resistentes ao calor, desde que as cinzas não sejam empregadas em posterior análise de metais.
- Em caso de borbulhamento, adicionar algumas gotas de óleo vegetal para facilitar a carbonização.
- Deve-se tomar cuidado ao manusear a mufla e as cápsulas, utilizando sempre pinça apropriada e equipamentos de proteção individual (EPI), devido às altas temperaturas.
- Algumas substâncias minerais podem sofrer volatilização ou decomposição durante a incineração, podendo levar a subestimação do teor real de minerais.

## Cálculo

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{N}{P} * 100$$

Onde:

N: Massa de cinzas (g);  
P: Massa da amostra (g).

## Referências Bibliográficas

(AOAC, 2012; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

### 1.3. FIBRA BRUTA

#### Objetivo

Determinar o teor de fibra bruta presente nos alimentos, representando a fração orgânica resistente à digestão por ácidos e bases diluídos, composta principalmente por celulose e lignina.

#### Princípio do Método

A fibra bruta é a fração do alimento que resiste à digestão sob condições rigorosas de tratamento ácido e oxidante. Embora não represente o total de fibras alimentares (por não incluir hemiceluloses e substâncias solúveis), esse método é amplamente utilizado para comparação entre alimentos e controle de qualidade de produtos vegetais e ração animal.

O procedimento envolve a extração de lipídeos com éter, seguida de hidrólise ácida controlada e posterior incineração do resíduo para determinar a fração fibrosa. A perda de massa após a incineração corresponde ao teor de fibra bruta.

#### Materiais e Equipamentos

- Estufa com controle de temperatura (105°C)
- Mufla (550°C)
- Dessecador com sílica gel indicadora
- Frascos Erlenmeyer de 750 mL com boca esmerilhada
- Refrigerador de refluxo longo com boca inferior esmerilhada
- Papel tornassol (indicador de pH natural)
- Proveta de 100 mL
- Pipetas de 20 mL

- Cadinho de Gooch de porcelana com camada de filtração

## Reagentes

- Éter etílico
- Álcool etílico
- Areia diatomácea (agente filtrante)

Preparo da solução ácida

Em um béquer de 1000 mL, misturar:

- 500 mL de ácido acético glacial
- 450 mL de água
- 50 mL de ácido nítrico
- 20 g de ácido tricloracético.

## Procedimento

- Pesar 2 g da amostra seca e envolver em papel de filtro, amarrando-o com lã.
- Realizar extração contínua em aparelho de Soxhlet, utilizando éter como solvente
  - Aqueça em estufa para eliminar o resto de solvente.
  - Transferir o resíduo para um frasco Erlenmeyer de 750 mL, com boca esmerilhada
    - Adicionar 100 mL da solução ácida e 0,5 g de agente de filtração (areia diatomácea)
    - Acoplar o refrigerador de refluxo e aquecer por 40 minutos, contados a partir da adição da solução ácida, mantendo sob aquecimento.
    - Agitar frequentemente para evitar o ressecamento nas paredes do frasco.
    - Filtrar o conteúdo ainda quente em cadinho de porcelana previamente preparado com camada de areia diatomácea, utilizando vácuo.
    - Lavar o resíduo com água fervente até que o filtrado não apresente reação ácida (verificar com papel tornassol).

- Lavar em seguida com 20 mL de álcool e 20 mL de éter.
  - Aquecer em estufa a 105°C por 2 horas.
  - Resfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesar.
  - Pesar e repetir o processo de aquecimento e resfriamento até peso constante.
  - Incinerar o resíduo em mufla a 550°C até eliminar toda a matéria orgânica.
  - Resfriar novamente em dessecador até temperatura ambiente
  - Pesar e repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante
- ☐ A perda de massa após a incineração corresponde ao teor de fibra bruta da amostra.

### Cálculo

$$\text{Fibra bruta (\%)} = \frac{N}{P} * 100$$

Onde:

N: Massa de cinzas (g)

P: Massa da amostra (g).

### Observações

- A análise de Fibra Bruta requer aparelhos e infraestrutura que não estão disponíveis neste laboratório. Nesse caso, a análise pode ser realizada em laboratórios parceiros (LAPEQ ou LANA). É importante verificar antecipadamente a disponibilidade dos equipamentos e alinhar o procedimento com o responsável pelo laboratório parceiro antes de iniciar a análise.
- A amostra deve estar previamente seca e homogênea, para garantir a precisão na pesagem.
- A extração no Soxhlet deve ser contínua e eficiente.
- A filtração deve ser realizada com cuidado, evitando perdas de material durante a transferência e lavagem.

- Caso a amostra tenha alto teor de minerais, o valor da fibra pode ser afetado, sendo importante a correta etapa de incineração para descontar o resíduo mineral.
- Sempre realizar a análise em triplicata, para garantir a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados.

### Referência Bibliográfica

(Instituto Adolfo Lutz, 2008).

## 1.4. PROTÍDIOS (PROTEÍNA BRUTA) MÉTODO DE KJELDAHL CLÁSSICO

### Objetivo

Determinar o teor de proteínas (protídios) em alimentos por meio da quantificação do nitrogênio total utilizando o método de Kjeldahl, composto pelas etapas de digestão, destilação e titulação.

### Princípio do Método

O método de Kjeldahl, proposto em 1883, é o procedimento clássico para determinação do nitrogênio total em substâncias orgânicas.

O princípio baseia-se na conversão do nitrogênio orgânico em amônia ( $\text{NH}_3$ ) através de digestão ácida, seguida pela destilação da amônia liberada e titulação para quantificação.

As etapas principais incluem a digestão, onde a amostra é tratada com ácido sulfúrico concentrado na presença de um catalisador (mistura de dióxido de titânio, sulfato de cobre e sulfato de potássio), que acelera a oxidação da matéria orgânica e transforma o nitrogênio em sulfato de amônio. Seguida da destilação, onde o meio é alcalinizado com hidróxido de sódio, liberando a amônia, que é destilada e capturada em solução padronizada de ácido sulfúrico 0,05 M e a titulação, onde o excesso de ácido é titulado com hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando vermelho de metila como indicador.

O teor de nitrogênio total obtido é convertido em proteína bruta (protídios) multiplicando-se pelo fator empírico 6,25, correspondente ao teor médio de 16% de nitrogênio nas proteínas.

Em alguns alimentos específicos, utiliza-se fator de conversão diferenciado conforme a Tabela 1 do IAL (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

Tabela 1 – Fatores de conversão de nitrogênio total em proteína.

Alimento	Fator	Alimento	Fator
Farinha de centeio	5,83	Castanha do Pará	5,46
Farinha de trigo	5,83	Avelã	5,30
Macarrão	5,70	Coco	5,30
Cevada	5,83	Outras nozes	5,30
Aveia	5,83	Leite e derivados	6,38
Amendoim	5,46	Margarina	6,38
Soja	6,25	Gelatina	5,55
Arroz	5,95	Outros alimentos	6,25
Amêndoas	5,18	-	-

Fonte: Instituto Adolfo Lutz

## Materiais e Equipamentos

- Balança analítica
- Frascos de Kjeldahl (500 a 800 mL)
- Chapa elétrica ou manta aquecedora
- Balão de destilação
- Frasco Erlenmeyer (500 mL)
- Bureta de 25 mL
- Espátula
- Papel de seda
- Dedal de extração
- Pipeta graduada de 25 mL ou pipetador automático

## Reagentes

- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido sulfúrico 0,05 M
- Hidróxido de sódio a 30% (m/v)
- Hidróxido de sódio 0,1 M
- Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$  )
- Sulfato de potássio ( $\text{K}_2 \text{SO}_4$  )
- Dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$  )
- Zinco em pó
- Fenolftaleína (indicador)
- Vermelho de metila 1% (m/v)

Mistura catalítica - Dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3: 0,3: 6.

### Procedimento

- Pesar 1 g da amostra seca em papel de seda e transferir (papel + amostra) para o balão de Kjeldahl.
- Adicionar 25 mL de ácido sulfúrico concentrado e aproximadamente 6 g da mistura catalítica.
- Aquecer em chapa elétrica, sob capela, até a solução tornar-se azul-esverdeada e isenta de partículas escuras (carbonáceas).
- Manter o aquecimento por mais 1 hora após clarificação da amostra e deixar esfriar.
- Transferir quantitativamente o conteúdo para o balão de destilação (caso o sistema não seja automático).
- Adicionar 10 gotas de fenolftaleína e 1 g de zinco em pó para auxiliar a quebra de moléculas de proteínas.
- Conectar o balão ao sistema de destilação, cuja saída deve estar mergulhada em 25 mL de ácido sulfúrico 0,05 M, contendo 3 gotas de vermelho de metila.
- Adicionar lentamente solução de hidróxido de sódio a 30% (m/v) até observar ligeiro excesso de base.

- Aquecer até ebulição e destilar até coletar aproximadamente 250–300 mL do destilado.
- Titular o excesso de ácido com hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando vermelho de metila como indicador.

### Cálculo

$$\text{Nitrogênio (\%)} = \frac{V * N * 14,007 * 100}{P * 1000}$$

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \text{Nitrogênio (\%)} * f$$

Onde:

V = diferença entre o volume de ácido sulfúrico 0,05 M e o volume de hidróxido de sódio 0,1 M (mL).

N = normalidade da solução ácida (0,05 N).

P = massa da amostra (g).

f = fator de conversão (geralmente 6,25; varia conforme o alimento, conforme tabela 6).

### Observações

- A análise de Proteína requer aparelhos e infraestrutura que não estão disponíveis neste laboratório. Nesse caso, a análise pode ser realizada em laboratórios parceiros como o LANA (Laboratório de Análise de Alimentos). É importante verificar antecipadamente a disponibilidade dos equipamentos e alinhar o procedimento com o responsável pelo laboratório parceiro antes de iniciar a análise.

### Referência Bibliográfica

(Instituto adolfo lutz, 2008).

## 1.5. LIPÍDIOS OU EXTRATO ETÉREO - EXTRAÇÃO DIRETA POR SOXHLET

### Objetivo

Determinar o teor de lipídios totais (extrato etéreo) em amostras de alimentos por meio de extração contínua com éter etílico em

aparelho tipo Soxhlet, método clássico descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

### Princípio do Método

O método baseia-se na extração contínua das substâncias solúveis em solventes orgânicos, principalmente lipídios, por meio de refluxo em aparelho tipo Soxhlet.

Durante o processo, o solvente é aquecido e vaporizado, condensando-se no cartucho que contém a amostra. Esse ciclo contínuo dissolve os lipídios, que são arrastados para o balão inferior, onde o solvente é posteriormente removido por destilação, restando o resíduo graxo. O resíduo seco e constante representa a fração lipídica da amostra.

### Materiais e Equipamentos

- Aparelho extrator de Soxhlet
- Bateria de aquecimento com refrigerador de bolas
- Balança analítica
- Estufa com controle de temperatura (105 °C)
- Balão de fundo chato (250 a 300 mL) com boca esmerilhada
- Cartucho de Soxhlet ou papel de filtro (12 cm de diâmetro)
- Lã desengordurada
- Algodão
- Espátula
- Dessecador com sílica gel

### Reagente

- Éter etílico ou Hexano (solvente de extração)

### Procedimento

- Pesar de 2 a 5 g da amostra (amostra seca) em cartucho de Soxhlet ou em papel de filtro, amarrado com fio de lã desengordurado.
- Para amostras líquidas, pipetar o volume desejado e esgotar sobre algodão disposto em papel de filtro duplo.
- Secar a amostra em estufa a 105 °C por 1 hora.
- Montagem: transferir o cartucho ou o papel de filtro para o extrator de Soxhlet, acoplado a um balão previamente tarado a 105 °C.
- Extração: adicionar éter etílico em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio.
- Adaptar o refrigerador de bolas e proceder à extração contínua sob aquecimento moderado, observando a taxa de gotejamento:
  - 8 horas: 4 a 5 gotas por segundo
  - 16 horas: 2 a 3 gotas por segundo
  - Recuperação do solvente: ao término, remover o cartucho e destilar o éter do balão.
- Secagem e pesagem: colocar o balão com o resíduo graxo em estufa a 105 °C por 1 hora.
- Resfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesar.
- Repetir as operações de aquecimento (30 min) e resfriamento até peso constante (máximo 2 horas).

## Cálculo

$$\text{Teor de lipídios (\%)} = \frac{N \cdot 100}{P}$$

Onde:

- N = massa de lipídios (g)
- P = massa da amostra (g).

## Observações

- Para a extração de lipídeos pelo método Soxhlet, a amostra deve estar previamente seca (pode utilizar a amostra submetida à

análise de umidade a 105°C), a fim de evitar interferência da umidade na extração.

- No caso de produtos contendo alta proporção de carboidratos, pese a amostra sob papel de filtro e lave com cinco porções de 20 mL de água. Coloque em estufa a 105°C por uma hora para secagem e proceda a extração conforme acima descrito.

- Em produtos com alta proporção de carboidratos, pesar a amostra sobre papel de filtro e lavar com cinco porções de 20 mL de água antes da secagem

- Proceder à secagem em estufa a 105 °C por 1 hora antes da extração.

## Referência Bibliográfica

(AOAC, 2012; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

### 1.6. CARBOIDRATOS (POR DIFERENÇA)

O teor de carboidratos totais é determinado por diferença, considerando-se as demais frações da composição centesimal previamente quantificadas (umidade, proteínas, lipídios, cinzas e fibra bruta).

O cálculo baseia-se na subtração da soma percentual desses constituintes de 100, conforme a expressão:

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - (\text{Umidade} + \text{Proteínas} + \text{Lipídios} + \text{Cinzas} + \text{Fibras}).$$

As análises da composição centesimal são realizadas de acordo com a metodologia proposta pela Association of Official Analytical Chemists, e os resultados devem ser expressos em gramas por 100 gramas de amostra (g/100g).

## Observações

- A determinação de carboidratos é um método indireto, portanto, eventuais erros analíticos nas demais frações influenciam diretamente no resultado final.

- Recomenda-se que todas as análises da composição centesimal sejam realizadas em triplicata, a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados.
- É fundamental que os valores utilizados no cálculo estejam expressos na mesma base (base úmida ou base seca)
- O método não permite a quantificação individual dos tipos de carboidratos (açúcares, amido, oligossacarídeos), sendo indicado apenas para estimativa do teor total.

### Referência Bibliográfica

(AOAC, 2012).

## 1.7. POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH)

### Objetivo

Determinar o Potencial Hidrogeniônico (pH) de amostras de alimentos por método eletrométrico, utilizando pHmetro devidamente calibrado.

### Princípio do Método

O pH é determinado com o auxílio de um potenciômetro digital devidamente calibrado, conforme metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012) e Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 2008). A análise permite avaliar o grau de acidez ou alcalinidade do alimento, sendo expressa como o valor direto de pH obtido pelo equipamento.

O pH pode ser determinado por métodos colorimétricos, que utilizam indicadores ácido-base cuja coloração varia conforme a concentração de íons hidrogênio ( $H^+$ ) e métodos eletrométricos, que utilizam potenciômetros (pHmetros) adaptados para medição direta e precisa do potencial hidrogeniônico.

### Materiais e Equipamentos

- Béqueres de 50 mL e 150 mL.

- Proveta de 100 mL.
- pHmetro calibrado
- Balança analítica
- Espátula metálica
- Agitador magnético.

## Reagentes

- Soluções tampão padrão de pH 4,0.
- Soluções tampão padrão de pH 7,0.
- Soluções tampão padrão de pH 10,0.

## Procedimento

- Pesar 10 g de amostra (fresca) em um béquer.
- Adicionar aproximadamente 100 mL de água destilada.
- Agitar até que as partículas estejam uniformemente suspensas.
  - Calibrar pHmetro utilizando as soluções tampão adequadas (pH 4, pH 7 e/ou 10, conforme a faixa da amostra).
  - Determinar o pH com o aparelho previamente calibrado, seguindo as instruções do fabricante.

## Observações

- No caso de amostras líquidas, a determinação do pH pode ser feita diretamente, sem necessidade de diluição.
  - A amostra deve estar previamente homogeneizada.
  - O eletrodo deve ser enxaguado com água destilada entre as leituras e seco cuidadosamente com papel absorvente sem friccionar.
    - Não permitir que o eletrodo seque durante o uso.
    - Após a análise, armazenar o eletrodo em solução de armazenamento apropriada (geralmente solução de KCl).
    - Realizar a calibração do equipamento antes da análise.

- Evitar medir diretamente amostras com alta viscosidade ou presença de gordura sem diluição prévia, para não danificar o eletrodo.

## Referência Bibliográfica

(AOAC, 2012; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

## 1.8. ACIDEZ TITULÁVEL

### Objetivo

Determinar a acidez titulável total em amostras de alimentos, expressando os resultados em gramas de ácido predominante por 100 g de amostra (g/100g). Essa análise fornece uma estimativa da quantidade total de ácidos orgânicos presentes e é um importante indicador de qualidade, frescor e estabilidade de produtos alimentícios.

### Princípio do Método

A acidez titulável total corresponde à quantidade total de substâncias ácidas capazes de reagir com uma base forte, geralmente hidróxido de sódio (NaOH).

O método baseia-se na neutralização ácido-base, na qual a amostra é diluída em água destilada e titulada com uma solução padronizada de NaOH 0,1 M, utilizando um indicador ácido-base (fenolftaleína ou outro apropriado).

O ponto final da titulação é atingido quando ocorre a mudança de coloração do indicador, indicando que os ácidos presentes na foram neutralizados.

Os resultados são expressos em gramas do ácido predominante (ex.: ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, dependendo do alimento) por 100 g de amostra.

### Materiais e Equipamentos

- Proveta de 50 mL.
- Frasco Erlenmeyer de 125 mL.

- Bureta de 25 mL.
- Balança analítica
- Espátula metálica
- Pipetas volumétricas de 1 mL e 10 mL

## Reagentes

- Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, padronizado
- Solução de fenolftaleína (1% m/v)

## Preparo das Soluções

### Solução de Ácido Ftálico Padrão (para padronização do NaOH)

#### Preparo

- Secar o ácido ftálico primário em estufa a 105 °C por 2 horas antes de usar
- Armazenar em dessecador até resfriar
- Utilizar diretamente para a titulação da solução de NaOH

### Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,1 M

A solução de NaOH 0,1 M é usada como solução titulante na neutralização dos ácidos presentes na amostra.

#### Preparo

- Dissolver 4,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) em aproximadamente 800 mL de água destilada.
- Transferir a solução para um balão volumétrico de 1 L e completar o volume com água destilada até o menisco.
- Armazenar em frasco de vidro âmbar bem vedado, para evitar absorção de CO<sub>2</sub> do ar.
- Padronizar a solução antes do uso.

### Padronização da solução de NaOH 0,1 M

- Utilizar ácido ftálico primário (ácido benzênodioico 1,2-dicarboxílico) como padrão primário.
  - Secar o ácido ftálico primário em estufa a 105°C por 2 horas.
  - Dissolver em 50 mL de água destilada.
  - Adicionar 2 a 3 gotas de fenolftaleína 1%.
  - Titular com a solução de NaOH até o aparecimento de coloração rosada persistente por 30 segundos.
  - Calcular a normalidade exata (N) da solução com base no volume gasto.

$$N(\text{NaOH}) = \frac{\text{Massa do padrão (g)} * 1000}{\text{PM} * \text{volume gasto (mL)}}$$

Onde:

PM: Ácido ftálico primário (204,22 g/mol).

### Solução Indicadora de Fenolftaleína 1% (m/v)

- Dissolver 1,0 g de fenolftaleína em 50 mL de etanol 95% (v/v)
- Completar o volume a 100 mL com água destilada
- Armazenar em frasco âmbar, ao abrigo da luz
- O indicador é incolor em meio ácido e rosado em meio básico (pH de viragem: 8,2 – 10,0).

### Água Destilada ou Deionizada

- Utilizada para diluição das amostras e preparo das soluções
  - Deve ser livre de íons e gases dissolvidos, com condutividade inferior a 2 µS/cm, e mantida em frasco de vidro ou polietileno limpo.

### Procedimento

- Pesar 1 a 5 g de amostra sólida (fresca) ou pipetar de 1 a 10 mL da amostra líquida
  - Transferir para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, utilizando 50 mL de água destilada para auxiliar a transferência.

- Adicionar 2 a 3 gotas da solução de fenolftaleína 1%.
- Titular com solução de NaOH 0,1 M, sob agitação constante, até coloração rosada persistente por pelo menos 30 segundos.
- Leitura: registrar o volume gasto de NaOH (em mL).
- Cálculo: Expressar os resultados conforme o ácido predominante.

### Cálculo

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{V * N * f * 100}{P * 1000}$$

Onde:

- V = volume de NaOH gasto na titulação (mL).
- N = normalidade da solução de NaOH (geralmente 0,1 N).
- f = fator de conversão do ácido correspondente (g de ácido equivalente a 1 mL de NaOH 1 N).
- P = massa da amostra (g).

### Observações

O ácido utilizado como referência depende da natureza da amostra:

- Frutas e sucos: ácido cítrico – f = 0,064, (considerando NaOH 1N).
- Leite e derivados: ácido láctico – f = 0,090 (considerando NaOH 1N).
- Vinagres e picles: ácido acético – f = 0,060 (considerando NaOH 1N).
- No caso de amostras coloridas ou turvas, recomenda-se utilizar o método potenciométrico para determinação precisa do ponto de viragem.
- O ácido ftálico utilizado na padronização deve ser pesado com precisão de 0,1 mg.
- A amostra deve estar homogeneizada previamente.
- Se a amostra for sólida, triturar previamente.

- Se a amostra for muito viscosa, indicar diluição prévia.
- A coloração deve ser rosa claro e deve persistir por 30 segundos sob agitação.
  - Se ficar rosa intenso, repetir a titulação, para garantir a confiabilidade do resultado.

## Referência Bibliográfica

(Aoac, 2012).

## 1.9. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

### Objetivo

Determinar o teor de sólidos solúveis totais (SST) em amostras de alimentos líquidos ou semilíquidos, expresso em graus Brix (°Brix), utilizando refratômetro digital conforme metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists (Aoac, 2012).

### Princípio do Método

O teor de sólidos solúveis totais indica a quantidade de substâncias dissolvidas na fração líquida do alimento, principalmente açúcares, ácidos orgânicos, sais minerais e compostos fenólicos. O método baseia-se na medição do índice de refração da amostra, propriedade óptica que varia conforme a concentração de solutos e a temperatura.

O refratômetro converte automaticamente o índice de refração em graus Brix (°Brix), que correspondem à percentagem em massa de sacarose em solução aquosa equivalente.

Essa análise é amplamente utilizada como indicador de maturação e qualidade em frutas e produtos derivados.

### Materiais e Equipamentos

- Refratômetro digital (calibrado a 20 °C, com correção automática de temperatura – ATC).
- Pipetas ou micropipetas.
- Papel absorvente ou lenço macio.

- Água destilada.
- Pano de limpeza sem fiapos.
- Termômetro digital (caso o refratômetro não tenha compensação automática).

### Reagentes

- Água destilada (para calibração do equipamento)
- Soluções padrão de sacarose (opcional, para verificação de precisão do refratômetro).

### Procedimento

Calibrar o equipamento

- Limpar cuidadosamente o prisma do refratômetro.
- Adicionar uma gota de água destilada sobre o prisma e fechar a tampa.
- Ajustar a leitura para 0,0 °Brix a 20 °C.
- Secar o prisma com papel absorvente limpo e seco.

### Preparação da Amostra

- Homogeneizar a amostra líquida (sucos, polpas, néctares, etc.).
- Caso a amostra contenha partículas sólidas, filtrar em papel de filtro para obter um líquido claro.

### Leitura

- Colocar duas a três gotas da amostra sobre o prisma limpo do refratômetro.
- Fechar a tampa e aguardar estabilização da leitura.
- Registrar o valor indicado em graus Brix (°Brix).
- Após cada leitura, limpar o prisma com água destilada e secar com pano macio.

### Correção de Temperatura

- Quando o refratômetro não possui compensação automática, corrigir os valores conforme tabela de conversão fornecida pelo fabricante, ajustando para 20 °C.

### Cálculo e Expressão dos Resultados

O refratômetro fornece diretamente o resultado em graus Brix (°Brix), que corresponde à percentagem em massa de sólidos solúveis totais.

*Sólidos solúveis totais (°Brix) = leitura direta no refratômetro*

Os resultados devem ser expressos como:

$$\text{Sólidos solúveis totais (°Brix)} = \frac{(\text{g de sólidos de sólidos solúveis})}{100\text{g de amostra}}$$

### Observações

- Utilizar amostra fresca devidamente homogeneizada.
- Manter o equipamento calibrado e limpo antes de cada série de análises.
- Para amostras muito viscosas, pode-se diluir com água destilada e corrigir o resultado considerando o fator de diluição.
- Evitar bolhas de ar na amostra, pois interferem na leitura.

### Referência Bibliográfica

(Aoac, 2012).

## 1.10. EXTRAÇÃO DE AMIDO

### Objetivo

Extrair e determinar o rendimento de amido presente na amostra, por meio de processo de maceração, decantação, filtração e secagem, expressando o resultado em porcentagem (%).

### Princípio do Método

O método baseia-se na extração do amido por imersão da amostra em solução de metabissulfito de sódio, que auxilia na inibição de reações enzimáticas e oxidação, preservando a integridade dos grânulos de amido.

Após o período de maceração, o material é submetido à peneiração, decantação e lavagens sucessivas, promovendo a separação do amido das demais frações da amostra. O amido isolado é seco em estufa até peso constante, permitindo o cálculo do rendimento da extração com base na relação entre massa inicial da amostra e massa final de amido obtido.

### Materiais e Equipamentos

- Balança analítica
- Béqueres
- Peneira ou pano de musselina
- Papel filtro qualitativo
- Estufa com controle de temperatura (50 °C)
- Refrigerador (4 °C)
- Espátula

### Reagentes

- Solução de metabissulfito de sódio 0,2%
- Álcool etílico 95% (v/v)

### Preparo da Solução

- Solução de Metabissulfito de Sódio 0,2%
- Dissolver 0,2 g de metabissulfito de sódio em 100 mL de água destilada.
- Preparar volume suficiente conforme a proporção utilizada na extração.

### Procedimento

- Pesar de 3 a 5 g da amostra previamente homogeneizada.

- Adicionar solução de metabissulfito de sódio 0,2%, na proporção de 30 mL para cada 3 g de amostra.
- Manter a mistura em repouso por 72 horas, sob refrigeração a 4 °C.
- Após o período de maceração, peneirar a mistura em pano de musselina transparente.
- Reprocessar o sedimento retido, filtrar novamente e descartar o resíduo sólido.
- Deixar o filtrado em repouso por 1 hora para decantação.
- Descartar cuidadosamente o sobrenadante.
- Lavar a pasta sedimentada (amido) com solução de metabissulfito de sódio 0,2% e deixar novamente em decantação por 1 hora.
- Após decantação, realizar filtração em papel filtro qualitativo.
- Lavar a pasta de amido com álcool etílico 95%.
- Secar o amido em estufa a 50 °C até peso constante.

### Cálculo

O rendimento da extração do amido é calculado através da expressão:

$$Y_{amido}(\%) = 100 * \left( \frac{P_f}{P_i} \right)$$

Onde:

- Pf = massa final de amido seco (g)
- Pi = massa inicial da amostra utilizada na extração (g)

### Observações

- A amostra deve estar previamente homogeneizada.
- Manter a temperatura de 4 °C durante a maceração para evitar degradação do amido.
- O descarte do sobrenadante deve ser feito cuidadosamente para evitar perda da fração sedimentada.
- A secagem deve ser realizada até peso constante para garantir precisão no rendimento.

- O álcool 95% auxilia na remoção de impurezas e na desidratação parcial da pasta antes da secagem final.
- Recomenda-se realizar a análise em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

## Referência Bibliográfica

(Castro *et al.*, 2018).

## 1.11. DETERMINAÇÃO DE PECTINA

### Objetivo

Extrair e determinar o rendimento de pectina presente na amostra vegetal seca, utilizando extração ácida seguida de precipitação alcoólica, expressando os resultados em porcentagem (%).

### Princípio do Método

A pectina é um polissacarídeo estrutural presente na parede celular de vegetais, especialmente em frutas, sendo composta principalmente por cadeias de ácido galacturônico parcialmente metoxiladas. Sua principal aplicação industrial está relacionada à formação de géis, sendo amplamente utilizada na indústria alimentícia como agente espessante, estabilizante e gelificante.

A extração de pectina é geralmente realizada por meio de tratamento ácido em meio aquoso, sob aquecimento, promovendo a solubilização das protopectinas presentes na parede celular. O pH ácido favorece a ruptura das ligações que mantêm a pectina insolúvel na matriz vegetal.

Após a extração, a pectina é recuperada por precipitação alcoólica, pois apresenta baixa solubilidade em solventes orgânicos como etanol. O material precipitado é então separado, seco e pesado para determinação do rendimento.

Fatores como pH, temperatura, tempo de extração e proporção sólido/solvente influenciam diretamente na eficiência do processo e na qualidade da pectina obtida.

### Materiais e Equipamentos

- Balança analítica
- Béqueres ou frascos Erlenmeyer
- Proveta graduada
- Termômetro
- Chapa aquecedora com agitação magnética
- Barra magnética (peixinho)
- Suporte universal com garras metálica
- Tecido de musselina ou sistema de filtração
- Papel filtro qualitativo
- Estufa com controle de temperatura
- Vidrarias volumétricas

### Reagentes

- Ácido clorídrico (HCl) 0,5 M
- Etanol 96% (v/v)
- Água destilada ou deionizada

### Preparo de Soluções

#### Solução de HCl 0,5 M

- Preparar por diluição do ácido clorídrico concentrado em água destilada, conforme cálculo estequiométrico adequado.

### Procedimento

- Pesar de 3 a 5 g da amostra seca e moída
- Adicionar água destilada na proporção de 1 g de amostra para 30 mL de água
- Ajustar o pH da suspensão entre 1,0 e 1,5 com solução de HCl 0,5 M

- Aquecer a mistura entre 40 e 80 °C sob agitação contínua por 1 hora
- Filtrar o extrato ácido com auxílio de tecido de musselina ou papel filtro
- Ao filtrado, adicionar dois volumes de etanol 96% para precipitação da pectina
- Homogeneizar e manter sob filtração a 4 °C por 24 horas
- Após a filtração, remover o papel filtro contendo o precipitado
- Secar o material em estufa a 60 °C por 1 hora ou até peso constante
- Determinar a massa final da pectina seca

### Cálculo

O rendimento de pectina é calculado conforme a expressão:

$$y_{pectina} (\%) = 100 * \left( \frac{P}{Bi} \right)$$

Onde:

P = Massa de pectina seca obtida (g)

Bi = Massa inicial da amostra seca utilizada (g)

### Observações

- Adicionar sempre o ácido sobre a água, lentamente e sob agitação.
- Se a diluição é fortemente exotérmica (ex.: ácido sulfúrico concentrado, ácido nítrico ou ácido clorídrico), recomenda-se a diluição sob agitação e resfriamento (banho de gelo) para controlar a temperatura.
- Sempre usar capela de exaustão ao manusear os reagentes em capela de exaustão, utilizando devidamente Equipamentos de Proteção Individual (EPI's).
- A amostra deve estar previamente seca para evitar interferência da umidade no cálculo do rendimento.

- O controle rigoroso do pH (1,0 – 1,5) é fundamental para otimizar a solubilização da pectina.
- A temperatura deve ser monitorada constantemente para evitar degradação da pectina.
- A precipitação alcoólica deve ocorrer em ambiente refrigerado (4 °C) para maior eficiência.
- O rendimento pode variar conforme a matéria-prima, granulometria e condições de extração.

### Referência Bibliográfica

Metodologia adaptada de (Kratchanova, Pavlova e Panchev, 2004; Torralbo *et al.*, 2012).

## 1.12. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ

### Objetivo

Determinar o índice de acidez de óleos e gorduras, expresso em mg de KOH por grama de amostra, indicando o grau de hidrólise e presença de ácidos graxos livres.

### Princípio do método

Os ácidos graxos livres presentes na amostra reagem com uma base forte (NaOH ou KOH) por titulação ácido-base. O ponto final da reação é indicado pela viragem da fenolftaleína em meio levemente alcalino. A quantidade de base consumida é proporcional ao teor de ácidos graxos livres.

### Materiais

- Balança analítica
- Frasco Erlenmeyer de 125 mL
- Proveta
- Bureta de 10 mL

### Reagentes:

- Solução de éter-álcool (2:1) neutra
- Solução fenolftaleína
- Solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou 0,01 M

### Procedimento:

- Amostras homogêneas e completamente líquidas.
- Pesar 2 g da amostra fresca no frasco de 125 mL.
- Adicione 25 mL da solução de éter-álcool.
- Adicione 2 gotas do indicador fenolftaleína.
- Titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou 0,01 M.

### Cálculos

$$\frac{V \cdot F \cdot 6,61}{p} = \text{índice de acidez}$$

Onde:

V = nº de mL de NaOH

F = fator da solução

p = nº g da amostra

$$\frac{V \cdot F \cdot 100}{p} = \text{acidez em solução molar, (V/m)}$$

$$V \cdot F \cdot M. 28,2 = \text{acidez em ácido oleico, (m/m)}$$

### Conversão

Índice de acidez em solução molar → divide o resultado por 1,78.

Índice de acidez como acidez em ácido oleico → divide o resultado por 1,99.

Acidez em ácido oleico em acidez em volume normal → divide o resultado por 3,55.

### Observações

- A amostra deve estar completamente homogênea e líquida
- A solução éter-álcool deve estar previamente neutralizada
- Evitar exposição prolongada ao ar, pois pode oxidar
- Realizar titulação lentamente próximo ao ponto final
- Registrar corretamente o fator da solução titulante

- Índices elevados indicam degradação hidrolítica
- Realizar em triplicata.

## Referência Bibliográfica

(Instituto Adolfo Lutz, 2008).

## 1.13. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

### Objetivo

Determinar o índice de refração de óleos e gorduras como parâmetro físico-químico de identidade e pureza, relacionado ao grau de insaturação e à composição da amostra.

### Princípio do Método

O índice de refração corresponde à razão entre a velocidade da luz no vácuo e no meio analisado. Óleos e gorduras apresentam valores característicos que variam de acordo com o grau de insaturação, o comprimento da cadeia carbônica e a temperatura.

A medição é realizada em refratômetro de Abbé, com controle rigoroso da temperatura, uma vez que o índice de refração é altamente dependente da mesma.

### Materiais

Refratômetro de Abbé

### Reagente

Éter de petróleo ou outro solvente

### Procedimento

Ajuste do aparelho:

- Ajustar previamente com água
- Fazer circular uma corrente de água a 40 °C pelo aparelho
- Deixe estabilizar a temperatura

- Ajuste a 40 °C para óleos e 60 °C para amostras
- A temperatura do refratômetro deve ser controlada a  $\pm 0,1$  °C. Para isso, é preferível usar banho de água controlado termostaticamente e com circulação de água.

### Tratamento da Amostra

- Pesar a amostra seca previamente (fundir a amostra caso não esteja líquida).
- Utilizar prismas limpos e completamente secos
- Colocar no prisma inferior algumas gotas da amostra
- Deixe por 1 a 2 minutos até que a amostra atinja a temperatura do aparelho.

### Cálculo para Correção da Temperatura

$$R' + K(T - T') = R$$

Onde:

R' = leitura à temp. T' (°C)

R = leitura corrigida

K = 0,000365 (gorduras)

K = 0,0003885 (óleos)

T = temperatura padrão

T' = temperatura da leitura (R' realizada)

### Observações

- A amostra deve estar completamente seca e isenta de impurezas.
- Caso esteja sólida, deve ser previamente fundida em temperatura controlada.
- A temperatura deve ser mantida com precisão de  $\pm 0,1$  °C.
- Óleos são geralmente medidos a 40 °C; gorduras podem requerer 60 °C.
- Os prismas devem estar perfeitamente limpos e secos.

- Caso a leitura não seja realizada na temperatura padrão, aplicar correção usando a constante apropriada (K).
- Evitar bolhas de ar entre os prismas.

### Referência Bibliográfica

(Instituto Adolfo Lutz, 2008).

## 1.14. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO

### Objetivo

Determinar a quantidade de hidróxido de potássio necessária para saponificar completamente os ésteres presentes em 1 g de amostra.

### Princípio do Método

Os triglicerídeos reagem com KOH em meio alcoólico sob aquecimento, formando sabões (saponificação). O excesso de KOH é posteriormente titulado com ácido clorídrico padrão. A diferença entre o volume gasto no branco e na amostra corresponde ao KOH consumido na saponificação.

O índice está relacionado ao peso molecular médio dos ácidos graxos:

- Valores altos → ácidos graxos de cadeia curta → menor peso
- Valores baixos → ácidos graxos de cadeia longa → maior peso molecular

### Materiais

- Frasco Erlenmeyer de 250 mL
- Condensador de vidro
- Banho-maria ou chapa aquecedora com controle de temperatura.

### Reagentes

- Solução de ácido clorídrico 0,5 M

- Hidróxido de potássio
- Solução de fenolftaleína
- Álcool
- Solução alcoólica de hidróxido de potássio a 4% m/V

### Procedimento

- A amostra deve estar completamente seca.
- Pesar uma quantidade de amostra de tal modo que sua titulação corresponda a 45 a 55 mL de titulação do branco (massa normalmente de 4 a 5 g).
- Adicionar 50 mL da solução alcoólica de KOH.
- Preparar um branco e proceda ao andamento analítico, simultaneamente com a amostra
- Conectar o condensador e deixe ferver suavemente até completa saponificação da amostra (aprox. 1 h para amostras normais).
- Após o resfriamento do frasco lave a parte interna do condensador com um pouco de água.
- Desconectar e adicionar 1 mL do indicador e titule com ácido clorídrico 0,5 M.

### Cálculo

$$\frac{26,06 \cdot f \cdot (B-A)}{p} = \text{Índice de saponificação}$$

Onde:

A = volume gasto na titulação da amostra

B = volume gasto na titulação do branco

f = fator da solução de HCl 0,5 M

p = n.º de g da amostra

### Observação

- Algumas amostras requerem mais de 1 hora de saponificação.
- Realizar ensaio branco simultaneamente.
- Algumas amostras podem exigir maior tempo de saponificação.

- Realizar a análise em triplicata.

## Referência Bibliográfica

(Instituto Adolfo Lutz, 2008).

## 1.15. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO

### Objetivo

Determinar o índice de peróxido de óleos e gorduras, expresso em miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de amostra, como indicador de oxidação primária.

### Princípio do Método

Os peróxidos presentes na amostra oxidam o iodeto de potássio (KI), liberando iodo ( $I_2$ ). O iodo liberado é titulado com solução padrão de tiosulfato de sódio.

A quantidade de tiosulfato consumida é proporcional ao teor de peróxidos presentes.

Este método determina todas as substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra, que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste.

### Material

- Balança analítica
- Erlenmeyer de 125 ou 250 mL com tampa esmerilhada
- Proveta de 50 mL, pipeta graduada de 1 mL
- Bureta de 10 mL com subdivisões de 0,05 mL.

### Reagentes

- Ácido acético
- Clorofórmio
- Solução de tiosulfato de sódio 0,1 N ou 0,01 N
- Amido solúvel
- Iodeto de potássio (KI)

- Solução de ácido acético-clorofórmio (3:2)

### Solução Saturada de Iodeto De Potássio

Pesar 30 g de iodeto e adicione 21 mL de água.  
Conserve a solução em frasco âmbar e utilize no mesmo dia de sua preparação.

### Solução de Amido 1% m/V

1 g de amido para 100 mL (água quente).

### Observações

- Realizar o ensaio ao abrigo da luz (reação fotossensível).
- Utilizar solução de Iodeto de Potássio recém-preparada.
- Adicionar amido apenas próximo ao ponto final da titulação.
- Amostras muito oxidadas podem apresentar resultados inconsistentes.
- Expressar resultados em meq O<sub>2</sub> /kg de amostra.

### Referência Bibliográfica

(Instituto Adolfo Lutz, 2008).

## CAPÍTULO

# 02

## COMPOSTOS ANTINUTRICIONAIS

---

### 2.1. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS CIANOGENÍOS (TESTE DE GUIGNARD – QUALITATIVO)

#### Objetivo

Identificar qualitativamente a presença de glicosídeos cianogênicos (precursores de ácido cianídrico – HCN) em amostras alimentares pelo teste de Guignard, conforme metodologia descrita por (Araújo, 2011).

#### Princípio do Método

Os glicosídeos cianogênicos são compostos que, sob ação de enzimas ( $\beta$ -glicosidases), liberam ácido cianídrico (HCN). O teste de Guignard é um método qualitativo baseado na detecção dos vapores de HCN liberados pela amostra em meio úmido, que reagem com papel de filtro impregnado com picrato de sódio, produzindo coloração vermelho - alaranjada, indicativa da presença de cianetos. Para a comparação da presença de cianogênicos utiliza-se a semente de ameixa, já que a mesma apresenta glicosídeos cianogênicos precursores do ácido cianídrico (Araujo, 2011).

#### Materiais e Equipamentos

- Frascos de vidro com tampa hermética
- Papel de filtro
- Pinça
- Pipetas graduadas

- Balança analítica

## Reagentes

- Solução de picrato de sódio (1%)
- Solução alcalina diluída (bicarbonato de sódio 10%)
- Amostra fresca triturada
- Preparo do papel reagente (papel de Guignard)
- Tiras de papel de filtro imersas em solução de picrato de sódio 1% (m/v)
- Deixar secar à temperatura ambiente, protegidas da luz
- Armazenar em frasco escuro e bem vedado até o uso

## Procedimento

- Triturar 2 g da amostra fresca em um almofariz
- Em um Erlenmeyer de 100 mL, colocar 10 mL de água destilada
- Preparar o controle com a semente de ameixa
- Cortar tiras de aproximadamente 2 cm de largura e umedecer com solução de ácido pícrico 1% e solução de bicarbonato 10%.
- Fixar a tira de papel reagente (Guignard) na parte superior interna da tampa do Erlenmeyer, sem que o papel entre em contato com o líquido.
- Fechar o frasco e deixar em repouso por 12 a 24 horas à temperatura ambiente (25 °C).
- Fazer a confirmação de presença ou ausência de glicosídeos cianogênicos, com base no controle.

## Controle Positivo

Utilizar uma semente de ameixa triturada, rica em glicosídeos cianogênicos, como controle positivo da reação.

## Expressão dos Resultados

O resultado é qualitativo, sendo expresso como:

- Presença de cianogênios: formação de cor laranja ou vermelha

- Ausência de cianogênicos: papel permanece amarelo.

### Observações

- O teste é qualitativo, não permitindo a quantificação da concentração de cianogênicos na amostra, apenas indicação de presença e ausência.
- Se houver presença de cianogênicos, fazer análise quantitativa da concentração de cianogênicos na amostra.
- A amostra deve ser fresca ou recém-triturada, pois a degradação enzimática é fundamental para liberação do ácido cianídrico.
- O frasco deve estar hermeticamente fechado, evitando perda de vapores de HCN e interferência nos resultados.
- O papel reagente deve ser armazenado ao abrigo da luz e umidade, pois o picrato pode sofrer degradação.
- Fazer o teste em triplicata, para garantir a confiabilidade dos resultados.
- Após a análise, descartar corretamente os resíduos conforme normas de segurança do laboratório.

### Referência Bibliográfica

(Araújo, 2011).

## 2.2. DETERMINAÇÃO DE TANINOS (TESTE QUALITATIVO COM CLORETO FÉRRICO)

### Objetivo

Identificar qualitativamente a presença de taninos em amostras alimentares por meio de reação colorimétrica com solução aquosa de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$  10% p/v).

### Princípio do Método

Os taninos são compostos fenólicos capazes de formar complexos coloridos com íons metálicos, especialmente com o ferro trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

A reação com cloreto férrico permite distinguir dois grupos principais de taninos:

- Taninos flobafênicos (condensados): produzem coloração azulada.
- Taninos pirogálicos (hidrolisáveis): produzem coloração esverdeada.

Essa variação cromática é utilizada como indicativo qualitativo da presença de compostos fenólicos do tipo tanino.

### Materiais e Equipamentos

- Balança analítica
- Tubos de ensaio limpos e secos
- Pipetas graduadas ou automáticas
- Conta-gotas
- Bastão de vidro

### Reagentes

- Etanol (PA)
- Água destilada
- Solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 10% p/v

### Preparo da Solução de $\text{FeCl}_3$ 10%

- Dissolver 10 g de cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) em 100 mL de água destilada.
- Armazenar em frasco âmbar e manter ao abrigo da luz.

### Procedimento

- Pesar 10 g da amostra fresca e transferir para um tubo de ensaio
- Adicionar 1 mL de etanol, agitando até completa dissolução
- Acrescentar 2 mL de água destilada

- Adicionar 4 gotas da solução aquosa de  $\text{FeCl}_3$  a 10% (p/v)

### Interpretação dos Resultados

- Azul → presença de taninos flobafênicos (condensados)
- Verde → presença de taninos pirogálicos (hidrolisáveis)

### Expressão dos Resultados

O resultado é qualitativo, sendo expresso como:

- Presença de taninos: formação de coloração azul ou verde.
- Ausência de taninos: ausência de mudança de cor.

### Observações

- A intensidade da coloração pode variar conforme a concentração de compostos fenólicos presentes na amostra.
- A leitura deve ser realizada logo após a adição do reagente, pois a coloração pode se alterar com o tempo.
- O reagente deve estar recém-preparado ou dentro do prazo de estabilidade, pois o  $\text{FeCl}_3$  pode sofrer hidrólise e perda de reatividade.

### Referência Bibliográfica

(Araújo, 2011).

## 2.3. DETERMINAÇÃO DE TANINOS (MÉTODO QUANTITATIVO – FOLIN-DENIS)

### Objetivo

Determinar quantitativamente o teor de taninos totais em alimentos por método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Denis, que forma um complexo de coloração azul de intensidade proporcional à concentração de compostos fenólicos do tipo tanino. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada.

### Princípio do Método

O método baseia-se na reação dos taninos com o reagente Folin-Denis, que contém uma mistura de ácido fosfomolibdico e ácido fosfotúngstico.

Em meio alcalino (fornecido por solução saturada de carbonato de sódio), os taninos reduzem o reagente, formando um complexo azul cuja intensidade é medida por espectrofotometria.

A absorbância obtida é comparada com uma curva padrão de ácido tânico, e os resultados são expressos em mg de equivalentes de ácido tânico por 100 g de amostra (mg EAT/100 g).

### Materiais e Equipamentos

- Balança analítica
- Espectrofotômetro (comprimento de onda: 760 nm)
- Balões volumétricos (100, 250 e 500 mL)
- Béqueres
- Tubos de ensaio
- Pipetas volumétricas e automáticas
- Funil e papel de filtro
- Condensador (para infusão)
- Cubetas de vidro ou quartzo

### Reagentes

#### Folin-Denis

(1) Mistura de ácido fosfomolibdico e ácido fosfotúngstico preparada conforme especificação comercial.

(2) Pode ser adquirido pronto ou preparado segundo AOAC (2012).

#### Solução saturada de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

- Dissolver 40 g de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) em aproximadamente 100 mL de água destilada a quente.
- Deixar saturar, filtrar e armazenar em frasco tampado.

#### Solução padrão de Ácido Tânico

- Preparar uma solução de ácido tânico recentemente dissolvido em água destilada na concentração de 0,1 mg/mL.
- Utilizar para construção da curva padrão.

## Procedimento Experimental

### Preparo da Amostra

- Pesar 2,0 g da amostra moída
- Aquecer 200 mL de água destilada até 80 °C
- Transferir a amostra para um béquer contendo a água quente e manter em infusão por 5 minutos, com agitação contínua e tampar em seguida.
- Transferir a mistura para um balão volumétrico de 250 mL e completar o volume com água destilada.
- Deixar esfriar à temperatura ambiente e filtrar.
- Retirar 10 mL do filtrado, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada. Essa solução será utilizada para as leituras.

### Preparo da Curva Padrão

- Em uma série de tubos de ensaio, pipetar volumes crescentes da solução padrão de ácido tânico (0,1 mg/mL), como na tabela 1 abaixo:
- Completar o volume de cada tubo para 10 mL com água destilada
- Adicionar 1 mL do reagente Folin-Denis a cada tubo
- Adicionar 2,5 mL da solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Homogeneizar e deixar em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente.
- Ler a absorbância a 760 nm contra o branco (preparado nas mesmas condições sem amostra).
- Construir a curva de calibração relacionando absorbância (A) × concentração de ácido tânico (mg/mL).

Tabela 2 – Preparo da curva padrão para análise de Taninos

1	Água (mL)	Ácido Tânico (mL)	Folin - Denis (mL)	Carbonato de sódio (mL)
2	8,5	0	0,5	1,0
3	8,3	0,2	0,5	1,0
4	8,1	0,4	0,5	1,0
5	7,9	0,6	0,5	1,0
6	7,7	0,8	0,5	1,0
7	7,5	1,0	0,5	1,0

Fonte: Singleton e Rossi, 1965; Swain et al., 1959, Adaptada.

### Observações

- Adicionar soluções em ordem exata e deixar em repouso por 30 minutos.
- Absorbância lida em 760 nm.

*Curva abs. mg de ácido tânico*

- Pesar 0,010g (10mg) e completar para 100 mL (0,1L) com água destilada\*.
- Filtrar, se necessário.
- Preparar no dia da análise.

$$* C = \frac{10 \text{ mg}}{0,1L} = 100 \text{ mg/L}$$

### Solução Saturada de Carbonato de Sódio:

- Pesar 25 g em 100 mL de água a 70 °C
- Adicionar cristais de carbonato de sódio decahidratado e deixar em repouso até cristalizar.
- Filtrar antes de utilizar.

### Preparo da Curva da Amostra

- Pesar 2,0 g de amostra moída
- Aquecer água (200 mL) até 80°C
- Transferir amostra para béquer e manter em infusão por 5 minutos tampado e com agitação.

- Transferir para balão de 250 mL, completar com água destilada e deixar esfriar.
- Filtrar, coletar 100 mL do volume, transferir para balão de 100 mL e utilizar para o preparo da curva.

### Determinação da Amostra

Em um tubo de ensaio, adicionar:

- 1 mL do extrato da amostra filtrado
- 1 mL do reagente Folin-Denis
- 2,5 mL da solução saturada de carbonato de sódio
- Completar o volume com água destilada até 10 mL
- Misturar bem e deixar em repouso por 30 minutos
- Determinar a absorbância a 760 nm
- Calcular a concentração de taninos a partir da curva padrão.

### Cálculo

$$\text{Taninos} \left( \text{mg} \frac{\text{EAT}}{100\text{g}} \right) = C * \frac{V_t}{P} * 100$$

Onde:

- C = concentração obtida da curva padrão (mg/mL)
- $V_t$  = volume total do extrato (mL)
- P = massa da amostra (g)

O resultado é expresso em mg de equivalentes de ácido tânico por 100 g de amostra (mg EAT/100 g).

### Observações

- O pH da reação deve estar em meio alcalino (idealmente entre 9 e 10).
- A solução padrão de ácido tânico deve ser preparada no dia da análise.
- Amostras turvas devem ser filtradas ou centrifugadas antes da leitura.

- As leituras devem ser realizadas em até 1 hora após o preparo da reação.
- A ordem de adição dos reagentes deve ser rigorosamente seguida. Alterações na sequência podem comprometer a reprodutibilidade.
- O tempo de reação (30 minutos) deve ser rigorosamente controlado, pois a intensidade da cor varia com o tempo.
- As cubetas devem estar perfeitamente limpas e secas, sem riscos ou resíduos, para evitar interferências na absorbância.
- Caso o valor de absorbância da amostra ultrapasse o intervalo da curva padrão, deve-se realizar diluição adequada do extrato e aplicar o fator de correção no cálculo final.
- Realizar as análises em triplicata para maior confiabilidade estatística.

#### Referência Bibliográfica

(Singleton e Rossi, 1965; Swain et al., 1959).

## 2.4. DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS PELO ENSAIO DE VANILINA/ÁCIDO SULFÚRICO

### Objetivo

Determinar qualitativamente o teor de taninos condensados (proantocianidinas) presentes em amostras alimentares por método espectrofotométrico, utilizando reagente vanilina em meio ácido, com leitura em 500 nm e quantificação por curva de catequina.

### Princípio do Método

Os taninos condensados, também denominados proantocianidinas, são polímeros flavonoídicos formados principalmente por unidades de flavan-3-ol, como catequina e epicatequina (Broadhurst e Jones, 1978). O método baseia-se na reação entre os taninos condensados (flavan-3-óis e

proantocianidinas) e a vanilina em meio fortemente ácido (ácido sulfúrico em metanol). Em meio ácido, a vanilina reage especificamente com os grupos flavanólicos das proantocianidinas, formando um complexo de coloração vermelha. A intensidade da coloração desenvolvida é proporcional à concentração de taninos condensados presentes na amostra.

A absorvância do complexo é medida a 500 nm, e a quantificação é realizada por comparação com uma curva padrão de catequina, sendo os resultados expressos em equivalentes de catequina.

### Reagentes

- Ácido Sulfúrico – Peso molecular = 98,08 g/mol
- (2R,3S) -2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-trio ou (+) -Catequina – Peso molecular = 290,26 g/mol
- Metanol – Peso molecular = 32,04 g/mol
- 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde ou Vanilina – Peso molecular = 152,15 g/mol (Sigma-Aldrich V1104; grau reagente; 99% de pureza)

### Preparo das Soluções

#### Solução de Ácido Sulfúrico 32% (v/v) em Metanol

- Em um balão volumétrico, dentro de um banho de gelo, adicionar aproximadamente 20 mL de metanol.
- Pipetar 16 mL de ácido sulfúrico concentrado aos poucos e completar o balão para 50 mL com metanol.

#### Solução de Vanilina 4% (m/v) em Metanol

- Pesar 2 g de vanilina, dilua com 10 mL de metanol, adicionar num balão volumétrico e completar o balão para 50 mL com metanol.

#### Solução estoque de Catequina 300 mg/L em Metanol

- Pesar 3 mg de catequina e diluir em metanol para uma solução com 10 mL.
- Armazenar no escuro a 4 °C por três dias.

### Procedimento Experimental

Na microplaca, adicionar 25 µL da amostra diluída em metanol. Em seguida, misturar 150 µL da solução de vanilina 4% e 75 µL da solução de ácido sulfúrico 32%. Então, a microplaca é deixada em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. Para o branco, utilize água ao invés da amostra. A absorbância das amostras deve ser medida em comprimento de onda de 500 nm, e o valor do branco deve ser descontado da absorbância das amostras.

### Curva Analítica

- Adicionar alíquotas de 0 a 25 µL da solução padrão de catequina.

Em seguida, misturar:

- 150 µL da solução de vanilina 4%
- 75 µL da solução de ácido sulfúrico 32%.
- Deixar a microplaca em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente.

Tabela 3- Dados utilizados para construção da curva analítica de Taninos Condensados

Solução de Catequina (µL)	Metanol (µL)	Concentração (mg/L)	Absorbância (500 nm)
0	25	0	0,047
3	22	36	0,078
5	20	60	0,101
7	18	84	0,116
10	15	120	0,148
13	12	156	0,192
17	8	204	0,268

## Observações

- O ácido sulfúrico deve ser adicionado lentamente ao metanol, sob banho de gelo, devido à reação exotérmica.
- As soluções devem ser preparadas preferencialmente no dia da análise, especialmente a solução de vanilina, pois pode sofrer degradação.
- A reação deve ocorrer em ambiente protegido da luz intensa, pois os compostos fenólicos são sensíveis à luz.
- A leitura da absorbância deve ser realizada imediatamente após o tempo de incubação, evitando variações por instabilidade do complexo formado.
- Amostras muito concentradas devem ser previamente diluídas em metanol, para que os valores de absorbância permaneçam dentro da faixa linear da curva padrão.

## Referência bibliográfica

Método baseado na metodologia descrita por (Broadhurst e Jones, 1978), com adaptações.

## 2.5. DETERMINAÇÃO DE INIBIDOR DE TRIPSINA

### Objetivo

Determinar a atividade de inibidores de tripsina presentes em amostras alimentares, avaliando sua capacidade de reduzir a atividade proteolítica da enzima tripsina bovina sobre a caseína, sob condições controladas de pH e temperatura.

### Princípio do Método

O método baseia-se na capacidade de a tripsina bovina hidrolisar a caseína em meio tamponado (pH 7,6), liberando peptídeos solúveis.

Na ausência de inibidores, ocorre hidrólise normal da caseína, resultando em maior quantidade de produtos solúveis, mensuráveis

espectrofotometricamente após precipitação das proteínas não hidrolisadas com ácido tricloroacético (TCA).

Na presença de inibidores de tripsina, a atividade enzimática é reduzida devido à formação de complexo enzima-inibidor, diminuindo a hidrólise da caseína e, conseqüentemente, a absorvância obtida.

A diferença entre a atividade da tripsina no ensaio controle (sem inibidor) e no ensaio com extrato da amostra permite determinar a atividade inibitória, geralmente expressa como unidades de inibição de tripsina (UTI) por grama de amostra.

## Preparo dos Reagentes

### Solução de Caseína 1%

- Pesar 1,0 g de caseína, diluir com 50 mL de NaOH 0,1 M e aquecer a 60°C.
- Ajustar o pH para 7,6 com HCl 2,0 M e completar o volume para 100 mL.
- Armazenar na geladeira.

### Tampão Fosfato de Sódio 0,1 M pH 7,6

- Preparar a solução de fosfato de solução monobásica anidro 0,1 M \*.
- Preparar solução de fosfato de sódio dibásico 0,1 M.
- Misturar 13,0 mL de monobásico e 87,0 mL de dibásico e ajustar o pH para 7,6.
- Armazenar na geladeira.

### Solução de Ácido Tricloroacético 10%

Tripsina bovina 0,5 mg/mL

- Pesar 0,5 mg para cada 1 mL de tampão.
- Guardar no congelador em eppendorfs (tubos de ensaio), pode descongelar no dia do ensaio.

### Preparo do Extrato 1%\*\*

- Deixar sob agitação na geladeira por 30 min tampado com insulfilme (ou colocar sob agitação dentro de béquer com água gelada por 30 minutos).
- Centrifugar a 7000 rpm por 10 minutos a 15°C em tubos de centrífuga.
- Separar o sobrenadante para análise.

### Ensaio Normal de Tripsina

- Deve ser feito todos os dias de análise.
- Caseína deve ser adicionada antes do banho-maria para não reagir com a enzima.
- Deve-se marcar o tempo exato de banho-maria com cronômetro colocando caseína e depois o TCA em intervalos de 15 segundos a cada tubo.
- A leitura do Branco da caseína deve ser de no máximo 0,3, ou deve ser trocado.
- Calibrar com água destilada.

### Ensaio do Inibidor

- No ensaio da amostra, esperar 10 min antes de colocar caseína, esse é o tempo para que o inibidor se ligue na enzima.

### Observações

\*A farinha e a solução de fosfato de sódio pH 7,6 devem estar em temperatura ambiente.

\*\*Preparar o extrato a 1% (Alto teor de lipídeos pode interferir na análise, nesses casos, pode ser necessária desengorduração prévia).

- Ideal preparar no mínimo 2 extratos para confirmar tanto a presença e ausência de inibidor de tripsina.
- A solução de caseína deve estar completamente dissolvida antes do ajuste de pH.

- A solução de tripsina deve ser preparada em tampão frio e mantida congelada em alíquotas, evitando ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.
- O ácido tricloroacético (TCA) deve ser manipulado em capela, pois é corrosivo.

### Referência Bibliográfica

(Kakade, Simons e Liener, 1969).

## CAPÍTULO

# 03

## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

---

### 3.1. PREPARO DE EXTRATOS E AMOSTRAS

#### Frutos Frescos (polpa, casca e semente)

- Triturar amostras em liquidificador ou similar. Se congeladas, deve-se retirar o excesso de água; as cascas devem estar bem picadas, e as sementes devem estar completamente separadas da polpa ou moídas em conjunto (levar em consideração para dados comparativos).
- Pesar 25 g de amostra em béquer de 200 – 250 mL e adicionar solução extratora\* (40 mL).
- Homogeneizar com bastão de vidro e deixar em repouso por 60 min no escuro. Após o período, retirar o sobrenadante com pipeta de pasteur ou similar; se tiver resíduo, levar para centrífuga em tubos de falcon por 15 minutos na velocidade 3 – 4. Os resíduos sólidos devem ficar no fundo do tubo. Transferir o líquido para um balão de 100 mL âmbar.
- Repetir o processo anterior e transferir para o balão, completando o volume para 100 mL com o solvente extrator.

## Soluções Extratoras

- Álcool 80%
- Metanol 50%
- Acetona 70%
- Água

A concentração final será de  $c = 0,25 \text{ g/mL}$

## Frutos Secos (polpa, casca e semente)

Similar ao processo anterior

- Pesar de 1 a 5 g de amostra.
- A amostra deve estar bem seca e triturada (cuidado com o tempo e a temperatura de secagem).
  - A concentração pode variar de 0,01 e 0,05 g/mL.
  - Para testes, devem ser feitos com as proporções 1:10, 1:20 e 1:30 (para que o extrato tenha o máximo possível de compostos de interesse).

## Folhas (secas)

As folhas devem ser secas a 40 °C até completa retirada da água.

- Pesar 1 g de amostra seca e adicionar 100 mL do solvente extrator (semelhante aos anteriores).
- Diluir 1 mL do extrato em 9 mL do solvente extrator

## 3.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA CAPTURA DE RADICAIS LIVRES DPPH

### Objetivo

Determinar a atividade antioxidante de extratos vegetais por meio da capacidade de sequestrar o radical livre DPPH, expressando os resultados como percentual de sequestro de radicais livres (%SRL).

### Princípio do Método

O método baseia-se na redução do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por compostos antioxidantes presentes na amostra.

O DPPH apresenta coloração violeta intensa em solução metanólica, com absorvância máxima em 515 nm. Quando reage com substâncias antioxidantes capazes de doar hidrogênio ou elétrons, o radical DPPH é reduzido, formando uma molécula estável de coloração mais clara (amarelo-pálida).

A diminuição da absorvância é proporcional à capacidade antioxidante da amostra.

A captura do radical livre DPPH por antioxidantes naturais, produz um decréscimo na absorvância a 515 nm, provocando mudança na coloração.

→ Violeta escuro → violeta claro → amarelado

### Preparo da Solução

Solução DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil-hidratado): 0,06 mM ou 60  $\mu$ M

- Pesar 24 mg (0,0024 g) de DPPH
- Dissolver em Metanol PA.
- Transferir para um frasco âmbar de 100 mL
- Manter protegido da luz.
- Preparar apenas no dia da análise.

### Diluição e Leitura

- Retirar 0,1 mL do extrato (concentração conhecida).
- Adicionar 3,9 mL da solução de DPPH.
- Realizar em triplicata.
- Preparar um controle com 0,1 mL do solvente de extração + 3,9 mL de DPPH.

• Deixar em ambiente escuro por 30 minutos, à temperatura ambiente.

- Realizar leitura no espectrofotômetro a 515 nm.
- Utilizar álcool metílico PA para calibrar (zero) o espectro.

## Cálculos

$$\% \text{ Sequestro de radicais livres (\%SRL)} = \left( \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) * 100$$

Onde:

- A controle = absorvância da solução de DPPH sem extrato (somente o radical livre + solvente).
- A amostra = absorvância da solução de DPPH com o extrato antioxidante.

## Interpretação dos Resultados

- Valores elevados de %SRL - indicam maior capacidade antioxidante do extrato, ou seja, maior eficiência na neutralização dos radicais livres.
- Valores baixos de %SRL - indicam menor atividade antioxidante, sugerindo menor presença de compostos redutores ou fenólicos ativos.
- Quanto menor a absorvância da amostra em relação ao controle, maior a capacidade de neutralização dos radicais livres, indicando maior atividade antioxidante do extrato testado.

## Observações

- A solução de DPPH é sensível à luz e deve permanecer protegida durante todo o ensaio.
- A absorvância inicial do DPPH deve estar entre 0,6 e 0,8 para garantir boa sensibilidade analítica.
- O tempo de reação (30 minutos) deve ser rigorosamente controlado para todas as amostras e padrões.
- Amostras muito coloridas podem interferir na leitura; nesses casos, recomenda-se preparar branco da amostra (extrato + metanol sem DPPH).
- Caso seja desejado, pode-se determinar o IC<sub>50</sub> (concentração necessária para sequestrar 50% do radical), realizando o ensaio em diferentes concentrações do extrato.

- Utilizar cubetas limpas, secas e sem riscos, evitando interferências na leitura espectrofotométrica.

## Referência Bibliográfica

(Cheng, Moore e Yu, 2006).

## 3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA CAPTURA DE RADICAIS LIVRES - DPPH MODIFICADO

### Objetivo

Determinar a atividade antioxidante total de amostras líquidas ou sólidas por meio da capacidade de sequestro do radical livre DPPH em sistema etanol:água (1:1 v/v), permitindo a avaliação simultânea de compostos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, com resultados expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por grama de amostra.

### Princípio do Método

O método de DPPH é rápido e baseado na redução do DPPH por um composto antioxidante, permitindo a determinação do decréscimo de absorção em 517 nm. Etanol e metanol são solventes comuns para esse ensaio.

Entretanto, extratos vegetais podem conter compostos fenólicos com diferentes graus de polaridade e, portanto, hidrofílicos/lipofílicos. Assim, análises apenas em meio alcoólico (EtOH ou MeOH) podem ser insuficientes para medir a capacidade antioxidante total.

O método original de Blois (1958) foi modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Porém, diversos fatores interferem no ensaio, como:

- Solvente utilizado
- Tempo de reação
- Temperatura de incubação

- Concentração e tipo de antioxidantes na matriz
- Concentração do DPPH
- Efeitos de desprotonação do DPPH (produto reduzido absorve em 517 nm)

Staško et al. (2007) propuseram modificar o método para diminuir a desprotonação e aumentar a solubilização de compostos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos usando solução etanólica:água (1:1 v/v).

Esse método modificado permite medir transferência de elétrons tanto para antioxidantes hidrofílicos quanto lipofílicos frente ao radical DPPH.

### Reagentes

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH (Sigma Aldrich) – PM = 394.32 g/mol
- Etanol absoluto – PA
- Fosfato de sódio monobásico,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – PM = 119,98 g/mol
- Ácido ascórbico,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  – PM = 176,12 g/mol

### Preparo de Soluções

#### Solução 1: Tampão Fosfato de Sódio Monobásico 50 mM em pH 6,0

- Pesar 3,0 g de fosfato de sódio monobásico
- Adicionar 400 mL de água ultrapura
- Ajustar pH para 6,0 com solução 0,1 M de NaOH
- Transferir para balão volumétrico de 500 mL e completar com água ultrapura
- Armazenar em frasco de vidro/plástico refrigerado (8 °C) por até 1 mês.

#### Solução 2:

- Medir 125 mL de etanol absoluto e 125 mL da Solução 1.
- Agitar e armazenar em frasco de vidro/plástico em refrigerador (8 °C) por até 1 mês.

### Solução 3: Solução de DPPH 0,1 mM

- Pesar 3,95 mg de DPPH
- Solubilizar com 50 mL de etanol absoluto
- Transferir para balão volumétrico de 100 mL
- Ajustar volume usando Solução 1
- Utilizar no mesmo dia do preparo

### Procedimento Experimental

- Uma alíquota de 40 µL da amostra diluída (recomenda-se 1:45 para sucos) deve ser colocada em microplaca de 96 poços.
- Adicionar 260 µL de solução de DPPH 0,10 mM preparada na proporção 1:1 com Solução 2.
- A mistura deve reagir por 30 min a 25 °C no escuro.
- A absorbância é medida a 525 nm (branco com água ultrapura).
- A solução de DPPH sem amostra (controle).

### Cálculo da Atividade Antioxidante

Usando a Equação (1):

$$\% \text{ atividade antioxidante} = \left[ 1 - \frac{A_{525 \text{ amostra}}}{A_{525 \text{ branco}}} \right] * 100$$

### Curva Analítica Usando Ácido Ascórbico

- Utilizar o ácido L-ascórbico como padrão analítico
- Realizar os experimentos em triplicata
- Os resultados devem ser expressos em mg de ácido ascórbico equivalente/g de amostras líquidas ou mg de ácido ascórbico equivalente/g de amostras sólidas

### Para Preparar a Solução-mãe

- Diluir 15,05 mg de ácido ascórbico (99,7% pureza) em 100 mL da Solução 2, (corresponde a 150 mg/L).

### Para Preparar Solução de 15 mg/L

- Em balão de 100 mL, pipetar 10 mL da solução mãe e completar o volume com Solução 2.
- A partir desta solução, preparar diluições seriadas até obter, no mínimo, 6 concentrações diferentes.

Tabela 6- Dados médios de inibição do radical DPPH (525 nm) para curva padrão

Solução - mãe (μL)	Solução 2 (μL)	Concentração (mg/L)	% Inibição DPPH
35	5	13,125	53,450
30	10	11,250	45,540
25	15	9,375	40,980
20	20	7,500	31,220
15	25	5,625	23,620
10	30	3,750	15,010
5	35	1,875	4,120
2,5	37,5	0,938	3,100
0	0	0	0

### Cálculo Inibição DPPH

$$\text{Inibição do DPPH} = \left[ 1 - \frac{A_{525 \text{ amostra}}}{A_{525 \text{ branco}}} \right] * 100$$

### Referência Bibliográfica

(Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995).

## 3.4. MEDIÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO DE FERRO (FRAP)

### Objetivo

Determinar a capacidade antioxidante de extratos, soluções biológicas ou compostos puros por meio do método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), que quantifica a habilidade das

amostras em reduzir íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) em meio ácido.

### Princípio do Método

O método FRAP baseia-se na capacidade de antioxidantes presentes nas amostras em reduzir o complexo férrico  $\text{Fe}^{3+}$  TPTZ (incolor) ao complexo ferroso  $\text{Fe}^{2+}$  TPTZ, que apresenta coloração azul intensa e elevada absorbância em 593 nm.

O reagente FRAP contém:

- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), que reage especificamente com  $\text{Fe}^{2+}$  produzindo o composto azul.
- $\text{FeCl}_3$  , fonte de  $\text{Fe}^{3+}$ .
- HCl, que mantém o pH ácido, essencial para a reação.

Quanto maior for a formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$  TPTZ, maior será a absorbância a 593 nm, indicando maior poder redutor e, portanto, maior capacidade antioxidante da amostra.

A metodologia é simples, rápida e amplamente utilizada para avaliação da atividade antioxidante total em alimentos, extratos vegetais e compostos bioativos.

### Materiais e Equipamentos

- TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazina)
- HCl concentrado (37%)
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Água destilada
- Frascos âmbar
- Pipetas automáticas
- Tubos Falcon ou tubos de ensaio
- Espectrofotômetro ( $\lambda = 593 \text{ nm}$ )
- Agitador tipo vórtex
- Balões volumétrico
- Pipeta
- Béquer
- Metanol ou etanol (quando necessário para diluir amostras)

- Banho-maria (37 °C), opcional, dependendo da metodologia

## Preparo de Soluções

### Solução de HCl 40 mM

- Adicionar 3,34 mL de HCl concentrado (37%) em um balão volumétrico de 1 L.
- Completar o volume com água destilada.
- Armazenar em frasco âmbar.
- Validade: indeterminada.

**Observação:** Se necessário, ajustar o valor

### Solução de TPTZ 10 mM

- Dissolver 3,12 g de TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) em 5 mL de HCl
- Completar para 1L em HCl 40 Mm em refrigeração.
- Armazenar em vidro âmbar, sob refrigeração, por até 1 mês.

### Observações Sobre Produção da Curva

- O gasto para produção da curva é de 2,5 mL de TPTZ, totalizando 30 mL para o FRAP (item a seguir). Equivalente a 10 amostras, ou seja, 4 da curva e 6 amostras com sobra para o branco.
- Assim, para produzir apenas o necessário, sem desperdícios, fazer:

#### Para Produzir 120 mL de FRAP:

$$3,12g - 1000mL$$

$$x g - 10mL$$

$$x g - 0,031g$$

#### Para Produzir 60 mL de FRAP:

$$3,12g - 1000mL$$

$$x g - 5mL$$

$$x g - 0,0156g$$

(As linhas abaixo indicam duas possibilidades: Preparo de 120 mL ou 60 mL de solução FRAP).

### Solução de Cloreto Férrico 20 mM

- Dissolver 5,4 g de cloreto férrico em 1L de água destilada.
- Armazenar em frasco âmbar em refrigeração por até um mês (1 mês).

#### Observação:

Produzir o mesmo volume que o item (b) para TPTZ, pois será utilizado para o preparo do FRAP.

$$5,4 g - 1000mL$$

$$x g - 10mL$$

$$x g - 0,054g$$

Ou

$$5,4 g - 1000mL$$

$$x g - 5 mL$$

$$x g - 0,027g$$

### Tampão Acetato 0,3 M pH 3,6

- Dissolver 301 g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético glacial
- Completar para 1L de água destilada.
- Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado

### Solução de Reagente FRAP

- A solução é obtida através da combinação de 25 mL de tampão acetato; 2,5 mL de TPTZ e 2,5 mL de Cloreto férrico.
- Deve ser utilizada imediatamente após a preparação.

### Solução de Sulfato Ferroso 2 mM (2000µm)

- Dissolver 27,8 mg (0,027 µg) de sulfato ferroso e diluir em 50 mL de água destilada.
- Armazenar em frasco âmbar
- Usar apenas no dia da análise.

### Curva de Calibração

Preparar diluições de sulfato ferroso 2 mm (como mostrado abaixo) em balões de 10 mL ou tubos de ensaio envolvidos em papel alumínio.

Tabela 7- Dados para curva de calibração para análise de FRAP

Sulfato ferroso (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (µg)
2,5	7,5	500
5,0	5,0	1000
7,5	2,5	1500
10,0	0	2000

### Procedimento

- Transferir 90 µg de cada diluição, misturar com 270 µL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP.
- Levar ao banho-maria a 37°C por 30 minutos, realizar a leitura em 595 nm utilizando o FRAP como branco.

### Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT)

- Para determinar a atividade antioxidante total, preparar no mínimo 3 (três) diluições diferentes do extrato e prosseguir para a curva de calibração.

### Cálculos

A partir das diluições (mg/L), plotar absorbância x concentração e obter a equação da reta:

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde: y: absorvância e x:  $\mu\text{m}$  de sulfato ferroso

- Calcular o y (abs) conforme correspondente a x=1000  $\mu\text{m}$  de sulfato ferroso
- O resultado será expresso em  $\mu\text{m}$  de sulfato ferroso/g de fruta (ou porção comestível).

### Observações

- Adaptação do método é feita apenas no preparo dos extratos.
- As soluções devem ser reduzidas por custo de material e para evitar desperdícios.
- O reagente FRAP deve ser preparado imediatamente antes do uso, pois o complexo TPTZ é sensível à oxidação e pode perder estabilidade ao longo do tempo.
- Todas as soluções contendo TPTZ e sulfato ferroso devem ser armazenadas em frascos âmbar e protegidas da luz para evitar degradação.
- O branco deve conter apenas o reagente FRAP e água destilada, garantindo que a absorvância medida seja exclusivamente decorrente da redução do  $\text{Fe}^{3+}$  pela amostra.
- A homogeneização adequada das soluções deve ser realizada em agitador tipo vórtex antes da incubação.

### Referências Bibliográficas

(Rufino, Alves, Brito, Morais, *et al.*, 2006).

## 3.5. MEDIÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS<sup>+</sup>

### Objetivo

Determinar a atividade antioxidante de extratos, frutos e compostos bioativos pela capacidade de neutralização do radical

estável ABTS<sup>+</sup>, expressa em  $\mu\text{M}$  Trolox/g de amostra e/ou % de inibição do radical.

### Princípio do Método

O método ABTS se baseia na formação do radical catiônico ABTS<sup>+</sup>, de coloração verde-azulada, gerado pela reação do sal ABTS com persulfato de potássio.

O radical ABTS<sup>+</sup> apresenta forte absorvância entre 734 nm, podendo ser neutralizado por antioxidantes presentes na amostra. A ação antioxidante reduz a intensidade de cor do radical, resultando em diminuição da absorvância.

Este método permite avaliar tanto antioxidantes hidrofílicos quanto lipofílicos, sendo amplamente utilizado para caracterização antioxidante de frutas, vegetais, extratos vegetais e compostos isolados.

### Materiais e Reagentes

- ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))
- Persulfato de potássio
- Trolox (padrão)
- Metanol PA ou álcool etílico PA
- Água destilada
- Micropipetas e ponteiros
- Balões volumétricos
- Tubos tipo Falcon
- Frascos âmbar

### Equipamentos

- Espectrofotômetro ( $\lambda = 734 \text{ nm}$ )
- Vórtex
- Vidrarias em geral
- Refrigerador para armazenar soluções

### Preparo das Soluções

#### (a) Solução Estoque de ABTS 7 mM ou 7000 µg

- Pesar 192 mg (0,192 g) de ABTS
- Dissolver em 50 mL (10mL) de água destilada
- Armazenar em frasco âmbar sob refrigeração por até 1 mês.

#### (b) Solução de Persulfato de Potássio 140 mM

- Pesar 378,4 mg (0,3784 g)
- Dissolver em balão com 10 mL de água destilada
- Armazenar em âmbar em temperatura ambiente por até 1 mês.

#### (c) Preparo do Radical ABTS<sup>•+</sup>

- A partir da solução estoque (a), misturar 5 mL da solução de ABTS 7 mM com 88 µL da solução de persulfato 140 mM
  - Manter a mistura no escuro à temperatura ambiente por 16 h.
  - Diluir 1 mL da mistura em álcool etílico PA até a obtenção da absorbância entre 0,70 nm a 734 nm.

#### Solução Padrão de Trolox (Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-chroman-2-ácido carboxílico) 2 mM

- Pesar 25 mg (0,025 g) de trolox
- Dissolver em balão volumétrico de 50 mL (ou 25mL) de álcool etílico
  - Armazenar em frasco âmbar
  - Usar somente no dia da análise.

#### Curva Padrão de Trolox

#### Preparo das Soluções

Preparar as diluições de Trolox 2 mM em balões de 10 mL

- Transferir 30 µL de cada diluição
- Misturar com 3,0 mL de ABTS<sup>•+</sup> (item (c))
- Homogeneizar
- Aguardar 6 minutos
- Realizar a leitura em espectrofotômetro a 734 nm, usando álcool etílico PA como branco.

Tabela 9- Dados para curva de calibração para análise de ABTS<sup>+</sup>

Trolox (mL)	Alcool etílico (mL)	Concentração final (µM)
0,5	9,5	100
2,5	7,5	500
5,0	5,0	1000
7,5	2,5	1500
10,0	0,0	2000

### Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT)

- Preparar no mínimo três diluições do extrato e prosseguir como no item (b) da curva padrão
- Realizar a leitura de um controle utilizando 30 mL de álcool etílico PA e 3,0 mL de radical ABTS<sup>+</sup>.

### Cálculos

#### Equação da Curva Padrão

$$y = -ax + b \quad (1)$$

Onde:

Y: Absorbância e x: µm de Trolox

#### Calcular o y (abs) Correspondente a um µm

X = 1000 µm de Trolox

A partir das diluições no item (AAT) que devem estar em mg/L, plotar abs x concentração e obter a equação da reta:

$$y = -ax + b \quad (2)$$

Onde:

Y: abs

X: mg/L de extrato

Substituir y obtido na equação 2, o x que será obtido será a diluição da amostra equivalente a 1000 µm de trolox.

#### Converter para µg

$$x (\mu g) = \frac{x}{1000}$$

Resultado Final ( $\mu\text{M}$  Trolox / g de amostra)

$$Z = \frac{1000}{x (\mu g)}$$

Percentual de Inibição

$$\% SRL = \frac{(A \text{ controle} - A \text{ amostra})}{A \text{ controle}} * 100$$

Observações

- A formação do radical  $\text{ABTS}^+$  deve ocorrer por 16 horas no escuro, garantindo completa oxidação da molécula.
- O radical  $\text{ABTS}^+$  é sensível à luz; portanto, todas as soluções devem ser mantidas em frascos âmbar e protegidas da luminosidade.
- A solução de Trolox deve ser preparada no dia da análise, pois apresenta instabilidade oxidativa.
- O tempo de reação (6 minutos) deve ser rigorosamente controlado para garantir comparabilidade entre amostras e curva padrão.
- Caso a absorbância da amostra esteja fora da faixa linear da curva padrão, deve-se realizar novas diluições.
- A análise deve ser realizada em triplicata.

Referência Bibliográfica

(Rufino *et al.*, 2007).

### 3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM FRUTAS NO SISTEMA B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO

Objetivo

Determinar a atividade antioxidante total de extratos de frutas por meio da capacidade de inibir a oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, expressando os resultados em

percentual de proteção ou comparando-os ao padrão antioxidante Trolox.

### Princípio do Método

O método baseia-se na oxidação do ácido linoléico, que gera radicais livres peroxil durante a incubação em meio aerado e aquecido. Esses radicais atacam as moléculas de  $\beta$ -caroteno presentes no sistema emulsificado, promovendo sua degradação e consequente descoloração da solução (de amarelo-alaranjado para incolor), com diminuição da absorbância a 470 nm.

Na presença de compostos antioxidantes, ocorre neutralização dos radicais livres formados, retardando a degradação do  $\beta$ -caroteno. Assim, quanto menor for a redução da absorbância ao longo do tempo, maior será a capacidade antioxidante da amostra.

### Reagentes

- $\beta$ -Caroteno – Merk, código 01111324, ou equivalente.
- Acetona P.A.
- Ácido linoleico – Acros organics, código 01111322, ou equivalente.
- Água destilada
- Álcool etílico P.A.
- Álcool metílico P.A.
- Clorofórmio
- Trolox (PM = 250,29) – Sigma, código 218940050, ou equivalente.
- Tween 40

### Equipamentos e Vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio
- Balança analítica
- Balão volumétrico 100 mL e 1.000 mL
- Banho-maria
- Bequer 25 e 100 mL
- Cronômetro digital

- Cubetas de vidro (4 × 1 cm)
- Erlenmeyer 250 mL
- Espectrofotômetro
- Oxigenador
- Pipeta automática (1mL, 5mL e 50µL)
- Proveta de 50 mL
- Tubos de 2 mL
- Tubos de ensaio com tampa de rosqueada (18 mL)

## Preparos das Soluções

### Solução de Álcool Metílico a 50%

- Adicionar 500 mL de álcool metílico
- Completar o volume de 1000 mL com água destilada.
- Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado.
- Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

### Solução de Acetona a 70%

- Adicionar 700 mL de acetona em balão volumétrico de 1 L
- Completar o volume com água destilada
- Homogeneizar e transferir para frasco devidamente etiquetado
- Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

### Solução controle de Trolox 200 mg/L

- Pesar 2 mg de Trolox
- Dissolver em 5 mL de álcool etílico P.A
- Completar o volume para 10 mL com álcool etílico
- Homogeneizar e transferir para frasco devidamente etiquetado.
- Preparar apenas no dia da análise

## Tratamento da Água Destilada

- Submeter 500 mL de água destilada a borbulhamento com oxigênio (oxigenador) por 30 minutos.

## Solução $\beta$ -caroteno 20 mg/mL

- Pesar 20 mg de  $\beta$ -caroteno em um tubo de 2 mL, protegido da luz com papel alumínio.
- Adicionar 1 mL de clorofórmio, agitar e utilizar imediatamente.

## Solução Sistema $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico

- Em um erlenmeyer, adicionar:
    - 40  $\mu$ L de ácido linoleico
    - 530  $\mu$ L de Tween 40
    - 50  $\mu$ L da solução  $\beta$ -caroteno
    - E solubilizar em 1 mL de clorofórmio
    - Homogeneizar e evaporar o clorofórmio com o auxílio do oxigenador.
  - Adicionar água tratada com oxigênio até obter uma absorbância de 0,6 - 0,7 nm a 470 nm.
- \* A solução do sistema apresenta uma coloração amarelo alaranjada, deve ser protegida da luz e utilizada imediatamente.

## Obtenção dos Extratos da Fruta

- Pesar de 1 g a 25 g de amostra fresca (de acordo com a fruta), previamente homogeneizada.
- Transferir a amostra para um béquer e adicionar 40 mL de metanol 50% (v/v)
- Homogeneizar e deixar em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugar a 15.000 rpm por 15 minutos.
- Transferir o sobrenadante para um balão volumétrico de 100 mL.

- A partir do resíduo sólido da primeira extração, adicionar 40 mL de acetona 70% (v/v)
- Homogeneizar novamente e deixar em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugar novamente a 15.000 rpm por 15 minutos.
- Transferir o sobrenadante para o balão contendo o sobrenadante da primeira etapa.
- Completar para balão volumétrico de 100 mL com água destilada
- O extrato obtido deve ser mantido sob refrigeração e protegido da luz até o momento da análise.

### Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT)

A partir do extrato obtido previamente, preparar em tubos de ensaio, no mínimo três diluições distintas, realizando cada uma em triplicata.

☒ Em tubos de ensaio, adicionar:

- 0,4 mL de cada diluição do extrato
- 5,0 mL da solução do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

☒ Para o controle, adicionar:

- 0,4 mL da solução padrão de Trolox 200 mg/L (diluição 1:10)
- 5,0 mL da solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico
- Homogeneizar as misturas em agitador magnético e manter em banho-maria a 40°C.
- Realizar a primeira leitura a 470 nm após 2 minutos de efetuar a mistura.
- Efetuar leituras subseqüentes em intervalos de 15 minutos até 120 minutos.
- O espectrofotômetro deve ser calibrado utilizando como branco, 0,4 mL de água destilada e 5,0 mL da solução de  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

### Cálculos

Os resultados são expressos em porcentagem de inibição da oxidação. A redução da absorbância do sistema sem antioxidante (Eq. 1) é considerada como 100% de oxidação.

$$\text{Redução da Absorbância} = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$$

O decréscimo da leitura da absorbância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece-se a porcentagem de oxidação (Eq. 2), subtraindo-se a porcentagem de oxidação do controle  $\times 100$  (Eq. 3). Verifica-se a ação antioxidante da amostra (fruta), comparando-a com a atividade do antioxidante sintético (Trolox).

$$\text{Oxidação (\%)} = \frac{[(\text{Redução da abs})\text{amostra} * 100]}{(\text{redução da abs})\text{sistema}}$$

$$\text{Proteção (\%)} = 100 - (\% \text{ oxidação})$$

## Observações

- A preparação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico deve ser feita imediatamente antes do uso, devido à alta sensibilidade à oxidação e à luz.
- As leituras devem ser realizadas rigorosamente nos tempos estabelecidos (inicial e a cada 15 minutos até 120 minutos).
- O banho-maria deve permanecer estável a 40 °C durante todo o ensaio.
- Extratos muito concentrados podem interferir na leitura devido à coloração própria; nesses casos, realizar diluições adequadas.
- A centrifugação deve ser realizada corretamente para evitar partículas em suspensão que possam interferir na leitura espectrofotométrica.
- O espectrofotômetro deve ser devidamente calibrado antes das leituras.

## Referência Bibliográfica

(Rufino, et al., 2006).

### 3.7. DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS

#### Objetivo

Determinar quantitativamente o teor de vitamina C (ácido ascórbico) em extratos vegetais por espectrofotometria UV-Vis, utilizando o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), com leitura da absorbância a 520 nm.

#### Princípio do Método

O método baseia-se na oxidação do ácido ascórbico a ácido deidroascórbico, que reage com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando um derivado hidrazona de coloração avermelhada após aquecimento em meio ácido. Posteriormente, a adição de ácido sulfúrico concentrado promove o desenvolvimento da cor estável, cuja intensidade é proporcional à concentração de vitamina C presente na amostra.

A absorbância do complexo formado é medida a 520 nm, sendo a quantificação realizada por meio de curva padrão construída com ácido ascórbico.

#### Preparo de reagentes

##### a) Solução DNPH 2%

- Pesar 2 g de DNPH e diluir em ácido sulfúrico 9 N em balão de 100 mL
- Antes de usar, deixar em repouso por 2 horas (filtrar).
- Armazenar na geladeira por até 7 dias.

##### b) Solução de Ácido Ascórbico 0,006%

- Pesar 15 mg de ácido ascórbico
- Diluir em 250 mL de água destilada
- Armazenar na geladeira por tempo indeterminado.

##### c) Solução de Ácido Oxálico 0,5%

- Pesar 2,5 g de ácido oxálico

- Diluir em 500 mL de água destilada
- Armazenar por tempo indeterminado na geladeira.

#### d) Solução de Ácido Sulfúrico 85%

- Em balão volumétrico de 1.000 mL, adicionar 850 mL de ácido sulfúrico
- Completar em balão de 1.000 mL com água destilada.
- Armazenar na geladeira por tempo indeterminado.

\* Nunca adicionar água ao ácido.

#### e) Solução de Ácido Sulfúrico 9 N

- Medir 24,116 mL de ácido sulfúrico PA
- Completar o volume com água destilada em balão de 100 mL
- Armazenar na geladeira por tempo indeterminado.

#### (f) Solução de Tiourea 1,0%

- Pesar 1,0 g de tiourea
- Diluir em 10 mL de água destilada em balão volumétrico de 100 mL
- Armazenar em geladeira por tempo indeterminado.

### Preparo da Curva Padrão

Tabela 10- Dados para curva de calibração Vitamina C

Tubos	Acido ascórbico (mL)	Acido oxálico (mL)	DNPH (mL)	Tiorea (gota)
Concentração				
Branco	0,0 = 0 mg/ml	4,0	1,0	1
	0,200 = 0,012	3,8	1,0	1
	0,400 = 0,024	3,6	1,0	1
	0,600 = 0,036	3,4	1,0	1
	0,800 = 0,048	3,2	1,0	1
	1,000 = 0,060	3,0	1,0	1

### Preparo da Amostra

- Pesar 5 g de amostra fresca
- Adicionar 50 mL da solução de ácido oxálico 0,5%.
- Homogeneizar e deixar em repouso por 10 minutos protegido da luz.
- Filtrar ou centrifugar

### Procedimento

- Após o preparo da curva padrão, aquecer os tubos e a solução base em água fervente a 120 °C por 10 minutos.
- Os tubos devem estar bem fechados e a água deve estar acima do nível da amostra dentro do tubo.
- Retirar do banho-maria e resfriar em banho de gelo
- Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico 85% em cada tubo
- Agitar e levar para leitura em espectrofotômetro a 520 nm.

### Cálculo

Plotar curva padrão e equação da reta do tipo:

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

$y = ax + b$  (Concentração de ácido ascórbico × Absorbância)

- ☑ Substituir “y” pela absorbância encontrada para obter “x” (mg de ácido ascórbico).
- ☐ Calcular a concentração da amostra (g/mL) utilizando a massa pesada e o volume utilizado no extrato.

$$mg \text{ de ácido } \frac{\text{ascórbico}}{100} = x(mg) * \frac{100}{\text{Concentração } (\frac{g}{mL})}$$

Faça para os tubos de 1 a 5, e por fim, faça a média dos resultados como no exemplo:

$$y = 7,3167x - 0,0346 \quad (1)$$

$$x = y + \left( \frac{0,0346}{7,8167} \right) \quad (2)$$

Tabela 11- Dados para preparo da amostra Vitamina C

Volume	Concentração de ácido ascórbico (mg/mL)	Absorbância
0,2	0,012	0,047 *
0,4	0,024	0,143
0,6	0,036	0,271
0,8	0,048	0,371
1,0	0,060	0,402

\*Em (1)

$$x = 0,047 + \left( \frac{0,0346}{7,8167} \right) = 0,007 \text{ mg de ácido ascórbico}$$

$$\text{Massa da amostra} = 5g$$

$$\text{Volume} = 50 \text{ mL} \text{ Concentração: } \frac{5}{50} = 0,1 \frac{g}{mL} * 0,2 = 0,020 \text{ g/mL}$$

$$\text{mg de ácido } \frac{\text{ascórbico}}{100g} = \frac{0,007 \text{ mg}}{0,020 \text{ mL}} * 100 = 36,48$$

#### Anotações:

Outra maneira de calcular:

0,007 mg de aa ---- 0,020g de amostra

X mg de aa ---- 100g

$$x = 0,007 * \frac{100}{0,020} = 36,48 \text{ mg de ácido ascórbico em } 100g \text{ de amostra}$$

#### Observações:

- Realizar a análise ao abrigo da luz, pois o ácido ascórbico é fotossensível.
- Faça para os tubos de 1 a 5, e por fim, faça a média dos resultados.
- O ácido sulfúrico deve ser adicionado lentamente para evitar aquecimento excessivo.
- Se a amostra for muito colorida, preparar branco da amostra.

\* Metodologia adaptada da prática de determinação de Vitamina C cedida pelo professor Eduardo Ramirez Asquieri do Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFG, baseado no método de Strohecker, Henning,

*H. M. Análise de vitaminas: Métodos comprovados. Madrid paz Montalvo, 1767.428p. (Strohecker, Henning e Mayor, 1967).*

## Referências Bibliográficas

(Francis, 1982; Strohecker, Henning e Mayor, 1967).

## 3.8. DETERMINAÇÃO DE ORTODIFENÓIS

### Objetivo

Determinar o teor de compostos ortodifenóis presentes em extratos vegetais, bebidas ou matrizes alimentares por meio de reação colorimétrica com molibdato de sódio, expressando os resultados em mg de equivalente de ácido clorogênico ou ácido cafeico por litro ou grama de amostra.

### Princípio do Método

O método baseia-se na reação específica entre compostos que apresentam grupamentos ortodifenólicos (anel aromático com duas hidroxilas em posição orto) e o molibdato de sódio ( $\text{Na}_2 \text{MoO}_4$ ).

Em meio alcoólico, os ortodifenóis formam um complexo colorido com o molibdato, resultando em aumento da absorbância na região do visível. A intensidade da coloração formada é diretamente proporcional à concentração de compostos ortodifenólicos presentes na amostra. A leitura espectrofotométrica é realizada em 370 nm (conforme procedimento experimental descrito), e a quantificação é feita por meio de curva analítica construída com padrão apropriado (ácido clorogênico ou ácido cafeico).

A reação entre compostos contendo o grupo ortodifenol e o reagente  $\text{Na}_2 \text{MoO}_4$  produz um complexo colorido com alta

absorção na região do visível.

A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de orto-fenóis presentes no extrato. A leitura é feita em 420 nm.

## Reagentes

- Molibdato de sódio di-hidratado –  $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2 \text{O}$  (Sigma #71756) – PM = 241,95 g/mol
- Ácido cafeico – (Sigma #C0625) – PM = 180,16 g/mol

## Preparo das soluções

### Molibdato de Sódio Di-hidratado a 5%

- Pesar 5 g de  $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2 \text{O}$
- Completar o volume de 100 mL com etanol 50%
- Armazenar a solução em freezer por até um ano.

## Procedimento Experimental

- Misturar uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de chá (1:5) com 200  $\mu\text{L}$  de uma solução alcoólica de molibdato de sódio di-hidratado
- Deixar reagir por 25 minutos.
- Fazer a leitura em espectrofotômetro de microplaca a 370 nm contra um branco (água ultrapura).

## Curva de Calibração

O ácido clorogênico pode ser usado como padrão químico para este método, embora o ácido cafeico pareça ser uma opção melhor do ponto de vista químico.

## Preparo da Solução Estoque

- Diluir 5,10 mg de ácido clorogênico (98% de pureza) em 25 mL de etanol (concentração final de 0,2 mg/mL).

A partir desta solução estoque, preparar as seguintes soluções:

Tabela 8- Dados para construção da curva de calibração para determinação de ortodifenóis

Solução estoque ( $\mu\text{L}$ )	Etanol ( $\mu\text{L}$ )	Concentração (mg/L)	Absorbância a 370 nm
0	50	0	0
5	45	20	0.241
9	41	32	0.412
12	38	48	0.483
16	34	64	0.623
20	30	80	0.647
24	26	96	0.760
28	22	112	0.857
34	16	136	1.098
40	10	160	1.281

### Observações

- A solução de molibdato de sódio 5% deve ser preparada em etanol 50% e armazenada sob refrigeração ou congelamento, protegida da luz.
- O tempo de reação (25 minutos) deve ser rigorosamente controlado para garantir reprodutibilidade.
- Amostras com coloração intensa podem interferir na leitura; recomenda-se preparo de branco específico da amostra (extrato + solvente sem reagente).
- Caso a absorbância da amostra ultrapasse o limite da curva padrão, deve-se realizar nova diluição.
- Todas as análises devem ser realizadas, preferencialmente, em triplicata.

### Referência Bibliográfica

(Duran et al., 1991).

## 3.9. CAPACIDADE REDUTORA TOTAL DE EXTRATOS VEGETAIS

### Objetivo

Determinar a capacidade redutora total de extratos vegetais por meio do método de Folin-Ciocalteu modificado, avaliando a contribuição conjunta de compostos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, com resultados expressos em equivalentes de quercetina (mg QE/L).

### Princípio do Método

O método baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu por compostos redutores presentes nos extratos vegetais, principalmente fenólicos e outros antioxidantes capazes de transferir elétrons. O reagente de Folin-Ciocalteu contém complexos de molibdênio e tungstênio que, em meio alcalino, são reduzidos pelos antioxidantes formando compostos de coloração azul intensa.

A intensidade da coloração formada é proporcional à capacidade redutora total da amostra e é medida espectrofotometricamente a 665 nm. A modificação proposta por Berker et al. (2013) utiliza isobutanol como meio orgânico, permitindo a avaliação simultânea de compostos hidrofílicos e lipofílicos.

### Reagentes

- Reagente de Folin-Ciocalteu 2 N – Sigma-Aldrich F9252
- Isobutanol (C<sub>4</sub> H<sub>10</sub>O) – Grau P.A. PM = 74,12 g/mol
- Quercetina – Grau HPLC (pureza de 95%)
- Hidróxido de sódio (NaOH) em pérolas. PM = 40 g/mol

### Preparo de Soluções

#### Folin-Ciocalteu

- Diluir 75 mL de reagente Folin-Ciocalteu em 150 mL de isobutanol e misturar.
- Armazenar em frasco âmbar sob refrigeração por até 6 meses.
- Agitar bem o conteúdo por inversão antes de utilizar.

## NaOH 0,1 M

- Pesar 2 g de NaOH em um béquer
- Adicionar cerca de 100 mL de água destilada até dissolver o conteúdo.
- Transferir a solução para balão volumétrico e completar o volume para 500 mL.
- Essa solução deverá ser armazenada por até 12 meses em recipiente plástico.

## Procedimento Experimental

A determinação da capacidade redutora total dos extratos incluindo tanto compostos hidrofílicos quanto lipofílicos é baseada no método de Folin-Ciocalteu modificado por Berker et al. (2013).

- Diluir o reagente Folin-Ciocalteu 2 vezes com isobutanol  
Em um tubo de ensaio, adicionar:
  - 75  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu diluído
  - 50  $\mu\text{L}$  da amostra previamente diluída em acetona.Após 2 minutos, adicionar:
  - 875  $\mu\text{L}$  de solução de NaOH 0,1 M
  - Homogeneizar por 10 segundos.
  - Deixar reagir por 20 minutos à temperatura ambiente.
  - Transferir 250  $\mu\text{L}$  da mistura para microplaca
  - Realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 665 nm.

## Curva de Calibração e Cálculos

- Utilizar a Quercetina (0–360 mg/L) como padrão analítico para a construção da curva de calibração.
- Preparar diluições seriadas
- Construir a curva de:  
*Absorbância x Concentração*
- Os resultados devem ser expressos em mg QE/L

### Preparo da Curva:

- Pesar uma alíquota de 9,4 mg de quercetina (95% de pureza)
- Adicionar 10 mL de acetona ao recipiente para a solubilização completa e completar o volume para 25 mL.
- A partir dessa solução-mãe (360 mg/L), deverão ser preparadas soluções conforme a tabela, em triplicata:

Tabela 9- Dados para curva padrão

Solução - mãe (µL)	Acetona (µL)	Concentração (mg/L)	Absorbância a 665 nm
50	0	360	0,294
50	0	180	0,174
40	10	144	0,138
35	15	126	0,128
25	25	90	0,101
20	30	72	0,079
15	35	54	0,064
10	40	36	0,046
7	43	25,2	0,035
0	50	0	0

### Observações

- Trabalhar protegido da luz para evitar degradação dos reagentes.
- A solução de quercetina deve ser preparada no dia da análise devido à instabilidade oxidativa.
- Amostras muito concentradas devem ser previamente diluídas.
- Utilizar sempre o mesmo solvente da amostra para preparo do branco analítico.
- O tempo de reação (20 minutos) deve ser rigorosamente controlado.

### Referência Bibliográfica

(berker et al., 2013).

## CAPÍTULO

# 04

## COMPOSTOS BIOATIVOS

---

### 4.1. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

#### Objetivo

Determinar quantitativamente o teor de compostos fenólicos totais em amostras alimentares por método espectrofotométrico, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, com resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por litro ou por 100 g de amostra (mg EAG/L ou mg EAG/100 g).

Essa análise permite estimar a capacidade redutora da amostra, sendo amplamente utilizada como indicativo do conteúdo de compostos bioativos com potencial antioxidante.

#### Princípio do Método

O método baseia-se na reação de compostos fenólicos com o reagente de Folin-Ciocalteu, constituído por uma mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico.

Em meio alcalino, os compostos fenólicos presentes na amostra reduzem o complexo fosfomolibdato-fosfotungstato, promovendo a formação de um complexo de coloração azul intensa. A intensidade da coloração formada é proporcional à concentração de substâncias redutoras presentes na amostra e é determinada por espectrofotometria, geralmente em comprimento de onda de 725 nm.

#### Reagentes

- Reagente de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma 47641)
- Carbonato de sódio – Peso molecular = 105,99 g/mol
- Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico monohidratado (ácido gálico) – Peso molecular = 188,13 g/mol (Sigma-Aldrich 27645; grau HPLC; 99% pureza ou equivalente).

### Preparo de Soluções

#### Solução de Folin- Ciocauteu 10% (6,53 mL; 25 mL)

- Pipetar 26,131 mL de Folin em 100 mL de água destilada
- Completar o volume para 250 mL
- Armazenar em frasco âmbar sob refrigeração.

#### Solução de Carbonato de Sódio 4%

- Pesar 4 g de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2 \text{CO}_3$  )
- Dissolver e completar o volume para 100 ml com água destilada.

#### Solução de Ácido Gálico

- Pesar 0,050 g (50 mg) de ácido gálico
- Dissolver em 50 ml de água destilada
- Transferir para balão volumétrico.

### Preparo da Curva

Tabela 12- Dados para preparo da curva para compostos fenólicos

Diluições (mL)		Curva (mL)		
Ácido Gálico (mL)	Água (mL)	Folin Ciocauteu (mL)	Água (mL)	Carbonato de sódio (mL)
0,100	0,400	0,200	2,0	1,0
0,200	0,300	0,200	2,0	1,0
0,300	0,200	0,200	2,0	1,0
0,400	0,100	0,200	2,0	1,0

---

0,500

0,000

0,200

2,0

1,0

---

## Procedimento

- Misturar o ácido gálico + água
- Adicionar Folin 10 %
- Aguardar 3-5 minutos
- Adicionar Carbonato de sódio 4%
- Homogeneizar
- Deixar agir por 30 minutos
- Realizar a leitura a 750 nm.

## Preparo da Amostra

- Pesar 1 a 10 g de amostra fresca.
- Adicionar 50 mL de etanol 30%
- Homogeneizar
- Filtrar ou centrifugar a amostra
- Transferir 0,100 mL da amostra para o tubo de ensaio.
- Adicionar 0,200 mL da solução Folin-Ciocalteu seguido de 2,0 mL de água destilada
- Agitar por 3 minutos no vortex para reação e desenvolvimento da cor azul.
- Adicionar 1 mL de carbonato de sódio
- Deixar descansar por 2 horas
- Realizar leitura a 750 nm em espectrofotômetro
- Anotar os valores da curva para determinar a concentração de AGE no extrato.

## Cálculos

Fórmula da reta (equação 1):

$$y = ax + b$$

Onde:

Y = média das absorbâncias do extrato

X = concentração em mg/L

### Para a Conversão

*Resultado em mg – 3,3 mL*

*x mg – 1 mL*

*x mg \* volume do extrato*

*Resultado – 1 g de amostra*

*x g – 100 g*

*x = mg \* GAE \* 100<sup>-1</sup> de ácido gálico*

### Observações

- O reagente de Folin-Ciocalteu deve ser armazenado em frasco âmbar e mantido ao abrigo da luz.
- As leituras espectrofotométricas devem ser realizadas dentro do tempo estabelecido, evitando alterações na intensidade da cor.
- A curva padrão de ácido gálico deve ser preparada no mesmo dia da análise.
- Amostras turvas devem ser previamente filtradas ou centrifugadas para evitar interferência na leitura da absorbância.
- Realizar a análise em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

### Referência Bibliográfica

(Singleton e Rossi, 1965).

## 4.2. COMPOSTOS FENÓLICOS - MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU - QUANTITATIVO

### Reagentes

- Reagente de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma 47641)
- Carbonato de sódio – Peso molecular = 105,99 g/mol
- Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico monohidratado (ácido gálico) – Peso molecular = 188,13 g/mol (Sigma-Aldrich 27645; grau HPLC; 99% pureza ou equivalente).

### Solução de Carbonato de Sódio 10%

- Pesar 10 g de carbonato de sódio

- Diluir com 50 mL de água ultrapura e completar o balão para 100 mL com água ultrapura.

### Solução de Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico) monohidratado 200 mg/L

- Pesar 5 mg de ácido gálico monohidratado
- Dilua com 5 mL de etanol absoluto e completar o balão para 25 mL com água ultrapura.

### Procedimento Experimental e Curva Analítica

- Adicionar 25 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 200 µL de água ultrapura às amostras previamente diluídas (25 µL).
- Após 5 minutos, adicionar 25 µL da solução de carbonato de sódio 10% à mistura e agitar a placa por 20 segundos.
- Fazer a leitura após 60 minutos no comprimento de onda de 725 nm.
- O teor de compostos fenólicos totais é expresso em mg de ácido gálico equivalentes por litro de amostra, calculado a partir da equação da reta obtida da curva analítica.

A curva analítica é construída utilizando os dados apresentados na Tabela 4

Tabela 10 - Dados para construção da curva analítica para o método de Folin-Ciocalteu

Solução - mãe (µL)	Água ultrapura (µL)	Concentraç ão (mg/L)	Absorbânci a (725 nm)
0	25,0	0	0,052
5,0	20,0	40	0,254
7,5	17,5	60	0,360
10,0	15,0	80	0,430
12,5	12,5	100	0,493
15,0	10,0	120	0,615
17,5	7,5	140	0,697
20,0	5,0	160	0,728

---

22,5

2,5

180

0,750

---

### Observações

- O reagente de Folin-Ciocalteu deve ser armazenado em frasco âmbar e mantido ao abrigo da luz.
- O tempo de incubação (60 minutos) deve ser rigorosamente padronizado para todas as amostras e padrões.
- As leituras espectrofotométricas devem ser realizadas dentro do tempo estabelecido, evitando alterações na intensidade da cor.
- A curva padrão de ácido gálico deve ser preparada no mesmo dia da análise.
- Amostras turvas devem ser previamente filtradas ou centrifugadas para evitar interferência na leitura da absorbância.
- Realizar a análise em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

### Referência Bibliográfica

(Singleton e Rossi, 1965).

## 4.3. COMPOSTOS FENÓLICOS - MÉTODO AZUL DA PRÚSSIA - QUANTITATIVO

### Objetivo

Determinar quantitativamente o teor de compostos fenólicos totais em amostras alimentares por método espectrofotométrico, utilizando o ensaio do Azul da Prússia, com resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro de amostra (mg EAG/L).

### Princípio do Método

O método do Azul da Prússia baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos de reduzir íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) em meio ácido.

Inicialmente, os fenóis presentes na amostra reduzem o cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). Em seguida, os íons ferrosos formados reagem com o ferricianeto de potássio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), originando o complexo ferriferrocianeto, conhecido como Azul da Prússia.

Esse complexo apresenta coloração azul intensa, cuja absorvância é medida espectrofotometricamente a 725 nm. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de compostos fenólicos presentes na amostra.

## Reagentes

- Ácido Clorídrico –  $\text{HCl}$  – Peso molecular = 36,46 g/mol  
Cloreto férrico hexahidratado –  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – Peso molecular = 270,3 g/mol (Sigma-Aldrich F2877; grau reagente; 98% de pureza ou equivalente);
- Ferricianeto de potássio –  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  – Peso molecular = 329,25 g/mol (Sigma-Aldrich 244023; grau reagente; 99% de pureza ou equivalente);
- Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico monohidratado (ácido gálico) – Peso molecular = 188,13 g/mol (Sigma-Aldrich 27645; grau HPLC; 99% pureza ou equivalente).

## Solução de Ácido Clorídrico 0,1 M

- Em um balão de 100 mL, adicionar aproximadamente 50 mL de água ultrapura.
- Pipetar no balão 0,85 mL de ácido clorídrico concentrado (37%) e completar o volume para 100 mL com água ultrapura.

## Solução de Cloreto Férrico Hexahidratado 0,5 mM

- Pesar 6,75 mg de cloreto férrico hexahidratado
- Diluir com 10 mL da solução de ácido clorídrico 0,1 M
- Completar o balão para 50 mL com a solução de ácido clorídrico 0,1 M.

## Solução de Ferricianeto de Potássio 0,5 mM

- Pesar 8,23 mg de ferricianeto de potássio
- Diluir com 10 mL de água ultrapura
- Completar o balão para 50 mL com água ultrapura.

#### Solução de Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico) Monohidratado 100 mg/L

- Pesar 2,5 mg de ácido gálico monohidratado
- Diluir com 5 mL de etanol absoluto
- Completar o balão para 25 mL com água ultrapura.

#### Procedimento Experimental e Curva Analítica

- Adicionar uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução de cloreto férrico hexahidratado 0,5 mM e 100  $\mu\text{L}$  de amostra diluída, previamente adicionados na microplaca, deixando reagir por 2 minutos.
- Adicionar 100  $\mu\text{L}$  da solução de ferricianeto de potássio 0,5 mM à microplaca e agitar por 20 segundos. A absorbância é medida após 15 minutos em comprimento de onda de 725 nm.
- O teor de compostos fenólicos totais é expresso em mg de ácido gálico equivalentes por litro da amostra.
- O cálculo é realizado a partir da equação da reta obtida da curva analítica.

A curva analítica é construída utilizando os dados apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Dados para construção da curva analítica do método do Azul da Prússia

Solução - mãe ( $\mu\text{L}$ )	Água ultrapura ( $\mu\text{L}$ )	Concentração (mg/L)	Absorbância 725 nm
0	25,0	0,0	0,000
1,2	23,8	5,0	0,145
1,9	23,1	7,5	0,217
2,5	22,5	10,0	0,264
3,1	21,3	12,5	0,347

5,0	20,0	20,0	0,564
6,2	18,8	25,0	0,669
10,0	15,0	40,0	0,897

### Observações

- As soluções de cloreto férrico e ferricianeto de potássio devem ser preparadas recentemente ou armazenadas sob refrigeração e protegidas da luz, pois podem sofrer degradação ao longo do tempo.

- O ácido clorídrico deve ser adicionado cuidadosamente durante o preparo das soluções, sempre adicionando o ácido à água, e nunca o contrário, para evitar aquecimento excessivo e riscos de acidentes.

- As amostras devem estar previamente filtradas ou centrifugadas para evitar turbidez, que pode interferir na leitura espectrofotométrica.

- É fundamental manter o mesmo tempo de reação para todas as amostras e padrões (15 minutos), garantindo reprodutibilidade e comparabilidade dos resultados.

- O branco deve ser preparado nas mesmas condições da amostra, substituindo-a pelo solvente, para correção adequada da absorbância.

### Referência Bibliográfica

(Price e Butler, 1977).

## 4.4. ANTOCIANINAS TOTAIS

### Objetivo

Determinar o teor de antocianinas totais em amostras vegetais por espectrofotometria UV-Vis, após extração em solvente

metanólico acidificado, com resultados expressos em mg de antocianinas por 100 g de amostra (mg ANT/100 g).

### Princípio do Método

O método baseia-se na extração das antocianinas presentes na amostra utilizando solução metanólica acidificada com HCl 1%, que estabiliza a forma flavílio (forma colorida) das antocianinas.

As antocianinas apresentam coloração vermelha intensa em meio ácido e absorvem radiação na região do visível, geralmente em comprimento de onda próximo a 535 nm.

A concentração é determinada por espectrofotometria, sendo proporcional à absorbância medida. A quantificação é realizada utilizando coeficiente de absorvidade específico.

### Reagentes

- Metanol P.A
- Ácido clorídrico P.A (HCl)
- Solução metanólica acidificada com HCl 1% (v/v)
- Água destilada ou deionizada.

### Materiais e Equipamentos

- Balança analítica
- Béquer (50 e 100 mL)
- Bastão de vidro
- Homogeneizador ou agitador magnético
- Papel alumínio
- Funil de vidro
- Papel filtro
- Balão volumétrico (25, 50 ou 100 mL)
- Pipetas volumétricas e automáticas
- Proveta graduada
- Tubos de ensaio
- Cubetas de vidro ou quartzo
- Espectrofotômetro

## Preparo da Amostra

- Pesar de 1 a 10 g de amostra fresca triturada
- Adicionar solução metanólica acidificada com HCl a 1% (v/v).
- Homogeneizar as amostras e manter a 4 °C na ausência de luz por 18 horas.
- Filtrar a vácuo com lavagem com solução metanólica acidificada.
- Transferir o filtrado para balão volumétrico
- Completar o volume com a solução extratora.
- O volume final deve ser considerado para calcular o fator de diluição (FD).
- Realizar leitura a 535 nm com metanol acidificado como branco.

$$mg\ de\ \frac{ANT}{100g} = Abs * \frac{FD}{P \times CA} * 100$$

Onde

Abs = absorbância

FD = fator de diluição

P = massa da amostra

$\epsilon$  = coeficiente de absorvidade molar (982 L/g.cm).

O fator de diluição é calculado através da fórmula:

$$FD = \left(\frac{V}{m}\right) = \frac{volume\ final}{massa}$$

O volume final indica quantas vezes a amostra foi diluída.

### (Exemplo de cálculo)

Amostra	Absorbância
1	0,142
2	0,140
3	0,141
Média da massa	0,141

$$FD = \left(\frac{V}{m}\right) x * 10^1$$

$$FD = \left(\frac{30}{1}\right) x * 10^1 = 300$$

mg de ANT/100g = 0,141 x 300 x 1000 = 43,075

ou:

$$mg\ de\ \frac{ANT}{100g} = \frac{Abs * V * 100}{\epsilon * m}$$

Onde:

- Abs = absorvância
- V = volume final do extrato (mL)
- m = massa da amostra (g)
- $\epsilon$  = coeficiente de absorvidade
- Caminho óptico = 1 cm

### Observações

- Trabalhar sempre protegido da luz (antocianinas são fotossensíveis).
- Manter extração sob refrigeração para evitar degradação.
- Registrar o caminho óptico da cubeta (geralmente 1 cm).
- Amostras muito pigmentadas devem ser diluídas.
- Especificar se o resultado é em base fresca ou seca.
- Realizar análises em triplicata.
- O método simples pode superestimar valores por interferência de outros pigmentos.

### Referência Bibliográfica

(Lee *et al.*, 2005).

## 4.5. ANTOCIANINAS POR PH DIFERENCIAL

### Objetivo

Determinar quantitativamente o teor de antocianinas monoméricas totais em amostras vegetais pelo método espectrofotométrico do pH diferencial, com resultados expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 g de amostra.

## Princípio do Método

O método baseia-se na mudança estrutural reversível das antocianinas em função do pH.

- Em pH 1,0, as antocianinas estão predominantemente na forma flavílio (vermelha), altamente absorvente.
- Em pH 4,5, ocorre conversão para formas hemicetal ou chalcona, com redução significativa da absorbância.

A diferença de absorbância entre os dois pHs é proporcional à concentração de antocianinas monoméricas presentes na amostra.

## Reagentes

- Etanol P.A.
- Ácido cítrico P.A. (para preparo do etanol acidificado 1%)
- Ácido clorídrico (HCl) 1 M (ajuste de pH)
- Cloreto de potássio (KCl), PM = 74,55 g/mol
- Ácido acético glacial, PM = 60,05 g/mol
- Acetato de sódio ( $C_2H_3NaO_2$ ), PM = 82,03 g/mol
- Água destilada ou deionizada
- Cianidina-3-glicosídeo

## Materiais e Equipamentos

- Balança analítica
- Béqueres (50, 100 e 250 mL)
- Bastão de vidro
- Ultrassom (banho ultrassônico)
- Centrífuga
- Sistema de filtração (funil, papel filtro ou filtração a vácuo)
- Balões volumétricos (25, 50, 100 e 500 mL)
- Pipetas volumétricas e micropipetas
- Proveta graduada
- Tubos de ensaio
- Cubetas de vidro ou quartzo
- Espectrofotômetro UV-Vis

- pHmetro calibrado
- Papel alumínio

### Preparo do Extrato

- Obter os extratos na proporção 1:3 de matéria-prima/ solvente (m/m) de etanol acidificado com ácido cítrico 1%. (1g de amostra, diluído em 25 mL de etanol acidificado durante 75 minutos de extração em ultrassom, seguido de filtração e centrifugação).
- Obter a solução em temperatura ambiente por 2 horas, filtrando e concentrando o extrato em evaporador rotativo sob pressão reduzida.

### Preparo dos Reagentes

#### Solução Tampão de Cloreto de Potássio 0,025 M pH 1,0

PM = 74,553 g (KCl) /mol

1 mol → 74,553 g → 1 L

0,025 mol →  $xx = 1,864 \text{ g de KCl}$

### Observações

- Ajustar pH com a solução de HCl 1M
- Para 500 mL, pesar 0,932 g e dissolver com água destilada.

#### Solução Tampão de Acetato de Sódio 0,40 M pH 4,5

$$CT = CAA + CAS \quad (1)$$

$$pH = pKa + \frac{[sal]}{[ácido]} \quad (2)$$

Ácido acético [CH<sub>3</sub>COOH]<sup>1</sup>

PM = 30,052 g/mol

pKa = 4,74

Pureza (%) = 99,7

[C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>]<sup>3</sup>: Acetato de sódio

PM = 82,0343 g/mol

Em (2):

$$4,75 = 4,74 + \log \log \left[ \frac{S}{A} \right]$$

$$- 0,24 = \log \log \left[ \frac{S}{A} \right]$$

$$(1) \quad - 0,24 = \log \log \left[ \frac{S}{A} \right] \quad : 10^{-0,24} = [S]/[A]$$

$$0,57 = \frac{S}{A}$$

$$(2) \quad 0,57 = \frac{S}{A^*}$$

Sabendo que o pH é mais ácido, A\* é próximo do pKa do ácido acético.

Testar em (1):

$$CT = 0,4 \text{ M} \rightarrow 0,4 \text{ M} = C \text{ ácido} + C \text{ sal}$$

\* As somas das concentrações devem estar iguais à concentração total, portanto testar valores para A (concentração de ácido) para encontrar o equilíbrio na igualdade.

$$(3) \quad 0,57 = \frac{S}{0,26} \quad : S = 0,14$$

$$\text{Em (1): } CT = 0,26 + 0,14$$

$$CT = 0,40 \text{ M}$$

### Para 500 mL Preparar

- 100 mL de acetato de sódio 0,14 mol/L
- 100 mL de ácido acético 0,26 mol/L
- Em agitação adicionar água destilada até 500 mL e conferir valor no pHmetro
- Armazenar em temperatura ambiente, em frasco âmbar por tempo indeterminado.

### Observações

- Método determina apenas antocianinas monoméricas.
- Realizar a análise ao abrigo da luz.
- Realizar leituras no mesmo intervalo de tempo para todas as amostras.

### Referência Bibliográfica

(Eisele *et al.*, 2005).

## 4.6. CAROTENOIDES TOTAIS

### Objetivo

Determinar o teor de carotenoides totais em amostras vegetais por espectrofotometria UV-Vis, após extração com solventes orgânicos, com resultados expressos em  $\mu\text{g}$  de carotenoides por 100 g de amostra fresca.

### Princípio do Método

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis responsáveis pelas colorações amarela, laranja e vermelha em frutas e vegetais. Esses compostos apresentam forte absorção na região do visível, especialmente entre 450 – 470 nm, devido ao seu sistema de duplas ligações conjugadas.

Após extração com acetona fria e partição para solvente orgânico apolar (éter etílico), a concentração é determinada por espectrofotometria a 450 nm, sendo proporcional à absorbância medida. A quantificação é realizada utilizando coeficiente de absorção específico ( $A\%_1 \text{ cm}$ ), geralmente considerando  $\beta$ -caroteno como referência.

### Preparo da Amostra

- Pesar 1 g da amostra (1 ou 5 g de amostra fresca), previamente homogeneizada.
- Macerar a amostra com 30 ml de acetona fria até completa extração do pigmento.
- Filtrar em papel filtro.
- Transferir o extrato acetônico para um funil de separação com 20 ml de éter etílico.
- Lavar a fase orgânica com água destilada por três vezes para remover os resíduos da acetona.

- Na última lavagem o éter decantado volta ao funil identicamente para outro funil com algodão, papel filtrante com sulfato de sódio anidro.
- Este último filtrado deve ser transferido para o funil de separação novamente para decantar a fase inferior.
- Transferir o extrato para um balão de 25 ml e completar o volume com éter etílico.
- Realizar a leitura com éter etílico como branco a 450 nm.

## Cálculos

$$\mu\text{g de } \frac{\text{carotenoides}}{100\text{g}} \text{ de fruta} = \frac{A \cdot V \cdot 10^4}{A(1\%) \cdot \text{cm} \cdot m}$$

Onde:

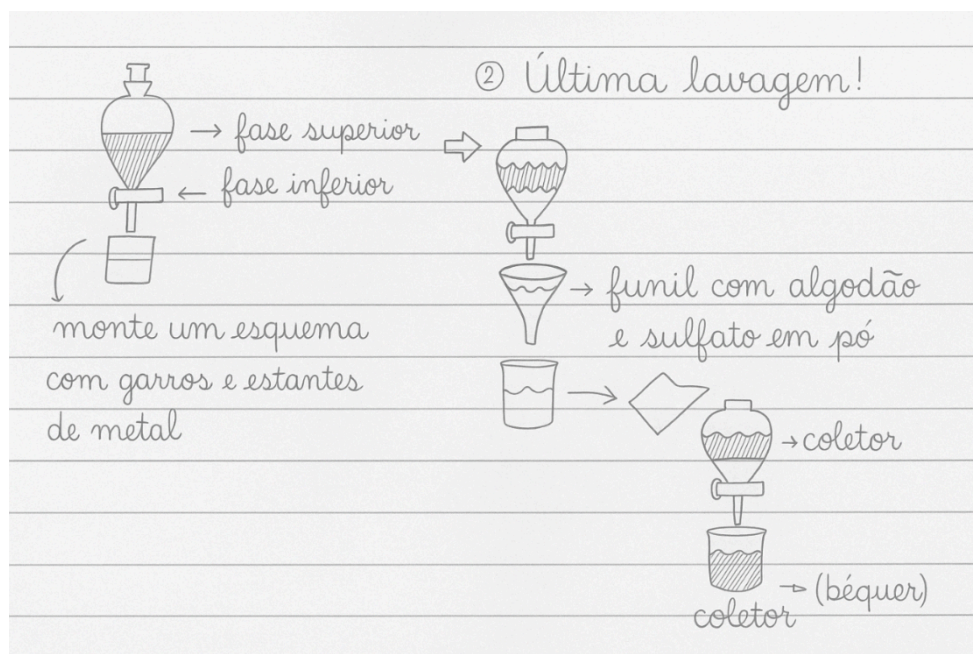
A = absorbância

V = volume final da diluição (mL)

A (1 %cm) = coeficiente de absorção molar do pigmento (2592 para β-caroteno)

m = massa da amostra (g)

10<sup>4</sup> = fator de conversão



## Observações

- Absorbância deve estar entre 0,2 e 0,8
- Utilizar capela de exaustão
- Trabalhar sempre protegido da luz (carotenoides são fotossensíveis).
- Utilizar solventes frios para evitar degradação térmica.
- Se necessário, realizar diluição e incluir fator de diluição no cálculo.
- Realizar análises em triplicata.

### Referência Bibliográfica

(Rodriguez-Amaya, 2001).

## 4.7. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

### Preparo dos Reagentes

#### Ácido Tânico

- Pesar 0,010 g de ácido tânico
- Dissolver em 100 mL de água destilada.
- Preparar no dia da análise.

#### Carbonato de Sódio

- Pesar 25 g de carbonato de sódio em 100 mL de água destilada a 70°C para fazer solução saturada.
- Adicionar cristais de carbonato de sódio decahidratado.
- Deixar em repouso à noite até cristalizar
- Filtrar antes de usar.

### Preparo da Curva Padrão

Tabela 12- Dados para o preparo da curva padrão para análise de flavonoides

Acido tânico (mL)	Água (mL)	Folin-Denis (mL)	Carbonato (mL)

0 (00 mg/L)	8,5	0,5	1,0
0,20 (0,20 mg/L)	8,3	0,5	1,0
0,4 (40 mg/L)	8,0	0,5	1,0
0,6 (60 mg/L)	7,9	0,5	1,0
0,8 (60 mg/L)	7,7	0,5	1,0
1,0 (100 mg/L)	7,5	0,5	1,0

- Adicione as soluções, homogeneizar e deixar em repouso por 30 minutos.
- Realizar a leitura em espectrofotômetro a 760 nm.
- Curva abs x ácido tânico

#### Preparo da Amostra

- Pesar 2,0 g de amostra moída, aqueça a água até 30°C e transfira a amostra, mantendo em aquecimento, tampada e com agitação por 5 minutos.
- Deixar esfriar
- Filtrar, coletar 10 mL do volume
- Transferir para um balão de 100 mL.
- Utilizar para leitura na curva utilizando água destilada como branco.
- Fazer a leitura em espectrofotômetro a 760 nm.

Tabela 13- Dados para o preparo de amostra para análise de flavonoides

Amostra	Água (mL)	Folin-Denis (mL)	Carbonato (mL)
0,2	8,3	0,5	1,0
0,4	8,1	0,5	1,0
0,6	7,9	0,5	1,0
0,8	7,7	0,5	1,0

1,0	7,5	0,5	1,0
0	8,5	0,5	1,0

### Observações

- Manter o mesmo tempo de reação para todas as amostras.
- Trabalhar protegido da luz.
- Amostras muito concentradas devem ser diluídas.

### 4.8. DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

#### Reagentes

- Nitrito de sódio –  $\text{NaNO}_2$  . Peso molecular = 69 g/mol.
- Cloreto de alumínio hexahidratado –  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  . Peso molecular = 241,4 g/mol.
- Hidróxido de sódio –  $\text{NaOH}$ . Peso molecular = 40 g/mol.
- Etanol absoluto grau analítico (P.A.).

#### Como Preparar as Soluções

##### Solução 1: Solução Alcoólica 1:1 (v/v) de Água/Etanol

- Medir em proveta 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$
- Transferir esse volume para um balão volumétrico de 100 mL
- Completar o volume com etanol absoluto 99,5%.

##### Solução 2: Nitrito de Sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) a 50 g/L (0,725 mol/L)

- Pesar 5,0 g de  $\text{NaNO}_2$
- Diluir em cerca de 50 mL de água ultrapura.
- Transferir o conteúdo para um balão volumétrico de 100 mL.
- Completar o volume com água ultrapura.
- Etiquetar e armazenar a solução em recipiente de vidro por até 6 meses em temperatura ambiente (25°C).

##### Solução 3: Cloreto de Alumínio Hexahidratado ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) a 100 g/L (0,414 mol/L)

- Pesar 10,0 g de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Diluir em aproximadamente 10 mL de água
- Completar o volume do balão volumétrico para 100 mL com a mesma solução.
- Agitar e estocar a solução em recipiente de vidro por até 6 meses em temperatura ambiente (25°C).

#### Solução 4: NaOH a 1 mol/L

- Pesar 4 g de NaOH
- Diluir com cerca de 50 mL de água ultrapura
- Completar o volume para 100 mL em um balão volumétrico.
- Agitar bem e estocar a solução em um recipiente de plástico por até 6 meses em temperatura ambiente (25°C).

#### Procedimento Experimental, Curva Analítica e Cálculos

Em uma microplaca (adaptada para microplaca), adicionar:

- 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  a 0,725 mol/L
- 25  $\mu\text{L}$  de amostra diluída em água destilada.
- Após 5 min, adicionar:
  - 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 100 g/L (0,414 mol/L)
  - Deixar reagir por 5 minutos
  - Em seguida adicionar 50  $\mu\text{L}$  de NaOH a 1 mol/L à microplaca.
- Após 5 min de reação em agitação contínua e estabilização da cor, a placa deve ser lida em absorbância de 510 nm contra o branco (água em substituição à amostra) usando um leitor de microplacas.
- Para quantificar o teor de flavonoides totais na amostra teste, (+)-catequina (0 – 250 mg/L) deve ser usada como padrão analítico para a construção da curva padrão. Os experimentos devem ser realizados em triplicata, no mínimo, e os resultados expressos em mg catequina equivalente/L de amostra em caso de

amostras líquidas ou mg catequina equivalente/g de amostra para sólidos.

Tabela 1: Dados médios de absorvância em absorvância a 510 nm para construção da curva padrão para determinação de flavonoides totais em extratos.

Solução - mãe ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	Concentração (mg/L)	Absorvância a 510 nm
25	0	250	0,507
22,5	2,5	225	0,447
20	5	200	0,417
18	7	180	0,366
15	10	150	0,307
10	15	100	0,215
8	17	80	0,170
5	20	50	0,099
0	0	0	0

### Observações

- A leitura deve ser realizada exatamente após o tempo de estabilização da cor, evitando variações na absorvância.
- Amostras muito concentradas devem ser previamente diluídas, registrando-se o fator de diluição para correção nos cálculos.
- Trabalhar sob iluminação reduzida, pois compostos fenólicos podem sofrer degradação por luz.
- Garantir que as soluções reagentes estejam dentro do prazo de estabilidade e armazenadas adequadamente.

### Referência Bibliográfica

(Zhishen, Mengcheng e Jianming, 1999a). Modificação: (Herald *et al.*, 2012).

## 4.9. DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIS EM EXTRATOS

### Objetivo

Determinar o teor de flavonóis totais em extratos vegetais por método espectrofotométrico baseado na complexação com cloreto de alumínio, com resultados expressos em mg de quercetina equivalente por litro (mg QE/L) ou por grama de amostra (mg QE/g).

### Princípio do Método

O método baseia-se na formação de complexo estável entre flavonóis e íons alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) em meio levemente ácido tamponado com acetato de sódio.

Os flavonóis apresentam grupos hidroxila em posições específicas (C-3 ou C-5) capazes de formar complexos com  $\text{AlCl}_3$ , resultando em coloração amarelada.

A intensidade da coloração formada é proporcional à concentração de flavonóis presentes no extrato e é medida por espectrofotometria a 440 nm.

A quantificação é realizada por meio de curva analítica utilizando quercetina ou rutina como padrão.

### Reagentes

- Acetato de sódio anidro –  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ . Peso molecular = 82,03 g/mol.
- Cloreto de alumínio hexahidratado –  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Peso molecular = 241,4 g/mol.
- Quercetina –  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ . Peso molecular = 302,24 g/mol. Referência para uso analítico: Sigma-Aldrich nº Q4951.

### Solução 1: Acetato de Sódio a 50 g/L

- Pesar 25 g de acetato de sódio e diluir em cerca de 200 mL de água destilada.
- Completar o volume do balão volumétrico para 500 mL.
- Armazenar em geladeira por até 1 mês.

## Solução 2: Cloreto de Alumínio Hexahidratado a 2%

- Pesar 10 g de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e diluir com aproximadamente 10 mL de etanol absoluto.
- Transferir para um balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com água destilada.
- Armazenar essa solução em frasco âmbar por até 6 meses em temperatura ambiente.

## Procedimento Experimental, Curva de Calibração e Cálculos

O conteúdo de flavonóis em extratos vegetais é estimado pela metodologia descrita por Yermakov et al. (1987), e pode ser adaptado para microplaca (pequenos volumes de reagentes).

- Diluir o extrato vegetal com água ou etanol e uma alíquota de 80  $\mu\text{L}$  deverá ser inserida na microplaca.
- Uma alíquota (80  $\mu\text{L}$ ) de solução etanólica de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 2% deverá ser adicionada nos poços, seguida de 120  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio (50 g/L).
- Agita-se a microplaca por 20 s, e após 2,5 horas de incubação em temperatura ambiente, a absorbância deve ser lida em  $\lambda = 440 \text{ nm}$ .
- Água destilada é usada como branco do ensaio.

Para fins de quantificar o teor de flavonóis totais, quercetina ou rutina (0 – 80 mg/L) deverão ser usadas como padrão analítico para construção da curva padrão.

Os experimentos devem ser realizados em triplicata, no mínimo, e os resultados expressos em mg quercetina ou rutina equivalente/L de amostra em caso de líquidos, ou mg equivalente/g de amostra para sólidos.

## Preparo da Solução – mãe

- Diluir 2,11 mg de quercetina (95% pureza) em 5 mL de etanol, e completar o balão volumétrico de 25 mL com água destilada ou ultrapura, obtendo uma solução de 80 mg/L.
- A partir dessa solução, fazer diluição seriada até obter, no mínimo, 6 concentrações diferentes.

Para fins metodológicos, sugere-se preparar as soluções contidas na Tabela 1.

A curva padrão será construída com 10 pontos, para que a reta seja mais linear, melhorando o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). A partir da curva analítica deve-se obter a equação de regressão, que poderá ser utilizada para estimar o teor de flavonóis totais nas amostras-teste.

Tabela 14 – Dados médios de absorvância em comprimento de onda de 440 nm para curva padrão de quercetina.

Água ( $\mu\text{L}$ )	Solução-mãe quercetina ( $\mu\text{L}$ )	Concentração (mg/L)	Absorvância a 440 nm
10	70	70	1,014
15	65	65	0,913
25	55	50	0,733
35	45	45	0,634
45	35	35	0,480
55	25	25	0,363
65	15	15	0,196
70	10	10	0,141
73	7	7	0,113
80	0	0	0

### Cálculos

$$\text{Concentração de flavonóis totais } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = [(69,75 * 0,447) + 0,20] * 3 = (31,38) * 3 = 94,14$$

### Observações

Caso o método seja realizado em cubetas convencionais (1 cm de lado), a quantidade de amostra e reagente deve ser aumentada 10 vezes, ou seja:

- 800 µL de amostra
- 800 µL de solução etanólica de cloreto de alumínio hexahidratado
- 1,20 mL de solução de acetato de sódio.
- Utilizar branco do ensaio contendo todos os reagentes, exceto a amostra.
- A estabilidade da solução de  $\text{AlCl}_3$  deve ser monitorada; descartar caso haja turbidez ou precipitação.

### Referência Bibliográfica

(Zhishen, Mengcheng e Jianming, 1999b).

## CAPÍTULO

# 05

## TESTES BIOLÓGICOS

---

### 5.1. SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL IN VITRO

#### Equipamentos

- Balança analítica
- pHmetro
- Banho de aquecimento com agitação
- Centrífuga

#### Preparação das soluções estoque

Tabela 15 – Concentrações de cada solução estoque necessária para o preparo dos fluídos (salivar, gástrico e intestinal).

Solução	Concentração o (g/mL)	Massa (g)	Volume (mL)
---------	--------------------------	-----------	-------------

KCl (cloreto de potássio)	37.3	37.30	1000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (fosfato monopotássico)	68	68	1000
NaHCO <sub>3</sub> (bicarbonato de sódio)*	84	84	1000
NaCl (cloreto de sódio)	117	117	1000
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> (cloreto de magnésio hexahidratado)	30.5	30.50	1000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (carbonato de amônio)	48 g/L	48	1000
HCl (ácido clorídrico)	6 mol/L	218.76	1000
NaOH** (hidróxido de sódio)	1 mol/L	39.99	1000
CaCl <sub>2</sub> (cloreto de cálcio)	44.1 g/L	44.1	1000

### Observações

\* Bicarbonato de sódio deve ser filtrado através de um filtro de 0.22 µm. Pode ser armazenado a 2-5 °C durante aproximadamente um mês.

\*\* NaOH é somente para o ajuste de pH.

### Preparação dos Fluidos Simulados

O Fluido Salivar Simulado (SSF), o Fluido Gástrico Simulado (SGF) e o Fluido Intestinal Simulado (SIF) são constituídos pelas correspondentes soluções estoque de eletrólitos (Tabela 1). Os volumes são calculados para um volume final de 500 mL para cada fluido simulado. No entanto, no momento da preparação do fluido simulado, é necessário completar a solução estoque com água destilada para 400 mL.

Para a adição de enzimas, sais biliares, solução de Ca<sup>2+</sup> e água resultará na concentração correta de eletrólitos na mistura da digestão final.

Tabela 16 – Quantidade das soluções estoque (mL) para preparação de 400 mL de fluido

Solução estoque	Fluido salivar	Fluido gástrico	Fluido intestinal
KCl	15,1	6,9	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,7	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	6,8	12,5	42,5
NaCl	—	11,8	9,6
MgCl <sub>2</sub>	0,5	0,4	1,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,06	0,5	—
HCl	0,09	1,3	0,7
Total	26,25	34,3	61,5
H <sub>2</sub> O	373,75	365,7	338,5

### Observações

\*Armazenar em temperatura ambiente por até 6 meses.

\*CaCl<sub>2</sub> é adicionado separado aos fluídos pois pode haver precipitação.

### Preparação das Soluções de Enzimas

A quantidade de enzima necessária para o preparo das soluções é obtida através das seguintes equações:

$$\text{enzima} = \frac{\text{solução. volume da solução}}{\text{volume da enzima}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{massa (mg)} = \frac{\text{enzima}}{\text{lote}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

Equação 2: Quantidade de enzima que será pesado para utilização.

\*Enzima = atividade enzimática (U/mL) da quantidade pipetada

Solução = atividade enzimática (U/mL) total da solução

Volume da solução = volume total da solução, calculado com base na quantidade de amostras (quantidade de mL x quantidade de tubos. Atentar para não desperdiçar).

Volume da enzima = volume da solução que será pipetado.

Massa = peso em (mg) da enzima por mL.

Lote = atividade enzimática (U/mg) descrita no lote da enzima.

### Observações

Amilase 0,5 mL

$$35,5 * \frac{32,5}{5}$$

35,5 (lote); 32,5 (quantidade necessária)

$$x = \frac{2*285,55}{35,5} = 64,1 \text{ mg}$$

\*Verificar no rótulo a atividade enzimática

Exemplo:

Pepisa

$$\frac{250*104}{1,6} = 16,250$$

$$x = \frac{16,250}{1,6} = 65 \text{ mg}$$

Pancreatina

$$\frac{8*325}{5} = \frac{65 \text{ mg}}{325 \text{ mL}}$$

Tabela 17 – Informações necessárias para as equações 1 e 2

Enzimas	Solução	Volume enzima	Volume solução
$\alpha$ -amilase	75 U/mL	0.5 mL	0.5 × n. de tubos*
Pepsina	2000 U/mL	1.6 mL	1.6 × n. de tubos
*Pancreatina	800 U/mL	5 mL	5 × n. de tubos

\*O número de tubos é calculado com base que para cada amostra são necessários 3 tubos (oral, gástrica e intestinal)

\*Preparar somente na fase gástrica

### Informações Sobre as Enzimas

- $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae* da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA): CAS nº 232-588-1, powder: 35.9 U/mg (verificar o lote).
- Pepsina de mucosa gástrica de suínos (ou pepsina A. O pepsinato de estômago de porco) da Sigma-Aldrich (St. Louis,

Missouri, USA): CAS nº 9001-75-6, powder 421 U/mg (verificar o lote).

- Pancreatina de mucosa gástrica de suínos (ou Pancreatina de pâncreas de porco) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA): CAS nº 8049-47-6, powder 416 U/mg (verificar o lote).

### Observações

- Preparar na fase gástrica (Preparar os sais após 1 hora de início da fase gástrica)
- Preparação e utilização apenas no dia da análise.

### Preparação dos Sais Biliares

Composição dos sais biliares:

- \*0,8 mM glicodesoxicolato de sódio (0,38 g/L) (Preparar para 1L) – CAS nº 16409-34-0
- 0,45 mM de taurodesoxicolato de sódio hidratado (0,23 g/L) – CAS nº 207737-97-1
- 0,75 mM de taurocolato de sódio hidratado (0,40 g/L) – CAS nº 345909-26-4

### Observações

- Fazer os cálculos de proporção
- Misturar os 3, a partir disso, os sais biliares serão formados

### Procedimento Experimental

#### Preparação das Amostras

Definir as fases da digestão:

#### Preparação das Amostras

- Cada uma das amostras deverá ser identificada de acordo com cada fase da digestão (oral, gástrica e intestinal), incluindo a amostra controle.
- A amostra controle segue o protocolo da fase intestinal, mas não são adicionadas enzimas nem sais ( $\text{CaCl}_2$  e sais biliares). Neste caso, estas quantidades devem ser substituídas por água destilada.

#### Fase oral – Procedimento Experimental

- Volume final da fase oral: 5 mL (amostra sólida) e 10 mL (amostra líquida).

- Proporção amostra: reagente = 50:50 (p/v ou v/v) é almejada. No caso de amostras sólidas objetiva-se obter uma consistência pastosa fina.

- O tempo recomendado de contato com a enzima por 2 minutos a 37 °C, o que requer pré-aquecimento de todos os reagentes. (O pré-aquecimento só é necessário de o local de realização da análise for frio).

### Quantidade de Reagentes

Tabela 18- Quantidade de reagentes para realização da fase oral

Reagentes	Fase oral	Controle
Fluído salivar	3.5 mL	3.5 mL
CaCl <sub>2</sub>	25 µL	—
H <sub>2</sub> O	0.975 mL	1.5 mL
α-amilase	0.5 mL	—

### Observação

- Após a adição de todos os reagentes, colocar em banho-maria a 37°C e agitar os tubos a cada 5 minutos.

### Fase Gástrica

- Volume final: 10 mL (amostra sólida) e 20 mL (amostra líquida).
- Proporção fase oral: reagente de 50:50 (p/v ou v/v) é definida.
- O tempo de digestão recomendado é de 2 horas a 37 °C
- O pH para (2.0) pode ter que ser reajustado com HCl 1 M.

### Quantidade de Reagentes

Tabela 19 – Reagentes da fase gástrica

Amostra sólida		
Reagentes	Fase gástrica	Controle
Fluído gástrico	3.75 mL	3.75 mL
CaCl <sub>2</sub>	1.25 µL	—
H <sub>2</sub> O	0.35 mL	1.6 mL

Pepsina	1,6 mL	—
<b>Amostra Líquida</b>		
Reagentes	Fase gástrica	Controle
Fluído gástrico	7,5 mL	7,5 mL
CaCl <sub>2</sub>	20 µL	—
H <sub>2</sub> O	0,7 mL	2,32 mL
Pepsina	3,2 mL	—

### Fase Gástrica

### Fase Intestinal

- Volume final da fase gástrica: 20 mL (amostra sólida) e 40 mL (amostra líquida).
- Uma proporção fase gástrica: reagente de 50:50 (p/v ou v/v) é definida.
- O tempo de digestão recomendado é de 2 horas a 37°C.
- A adição de base (1M NaOH) será necessária para neutralizar a mistura para pH 7,0.

### Quantidade de Reagentes

Tabela 20- Reagentes da fase intestinal

Fase intestinal		
Reagentes	Amostra sólida	Controle
Fluído intestinal	5.5 mL	5.5 mL
Sais biliares	1.25 mL	—
CaCl <sub>2</sub>	20 µL	—
NaOH	0.73 mL	0,73 mL
H <sub>2</sub> O	—	3,77 mL
Pancreatina	2,5 mL	—
<b>Pancreatina</b>		

Fluído intestinal	11 mL	11 mL
Sais biliares	2.5 mL	—
CaCl <sub>2</sub>	40 µL	—
NaOH	1.46 mL	1,46 mL
H <sub>2</sub> O	—	7,54
Pancreatina	5 mL	—

### Anotações

- Precisam ser realizadas análises de antioxidante, HPLC e perfil de fenólicos

## 5.2. MÉTODO DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE GEMA DE OVO TAMPONADA POR EXTRATOS

O método de Kuppusamy, Indran e Balraj (2002) foi modificado, para determinar as condições que induziriam uma elevada quantidade de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um produto secundário da peroxidação lipídica.

A gema de ovo de galinha — composta principalmente de fosfolipídios, triacilgliceróis e proteínas — foi usada como alternativa aos microsomas de fígado de rato e ácido linoleico, que eram mais caros e exigiam preparação tediosa (Kuppusamy et al., 2002).

A lecitina — um componente importante dos sistemas celulares — é adequada para o ensaio de peroxidação lipídica porque os lipídios insaturados são mais propensos à oxidação.

O uso de gema de ovo de galinha tamponada foi rentável.

### Reagentes

- Ovo de galinha
- Ácido tiobarbitúrico (TBA)
- Ácido tricloroacético (TCA)
- Fosfato de sódio monobásico anidro
- Fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado
- DL-catequina

- Sulfato ferroso
- Ácido acético

#### Solução tampão fosfato

- Tampão fosfato de sódio pH 7,4 (Ajustar) preparado com 1,2 g de fosfato de sódio monobásico anidro e 13,4 g de fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado, diluídos em água purificada até um volume final de 1000 mL.

O pH final foi ajustado com fosfato de sódio monobásico anidro.

#### Solução de Sulfato Ferroso 4 mmol/L – Microplaca

Pesar 0,0608 g de sulfato ferroso e diluir em 100 mL de água ultrapura.

#### Solução de Sulfato Ferroso 1000 µM – Tubo

Pesar 0,0152 g de sulfato ferroso e diluir em 100 mL de água.

$$\% \text{ inibição} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Amostra}}{\text{Branco}} \right) \right] * 100$$

- Onde A0 se refere à absorbância do controle
- As é a absorbância da amostra.

Para determinar a concentração necessária para atingir 50% de inibição da oxidação de fosfolipídios na gema de ovo, a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica foi plotada em relação à concentração do extrato.

#### Referências:

##### Métodos de Tubos de Ensaio

(Daker et al., 2008)

##### Método Adaptado para Microplaca

(Margraf et al., 2016).

### 5.3. ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA (INIBIÇÃO DA A-AMILASE E DA A-GLUCOSIDASE)

Os ensaios consistem na inibição da  $\alpha$ -amilase e da  $\alpha$ -glucosidase, enzimas vinculadas à digestão do amido. Os ensaios podem ser realizados com a amostra líquida original (extrato vegetal), bem como com a amostra liofilizada, testando diferentes concentrações (concentrações sugeridas: 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  – contudo, outras concentrações podem ser testadas,

de acordo com a pesquisa). As soluções devem ser guardadas ao abrigo da luz (pode ser utilizado papel alumínio para embalar o balão volumétrico) e estocadas em geladeira, por no máximo, 24 antes da realização da análise.

Para a amostra líquida original: adicionar diretamente a amostra.

Para as amostras em diferentes concentrações: fazer 100 mL de cada solução. Em balão volumétrico de 100 mL, adicionar a massa correspondente a cada concentração, como mostrado no Quadro 1. Completar o volume com água destilada, até o menisco e homogeneizar.

Quadro 1 – Preparação das soluções

Concentração de extrato vegetal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Massa (liofilizada) de extrato vegetal para 100 mL de solução (g)
50	0,005
100	0,010
250	0,025
500	0,050

#### 5.4. INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE

##### Meio Reacional:

Em um tubo de ensaio, adicionar 50  $\mu\text{L}$  da amostra (extrato vegetal) e 500  $\mu\text{L}$  da solução de  $\alpha$ -amilase. Incubar a 25°C por 10 min. Em seguida, adicionar 500  $\mu\text{L}$  de solução de amido a 1% (uma unidade da enzima irá liberar 1 mg de maltose do amido em 3 min). Incubar novamente a 25°C por 10 min. Adicionar 1 mL de reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Incubar em banho fervente por 5 min e resfriar até a temperatura ambiente. Adicionar 10 mL de água destilada.

##### Controle

Em um tubo de ensaio, adicionar 50  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato de sódio 20 mM (em substituição ao extrato), 500  $\mu\text{L}$  da solução de

$\alpha$ -amilase. Incubar a 25°C por 10 min. Em seguida, adicionar 500  $\mu$ L de solução de amido a 1%. Incubar novamente a 25°C por 10 min. Adicionar 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Incubar em banho fervente por 5 min e resfriar até a temperatura ambiente. Adicionar 10 mL de água destilada.

### Leitura

Zerar o espectrofotômetro com água destilada. Fazer a leitura da absorbância do meio reacional (ABS samples) e do controle (ABS control) no comprimento de onda de 540 nm. A inibição da  $\alpha$ -amilase é expressa em porcentagem de inibição usando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostras}}{\text{Abs controle}} * 100$$

### Soluções

Verificar os volumes necessários para não fazer soluções em excesso. Se necessário, refazer os cálculos para o volume correspondente.

#### Tampão de Fosfato de Sódio 20 mM (pH 6,9 com NaCl 6 mM):

- Fazer uma solução de NaCl 6mM: pesar 0,3506 g de NaCl e transferir para um balão de 1 litro. Completar o volume com água destilada.
- Retirar 20 mL da solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,9 (descrita no roteiro de atividade de  $\alpha$ -glucosidase) e transferir para um balão de 100 mL. Perfechar o volume com a solução de NaCl 6mM. A solução deverá ser guardada em geladeira.

#### Solução de $\alpha$ -amilase (0,5 mg/mL) em Tampão de Fosfato de Fódio 20 mM (pH 6,9 com NaCl 6 mM) (TAKA diastase de *Aspergillus oryzae*, ~100 U/mg, Sigma-Aldrich)

- A cada 1 mL de tampão de fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9 com NaCl 6 mM), adicionar 0,5 mg de  $\alpha$ -amilase. Ajustar a quantidade de amostras testadas – fazer sempre a quantidade que será utilizada, sem sobras.

#### Solução de amido a 1% (10 mg/mL) em tampão de fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9 com NaCl 6 mM)

- Utilizar 0,2 g de amido em 20 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9), com NaCl. O volume total irá depender da quantidade de amostras testadas.

#### Solução reagente DNS

- Adicionar 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N a 2,5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e aproximadamente 125 mL de água destilada e agitar até a dissolução. Posteriormente, adicionar 75 g do sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio) e completar o volume da solução para 250 mL. Esta reagente é instável na presença de luz e CO<sub>2</sub>.

#### Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2N

- Utilizar 8 g de hidróxido de sódio em 100 mL de água destilada. O volume total irá depender da quantidade de amostras testadas.

#### Referências Bibliográficas

(Oboh *et al.*, 2010; Oboh, Ademiluyi e Faloye, 2011).

## 5.5. INIBIÇÃO DA ALFA-GLUCOSIDASE

### Meio reacional

Em um tubo de ensaio, adicionar 1 mL da amostra (extrato vegetal) e 2 mL da solução de  $\alpha$ -glucosidase. Incubar a 25°C por 10 min. Em seguida, adicionar 1 mL de solução de pNPG (uma unidade da enzima irá liberar 1  $\mu$ mol de D-glicose de p-nitrofenil- $\alpha$ D-glucosídeo por minuto). Incubar novamente a 25°C por 5 min.

### Controle

Em um tubo de ensaio, adicionar 1 mL tampão fosfato de sódio 0,1 M (em substituição ao extrato) e 2 mL da solução de  $\alpha$ -glucosidase. Incubar a 25°C por 10 min. Em seguida, adicionar 1 mL de solução de pNPG. Incubar novamente a 25°C por 5 min.

### Leitura

Zerar o espectrofotômetro com água destilada. Fazer a leitura da absorbância do meio reacional (ABS samples) e do controle (ABS

control) no comprimento de onda de 405 nm. A inibição da  $\alpha$ -glucosidase é expressa em porcentagem de inibição:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostras}}{\text{Abs controle}} * 100$$

### Soluções ( $\alpha$ -glucosidase)

#### Tampão de fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,9)

##### Solução A:

Solução 0,2 M: pesar 27,6 g de fosfato de sódio monobásico. Adicionar em balão volumétrico de 1000 mL e completar até o menisco com água destilada.

##### Solução B

Solução 0,2 M fosfato de sódio dibásico: pesar 28,4 g e completar para 1000 mL.

- Preparar o tampão misturando 45 mL da Solução A e 55 mL da Solução B e completando para 200 mL com água destilada.

**Solução de  $\alpha$ -glucosidase (1 U/mL)** ( $\alpha$ -glucosidase de *Aspergillus niger* 30–60 U/mg, Sigma-Aldrich)

- A cada 1 mL de tampão pH 6,9, adicionar 0,016667 mg de  $\alpha$ -glucosidase.

#### Solução pNPG 5 mM em tampão de fosfato pH 6,9

- Pesar 0,105056 g de pNPG para 100 mL.

### Referência bibliográfica

(Apostolidis, Kwon e Shetty, 2007)

## 5.6. ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA (INIBIÇÃO DA ECA)

O ensaio consiste na inibição angiotensina (ECA), vinculada ao aumento da pressão arterial. O ensaio pode ser realizado com a amostra líquida original (extrato vegetal), bem como com a amostra liofilizada, testando diferentes concentrações (concentrações sugeridas: 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  – contudo, outras concentrações podem ser testadas, de acordo com a pesquisa). As soluções devem ser guardadas ao abrigo da luz (pode ser utilizado papel alumínio para embalar o balão volumétrico) e estocadas em geladeira, por no máximo, 24 antes da realização da análise.

- Para a amostra líquida original: adicionar diretamente a amostra.

Para as amostras em diferentes concentrações: Preparar 100 mL de cada solução.

- Em balão volumétrico de 100 mL, adicionar a massa correspondente a cada concentração, como mostrado no Quadro 1.

- Completar o volume com água destilada, até o menisco e homogeneizar.

Concentração de extrato vegetal mg/mL	Massa (liofilizada) de extrato vegetal para 100 mL de solução (g)
50	0,005
100	0,010
250	0,025
500	0,050

### Enzima

ACE, humana, recombinante, 10 U mg<sup>-1</sup>, expressa em células HEK 293, Sigma-Aldrich.

### Meio reacional

Em um tubo de ensaio, adicionar:

- 200 µL da amostra (extrato vegetal),
- 100 µL da solução 50mU de ACE, e
- 2 mL de uma solução 0,5 mM do substrato furilacriloil-fenilalanilglicil-glicina (FAPGG).

- Incubar a 25°C por 30 minutos
- A hidrólise de FAPGG por ACE resulta em uma diminuição na absorbância em 340 nm.

### Controle

Em um tubo de ensaio:

- Adicionar 200 µL do tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M),
- 100 µL da solução 50mU de ACE e

- 2 mL de uma solução 0,5 mM de FAPGG.

Incubar a 25°C por 30 min.

### Leitura

Zerar o espectrofotômetro com água destilada. Fazer a leitura da absorbância do meio reacional (ABS samples) e do controle (ABS control) no comprimento de onda de 340 nm. A inibição da ECA é expressa em porcentagem de inibição usando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostras}}{\text{Abs controle}} * 100$$

### Soluções

Verificar os volumes necessários para não fazer soluções em excesso. Se necessário, refazer os cálculos para o volume correspondente. Identificar as soluções com nome da solução, data de preparo e nome de quem preparou.

#### Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M

- Preparar a solução de NaCl 0,3M: pesar 17,532 g de NaCl, acrescentar em um balão volumétrico de 1.000 mL e completar com água ultrapura.
- Dissolver 6,057 g de Tris-base em 800 mL da solução de NaCl 0,3M.
- Ajustar o pH com HCl concentrado. Cerca de 3,5 mL de HCl são necessários para o pH 7,5.
- Adicionar solução de NaCl 0,3M até completar 1.000 mL.
- Autoclavar a 121°C por 15 min. Resfriar. Guardar em geladeira por no máximo 30 dias.

#### Solução 50mU de ECA dissolvida em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M (Angiotensina $\geq 10$ U/mg, expressada em HECK 293 cells, Sigma-Aldrich)

- Dissolver a embalagem de 0,5 U em 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M.
- Após utilizar o volume necessário, congelar o restante em ultra freezer.

#### Solução 0,5 mM do substrato furil acrilóil-fenilalanina glicil-glicina (FAPGG) dissolvido em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo NaCl 0,3 M)

- Dissolver a embalagem de 25 mg em 125 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M.
- Após utilizar o volume necessário, congelar o restante em ultra freezer.

#### Referências bibliográficas

(Elavarasan e Shamasundar, 2014; Raghavan e Kristinsson, 2009).

## 5.7. PROTOCOLO DE ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATOS POR EXTRUSÃO E GELIFICAÇÃO IÔNICA

### Objetivo

O objetivo deste procedimento é realizar a encapsulação de extratos vegetais por extrusão e gelificação iônica, utilizando alginato de sódio e cloreto de cálcio como agentes formadores da matriz polimérica e quitosana como agente de revestimento.

A metodologia visa a obtenção de microcápsulas estáveis, capazes de proteger compostos bioativos sensíveis à luz, oxigênio e temperatura, prolongando sua estabilidade e permitindo liberação controlada em aplicações futuras, como em alimentos, fármacos ou cosméticos.

### Fundamento Teórico

A encapsulação é uma técnica utilizada para proteger e estabilizar compostos bioativos, especialmente aqueles que são sensíveis a condições ambientais como luz, oxigênio, pH e temperatura. Dentre os métodos disponíveis, a extrusão seguida de gelificação iônica é amplamente empregada por ser um processo simples, de baixo custo e que não exige condições extremas, preservando a integridade das substâncias encapsuladas.

Neste método, o alginato de sódio atua como polímero formador da cápsula. Quando a solução de alginato entra em contato com uma solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), ocorre a troca iônica entre os íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), promovendo a reticulação das cadeias poliméricas e resultando na formação de um gel tridimensional estável. Esse processo dá origem às microesferas ou cápsulas que aprisionam o extrato no seu interior.

A quitosana, um biopolímero catiônico, é utilizada como revestimento externo das cápsulas de alginato, formando uma barreira adicional que melhora a resistência mecânica, a estabilidade e o controle da liberação dos compostos bioativos. Já o citrato de sódio é empregado posteriormente para o rompimento das cápsulas, atuando na desestabilização da rede polimérica e liberando o conteúdo encapsulado para análise.

A eficiência da encapsulação e a estabilidade das cápsulas dependem de variáveis como concentração dos polímeros, pH da solução, temperatura, velocidade de agitação e tempo de gelificação. O controle dessas condições é fundamental para garantir a uniformidade e a funcionalidade das cápsulas formadas.

### Materiais

- Alginato de sódio 1%: preparar em Erlenmeyer, sob agitação e leve aquecimento gradativo até completa dissolução do alginato.
- Cloreto de cálcio 3,2%: Cuidado no preparo, pois a solução esquenta; recomenda-se preparar em banho de gelo.
- Quitosana 0,4%: dissolver 0,4 g de quitosana em 90 mL de água destilada e acidificar essa solução com 0,4 mL do ácido acético glacial, ajustar o pH entre 5,7 e 6 por adição de Hidróxido de sódio (NaOH) 1M, filtrar se necessário em papel filtro e ajustar o volume para 100 mL em balão volumétrico.
- Citrato de sódio 5%: preparar a solução em água destilada.

### Equipamentos e vidrarias

- Agitador magnético
- Buretas interligadas a ponteiros de pipetas de 200 – 1000 µL
- Béquer de 200 mL
- Balão volumétrico de 100 mL
- Erlenmeyer
- Bastão de vidro

### Preparo da amostra

A metodologia utilizada como base metodológica prevê a percolação do extrato e uso de álcool 60% como solvente, no

entanto, essa etapa de obtenção do extrato e escolha do solvente é particular a cada projeto.

#### Encapsulação por metodologia adaptada de (Mendes et al., 2021).

- Homogeneizar 2 mL de extrato concentrado hidroalcoólico com 20 mL de solução de alginato de sódio 1%.
- Com auxílio de buretas interligadas às ponteiras de 200 ou 1000  $\mu\text{L}$ , gotear esta solução em 100 mL de Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) sob agitação constante (velocidade média) no agitador.
- Após total gotejamento, deixar a solução contendo as cápsulas em repouso por 30 minutos para completa gelificação.
- Filtrar a solução, retendo somente as cápsulas, lavar as cápsulas com água destilada por 3 vezes. Em seguida, deixar as cápsulas na solução de quitosana 0,4% em repouso por 40 minutos.
- Após o repouso, descartar a solução e lavar as cápsulas com água destilada por 3 vezes.
- Secar as cápsulas espalhadas de maneira uniforme em estufa a 40 °C para completa retirada de solução e água residual.

#### Rompimento das cápsulas

- Pesar 1 g de cápsulas e adicionar 10 mL de citrato de sódio 5% em tubos de falcon de 15 mL.
- Agitar em vórtex até a completa diluição das cápsulas; esse processo pode levar de 30 a 50 minutos.
- Esse extrato que se formará no tubo é o utilizado para as análises de bioativos contidos nas cápsulas.

#### Observações

- Realizar o procedimento de obtenção dos extratos na ausência de luz.
- Para os extratos hidroalcoólicos, homogeneizar 400 g de amostras (secas e moídas) em 4000 mL de solvente (álcool 60%), deixar sob agitação por 12 a 24 horas em ambiente escuro.
- Em seguida, reservar o extrato em percolador contendo em seu interior camadas de algodão e papel filtro para potencializar a extração.

- Percolar o extrato por 72 horas, com gotejamento de 30 gotas/min em frascos âmbar, recoberto por papel alumínio.
- Concentrar o extrato percolado em rota evaporadora a 45 °C, até remoção de 95% do solvente extrator.
- Atenção à temperatura de evaporação, pois dependendo do composto bioativo de interesse, temperaturas muito elevadas afetam a estabilidade do composto.

#### Referência bibliográfica

(Mendes et al., 2021).

## CAPÍTULO

# 06

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

### 6.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. Consensus by AOAC Methods Committee on Microbiology on Sept, v. 18, n. 12, p. 1-46, 2012.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.; SHETTY, K. Inhibitory potential of herb , fruit , and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. v. 8, p. 46–54, 2007.

ARAUJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. Viçosa: UFV. [s.l: s.n.].

ARAÚJO, J. M. A. **Compostos Cianogênicos Araújo**, 2011.

BERKER, K. I.; OLGUN, F. A. O.; OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Modified Folin – Ciocalteu Antioxidant Capacity Assay for Measuring Lipophilic Antioxidants. 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of Condensed Tannins Using Acidified Vanillin. **Applied Biochemistry Division**, p. 788–794, 1978.

CASTRO, D. S. DE; MOREIRA, S.; MARCIA, L.; GOMES, J. P.; MARIA, R.; FIGUEIRÊDO, F. DE. Isolation and characterization of starch from pitomba endocarp. **Food Research International**, p. #pagerange#, 2018.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7429–7436, 2006.

DAKER, M.; ABDULLAH, N.; VIKINESWARY, S.; GOH, P. C.; KUPPUSAMY, U. R. Food Chemistry Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp . as stabiliser of lipid-rich foods. v. 107, p. 1092–1098, 2008.

DURAN, P. R. M.; PADILLA, R. B.; MARTÍN, A. M.; URSINOS, J. A. F. R. DE. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. v. 42, p. 271–276, 1991.

EISELE, T. *et al.* Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. p. 1269–1278, 2005.

ELAVARASAN, K.; SHAMASUNDAR, B. A. Original article Angiotensin

l-converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates prepared from three freshwater carps ( *Catla catla* , *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala* ) using Flavorzyme. p. 1344–1350, 2014.

FRANCIS, F. J. *Analysis of Anthocyanins*. [s.l.] ACADEMIC PRESS, INC., 1982.

HERALD, T. J.; GADGIL, P.; TILLEY, M.; WILEY, J. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour ‡. n. January, p. 2326–2331, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos (Edição IV)*, 2008.

KAKADE, M. L.; SIMONS, N. R.; LIENER, I. E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chemistry*, v. 46, n. June, p. 518–526, 1969.

KRATCHANOVA, M.; PAVLOVA, E.; PANCHEV, I. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. v. 56, p. 181–185, 2004.

LEE, J.; BARNES, K. W.; EISELE, T.; HACHÉ, M. M. G. J.; HOFSSOMMER, H.; KOSWIG, S.; KUPINA, D. A. K. S.; MARTINSEN, S. K. M. B. K.; MILLER, T. C.; SKREDE, F. P. A. R. G.; WIGHTMAN, U. T. J. D. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

MARGRAF, T.; NEULYANA, É.; SANTOS, T.; FORVILLE, E.; ANDRADE, D.; RUTH, S. M. VAN; GRANATO, D. Effects of geographical origin , variety and farming system on the chemical markers and in vitro antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. *FRIN*, v. 82, p. 145–155, 2016.

MENDES, D. DE C. S.; ASQUIERI, E. R.; BATISTA, R. D.; MORAIS, C. C. DE; RAMIREZ ASCHERI, D. P.; MACÊDO, I. Y. L. DE; SOUZA GIL, E. DE. Microencapsulation of jabuticaba extracts (*Myrciaria cauliflora*): Evaluation of their bioactive and thermal properties in cassava starch biscuits. *Lwt*, v. 137, n. May 2020, 2021.

OBOH, G.; ADEMILUYI, A. O.; FALOYE, Y. M. Effect of Combination on

the Antioxidant and Inhibitory Properties of Tropical Pepper Varieties Against  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Activities In Vitro. v. 14, n. 10, p. 1152-1158, 2011.

OBOH, G.; AKINYEMI, A. J.; ADEMILUYI, A. O.; ADEFEGHA, S. A. Inhibitory effects of aqueous extract of two varieties of ginger on some key enzymes linked to type-2 diabetes in vitro. v. 49, n. 1, p. 14-20, 2010.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. v. 557, n. 1969, 1977.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, v. 117, n. 4, p. 582-588, 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. [s.l: s.n.].

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; FILHO, J. M.; MOREIRA, A. V. B. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema  $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico. *Embrapa*, v. 53, n. 9, p. 1689-1699, 2006.

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; MORAIS, DE, S. M.; SAMPAIO, GOES, C. DE; PÉREZ-JIMÉNEZ; JARA; SAURA-CALIXTO; DIEGO, F. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. *Comunicado Técnico*, p. 0-3, 2007.

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; MORAIS, S. M. DE; SAMPAIO, C. DE G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Comunicado Técnico*, 125 *Embrapa*, p. 3-6, 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, n. 48, p. 144-58, 1965.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. COAUT; MAYOR, F. TR. *Análise de vitaminas: Métodos comprovados*. [s.l: s.n.].

SWAIN, T.; HILLIS, W. E.; SWAIN, T.; HILLIS, A. E. The phenolic

constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 10, n. 1, p. 63–68, 1959.

TORRALBO, D. F.; BATISTA, K. A.; DI-MEDEIROS, M. C. B.; FERNANDES, K. F. Food Hydrocolloids Extraction and partial characterization of *Solanum lycocarpum* pectin. *Food hydrocolloids*, v. 27, n. 2, p. 378–383, 2012.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999a.

—. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals *Food Chemistry*, 1999b.

## *Organizadoras*

**Mariana Alencar da Macena Viana**

Estagiária em Engenharia de Alimentos – Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos

**Glêndara Aparecida de Souza Martins**

Engenheira de Alimentos, doutora em Biotecnologia – Coordenadora do Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos

# *Revisores*

## **Camila da Costa Gomes**

Mestranda em Ciência de Alimentos – Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos

## **Luana Regina Pereira Alves**

Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos

## **Rômulo Alves Moraes**

Engenheiro de Alimentos, doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos

## **Josineide Pereira de Sousa**

Bacharel em Química – Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos

