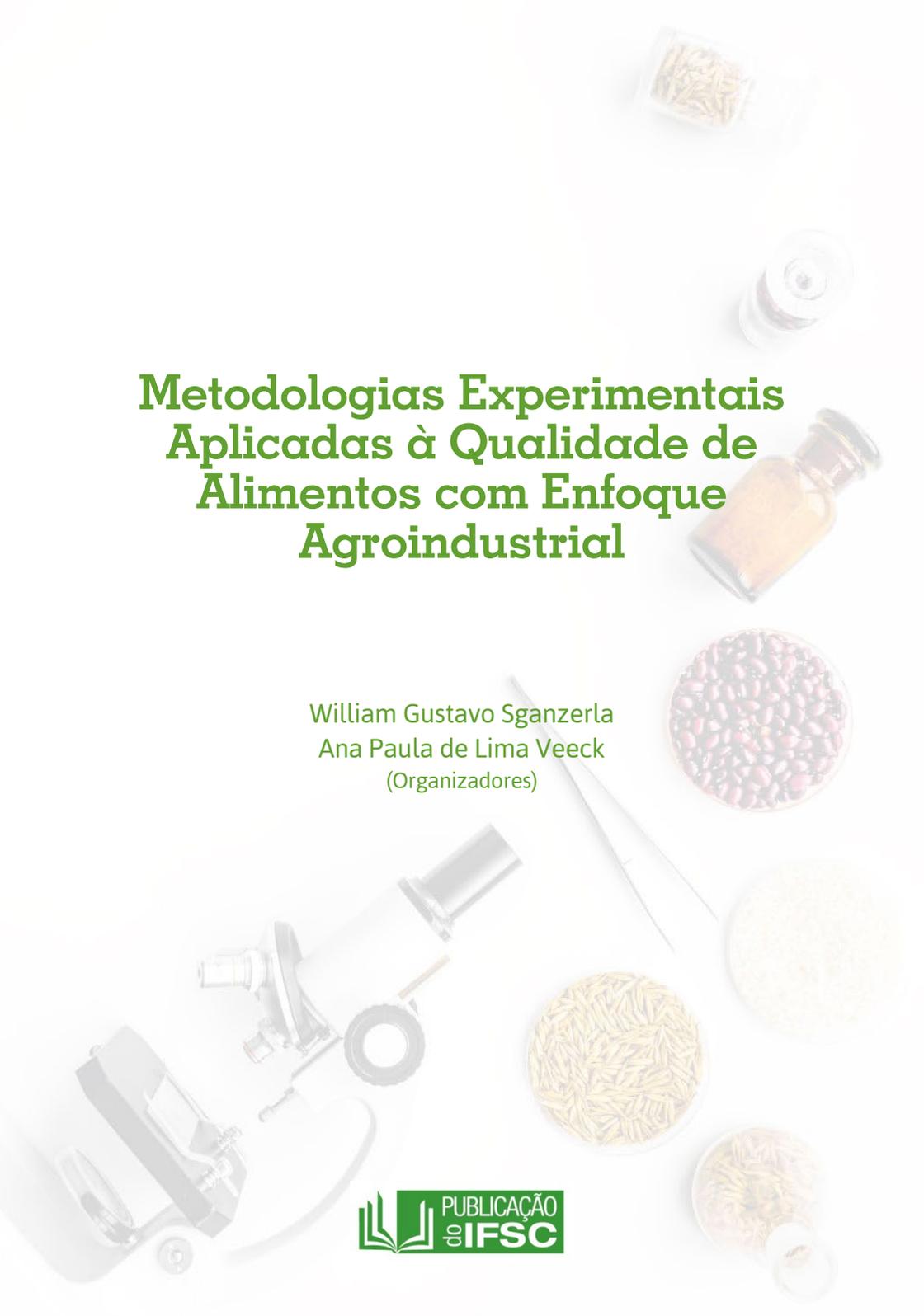


# METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS APLICADAS A QUALIDADE DE ALIMENTOS COM ENFOQUE AGROINDUSTRIAL

William Gustavo Sganzerla (Org.)  
Ana Paula de Lima Veeck (Org.)



# Metodologias Experimentais Aplicadas à Qualidade de Alimentos com Enfoque Agroindustrial

William Gustavo Sganzerla  
Ana Paula de Lima Veeck  
(Organizadores)

# Metodologias Experimentais Aplicadas à Qualidade de Alimentos com Enfoque Agroindustrial



Florianópolis/SC  
2022

Sumário

# Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina - IFSC

## **Reitor**

Maurício Gariba Júnior

## **Pró-Reitores**

Pró-Reitor de Administração: Aloisio da Silva Junior

Pró-Reitor de Desenvolvimento Institucional: Jesue Graciliano da Silva

Pró-Reitor de Ensino: Adriano Larentes da Silva

Pró-Reitor de Extensão e Relações Externas: Valter Vander de Oliveira

Pró-Reitora de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação: Flavia Maia Moreira

## **Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação**

Clóvis Antônio Petry

---

## **IFSC, Câmpus Lages**

### **Diretor do Câmpus**

Vilson Heck Junior

### **Chefe de Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão**

Silmar Primieri

### **Coordenador de Pesquisa**

João Gustavo Provesi

# Ficha Técnica

## Organizadores

William Gustavo Sganzerla e Ana Paula de Lima Veeck

## Colaboradores

Ana Letícia Andrade Ferreira, Aline Priscilla Gomes da Silva, Cleonice Gonçalves da Rosa, Gabriel Bacheга Rosa, Jhonatan da Silva, Jocleita Peruzzo Ferrareze, Leandra Oliveira Xavier, Michael Ramos Nunes, Mônia Stremel Azevedo, Natiele Correia Veloso e Rosane Schenkel de Aquino

## Capa e Projeto gráfico

Glauco Borges

## Revisão técnica

Aline Priscilla Gomes da Silva

## Revisão de texto

Saionara Greggio

Este projeto recebeu apoio com recursos financeiros da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação do IFSC (PROPPi), do CNPq e do Câmpus Lages.

Reprodução total ou parcial dessa obra autorizada pelos organizadores e pela instituição para fins educativos e não comerciais.

ISBN 978-65-996422-6-5

# Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (IFSC)

## **Reitoria:**

Rua 14 de Julho, 150 – Coqueiros  
Florianópolis – Santa Catarina  
CEP: 88075-010  
Telefone: (48) 3877-9000  
[www.ifsc.edu.br](http://www.ifsc.edu.br)

## **Câmpus Lages:**

Rua Heitor Villa Lobos, 222 – São Francisco  
Lages – Santa Catarina  
CEP: 88506-400  
Telefone: (49) 3221-4200  
[www.ifsc.edu.br/web/campus-lages](http://www.ifsc.edu.br/web/campus-lages)

Catálogo na fonte pela Biblioteca do Instituto Federal de Santa Catarina.

M593 Metodologias experimentais aplicadas à qualidade de alimentos com enfoque agroindustrial / William Gustavo Sganzerla, Ana Paula de Lima Veeck (Organizadores). – Florianópolis : Publicações do IFSC, 2022.  
144 p.

ISBN: 978-65-996422-6-5

1. Alimentos - Qualidade. 2. Alimentos - Análise. 3. Tecnologia de Alimentos. I.Sganzerla, William Gustavo. II. Veeck, Ana Paula de Lima. III. Título.

CDD 664

Elaborada pela Bibliotecária Karla Viviane Garcia Moraes – CRB14/1002

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1 - Aplicação das Metodologias Experimentais para a Qualidade de Alimentos: Introdução Geral 15**

*Autores: William Gustavo Sganzerla, Ana Paula de Lima Veeck*

### **CAPÍTULO 2 - Amostragem e Preparo de Amostras para Análises Laboratoriais: um Enfoque em Alimentos 21**

*Autores: William Gustavo Sganzerla, Ana Paula de Lima Veeck, Mônia Stremel Azevedo*

### **CAPÍTULO 3 - Análises Físico-Químicas em Alimentos 30**

*Autores: William Gustavo Sganzerla, Ana Letícia Andrade Ferreira, Mônia Stremel Azevedo, Ana Paula de Lima Veeck*

- Determinação da umidade e cinzas por gravimetria 33
- Quantificação de lipídeos pelo método de bligh-dyer 35
- Determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia a gás 37
- Quantificação de proteínas pelo método de kjeldahl 39
- Quantificação de proteínas pelo método de bradford 41
- Determinação de glicídios redutores, não-redutores e totais por titulação 43
- Determinação de açúcares totais, redutores e não redutores por espectrofotometria UV-VIS 47
- Determinação de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel 50
- Determinação de carboidratos por diferença 56
- Cálculo aproximado do teor calórico de alimentos 57
- Determinação do pH e da acidez total titulável 58
- Determinação de vitamina C com iodato de potássio 59
- Análise de espécies redutoras de mioglobina 61
- Determinação das espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – TBARS 63

### **CAPÍTULO 4 - Métodos de Extração e Quantificação de Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante 62**

*Autores: William Gustavo Sganzerla, Cleonice Gonçalves da Rosa, Aline Priscilla Gomes da Silva, Michael Ramos Nunes, Ana Paula de Lima Veeck*

- Introdução geral: compostos bioativos 66
- Métodos de extração de compostos bioativos 69
- Avaliação de compostos fenólicos totais 72

Determinação de flavonoides totais – método 1	74
Determinação de flavonoides totais – método 2	76
Determinação de flavonoides totais – método 3	78
Determinação de antocianinas totais por pH diferencial – método 1	80
Extração e determinação de antocianinas totais – método 2	82
Extração e determinação de carotenoides totais – método 1	84
Extração e determinação de carotenoides totais – método 2	85
Extração e determinação de clorofilas e carotenoides em folhas	86
Avaliação da atividade antioxidante pela inibição do radical livre ABTS	87
Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power	89
Avaliação da atividade antioxidante pela inibição do radical livre DPPH	91
Cálculos para expressar os resultados de atividade antioxidante – métodos DPPH, ABTS e FRAP	93
Avaliação da atividade anti-hiperglicêmica in vitro pela inibição da enzima $\alpha$ -glucosidase	14

## **CAPÍTULO 5 - Métodos de Análise da Atividade Microbiana em Alimentos** 95

*Autores: Natiele Correia Veloso, Rosane Schenkel de Aquino*

Determinação da atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais	99
Análise de <i>staphylococcus aureus</i> , coliformes e <i>salmonela spp</i>	113
Contagem de <i>staphylococcus aureus</i>	114
Contagem de coliformes totais e bactérias termotolerantes em alimentos - Técnica do número mais provável	118
Contagem de salmonella em alimentos	120
Contagem total de bolores e leveduras e bactérias mesófilos em alimentos	123

## **CAPÍTULO 6 - Análise da Atividade Enzimática em Alimentos Vegetais** 122

*Autores: Gabriel Bachega Rosa, Leandra Oliveira Xavier, Jhonatan da Silva, Jocleita Peruzzo Ferrareze*

Procedimentos gerais para análises enzimáticas	127
Atividade da enzima peroxidase – POD	130
Atividade da enzima catalase – CAT	131
Atividade da enzima polifenoloxidase – PPO	132
Atividade da enzima ascorbato peroxidase – APX	133
Atividade da enzima superóxido dismutase – SOD	134

**CAPÍTULO 7 - Aplicação das Metodologias Experimentais para Análise de Alimentos 130**

*Autores: William Gustavo Sganzerla, Ana Paula de Lima Veeck*

Resultados obtidos e Considerações Finais 130

## Sobre os autores-organizadores



### **William Gustavo Sganzerla**

Bacharel em Engenharia Química e doutorando no programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Atuou como bolsista de pesquisa e desenvolvimento no Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Câmpus Lages, em projetos relacionados à qualidade de alimentos, frutas nativas, compostos bioativos, antioxidantes naturais, desenvolvimento de embalagens inovadoras para conservação de alimentos e nanomateriais. Atualmente, trabalha com a avaliação de parâmetros técnico-econômicos e ambientais, propondo alternativas inovadoras para a transformação de resíduos agroindustriais em bioenergia e produtos de valor agregado em um conceito de biorrefinaria.

E-mail: [sganzerla.william@gmail.com](mailto:sganzerla.william@gmail.com)



### **Ana Paula de Lima Veeck**

Graduada em Farmácia e Bioquímica - Tecnologia dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestra e Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela mesma Instituição. É professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico do Instituto Federal de Santa Catarina, Câmpus Lages. Atuou na Coordenação do curso Técnico em Biotecnologia e na Coordenação de Pesquisa e Inovação. Atua principalmente nos seguintes temas: qualidade de alimentos, compostos bioativos, antioxidantes naturais, oxidação lipídica, pescados e frutas nativas.

E-mail: [ana.veeck@ifsc.edu.br](mailto:ana.veeck@ifsc.edu.br)

## Sobre os autores-colaboradores



### **Ana Letícia Andrade Ferreira**

Graduada em Tecnologia de Processos Químicos pelo Instituto Federal de Santa Catarina, Câmpus Lages. Atuou, na mesma instituição, desde 2018 como bolsista de pesquisa em projetos que envolvem frutas nativas, composição centesimal, compostos bioativos, atividade antioxidante e proteínas anticongelantes.



### **Aline Priscilla Gomes da Silva**

Atualmente é pós-doutoranda na Michigan State University. Engenheira Agrônoma e Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba. Doutora em Ciências pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP). Tem experiência na área de fisiologia pós-colheita, atuando principalmente nos seguintes temas: amadurecimento, quantificação e caracterização de compostos bioativos em frutos.



### **Cleonice Gonçalves da Rosa**

Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina. Possui experiência nos seguintes temas: alimentos funcionais, nanotecnologia, encapsulação, embalagens biodegradáveis, biopolímeros, estresse oxidativo, óleos essenciais, fitoquímicos de frutas e plantas medicinais.



### **Gabriel Bachega Rosa**

Graduado em Tecnologia de Processos Químicos pelo Instituto Federal de Santa Catarina, Câmpus Lages. Atuou em projetos de pesquisa na área de aplicação de biopolímeros antioxidantes para a conservação pós-colheita de uvas.



### **Jhonatan da Silva**

Graduado em Engenharia Química e mestrando em Ciências Ambientais pela Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Atuou como bolsista de pesquisa no Instituto Federal de Santa Catarina, Câmpus Lages, em projeto relacionado à aplicação de ácido salicílico visando à redução da atividade enzimática em tubérculos de batata.



### **Jocleita Peruzzo Ferrareze**

Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa. Docente do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Câmpus Lages. Atua em linhas de pesquisa relacionadas à tecnologia pós-colheita, especificamente sobre a atividade enzimática de vegetais.



### **Leandra Oliveira Xavier**

Graduada em Tecnologia de Processos Químicos pelo Instituto Federal de Santa Catarina, Câmpus Lages. Atuou em projetos de pesquisa relacionados ao desenvolvimento e caracterização de nanocompósito para utilização como embalagem primeira em pescados.



### **Michael Ramos Nunes**

Possui Graduação e Mestrado em Química pela Universidade Federal de Pelotas, e Doutorado em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Docente do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC). Trabalha com pesquisas na área de Físico-Química de Materiais. Atua no desenvolvimento de materiais com superfícies ativas, nanomateriais e materiais híbridos organo-inorgânicos.



### **Mônia Stremel Azevedo**

Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina. Tem experiência na área de Química Analítica com ênfase em cromatografia, eletroforese capilar e espectrometria de massas. Docente do Instituto Federal Catarinense (IFC).



### **Natiele Correia Veloso**

Graduada em Tecnologia de Processos Químicos pelo Instituto Federal de Santa Catarina, Câmpus Lages. Atuou como bolsista de pesquisa e desenvolvimento em projetos relacionados à qualidade de alimentos, com foco na caracterização antimicrobiana de compostos bioativos de frutas nativas.



### **Rosane Schenkel de Aquino**

Doutora em Neurociências pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Docente do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC).

## Apresentação

Resultado de um trabalho coletivo de professores, pesquisadores e estudantes do Instituto Federal de Santa Catarina, Câmpus Lages, este livro foi preparado após a realização de inúmeros projetos de pesquisa aprovados pela PROPPI/IFSC e pelo CNPq, iniciados em 2014. A partir da publicação de seus trabalhos científicos, os autores reuniram esforços coletivos para produzir esta obra, com o intuito de estabelecer uma base inicial para futuras pesquisas na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos e contribuir com a qualificação de acadêmicos e pesquisadores desta área.

A motivação de realizar este livro é para que você tenha uma base completa para execução de análises laboratoriais relacionadas à tecnologia agroalimentar e agroindustrial. Desse modo, este livro didático apresenta uma série de metodologias científicas testadas em projetos de pesquisa no Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Câmpus Lages. A principal finalidade é divulgar os métodos experimentais para facilitar novas investigações na área de tecnologia agroalimentar e agroindustrial, além de promover uma disseminação científica para novas investigações posteriores, servindo de base para alunos que queiram executar seus trabalhos de conclusão de curso, projetos integradores ou até mesmo para professores e pesquisadores que queiram ingressar em linhas de pesquisa referente a esta área do conhecimento. Assim, esperamos que os métodos descritos facilitem sua rotina laboratorial e auxiliem na execução dos experimentos.

Tratando-se do contexto histórico da execução e formulação das ideias contidas neste livro, devemos salientar que os primeiros projetos de pesquisa foram executados com enfoque na caracterização de frutas nativas do Planalto Sul Catarinense. Desta forma, a aplicação e/ou adaptação dos métodos analíticos mundialmente reconhecidos foram inicialmente realizados para a análise destas frutas. As análises de caracterização físico-química eram amplamente requisitadas pela comunidade, pois havia poucos trabalhos reportando esses dados para as frutas presentes na região. Em muitos casos, a obtenção de dados relativamente simples de uma fruta determina o modo com que será processada, ou até mesmo qual produto processado poderá ser produzido. Desse modo, após uma busca na literatura sobre métodos de análise de alimentos, começamos uma série de testes com as nossas amostras, para a execução exata e precisa das análises. Em seguida, escrevemos trabalhos científicos e comprovamos que os métodos utilizados em nosso laboratório apresentaram resultados condizentes com a literatura. Após executar os projetos relacionados à caracterização de frutas *in natura*, começamos a

trabalhar com o processamento e estabilidade de alimentos. Em um dos projetos, realizamos a formulação de geleias de frutas nativas, avaliando o produto mensalmente durante um ano, para comprovar a estabilidade de compostos antioxidantes. Para a obtenção destes resultados, as metodologias utilizadas foram fundamentais para a conclusão do perfil quantitativo de estabilização dos compostos bioativos.

Por fim, após a execução de inúmeros experimentos relacionados à caracterização de alimentos, escrevemos este livro compilando todos os métodos analíticos, microbiológicos e enzimáticos utilizados no decorrer de anos de pesquisa. Neste contexto, o livro foi organizado por capítulos, para facilitar a compreensão dos subgrupos de análises.

No **Capítulo 1**, apresentamos uma introdução geral sobre o escopo abordado no livro, bem como a importância desta obra para futuros estudos e aplicações acadêmicas relacionados à tecnologia agroalimentar e agroindustrial. No **Capítulo 2**, introduzimos conceitos práticos sobre amostragem e preparo de amostras para análises laboratoriais. Através deste capítulo você será capaz de selecionar sua amostra de maneira correta e deixá-la apta para uma análise laboratorial com representatividade. Em seguida, iniciamos a descrever as metodologias aplicadas à análise de alimentos. No **Capítulo 3**, descrevemos os métodos de análise físico-química em alimentos. No **Capítulo 4**, descrevemos alguns métodos de extração de compostos bioativos para a quantificação destes compostos presentes nos vegetais. Em seguida, descrevemos os métodos de quantificação de compostos bioativos e atividade antioxidante. No **Capítulo 5**, descrevemos os métodos de análise da atividade microbiana em alimentos. No **Capítulo 6**, apresentamos os métodos para análise da atividade enzimática em alimentos vegetais. Através da leitura desses capítulos, será possível compreender os métodos empregados para muitas análises laboratoriais, e este livro será um guia para você realizar as análises em seu laboratório. Por fim, no **Capítulo 7**, relatamos alguns resultados que nosso grupo de pesquisa obteve durante anos de estudos, por meio da aplicação destas metodologias analíticas. Apresentamos as nossas publicações em periódicos e anais de eventos científicos para que você possa ter uma base para conduzir seus experimentos de maneira científica.

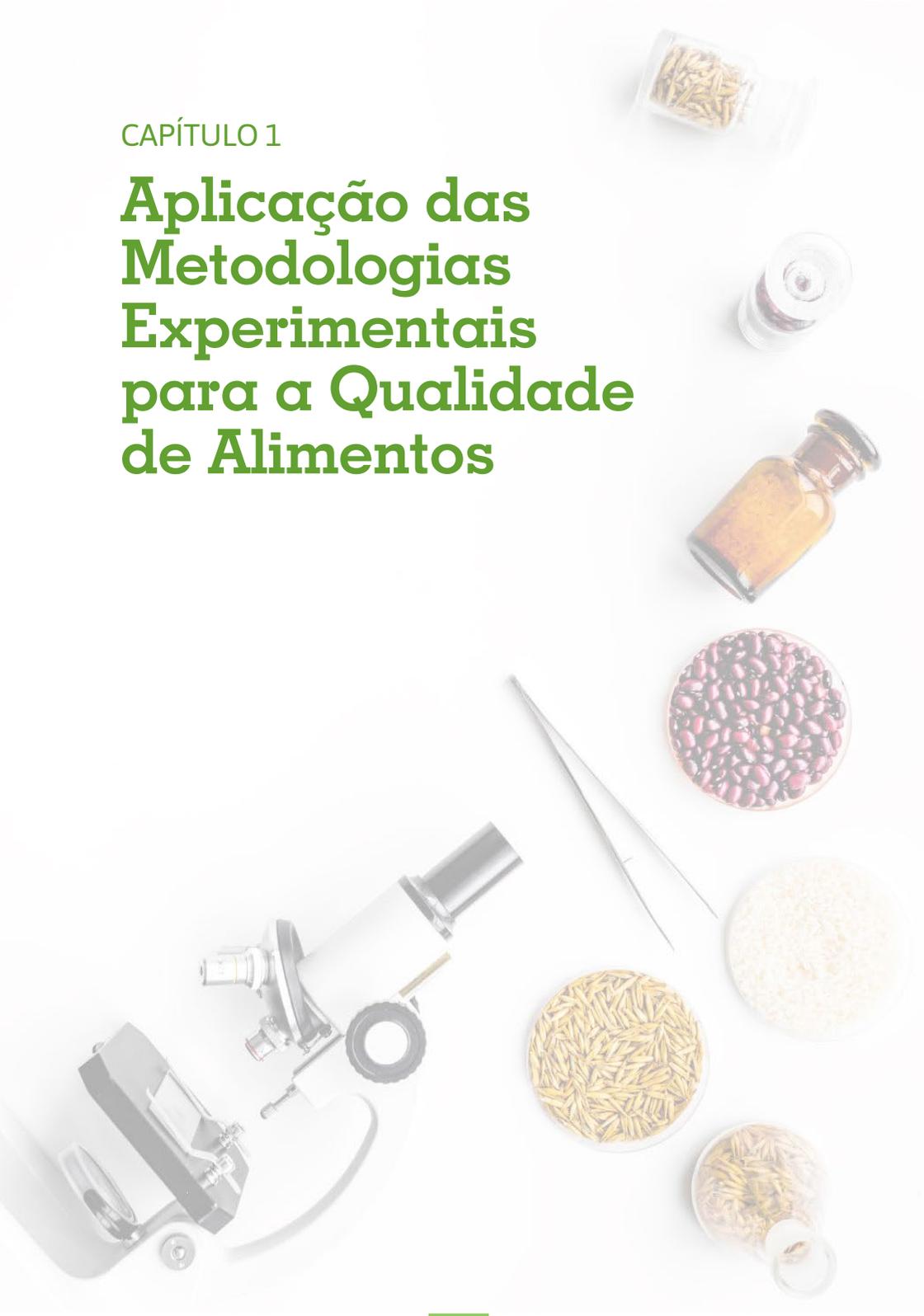
Esperamos que aproveite esta obra.

Boa leitura e bons experimentos!

*William Gustavo Sganzerla  
Ana Paula de Lima Veeck*

CAPÍTULO 1

# Aplicação das Metodologias Experimentais para a Qualidade de Alimentos



## CAPÍTULO 1

# Aplicação das Metodologias Experimentais para a Qualidade de Alimentos

**William Gustavo Sganzerla**  
**Ana Paula de Lima Veeck**

### Introdução geral

A busca por alimentos saudáveis que proporcionem a redução do risco de doenças crônicas e patogênicas tem levado a população ao consumo de alimentos que tragam mais benefícios à saúde. Além disso, os alimentos obtidos a partir da indústria alimentícia devem estar de acordo com as legislações vigentes. Assim, a avaliação da qualidade dos alimentos é fundamental e, mais especificamente, avaliações mais completas de alimentos *in natura* e processados estão se tornando cada vez mais importantes (ARAÚJO, 2011).

A análise de alimentos representa uma área da ciência com extrema importância na atualidade. Informações sobre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e nutricionais são importantes para o controle de qualidade, para a formulação de novos produtos processados e para a conservação dos alimentos (EVANGELISTA, 2001). A qualidade dos alimentos influencia diretamente na aceitação definitiva no mercado e na tomada de decisões dentro da indústria. Por exemplo, em frutas e vegetais, os parâmetros de cor, sabor, acidez, teor de açúcar e presença de compostos bioativos são avaliações determinantes para a definição do tipo de processamento e do melhor método de conservação a ser aplicado ou, também, como forma de agregar maior valor ao produto.

Alimentos de fontes conhecidas, com cores atrativas, presença de compostos com atividade biológica, aumentam a visibilidade do produto para a população. A presença de compostos antioxidantes tem atraído a atenção da indústria alimentícia, farmacêutica e da população em geral, sendo promissores no combate do estresse oxidativo celular. Estudos demonstram que essas substâncias auxiliam no mecanismo de defesa e controle de danos celulares causados por radicais livres (OETTERER; D'ARCE; SPOTO, 2006). As

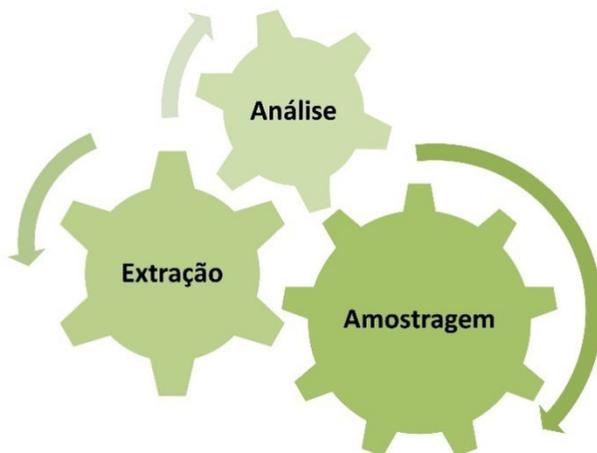
condições de processamento e armazenamento podem alterar os atributos de qualidade incluindo o conteúdo de compostos bioativos. Desse modo, os fatores de consumo dos alimentos, fazem com que as indústrias desse segmento tendam a optar por ingredientes naturais e orgânicos, promovendo, assim, uma melhoria na qualidade nutricional e, para isso, devem utilizar métodos analíticos adequados para a correta execução das análises (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Muitos alimentos *in natura* apresentam um curto período de vida útil quando comercializados, o que requer que se criem alternativas para seu processamento e conservação. Com o objetivo de diminuir o desperdício e incorporar novos ingredientes, a utilização dos métodos analíticos torna-se uma ferramenta de extrema importância para a caracterização desses novos alimentos, bem como, a avaliação do seu tempo de vida útil e qualidade microbiológica.

Algumas metodologias experimentais descritas neste livro foram padronizadas, outras ajustadas para o tipo de amostra, e outras somente foram aplicadas para a execução de experimentos. O enfoque apresentado neste livro didático foi baseado em três (03) eixos: amostragem, extração e análise (**Figura 1**), todos com o foco para o aprimoramento das matérias-primas alimentares (alimentos *in natura*) e produtos processados (**Figura 2**). Estes eixos são de fundamental importância para a correta execução e interpretação de uma análise laboratorial aplicada ao controle de qualidade e adequação às legislações vigentes. Desse modo, a integração entre os três eixos estabelecidos torna-se fundamental para compreender e aplicar os métodos analíticos neste livro.

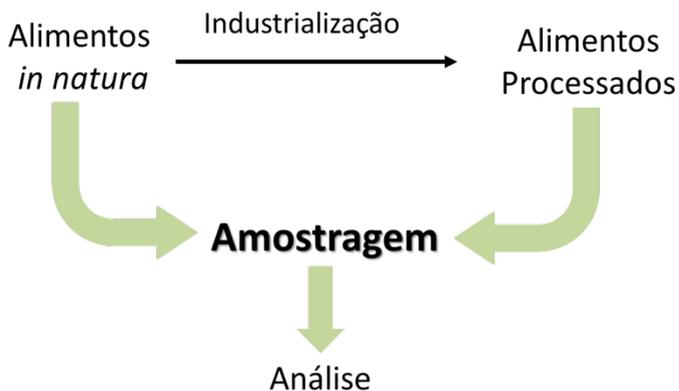
Diante destes princípios, pode-se relacionar cada um deles com as análises desejáveis (**Figura 3**). Através de uma amostragem adequada, pode-se realizar as análises de composição centesimal e caracterização físico-química de maneira adequada e confiável. Por meio da extração de compostos bioativos podemos determinar a capacidade antioxidante de nosso alimento vegetal. Após o processamento de um alimento *in natura*, pode-se, novamente, realizar a amostragem para avaliar a conservação microbiológica e a atividade enzimática, propondo um tempo de vida útil para esse alimento.

**Figura 1:** Eixos da análise de alimentos estabelecidos neste livro.



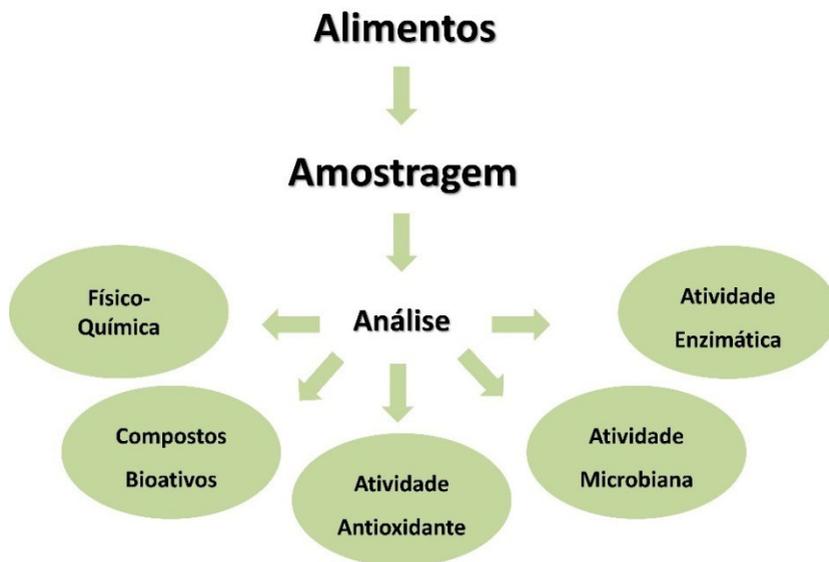
Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

**Figura 2:** Diagrama do enfoque estabelecido neste livro.



Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

**Figura 3:** Métodos laboratoriais abordados neste livro.



Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

As metodologias experimentais aplicadas à qualidade de alimentos com o enfoque agroindustrial podem ser utilizadas para diversos fins. Os mais importantes, em termos de aplicação, são:

**Pesquisa laboratorial:** avaliar de maneira preliminar a composição de um alimento, seja *in natura* ou processado. Pode ser utilizada para o desenvolvimento de novos métodos ou à adaptação para cada condição laboratorial, neste caso, mantendo uma relação com o método original. Exemplo: após o desenvolvimento de um produto contendo um aditivo natural, deve-se avaliar a qualidade deste alimento durante o armazenamento, para verificar sua vida útil na prateleira.

**Controle de qualidade em indústria:** utilizado para determinar o estado inicial de uma matéria-prima que chega até a indústria, pode ser estendido para durante o processamento como forma de verificar se o processo está ocorrendo de maneira correta. Além de, para o controle do produto final, que está sendo comercializado. Nesses casos, as análises são ditas “rotineiras”, pois estão sendo executadas regularmente. Exemplo: para a produção de produtos lácteos, a indústria avalia a qualidade inicial do leite, que deve satisfazer parâmetros regulados por agências governamentais.

**Fiscalização:** empregada para verificar o cumprimento da legislação vigente. A fiscalização ocorre por agências governamentais que realizam de maneira esporádica a análise dos produtos comercializados ou coletados diretamente nas indústrias. Neste caso, métodos analíticos oficiais são utilizados. Exemplo: laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) realizam análises para identificar a adição de outros óleos vegetais, principalmente soja, em azeites de oliva, o que caracteriza fraude.

Tratando-se da fiscalização da qualidade de alimentos, estão envolvidos órgãos como o MAPA e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), cada um com suas competências. O MAPA é o órgão brasileiro responsável pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor agropecuário, incluindo serviços à agricultura, produção agropecuária, processamento, transformação e distribuição de produtos de origem agropecuária até o consumidor final. Em se tratando de indústria de processamento, o MAPA é o responsável pelo controle dos produtos de origem animal e de bebidas em geral. Já a ANVISA tem por finalidade promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária. À ANVISA também compete a fiscalização das embalagens e dos rótulos dos alimentos.

## Referências

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5a ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 601 p.

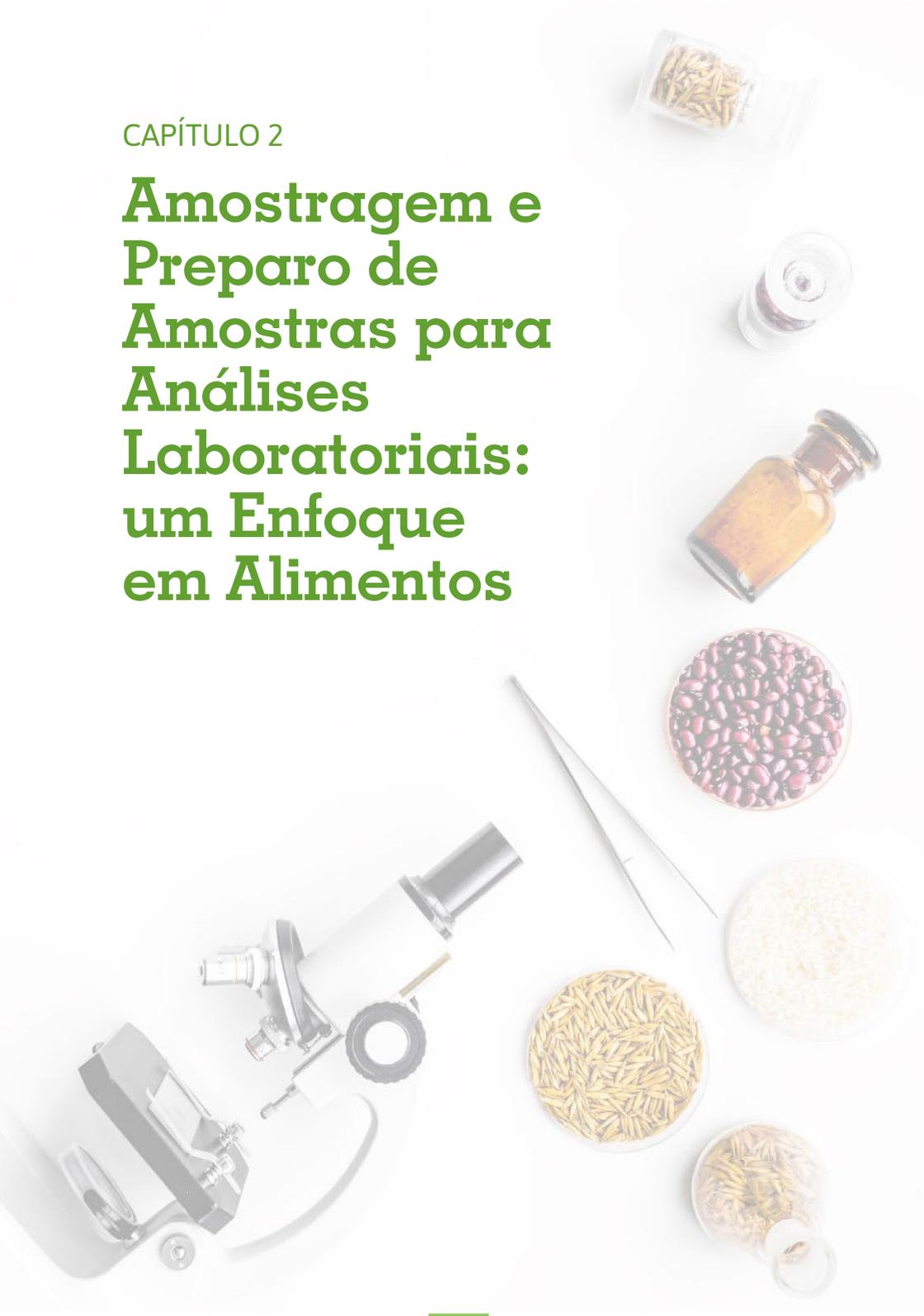
EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2a ed São Paulo, SP: Atheneu, 2001. 652 p.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4a ed. Porto Alegre, RS: Ed. Artmed, 2010. 900 p.

OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B. R.; SPOTO, M. H. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri, SP: Manole, 2006. 612 p.

CAPÍTULO 2

# Amostragem e Preparo de Amostras para Análises Laboratoriais: um Enfoque em Alimentos



## CAPÍTULO 2

# Amostragem e Preparo de Amostras para Análises Laboratoriais: um Enfoque em Alimentos

*William Gustavo Sganzerla*

*Ana Paula de Lima Veeck*

*Mônia Stremel Azevedo*

## Amostragem e Preparo de Amostras

As metodologias experimentais visando à qualidade de alimentos com o enfoque agroindustrial são aplicadas para diversos fins, sendo que a pesquisa laboratorial, o controle de qualidade em indústrias e a fiscalização são os mais recorrentes. Diante disso, para a correta utilização das metodologias experimentais, diversas etapas iniciais devem ser realizadas para garantir a confiabilidade do resultado. Assim, o objetivo deste capítulo é descrever as técnicas adequadas e cientificamente aceitas para a amostragem e preparo de amostras para análises em laboratório.

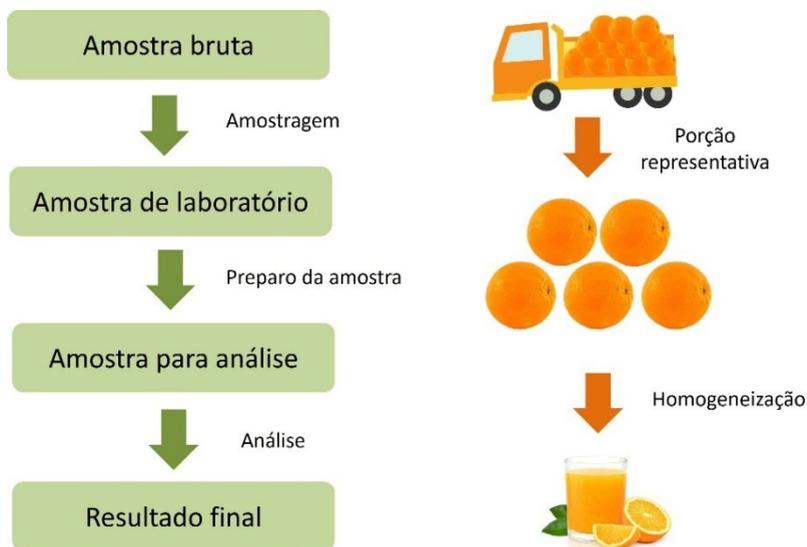
**Amostra** é definida como “uma porção limitada do material tomada do conjunto” e deve ser selecionada de maneira a possuir características essenciais do todo. Diante disso, critérios de amostragem devem ser escolhidos de maneira a assegurar a representatividade da amostra e evitar fontes de erros. A amostra de laboratório é resultado da redução da amostra bruta, e esse processo pode ser conduzido por muitas técnicas distintas. Para a tomada da amostra, a quantidade necessária a ser tomada depende do tipo, tamanho e homogeneidade do material (NESPOLO et al., 2015).

Assim, a **amostragem** deve ser realizada a fim de coletar uma fração de amostra que represente corretamente todo o conjunto. Por definição, a amostragem é o conjunto de operações com as quais se obtém uma porção pequena e representativa, quando comparada ao tamanho global da amostra (GOMES; OLIVEIRA, 2011). O tamanho dessa amostra a ser coletada vai depender de sua homogeneidade. Amostras como um caminhão de laranja,

maçã, soja, milho, necessitam de uma quantidade muito maior quando comparadas ao suco de laranja, suco de maçã, óleo de soja ou óleo de milho, por exemplo.

Um exemplo figurado do processo de amostragem pode ser observado na **Figura 1**. De maneira geral, o processo de amostragem consiste em três etapas fundamentais: i) Coleta de frações representativas de um lote do material (amostra bruta) a ser analisado; ii) Redução de tamanho da amostra para um tamanho adequado ao trabalho de laboratório; e iii) Homogeneização e/ou preparo da amostra para as análises laboratoriais (IAL, 2008).

**Figura 1:** Exemplificação do processo de amostragem



Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

A coleta das amostras deve ser realizada da maneira mais rápida possível, sendo previamente planejada para evitar erros nos resultados laboratoriais. Por exemplo, a falta de amostra para análise impossibilita a execução em laboratório, e em muitos casos os resultados obtidos para as determinadas análises não poderão ser representativos.

Dentre as **técnicas de coleta** de amostras mais usuais, pode-se destacar três tipos, cada uma baseada no tamanho do lote e/ou quantidade de amostra.

Entretanto, cada laboratório poderá estipular o seu plano de amostragem particular (OETTERER; D'ARCE; SPOTO, 2006).

**a) Embalagens únicas ou lotes pequenos:** coletar todo o material. Exemplo: Para avaliar as características de um lote pequeno de café liofilizado comercializado em recipientes de 100 g, deve-se coletar todo o conteúdo presente no recipiente para conduzir as análises, visto que o conteúdo utilizado representa o respectivo lote. Assim, não há diferença entre analisar 100 g e 1 kg de café do mesmo lote, ambos terão a mesma representatividade.

**b) Lotes grandes:** amostrar de 10 a 20 % do número de embalagens, ou de 5 a 10 % do peso total. Exemplo: em um lote de café de 1 tonelada, pode-se realizar uma conta de amostragem conforme descrito neste item. Assim, se o lote apresentar 1 tonelada de massa, o que poderá equivaler a 10 mil embalagens de 100 g, deve-se coletar de 10 a 20% do número de embalagens (equivalente a aproximadamente 1000 unidades).

**c) Quando nenhuma instrução específica for fornecida:** colher o número de amostras correspondente à raiz quadrada do número de unidades do lote mais uma.

$$\text{Amostra a ser coletada} = \sqrt{\text{número de unidades}} + 1$$

Exemplo: tomando o mesmo exemplo anterior de um lote de café, seguindo esta regra, deve-se coletar 101 unidades.

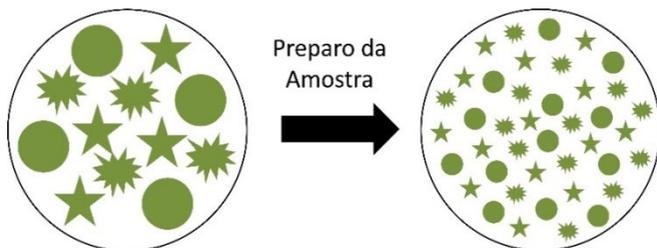
Após a coleta, as amostras devem ser identificadas e acondicionadas em temperatura específica, para evitar alterações (como reações de deterioração que podem ser desenvolvidas na amostra). Como mencionado, desde o processo de amostragem até a obtenção dos resultados, o processo deve ser realizado da maneira mais rápida possível, para evitar qualquer mudança na estrutura da matéria prima. Após a coleta, todos os detalhes devem ser anotados para que possam servir como comprovação da correta amostragem, como nome do produto, marca, data de coleta, origem da amostra, e peso do conteúdo da amostra. Deve-se também realizar uma avaliação visual do produto para verificar possíveis alterações físicas. Observações adicionais devem ser anotadas e levadas em consideração para a interpretação dos resultados. Uma fração da amostra deve ser mantida

guardada para possível contraprova. Esta fração deve possuir uma massa suficiente para realizar todas as análises previstas.

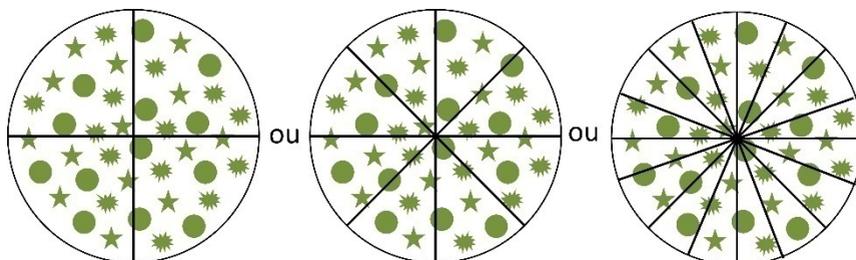
Para o preparo da amostra para análise laboratorial, o tamanho da amostra coletada deve ser suficiente para a realização de todas as análises previstas, levando em consideração as repetições suficientes para cada análise. O preparo da amostra é importante para diminuir os erros inerentes ao processo (ARAÚJO, 2011). Por exemplo, a **Figura 2** apresenta a “amostra de laboratório” que após o preparo torna-se uma “amostra para análise”. Neste caso, a principal diferença está relacionada à homogeneidade da amostra, ou seja, é muito mais confiável coletar uma porção representativa da “amostra para análise” do que na fração “amostra de laboratório”. Caso a amostra laboratorial esteja homogeneizada e seja muito grande, pode-se realizar a divisão por meio da técnica conhecida como **quarteamento**. O quarteamento é uma técnica que consiste em dividir a massa de uma amostra seca. Para isso, partes semelhantes devem ser fracionadas e em seguida deve-se escolher as amostras na diagonal, a fim de garantir a homogeneidade (**Figura 3**). A quantidade de divisões a ser realizada depende da quantidade de amostra coletada. Para massas pequenas, quatro partes são suficientes, no entanto, para massas maiores, proporções equivalentes devem ser executadas (GOMES; OLIVEIRA, 2011).

As **técnicas de preparo** de amostras laboratoriais são utilizadas para garantir a homogeneidade da amostra a ser analisada, e assim, um resultado confiável (NESPOLO et al., 2015). As técnicas devem ser escolhidas baseadas no tipo de amostra que possui (natureza da amostra), dos analitos a serem determinados, e na precisão e exatidão do método a ser empregado.

**Figura 2:** Preparo das amostras laboratoriais – Homogeneização



Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

**Figura 3:** Preparo das amostras laboratoriais – Quarteamento

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

Dentre as técnicas para o **preparo** de amostras, pode-se destacar lavagem, secagem, moagem, peneiramento, agitação mecânica e extração (IAL, 2008). Ainda assim, algumas particularidades devem ser seguidas em função das características dos alimentos (origem vegetal ou animal), as quais serão descritas a seguir.

**a) Lavagem:** a lavagem é empregada para poucos materiais, quando necessário. O analista deve sempre, antes de realizar este procedimento, realizar a verificação na metodologia a ser utilizada se este processo não interferirá no resultado da análise. Alguns exemplos comumente utilizados são para a lavagem de partes de vegetais, tais como raízes, folhas e frutos. Para isso, pode ser empregada uma solução de água deionizada e detergente neutro ou também água com hipoclorito de sódio, em diluições adequadas para cada tipo de material. O procedimento de lavagem deve ser realizado o mais rápido possível, a fim de garantir a integridade do material a ser analisado.

**b) Moagem:** a moagem é a técnica mais empregada para a diminuição do tamanho de partículas de uma amostra. Uma moagem grosseira pode ser realizada através de um liquidificador, processador ou moinho de facas. Uma moagem fina pode ser conduzida por meio de um moinho de disco, gral e pistilo. Já para uma moagem extrafina, um moinho de bolas ou um moinho criogênico pode ser empregado.

**c) Peneiramento:** dependendo do analito a ser analisado, a utilização de peneiras granulométricas é recomendada para fracionar os diferentes tamanhos de sólidos.

**d) Agitação mecânica:** a agitação é empregada em laboratório previamente a cada análise. Após obter a amostra laboratorial representativa, deve-se ter em mente que ela pode sofrer processos físicos naturais (como decantação), o que ocasiona a separação de compostos. Para evitar esse erro de alíquota durante a análise, deve-se utilizar uma agitação mecânica prévia da amostra, que pode ser feita manualmente.

**e) Extração:** a extração é uma técnica de preparo da amostra para a análise de um composto em específico. Um exemplo clássico é a extração de compostos bioativos, para a determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana. Desse modo, o **Capítulo 4** dedica-se exclusivamente aos métodos utilizados para a extração de compostos bioativos.

Além das técnicas de preparo de amostras, devemos conhecer os métodos de **conservação das amostras**, os quais são aplicados quando a amostra chega ao laboratório, e caso não seja analisada imediatamente, deve-se armazená-la corretamente. Desse modo, a amostra de laboratório pode ser submetida ao congelamento, refrigeração, liofilização ou secagem.

**a) Congelamento:** o congelamento é aplicado para a preservação de amostras utilizando-se temperaturas iguais ou inferiores a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para garantir a maior integridade dos alimentos, deve ser empregado temperaturas em torno de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as quais, além de promover a inibição da atividade microbológica, também promovem reações químicas e enzimáticas em taxas muito lentas. Não há um tempo máximo estabelecido para armazenar uma amostra em congelamento, sendo que o analista deve verificar esse período para cada amostra em específico.

**b) Refrigeração:** a refrigeração é um método brando de conservação e é realizada em temperaturas variando entre  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (acima do ponto de congelamento da amostra). Alimentos que necessitam ser avaliados o mais rápido possível e que possuem alta atividade de água devem permanecer sempre em refrigeração até serem analisados. Um exemplo clássico é aplicado em carnes e derivados. Se a análise a ser realizada não for conduzida no mesmo dia da coleta e preparo da amostra, deve-se armazenar a amostra em refrigeração até o momento da análise. Para cada alimento o analista deve verificar esse

período de armazenamento para cada amostra, para evitar qualquer alteração e prejudicar o resultado final da análise.

**c) Secagem:** a secagem poderá ser empregada como forma de melhorar o manuseio da amostra no laboratório, por determinação do método de análise a ser utilizado ou quando houver a necessidade de maior preservação de determinados constituintes alimentares que serão foco das análises. Para isto, as amostras poderão ser submetidas aos processos de secagem utilizando as estufas de ar estático, estufas de ar forçado, estufas a vácuo. Desse modo, o analista deverá ter clareza de quais analitos ele quer avaliar e quais serão as melhores formas de preservação destes compostos, para que não haja a sua degradação durante o preparo de amostra.

**d) Liofilização:** a liofilização é um processo de desidratação, obtido por sublimação (passagem do estado sólido para estado de vapor). É um processo físico-químico empregado em alimentos que apresentam um alto teor de água. Após a liofilização, a atividade de água dos alimentos diminui drasticamente, o que aumenta o tempo de vida útil do alimento. As propriedades químicas e sensoriais das amostras praticamente não são alteradas, entretanto, ainda é um método que apresenta alto custo.

Desse modo, para o **preparo da amostra para análise**, deve-se examinar cuidadosamente as condições da amostra. Retire partes representativas desta e em quantidade suficiente para análise em triplicata e eventuais repetições do ensaio. Conserve ao abrigo de umidade, da luz e de contaminações. Quando necessário, mantenha em temperatura mais baixa que a do ambiente, ou utilize uma técnica de conservação.

Outro ponto importante, que já foi mencionado anteriormente, é também realizar a **inspeção da amostra** antes de cada análise. Anote marcas, códigos, rótulos e outros fatores de identificação. Examine, cuidadosamente, para verificar indicações de anormalidades que se manifestem em seu aspecto físico, formação de gás, cheiro, alteração de cor, condições da embalagem e anote o resultado. Antes de abrir os enlatados, observe se há estufamento das latas e, depois de abertos, o estado interno das mesmas.

Diante disso, após conhecer os principais pontos para garantir a integridade do alimento para a análise, vamos verificar alguns exemplos em amostras sólidas, líquidas, grânulos, sorvetes, frutas, conservas vegetais, açúcares e produtos cárneos.

Para o preparo de **amostras sólidas**, a homogeneização deve ser a etapa preliminar, e para isso, a amostra contida na embalagem deve ser homogeneizada manualmente ou com a ajuda de espátulas. Dependendo do tipo de análise a ser realizada, apenas a fração comestível deve ser homogeneizada. Para as amostras de carne e produtos derivados, a separação dos ossos, pele ou couro deve ser previamente conduzida. No caso de pescado, os componentes não comestíveis da amostra devem ser retirados, como a pele e as espinhas. Da mesma forma, quando as amostras forem hortaliças *in natura*, elas devem ser lavadas e descascadas (quando for o caso) e então homogeneizadas para a análise.

Em **amostras líquidas**, após a homogeneização completa do alimento, a etapa de filtração pode ser empregada para a separação de algum componente indesejável na análise. Nos casos de produtos gaseificados (refrigerantes, vinhos espumantes, etc.), a remoção do gás deve ser conduzida, para evitar erros analíticos. Para isso, deve-se transferir a amostra para um béquero e a mesma deve ser agitada com um bastão de vidro até eliminar o gás, ou utilizar uma cuba ultrassônica.

Para elucidar o preparo de amostras sólidas e líquidas, os seguintes casos descritos são os mais usuais na análise de alimentos. Todas as operações realizadas devem ser completadas o mais rápido possível, para evitar ganho de umidade, alterações microbiológicas e outras contaminações. Amostras de **sorvetes e gelados** devem permanecer em repouso à temperatura ambiente, até liquefazerem, para depois serem homogeneizadas e analisadas.

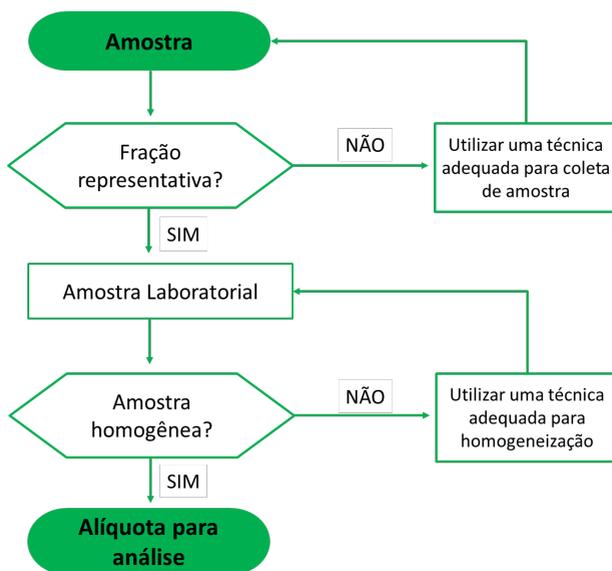
Para o preparo de **amostras de frutas**, como sucos, néctares de frutas e águas de coco, faça a homogeneização total da amostra por agitação. Geleias e doces em massa, contendo frutas sólidas e frutas cristalizadas, devem ser homogeneizados em multiprocessador. Frutas secas, liofilizadas e conservas vegetais devem ser removidos os caroços e sementes sem parti-los, para então homogeneizar a amostra em multiprocessador. Já as polpas de frutas congeladas devem ser manuseadas de maneira a evitar a degradação das características iniciais do produto, mantendo, assim, as amostras em refrigerador depois de abertas.

Para o preparo de amostras **de carnes e seus derivados**, porções de várias regiões da peça devem ser retiradas, evitando ossos, peles, e tecido adiposo, tendo o cuidado de não descaracterizar a amostragem. Para a homogeneização, o material deve ser moído três vezes em moedor de carne, sendo misturado após cada moagem. A amostra deve ser mantida sob

refrigeração (5 °C) para inibir a decomposição durante todo o processo da amostragem.

Por fim, para executar de maneira coerente o processo de amostragem, deve-se seguir o fluxograma apresentado na **Figura 4, a seguir, no qual** duas perguntas devem ser respondidas e/ou verificadas. A primeira diz respeito à fração representativa da amostra: se a resposta for “sim”, é possível obter a “amostra laboratorial”, ou seja, o processo de coleta de amostra foi representativo. Caso contrário, se a resposta for “não”, deve-se utilizar uma técnica adequada para a coleta da amostra. Após obter a amostra laboratorial, um novo questionamento deve ser feito, o qual está relacionado à homogeneidade da amostra. Caso a amostra esteja homogênea, é possível obter a “alíquota para análise”. A alíquota para análise representa que a amostra laboratorial está totalmente homogeneizada, e, assim, a análise pode ser executada com qualquer fração desta alíquota, garantindo uma confiabilidade na fração utilizada. No entanto, caso a amostra não esteja homogênea, uma técnica apropriada para homogeneização deve ser escolhida.

**Figura 4:** Fluxograma para coleta e preparo de amostras para análises laboratoriais



Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

## Referências

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5ª ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 601 p.

GOMES, J. C.; OLIVEIRA, J. F. **Análises Físico-Químicas de Alimentos**. 1a ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 303p

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores ZENEBO, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020p.

OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B. R.; SPOTO, M. H. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri, SP: Manole, 2006. 612p.

NESPOLO, C. R.; OLIVEIRA, F. A.; PINTO, F. S. T.; OLIVERA, F.C. **Práticas em tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2015. 205p.

CAPÍTULO 3

# Análises Físico-Químicas em Alimentos



## CAPÍTULO 3

# Análises Físico-Químicas em Alimentos

**William Gustavo Sganzerla**

**Ana Letícia Andrade Ferreira**

**Mônia Stremel Azevedo**

**Ana Paula de Lima Veeck**

## Determinação da umidade e cinzas por gravimetria

### 1) Procedimento Experimental para Análise de Umidade

- a) Colocar em estufa estabilizada a 105 °C o cadinho de porcelana por 24 h;
- b) Retirar o cadinho com auxílio de pinça metálica e colocar dentro do dessecador (contendo sílica gel) até que o cadinho alcance a temperatura ambiente (-30 min);
- c) Retirar o cadinho do dessecador com auxílio da pinça, transferir para a balança e anotar o seu peso (MCV); após tare a balança;
- d) Pesar 5 g da amostra (previamente preparada, triturada, homogeneizada) no cadinho (com auxílio da espátula para amostras sólidas, ou pipeta para amostras líquidas) (MA);
- e) Colocar o cadinho em estufa à 60 °C deixando por -3 h consecutivas;
- f) Aumentar a temperatura para 105 °C e permanecer por 24 h.
- g) Retirar o cadinho com a amostra já dessecada da estufa com uma pinça e colocar no dessecador até que atinja a temperatura ambiente (-30 min); pesar e registrar a massa obtida ( $MCA_{\text{Após Estufa}}$ );

## 2) Procedimento Experimental para Análise de Cinzas

- Colocar o cadinho na mufla (obtido após a determinação de umidade) e aumentar a temperatura de 50 em 50 °C até +550 °C;
- Incinerar de 4 a 6 h consecutivas, até obter um resíduo de cor branca ou ligeiramente acinzentado;
- Reduzir a temperatura da mufla para 105 °C e permanecer por 3 h;
- Retirar o cadinho e transferir para um dessecador até que atinja a temperatura ambiente (~ 30 min);
- Pesar e registrar a massa ( $MCA_{\text{Após Mufla}}$ ) para a realização dos cálculos.

## 3) Cálculos

$$\text{Umidade}(\text{g}100\text{g}^{-1}) = \frac{[MA - (MCA_{\text{Após Estufa}} - MCV)]}{MA} \times 100$$

$$\text{Cinzas}(\text{g}100\text{g}^{-1}) = \frac{(MCA_{\text{Após Mufla}} - MCV)}{MA} \times 100$$

Onde: MA = massa de amostra; MCA = massa do cadinho com amostra; MCV = massa do cadinho vazio.

## Referências

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry (Method 934.06). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC, 2006.

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry (Method 923.03). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC, 2006.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008, 1020p.

## Quantificação de lipídeos pelo método de Blich-Dyer

### 1) Reagentes e Soluções

- Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 1,5 %: Pesar 15 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, solubilizar com água e ajustar o volume em balão volumétrico de 1 L.

### 2) Procedimento Experimental

- a) Pesar entre 2,0 e 2,5 g (amostra com teor de gordura acima de 20 %) ou entre 3,0 e 3,5 g (amostra com teor de gordura abaixo de 20 %) de amostra, finamente moída e homogeneizada (registrar a massa). É essencial que as amostras estejam moídas;
- b) Adicionar exatamente 8 mL de clorofórmio, 16 mL de metanol e 6,4 mL de água destilada (Obs: ao trabalhar com solventes orgânicos utilize a capela de exaustão). Quando as amostras contêm água, em teor acima de 10%, a relação dos solventes 1:2:0,8 deve ser realizada considerando a água fornecida pela amostra;
- c) Transferir a solução para um tubo Falcon com capacidade de 50 mL;
- d) Tampar o tubo e agitar a cada 3 min, lentamente, em movimentos circulares (totalizando 30 min). Obs: Cuidado para a tampa do tubo não ser projetada por pressão;
- e) Adicionar exatamente 8 mL de clorofórmio e 8 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%. Esta adição de mais clorofórmio e mais água altera a proporção para 2:2:1,8, promovendo a separação total do clorofórmio que carrega os lipídeos (camada inferior);
- f) Agitar lentamente por 2 min em movimentos circulares. Obs: Cuidado para a tampa do tubo não ser projetada por pressão;
- g) Aguardar a separação das fases naturalmente;
- h) Se considerar necessário, succionar a camada metanólica superior e descartar (em local adequado, conforme gerenciamento de resíduos de seu laboratório);

- i) Retirar em torno de 10 mL da camada inferior com pipeta graduada (cuidando para não pipetar amostra) e colocá-los em tubo plástico com tampa contendo aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro. Tampar e agitar para remover os traços de água;
- j) Filtrar a camada contendo o clorofórmio em papel de filtro, recebendo o filtrado em um béquer;
- k) Pipetar 5 mL do filtrado, com pipeta volumétrica, e transferir para uma cápsula de porcelana previamente seca em estufa por 2 h a 105 °C, resfriada em dessecador (- 30 min) e pesada (registrar a massa);
- l) Evaporar o solvente em chapa de aquecimento (baixa temperatura), em capela de exaustão, e em seguida conduzir para estufa a 105 °C por 1 h; resfriar em dessecador (- 30 min), pesar e registrar a massa.

## 5) Cálculos

$$\text{Lipídeos (g 100 g}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Peso béquer com gordura} - \text{Peso béquer vazio}) \times 3,2}{\text{massa de amostra}} \times 100$$

## Referência

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

## Determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia a gás

### 1) Soluções

- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 mol L<sup>-1</sup> em metanol: Pesar 2 g de NaOH, solubilizar e ajustar o volume a 100 mL com metanol.

- Solução esterificante - cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e metanol: Transferir 5 g de NH<sub>4</sub>Cl para um balão de fundo redondo com boca esmerilhada; adicionar 150 mL de metanol; adicionar em pequenas porções, com agitação manual branda, 7,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado; adaptar o balão a um condensador de água e manter a mistura sob refluxo até a dissolução do NH<sub>4</sub>Cl (- 20 min), utilizando um sistema de aquecimento (manta térmica).

- Solução saturada de cloreto de sódio (NaCl): Pesar 37 g de NaCl, solubilizar e ajustar o volume a 100 mL.

### 2) Procedimento Experimental

- a) Coletar alíquota da amostra de óleo/gordura com auxílio de um algodão ou espátula;
- b) Transferir o algodão para um tubo de ensaio com tampa rosqueável. Obs: Não é necessário conhecer o peso exato da amostra quando se conhece o teor de lipídios da amostra;
- c) Adicionar 2 mL da solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> em metanol;
- d) Fechar o tubo de ensaio (Obs: se necessário verificar a vedação de tampas a fim de evitar vazamentos durante o banho fervente) e aquecer em banho de água fervente até completa dissolução dos glóbulos de gordura (- 5 min). Obs: Se necessário agitar o tubo eventualmente;
- e) Resfriar o tubo sob água corrente;
- f) Adicionar 2,5 mL do reagente esterificante à mistura, fechar (verificando a vedação de tampas) e homogeneizar a solução;
- g) Aquecer novamente em banho de água fervente por aproximadamente 5 min;
- h) Resfriar o tubo sob água corrente;
- i) Adicionar 2 mL de solução saturada de NaCl à mistura.
  
- j) Fechar o tubo e agitar vigorosamente por - 30 s;

- k) Adicionar 2,5 mL de hexano à mistura e agitar vigorosamente por aproximadamente 1 min. Permitir repouso para separação das fases orgânica e inorgânica.
- l) Transferir alíquota suficiente da fase orgânica (sobrenadante) contendo os ésteres metílicos de ácido graxos, para recipiente adequado e posterior injeção no cromatógrafo. Obs: Se o produto de extração não for injetado imediatamente, armazenar em frasco âmbar e em freezer.
- m) Injetar 1 µL da fase orgânica em caso de cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama.
- n) Obter o cromatograma com as áreas dos picos por meio do software do equipamento.

## Referências

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 474-476, 1973.

AOCS - American Oil Chemists' Society. Determination of cis and trans Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC, **AOCS Official Method Ce 1f-96**, Reapproved 1997, Revised 2002.

## Quantificação de proteínas pelo método de Kjeldahl

### 1) Soluções

- **Mistura catalítica:** Misturar 94 g de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) + 5 g de sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) + 1 g selênio e homogeneizar.

- **Ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) 2 %:** Pesar 20 g de  $H_3BO_3$  e dissolver em 500 mL de água deionizada. Acrescentar o indicador misto e ajustar o volume a 1 L com água deionizada.

- **Indicador misto:** Solução de vermelho de metila 0,1 % em etanol; Solução de verde de bromocresol 0,1 % em etanol. Adicionar 5 mL de vermelho de metila e 25 mL de solução de verde de bromocresol por litro de solução de ácido bórico.

- **Hidróxido de sódio (NaOH) 50 %:** Pesar 500 g de NaOH e dissolver em 1 L de água deionizada.

- **Ácido clorídrico (HCl) 0,02 mol L<sup>-1</sup>:** Medir 1,7 mL de HCl (37 %,  $d=1,19$  g mL<sup>-1</sup>) e ajustar o volume para 1 L com água deionizada em balão volumétrico. Padronizar a solução de HCl com  $Na_2CO_3$ .

### 2) Procedimento Experimental

- a) Pesar em tubo de digestão 0,2 g de amostra. Preparar um branco de reagentes (sem amostra);
- b) Adicionar aproximadamente 2 g de mistura catalítica e 5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado;
- c) Colocar os tubos no bloco digestor Kjeldahl, aquecer inicialmente a 50 °C e aumentar a temperatura de 50 °C a cada 15 min até atingir 350 °C;
- d) Realizar este processo (digestão) por aproximadamente 6 h, ou até que o conteúdo dos tubos fique transparente de cor verde-azulado. Em seguida, desligar o equipamento e permitir resfriamento até temperatura ambiente
- e) Após atingir temperatura ambiente, adicionar 10 mL de água destilada em cada tubo;
- f) Preparar um erlenmeyer contendo 10 mL de solução de ácido bórico 2 %;

- g) Levar o tubo contendo a diluição ao destilador, neutralizar com NaOH 50 % (aparecimento de cor escura). Obs: Seguir as instruções de uso específicas do destilador.
- h) Recolher o destilado (de 100 a 150 mL) no erlenmeyer preparado na etapa “f”;
- i) Titular o destilado utilizando HCl 0,02 mol L<sup>-1</sup> até o ponto final da titulação.
- j) Registrar o volume gasto de HCl.

Obs: O mesmo procedimento deve ser realizado com o branco de reagentes.

### 3) Cálculos

$$\text{Proteínas(g100g}^{-1}\text{)} = \frac{[0,014 \times \text{FC} \times (\text{Vol}_{\text{HCl}} - \text{Vol}_{\text{Branco}}) \times 0,02]}{\text{massa de amostra}} \times 100$$

**Tabela 1:** Fatores de conversão (FC) de nitrogênio total em proteína.

Alimentos	FC	Alimento	FC
Farinhas	5,83	Castanhas	5,46
Macarrão	5,70	Coco	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

Fonte: IAL (2008)

### Referências

AOAC – Association of Official Analytical Chemistry (Method 990.0). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC, 2006.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores ZENEON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008, 1020p.

## Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

### 1) Reagentes e Soluções

- **Reagente de Bradford:** Pesar 0,1 g de azul de Coomassie brilhante (G-250); diluir com 50 mL de etanol 95 %; adicionar 100 mL de ácido fosfórico 85 %; ajustar ao volume de 1 L. Deixar 24 h em repouso e em seguida filtrar a solução até deixar de apresentar sinais de coloração azul. Armazenar a 4 °C.

- **Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) 1 mol L<sup>-1</sup>:** Pesar 17,42 g de  $K_2HPO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- **Fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ ) 1 mol L<sup>-1</sup>:** Pesar 13,608 g de  $KH_2PO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- **Tampão fosfato de potássio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5):** Pipetar 83,4 mL de  $K_2HPO_4$  (fosfato dipotássico) 1 mol L<sup>-1</sup> + 16,6 mL de  $KH_2PO_4$  (fosfato monopotássico) 1 mol L<sup>-1</sup>. Ajustar ao volume de 1 L.

- **Albumina (1 mg mL<sup>-1</sup>):** Pesar 0,01 g de albumina e ajustar o volume a 10 mL com água deionizada.

### 3) Extração de Proteínas do Material Vegetal

- Pesar 1 g de material vegetal e registrar a massa;
- Adicionar 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5);
- Triturar em Turrax por 1 min;
- Colocar em cuba ultrassônica por 10 min;
- Centrifugar a 4000 rpm por 10 min (4 °C);
- Reservar o sobrenadante do extrato.

Obs: Todo o procedimento de extração deve ser realizado a 4 °C.

### 4) Procedimento Experimental

- Pipetar 20 µL de amostra e preparar um branco com água deionizada;
- Adicionar 400 µL do reagente de Bradford;
- Adicionar 1580 µL de água deionizada;
- Permitir repouso por 5 min e realizar a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

## 5) Curva Padrão de albumina

**Tabela 2:** Preparo da curva de calibração de albumina.

Ponto	Volume da solução de albumina	Volume de água deionizada	Concentração de albumina na reação (mg mL <sup>-1</sup> )	Absorbância em 595 nm
1	2,5 µL	17,5 µL	0,125	
2	5 µL	15 µL	0,25	
3	7,5 µL	12,5 µL	0,375	
4	10 µL	10 µL	0,5	
5	15 µL	5 µL	0,75	
6	20 µL	0 µL	1	

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

### Referência

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

# Determinação de glicídios redutores, não-redutores e totais por titulação

## 1) Reagentes e Soluções

- **Solução padrão de glicose:** Pesar 0,5 g de glicose (seca em estufa a 70 °C por 1 h), solubilizar e ajustar ao volume de 100 mL com água deionizada em balão volumétrico.

- **Azul de metileno 1 %:** Pesar 1 g de azul de metileno e solubilizar em 10 mL de etanol absoluto. Ajustar ao volume de 100 mL em balão volumétrico.

- **Ferrocianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) 15 %:** Pesar 150 g de ferrocianeto de potássio, solubilizar e ajustar ao volume de 1 L em balão volumétrico.

- **Acetato de zinco ( $Zn(CH_3CO_2)_2$ ) 30 %:** Pesar 300 g de acetato de zinco, solubilizar e ajustar ao volume de 1 L em um balão volumétrico.

- **Solução Fehling A:** Pesar 34,639 g de sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), solubilizar e ajustar ao volume de 1 L em balão volumétrico.

- **Solução Fehling B:** Pesar 173 g de tartarato de sódio e potássio ( $NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ) e solubilizar em 250 mL de água deionizada. Adicionar 250 mL de solução de NaOH a 20 %, recém-preparada. Ajustar ao volume de 1 L em balão volumétrico.

- **Hidróxido de sódio (NaOH) 50 %:** Pesar 50 g de NaOH, solubilizar e ajustar ao volume de 100 mL em balão volumétrico com água deionizada. Obs: Por se tratar de uma reação exotérmica, preparar esta solução em capela de exaustão utilizando o banho de gelo para auxílio na solubilização.

## 2) Padronização do Reagente de Fehling

Transferir para uma bureta a solução padrão de glicose.

- a) Transferir com pipeta volumétrica 10 mL de solução Fehling A e 10 mL de solução Fehling B para um erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 40 mL de água destilada e algumas pérolas de ebulição. Após organizar a instrumentação de titulação, iniciar o aquecimento da solução em chapa de aquecimento.
- b) Ao iniciar a fervura, começar a gotejar a solução-padrão de glicose até próximo ao ponto final da titulação.
- c) Ao iniciar o descoramento (perda da coloração azul), adicionar 1 gota de azul de metileno 1 % e continuar a

titulação até descoramento do indicador (ponto final da titulação).

- d) O tempo de titulação não deve ultrapassar 3 min. O ponto final da titulação será em torno de 10 mL de glicose. Registrar o volume gasto.

### 2.1 Cálculo do título da solução Fehling:

$$FC = \frac{\text{Volume glicose(mL)} \times 0,5}{100}$$

## 3) Determinação de Açúcares Redutores em Glicose

### 3.1 Utilização

Em produtos que tenham em sua composição até 5 % de açúcares deve-se pesar 25 g. Em produtos com alto teor de glicose (mel, geleias, etc.) pesar 1 g de amostra.

### 3.2 Procedimento Experimental

- a) Pesar a amostra homogeneizada em béquer de 250 mL (registrar a massa);
- b) Adicionar 50 mL de água destilada e homogeneizar com bastão de vidro;
- c) Transferir para balão volumétrico de 250 mL (não ajustar o volume).
- d) Adicionar 2 mL de ferrocianeto de potássio 15 % e 2 mL de acetato de zinco 30 %. Agitar e ajustar o volume.
- e) Aguardar a floculação e sedimentação do material. Filtrar, identificando o frasco que recebe o filtrado.
- f) Transferir o filtrado para a bureta.
- g) Pipetar 5 mL de Fehling A e 5 mL de Fehling B para um erlenmeyer. Adicionar algumas pérolas de ebulição.
- h) Adicionar 40 mL de água destilada. Aquecer até ebulição e gotejar a solução da amostra até que inicie o descoramento. Adicionar 1 gota de azul de metileno 1 % e continuar a titulação até descoramento do indicador (ponto final da titulação).

- i) Mantendo a ebulição, adicionar 1 gota de azul de metileno a 1 % e continuar a titulação até descoloração do indicador. Anotar o volume gasto.

### 3.3 Cálculos

$$\text{Glicídios Redutores em Glicose(\%)} = \frac{0,5 \times \text{FC} \times 250}{V \times P} \times 100$$

Onde: FC = título da solução de Fehling (Calculada em 2.1); V = volume da amostra gasto na titulação (mL); e P = peso da amostra (g)

## 4) Determinação de Açúcares Totais

### 4.1 Utilização e Princípio

Em produtos que tenham em sua composição até 5 % de açúcares deve pesar 25 g. Em produtos com alto teor de glicose (mel, geleias, etc.) pesar 1 g de amostra.

Os grupos redutores aldeído e cetona não se encontram livres na sacarose. Efetua-se uma hidrólise ácida e o resultado são duas moléculas de açúcares redutores, uma de glicose e outra de frutose, que são determinadas pelo método de Lane-Eynon (Fehling).

### 4.2 Procedimento Experimental

- a) Pesar a amostra homogeneizada em erlenmeyer de 250 mL. Registrar a massa da amostra.
- b) Adicionar 50 mL de água destilada e dissolver a amostra.
- c) Adicionar 2 mL de ácido clorídrico concentrado (em capela de exaustão) e levar ao banho de aquecimento a 60 °C por 60 min.
- d) Resfriar e neutralizar com hidróxido de sódio 50 %, usando papel indicador de pH.
- e) Transferir para balão volumétrico de 250 mL (não ajustar o volume).
- f) Adicionar 2 mL de ferrocianeto de potássio 15 % e 2 mL de acetato de zinco 30 %. Homogeneizar e ajustar o volume.
- g) Aguardar a floculação e sedimentação do material. Filtrar, identificando o frasco que recebe o filtrado.
- h) Transferir o filtrado para a bureta.

- i) Pipetar 5 mL de Fehling A e 5 mL de Fehling B para um erlenmeyer. Adicionar algumas pérolas de ebulição.
- j) Adicionar 40 mL de água destilada. Aquecer até ebulição e gotejar a solução da amostra até que inicie o descoramento. Adicionar 1 gota de azul de metileno 1 % e continuar a titulação até descoramento do indicador (ponto final).
- k) Mantendo a ebulição, adicionar 1 gota de azul de metileno a 1% e continuar a titulação até descoloração do indicador. Anotar o volume gasto.

#### 4.3 Cálculos

$$\text{Glicídios Totais (glicose+sacarose)(\%)} = \frac{0,5 \times \text{FC} \times 250}{V \times P} \times 100$$

Onde: FC = título da solução de Fehling; V = volume da amostra gasto na titulação (mL); e P = peso da amostra (g).

$$\text{Glicídios Não Redutores(\%)} = \text{Glicídios Totais} - \text{Glicídios Redutores} \times 0,95$$

Onde: 0,95 = fator de conversão da sacarose.

## Referências

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry (Method 958.06). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry.** Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC, 1995.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Coordenadores ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008, 1020p.

## Determinação de açúcares totais, redutores e não redutores por espectrofotometria UV-Vis

### 1) Preparo das Soluções

- **Reagente de Somogyi-Nelson I (SN-I):** Pesar 4 g de sulfato de cobre anidro ( $\text{CuSO}_4$ ) ou 6,25 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ); 24 g de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ); 16 g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ); 12 g de tartarato duplo de potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ); e 18 g de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Dissolver, na ordem descrita, em 600 mL de água destilada e ajustar o volume para 1 L em balão volumétrico. Permitir repouso por um dia, em ambiente escuro. Filtrar a solução com papel de filtro e colocar em frasco âmbar, identificado.

- **Reagente de Somogyi-Nelson II (SN-II):** *Solução A:* Pesar 50 g de molibdato de amônio anidro ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ) ou 53,09 g de molibdato de amônio tetra hidratado ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) em 900 mL de água destilada. Adicionar 42 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado lentamente; *Solução B:* Pesar 6 g de arseniato dibásico de sódio anidro e dissolver em 50 mL de água destilada. Misturar as soluções A e B e deixar em repouso por 24 h a 37 °C, em estufa. Armazenar esta solução em frasco âmbar por até 30 dias a 20-25 °C.

- **Ácido clorídrico (HCl) 2 mol L<sup>-1</sup>:** Pipetar 84 mL de HCl (37 %,  $d=1,19 \text{ g mL}^{-1}$ ) e transferir para um balão volumétrico de 500 mL. Completar o volume com água deionizada. Obs: Utilizar a capela de exaustão o preparo desse reagente.

- **Hidróxido de sódio (NaOH) 2 mol L<sup>-1</sup>:** Pesar 40 g de NaOH e transferir para um balão volumétrico de 500 mL. Completar o volume com água deionizada. Por se tratar de uma reação exotérmica, preparar esta solução em capela de exaustão utilizando o banho de gelo para auxílio na solubilização.

### 2) Preparo da Amostra

Pesar 1 g de amostras e adicionar 10 mL de água (1:10 m/v) ou 5 mL de água (1:5 m/v); homogeneizar em turrax e centrifugar para separação das fases. Obs: A concentração de açúcares na amostra irá definir a proporção de amostra:água a ser utilizada. Para amostras com baixo teor de açúcares, deve-se preparar um extrato concentrado.

### 3) Preparo da Curva Padrão

Preparar diluições da solução padrão de glicose ou frutose ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ) com água destilada em tubos de ensaio.

**Tabela 3:** Preparo da curva de calibração de glicose ou frutose.

Ponto	Volume ( $\mu\text{L}$ ) glicose $0,2 \text{ g L}^{-1}$	Concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ )	Absorbância (540 nm)
1	2	0,004	
2	8	0,016	
3	10	0,02	
4	20	0,04	
5	50	0,1	
6	100	0,2	

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

### 4) Determinação de Açúcares Redutores

- Pipetar  $100 \mu\text{L}$  da amostra em tubo de ensaio e adicionar  $200 \mu\text{L}$  do reagente SN-I;
- Elaborar um branco de reagentes com água deionizada;
- Agitar em vórtex e aquecer em banho de aquecimento ( $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 6 min);
- Resfriar em banho de gelo por 5 min;
- Adicionar  $200 \mu\text{L}$  do reagente SN-II, agitar em vórtex e permitir repouso por 5 min;
- Adicionar  $2,5 \text{ mL}$  de água destilada;
- Realizar a leitura da absorbância a  $540 \text{ nm}$ , após zerar o aparelho com o branco.

### 5) Determinação de Açúcares Totais

- Retirar  $200 \mu\text{L}$  de amostra;
- Adicionar  $200 \mu\text{L}$  de  $\text{HCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$  e aquecer em banho-maria em ebulição por 10 min;

- c) Resfriar a amostra em banho de gelo, acrescentar 200 µL de NaOH 2 mol L<sup>-1</sup> e agitar;
- d) Pipetar 100 µL da amostra em tubo de ensaio e adicionar 200 µL do reagente SN-I;
- e) Elaborar um branco de reagentes com água deionizada;
- f) Agitar em vórtex e aquecer em banho de aquecimento (100 °C por 6 min);
- g) Resfriar em banho de gelo por 5 min;
- h) Adicionar 200 µL do reagente SN-II, agitar em vórtex e permitir repouso por 5 min;
- i) Adicionar 2,5 mL de água destilada;
- j) Realizar a leitura da absorbância a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco.

### 6) Determinação de Açúcares Não Redutores

Calcular através da diferença:

$$\text{Açúcares não redutores} \left( \frac{\text{g sacarose}}{100\text{g}} \right) = (\text{açúcar total} - \text{açúcar redutor}) \times 0,94$$

### Referência

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biologic Chemistry**, v. 153, n. 2, p. 375-380, 1960.

## Determinação de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel

### 1) Reagentes e Soluções

- **Extran 2 %**: Extran é um concentrado de tensoativos que atinge um elevado poder de detergência, deixando limpos e sem resíduos todos os utensílios de laboratório. Deve ser empregado para limpeza de vidrarias empregado na análise de fibra alimentar.

- **Ácido clorídrico (HCl) 0,561 mol L<sup>-1</sup>**: Medir 47,68 mL de HCl (37 %, d=1,19 g mL<sup>-1</sup>) e ajustar ao volume de 1 L em balão volumétrico com água deionizada.

- **Ácido clorídrico (HCl) 1 mol L<sup>-1</sup>**: Medir 85 mL de HCl (37 %, d=1,19 g mL<sup>-1</sup>) e ajustar ao volume de 1 L em balão volumétrico com água deionizada.

- **Hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L<sup>-1</sup>**: Pesar 10 g de NaOH e ajustar ao volume de 250 mL em balão volumétrico com água deionizada. Obs: Por se tratar de uma reação exotérmica, preparar esta solução em capela de exaustão utilizando o banho de gelo para auxílio na solubilização.

- **Álcool 95 %**: Adicionar 950 mL de etanol anidro em um balão volumétrico de 1 L e ajustar o volume com água deionizada.

- **Álcool 78 %**: Adicionar 780 mL de etanol anidro em um balão volumétrico de ajustar ao volume de 1 L em balão volumétrico com água deionizada.

- **Solução tampão MES-TRIS 0,05 mol L<sup>-1</sup>**: Pesar 19,52 g de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico) e 12,2 g de TRIS (Tris(hidroximetil)aminometano). Dissolver em 1,7 L de água deionizada. Ajustar o pH para 8,2, a 24 °C, com NaOH 6 mol L<sup>-1</sup> e diluir para 2 L;

- **Protease 50 mg mL<sup>-1</sup>**: Pesar 50 mg de protease e diluir com 1 mL da solução tampão MES-TRIS. Verificar o volume da solução a ser empregada na análise. Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

### 2) Preparo da amostra

Adotar um procedimento específico para cada amostra dependendo do teor de umidade, gordura e açúcares. Esse tratamento deve ser empregado para facilitar a eficiência do tratamento enzimático.

### 2.1 Alimentos com alto teor de umidade

As amostras devem ser desidratadas em estufa a 70 °C por 12 h. Quantificar o teor de umidade na amostra *in natura* e na amostra seca para efeito do cálculo final da fibra alimentar.

### 2.2 Alimentos com alto teor de açúcares

As amostras devem ser tratadas previamente com 100 mL de álcool a 85 % por 30 min em banho-maria a 70 °C com posterior filtração. Lavar o resíduo álcool a 70 % até atingir o volume de 500 mL. Evaporar o solvente em estufa (70 °C) e quantificar o teor de açúcar na amostra.

### 2.3 Alimentos com alto teor de lipídeos

As amostras contendo mais de 5 % de lipídeos (em base seca), devem ser desengorduradas em aparelho de Soxhlet ou pelo método de Bligh-Dyer. Quantificar o teor de umidade na amostra *in natura* e na amostra seca para efeito do cálculo final da fibra alimentar. Após o tratamento, a amostra deve ser triturada e conservada em recipiente fechado até ser analisada.

## 3) Preparo dos materiais

Os cadinhos de vidro com placa de vidro sinterizado e porosidade nº 2 devem ser lavados com Extran 2 %, com a finalidade de remover qualquer resíduo retido na placa de vidro.

- a) Manter os cadinhos em banho por 24 h;
- b) Enxaguar com 6 porções de água;
- c) Lavar com 3 porções de água no sentido oposto ao da filtração;
- d) Secar os cadinhos em estufa a 105 °C;
- e) Transferir para um dessecador até atingir a temperatura ambiente;
- f) Pesar os cadinhos e registrar a massa;
- g) Revestir internamente os cadinhos com uma camada de cerca de 1 g de lã de vidro;
- h) Distribuir uniformemente a lã de vidro no fundo e nas paredes do cadinho (forma de concha);
- i) Lavar a lã até a neutralização com 50 mL de ácido clorídrico 0,5 mol L<sup>-1</sup> com auxílio de vácuo;
- j) Secar em estufa a 105 °C (24 h);
- k) Incinerar em mufla a 525 °C (5 h);

- l) Transferir para um dessecador até atingir a temperatura ambiente;
- m) Pesar ( $P_1$  para a amostra e  $B_1$  para branco).

#### 4) Procedimento Experimental

##### 4.1 Tratamento enzimático

- a) Pesar exatamente  $1 \pm 0,02$  g da amostra moída em béquer de 250 mL (em triplicata);
- b) Adicionar 40 mL de solução-tampão MES-TRIS (pH 8,2) dispersando completamente a amostra;
- c) Adicionar 50  $\mu$ g de  $\alpha$ -amilase termorresistente, agitando levemente;
- d) Tampar com papel alumínio e levar ao banho-maria (100 °C, 35 min) com agitação contínua;
- e) Remover os béqueres do banho e resfriar até 60 °C;
- f) Adicionar 100  $\mu$ L de solução de protease;
- g) Tampar com papel-alumínio e levar ao banho de aquecimento (60 °C por 30 min) com agitação contínua;
- h) Ainda no banho a 60 °C, remover o papel-alumínio dos béqueres e adicionar 5 mL de HCl 0,561 mol L<sup>-1</sup>, com agitação.
- i) Ajustar o pH para valores de 4,0 a 4,7, com adição de solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> e/ou HCl 1 mol L<sup>-1</sup>;
- j) Adicionar 300  $\mu$ L de solução de amiloglicosidase;
- k) Tampar com papel-alumínio e levar ao banho-maria (60 °C por 30 min) com agitação contínua;

##### 4.2 Fibra alimentar total

- a) Medir o volume do hidrolisado obtido no tratamento enzimático;
- b) Adicionar álcool 95 % a 60 °C, medido após aquecimento, na proporção de 4:1 do volume do hidrolisado;
- c) Tampar com papel-alumínio e deixar em repouso (25 °C por 1 h) para a precipitação da fração fibra solúvel;
- d) Posicionar o cadinho previamente preparado e pesado num kitassato acoplado a uma trompa de vácuo;
- e) Passar pelos cadinhos uma porção de 15 mL de álcool a 78 %, para redistribuir a lâ de vidro;

- f) Filtrar a solução alcoólica contendo o resíduo da hidrólise, cuidando para que a solução não ultrapasse o nível da lâ de vidro durante a filtração;
- g) Lavar o resíduo com duas porções de 15 mL de álcool a 95 % e duas porções de 15 mL de acetona;
- h) Secar os cadinhos contendo o resíduo em estufa (105 °C por 12h);
- i) Resfrie em dessecador;
- j) Pesar ( $P_2$  para a amostra e  $B_2$  para o branco);
- k) Determinar o teor de proteína em um dos cadinhos da amostra e em um cadinho do branco;
- l) Determinar o teor de cinzas nos outros dois cadinhos da amostra e em um cadinho do branco;
- m) Calcular o teor de fibra alimentar total.

$$\text{Fibra alimentar total(\%)} = \frac{(P_2 - P_1) - PT_A - CT_A - [(B_2 - B_1) - (PT_B - CT_B)]}{\text{massa de amostra}}$$

Onde:  $PT_A$  = Teor de proteína da amostra;  $CT_A$  = Teor de cinzas da amostra;  $PT_B$  = Teor de proteína do Branco; e  $CT_B$  = Teor de cinzas do Branco, todos após a execução do procedimento descrito no **Tópico 4.2**.

#### 4.3 Fibra alimentar solúvel

- a) Após a hidrólise enzimática, filtrar a solução contendo o resíduo, cuidando para não ultrapassar a lâ de vidro;
- b) Lavar o bquer e o resíduo com duas porções de 10 mL de água a 70 °C, recolhendo a água de lavagem junto ao filtrado da hidrólise;
- c) Reservar o filtrado em bquer de 250 mL;

Oob: A fração de fibra insolúvel fica retida no cadinho e a de fibra solúvel no filtrado.

- d) Lavar o resíduo do cadinho contendo a fibra insolúvel com duas porções de 15 mL de álcool a 78 %, duas porções de 15 mL de álcool a 95 % e duas porções de 15 mL de acetona.
- e) Secar os cadinhos em estufa (105 °C por 12 h);
- f) Resfrie em dessecador;
- g) Pesar ( $P_2$  para a amostra e  $B_2$  para o branco);

- h) Determinar o teor de proteína do resíduo insolúvel em um dos cadinhos da amostra e em um cadinho do branco;
- i) Determinar o teor de cinzas do resíduo insolúvel nos outros dois cadinhos da amostra e em um cadinho do branco;
- j) Calcular a fração fibra insolúvel:

$$\text{Fibra alimentar solúvel(\%)} = \frac{(P_2 - P_1) - PT_A - CT_A - [(B_2 - B_1) - (PT_B - CT_B)]}{\text{massa de amostra}}$$

Onde:  $PT_A$  = Teor de proteína da amostra;  $CT_A$  = Teor de cinzas da amostra;  $PT_B$  = Teor de proteína do Branco; e  $CT_B$  = Teor de cinzas do Branco, todos após a execução do procedimento descrito no **Tópico 4.3**.

#### 4.4 Fibra alimentar insolúvel

- a) Retomar o béquer com o filtrado após a hidrólise;
- b) Medir o volume e adicionar álcool 95 % a 60 °C (medido após aquecimento) na proporção de 4:1 do volume do filtrado;
- c) Tapar o béquer com papel-alumínio;
- d) Manter a mistura em repouso (15 °C por 1 hora) para a precipitação da fração fibra solúvel;
- e) Filtrar a solução alcoólica em cadinhos previamente tarados;
- f) Lavar o resíduo do cadinho contendo a fibra insolúvel com duas porções de 15 mL de álcool a 78 %, duas porções de 15 mL de álcool a 95 % e duas porções de 15 mL de acetona.
- g) Secar os cadinhos em estufa (105 °C por 12 h);
- h) Resfrie em dessecador;
- i) Pesar ( $P_2$  para a amostra e  $B_2$  para o branco);
- j) Determinar o teor de proteína do resíduo em um dos cadinhos da amostra e em um cadinho do branco;
- k) Determinar o teor de cinzas do resíduo nos outros dois cadinhos da amostra e em um cadinho do branco;
- l) Calcular a fração fibra insolúvel:

$$\text{Fibra alimentar insolúvel(\%)} = \frac{(P_2 - P_1) - PT_A - CT_A - [(B_2 - B_1) - (PT_B - CT_B)]}{\text{massa de amostra}}$$

Onde:  $PT_A$  = Teor de proteína da amostra;  $CT_A$  = Teor de cinzas da amostra;  $PT_B$  = Teor de proteína do Branco; e  $CT_B$  = Teor de cinzas do Branco, todos após a execução do procedimento descrito no **Tópico 4.4**.

## Referências

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores ZENEBO, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008, 1020p.

LEE, S. C.; PROSKY, L.; DEVRIES, J. W. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 75, p. 395-416, 1992.

## Determinação de carboidratos por diferença

Um dos métodos mais convencionais de determinar, aproximadamente, o teor de carboidratos em amostras de alimentos é a utilização de equações matemáticas que relacionam todos os dados da composição centesimal. A composição centesimal compreende a avaliação dos cinco componentes básicos presentes em um alimento, determinados pelas análises de umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos, expressos para cada 100 g do produto em questão.

Assim, as equações demonstradas, a seguir, apresentam algumas maneiras de determinar o teor de carboidratos em alimentos. A primeira equação demonstra uma maneira de calcular o teor de carboidratos em amostras de alimentos e a segunda equação apresenta o cálculo do teor de carboidratos disponíveis (metabolizáveis), pois desconta os valores de fibra alimentar presente na composição do alimento.

$$\text{Carboidratos totais}(\text{g}100\text{g}^{-1})=100-(\text{UM}+\text{CZ}+\text{LP}+\text{PT})$$

$$\text{Carboidratos disponíveis}(\text{g}100\text{g}^{-1})=100-(\text{UM}+\text{CZ}+\text{LP}+\text{PT}+\text{FA})$$

Onde: UM representa o teor de umidade (%); CZ o teor de cinzas (%); LP o teor de lipídeos (%); PT o teor de proteínas (%) e FA o teor de fibra alimentar (%). Nota-se que todas as análises devem estar na mesma unidade de medida (neste caso em percentual, g 100 g<sup>-1</sup> ou %), para cálculo ser realizado de forma correta.

## Cálculo aproximado do teor calórico de alimentos

Para o cálculo do valor calórico de alimentos, utilizar os valores de energia de combustão de cada alimento. Baseado nisso, as equações abaixo apresentam as relações que devem ser utilizadas para lipídeos, proteínas e carboidratos.

$$\text{Calorias}_{\text{Lipídeos}} = \text{Lipídeos}(\%) \times 9 \left( \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{Calorias}_{\text{Proteínas}} = \text{Proteínas}(\%) \times 4 \left( \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{Calorias}_{\text{Carboidratos}} = \text{Carboidratos}(\%) \times 4 \left( \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right)$$

Assim, para calcular o valor calórico total da amostra de alimento deve-se somar as calorias obtidas nas equações mostradas acima, conforme demonstra a equação a seguir:

$$\text{Valor Calórico}(\text{kcal}100\text{g}^{-1}) = \text{Cal}_{\text{Lipídeos}} + \text{Cal}_{\text{Proteínas}} + \text{Cal}_{\text{Carboidratos}}$$

## Determinação do pH e da acidez total titulável

### 1) Soluções:

- **Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L<sup>-1</sup>:** Pesar 4 g de NaOH e solubilizar em 1 L de água deionizada.

- **Solução de fenolftaleína 1 %:** Pesar 0,1 g e solubilizar com 5 mL de etanol absoluto. Ajustar o volume de 10 mL em balão volumétrico.

### 2) Procedimento Experimental:

- Pesar de 5 a 10 g ou pipetar de 10 a 20 mL da amostra homogeneizada;
- Diluir em aproximadamente 100 mL de água;
- Medir e registrar o pH da amostra com um pHmetro devidamente calibrado;
- Adicionar 0,3 mL de fenolftaleína para cada 100 mL de solução a ser titulada;
- Titular com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> até pH 8,1.

Obs: A coloração rósea deverá permanecer constante por aproximadamente 30 s.

### 3) Cálculo:

$$\text{Acidez Total (g ácido cítrico } 100\text{g}^{-1}) = \frac{\text{Vol}_{\text{NaOH}} \times 0,1 \times 192}{\text{massa de amostra} \times 10 \times 3}$$

$$\text{Acidez Total (\%)} = \frac{V \times f \times M}{P} \times 100$$

Onde: V = volume (mL) da solução de NaOH gasto na titulação; f = fator de correção da solução de NaOH; P = massa da amostra (g) ou volume (mL); e M = molaridade da solução de NaOH.

## Referência

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Coordenadores ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008, 1020p.

## Determinação de vitamina C com iodato de potássio

### 1) Soluções:

- Iodato de potássio ( $\text{KIO}_3$ )  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ : Secar 5 g de  $\text{KIO}_3$  em estufa a  $110^\circ\text{C}$  e resfriar em dessecador. Pesar 3,5668 g, solubilizar e ajustar o volume de 1000 mL em balão volumétrico.

- Iodato de potássio ( $\text{KIO}_3$ )  $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ : Pipetar 10 mL da solução de  $\text{KIO}_3$   $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  e ajustar o volume de 100 mL em balão volumétrico.

- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 20 %: Adicionar 200 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em um balão volumétrico de 1 L. Adicionar no balão volumétrico 200 mL de água. Deixar o balão imerso em banho de gelo, e transferir cuidadosamente o ácido para o balão. Completar o volume restante com água deionizada, realizando todo o processo em uma capela de exaustão.

- Iodeto de potássio (KI) 10 %: Pesar 10 g de KI e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL.

### 2) Procedimento Experimental:

- Homogeneizar a amostra e pesar uma quantidade que contenha - 5 g (para amostras sólidas) ou 5 mL (para amostras líquidas). Registrar a massa.
- Transferir a solução contendo a amostra para um erlenmeyer de 250 mL com o auxílio de 50 mL de água;
- Adicionar 10 mL da solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20 %;
- Homogeneizar e, se necessário, filtrar para outro erlenmeyer, lavando o filtro com água e posteriormente com 10 mL da solução de ácido sulfúrico 20 %.
- Adicionar 1 mL da solução de iodeto de potássio 10 %;
- Adicionar 1 mL da solução de amido 1 % (solução recentemente preparada)
- Titular com solução de iodato de potássio até coloração azul (ponto final).

### 3) Cálculo

$$\text{Vitamina C (mg ácido ascórbico } 100\text{g}^{-1}) = \frac{V \times F}{P} \times 100$$

Onde: V = volume (mL) de iodato de potássio gasto na titulação; F = 8,806 ou 0,8806, respectivamente para iodato de potássio 0,02 mol L<sup>-1</sup> ou 0,002 mol L<sup>-1</sup>; e P = massa (g) ou volume (mL) da amostra

## Referência

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Coordenadores ZENEBO, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008, 1020p.

## Análise de espécies redutoras de mioglobina

### 1) Procedimento Experimental

OBS: Todo procedimento deverá ser feito em ambiente escuro e refrigerado.

- a) Pesar exatamente 2 g de carne;
- b) Adicionar 20 mL de solução tampão fosfato (pH 6,8);
- c) Homogeneizar em Ultra-Turrax por 30 s;
- d) Após 1 h de repouso, centrifugar em 4000 rpm por 30 min;
- e) Filtrar o sobrenadante em papel Whatman #1;
- f) Adicionar solução tampão para completar 25 mL;
- g) Filtrar em uma membrana filtrante com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  de largura e 0,24 mm de diâmetro;
- h) Medir a absorvância em em espectrofotômetro a 503, 525, 557 e 582 nm;
- i) Realizar os cálculos.

### 2) Cálculos

$$\text{Desoximioglobina(DeoMb)} = -0.543 R1 + 1.594 R2 + 0.552 R3 - 1.329$$

$$\text{Oximioglobina(MbO}_2) = 0.722 R1 - 1.432 R2 - 1.659 R3 + 2.599$$

$$\text{Metmioglobina(MetMb)} = -0.159 R1 - 0.085 R2 + 1.262 R3 - 0.520$$

$$\text{Mioglobina Total (Mb)} = \text{DeoMb} + \text{MbO}_2 + \text{MetMb}$$

Onde:

$$R1 = \frac{\text{Abs}_{582}}{\text{Abs}_{525}}, R2 = \frac{\text{Abs}_{557}}{\text{Abs}_{525}}, R3 = \frac{\text{Abs}_{503}}{\text{Abs}_{525}}$$

Todos os resultados são expressos em  $\text{g}^{-1}$  de mioglobina.

## Referências

TANG, J.; FAUSTMAN, C.; HOAGLAND, T. A. Krzywicki revisited: equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extracts. **Journal of Food Science**. v. 69, p. 717–720, 2004.

VARGAS, F. C.; ARANTES-PEREIRA, L.; COSTA, P. A.; et al. Rosemary and pitanga aqueous leaf extracts on beef patties stability under cold storage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

## Determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS

### 1) Reagentes e Soluções

- **Ácido tricloroacético (TCA) 30 %**: Pesar 75 g de TCA, solubilizar com água deionizada e ajustar o volume de 250 mL em balão volumétrico.

- **Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67 %**: Pesar 3,35 g de TBA em um béquer e adicionar 50 mL de água. Adicionar 850  $\mu\text{L}$  de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> para solubilizar o TBA. Ajustar o volume de 500 mL em balão volumétrico

- **Cloreto de potássio (KCl) 1,15 %**: pesar 5,75 g de KCl e solubilizar em um balão volumétrico de 500 mL.

### 2) Procedimento Experimental

- a) Em um tubo Falcon de 50 mL, pesar 2 g de amostra e registrar a massa exata;
- b) Adicionar 10 mL de KCl 1,15 % e homogeneizar em Turrax;
- c) Centrifugar por 10 min a 4.000 rpm;
- d) Realizar a reação com o sobrenadante, cuidando para não pegar material sólido.
- e) Pipetar os seguintes reagentes em um tubo de ensaio, e entre cada adição de reagente, agitar vigorosamente a amostra em agitador de tubos tipo Vórtex. Realizar um branco de reagentes substituindo a amostra por 3.000  $\mu\text{L}$  de água deionizada.
  - 1 mL de solução TCA 30 %;
  - 3 mL de amostra;
  - 2 mL de TBA 0,67 %;
  - 1 mL de água deionizada.
- f) Colocar os tubos em banho fervente por 15 min;
- g) Resfriar a temperatura ambiente;
- h) Adicionar 6 mL de álcool n-butílico (sinônimos: n-butanol ou butan-1-ol);
- i) Agitar em agitador Vórtex por 40 s para extração do produto corado;
- j) Transferir para tubos Falcon de 15 mL e centrifugar por 20 min a 3.000 rpm;

- k) Aspirar a fase superior (com pipeta automática ou pipeta Pasteur) para uma cubeta (vidro ou quartzo). Cuidar para não aspirar material particulado;
- l) Realizar a leitura em espectrofotômetro a 535 nm e zerar o equipamento com a fase superior do tubo branco.

### 3) Cálculo

$$\text{TBARS} \left( \frac{\text{mg MDA}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{Abs} \times 24 \times \text{PM}_{\text{MDA}} \times 1000}{1,56 \cdot 10^5 \times m}$$

Onde:  $\text{PM}_{\text{MDA}}$  = peso molecular do malondialdeído ( $72,06 \text{ g mol}^{-1}$ );  $m$  = massa da amostra pesada (g).

### Referência

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-309, 1978.

CAPÍTULO 4

# Métodos de Extração e Quantificação de Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante



## CAPÍTULO 4

# Métodos de Extração e Quantificação de Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante

**William Gustavo Sganzerla**

**Cleonice Gonçalves da Rosa**

**Aline Priscilla Gomes da Silva**

**Michael Ramos Nunes**

**Ana Paula de Lima Veeck**

### Introdução geral: compostos bioativos

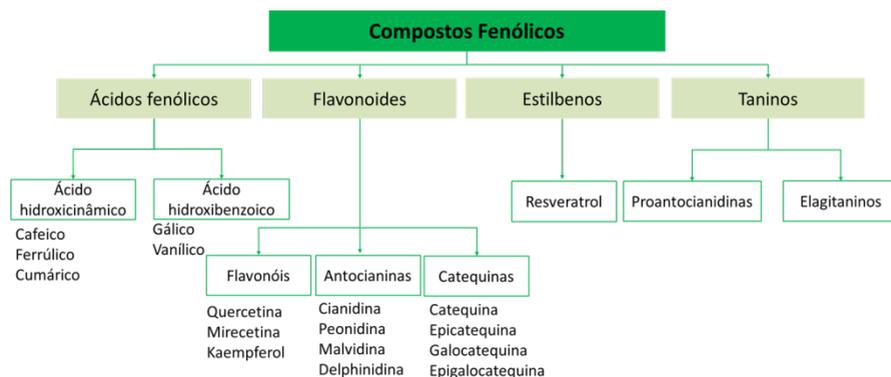
Os compostos bioativos podem ser classificados como nutrientes e não-nutrientes, que são encontrados em matrizes alimentares e possuem atividades biológicas. Diferentemente dos compostos chamados essenciais, que são importantes e necessários para o correto funcionamento das funções biológicas do organismo humano, como as proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais, os compostos bioativos têm um efeito benéfico no organismo vivo, sendo reconhecidos como potentes agentes antioxidantes, e podendo melhorar as atividades e reações químicas que acontecem dentro das células (PATIL et al., 2009). Dessa forma, os compostos bioativos são chamados de compostos funcionais, pois a sua ingestão proporciona benefícios comprovados em uma ou mais funções do organismo humano, o que reduz o risco do agravamento de doenças, como por exemplo, cânceres e diabetes (JAIME; SANTOYO, 2021). Outra particularidade dos compostos bioativos é que a sua maioria são derivados do reino vegetal, pois são metabolizados pelo metabolismo secundário das plantas. Dessa forma, são moléculas que estão presentes em frutas, hortaliças e raízes dos vegetais (GALANAKIS, 2021).

Além do aspecto biológico, que vem sendo bastante explorado pela indústria farmacêutica, os compostos bioativos vêm sendo utilizados também nas indústrias alimentícias e de cosméticos com diferentes objetivos. Isso ocorre porque além de participarem da atividade biológica dentro do organismo humano, essas moléculas também são responsáveis pela coloração

dos alimentos, sendo encontrados, principalmente, na casca e em subprodutos da indústria de alimentos (PIMENTEL; ELIAS; PHILIPPI, 2019). Por esse motivo, os compostos bioativos vêm sendo bastante utilizados como corantes naturais e incorporados em formulações que buscam fortalecer e/ou elevar o conteúdo nutricional dos alimentos processados. Alguns exemplos da aplicação dos compostos bioativos na indústria alimentícia podem ser vistos em massa de bolo enriquecida com compostos fenólicos. Outra indústria que está utilizando os compostos bioativos em sua formulação é a indústria dos cosméticos, seja pela coloração ou por outras propriedades químicas, como o aroma (NILE; PARK, 2014). Podemos citar nesse segmento, a formulação de sabonetes, hidratantes, cremes, dentre outros produtos que podem conter os compostos bioativos.

Os principais compostos bioativos podem ser classificados em: fenólicos; carotenoides; polissacarídeos não digeríveis; prébióticos; próbióticos; dentre outros. Os compostos fenólicos apresentam mais de 8 mil moléculas e podem ser classificados em diversas classes e subclasses, tais como os ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos (SILVA, 2021). A **Figura 1, a seguir**, apresenta uma esquematização das principais classes e subclasses dos compostos fenólicos.

**Figura 1:** Classes e subclasses dos compostos fenólicos.



Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

Para que ocorra a quantificação em análises laboratorial (em especial dos compostos fenólicos) e atividade antioxidante em amostras de alimentos, bem como a aplicação desses compostos em escala industrial, faz-se necessária a

extração e caracterização desses compostos. Por isso, diferentes tipos de solvente com distintas polaridades devem ser testados para otimizar a extração dos compostos bioativos, visto que os compostos sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas apresentam uma complexa estrutura química, e sua solubilidade depende da polaridade do solvente extrator (PUTNIK et al., 2018).

As análises de quantificação de compostos bioativos, atividade antioxidante e hiperglicêmica dependem de uma extração da matriz alimentar, que usualmente é conduzida por meio de uma extração sólido-líquida. Algumas metodologias de extração de compostos fenólicos serão elucidadas e, assim, para as análises de compostos fenólicos e flavonoides, deve-se empregar algum dos métodos descritos. Para as análises de carotenoides totais e antocianinas, os métodos de extração estão descritos junto com o método de análise, visto que para estas análises, a extração deve ser mais específica, e a mesma deve ser seguida de uma quantificação.

## Referências

GALANAKIS, C. M. **Innovative Food Analysis**. 1<sup>a</sup>. ed. London, United Kingdom: Academic Press, 2021.

JAIME, L.; SANTOYO, S. The Health Benefits of the Bioactive Compounds in Foods. **Foods**, v. 10, e325, 2021.

NILE, S. H.; PARK, S. W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. **Nutrition**, v. 30, 134-144, 2014.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; MURTHY, K. N. C.; VIKRAM, A. Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, 8142-8160, 2009.

PIMENTEL, C. V. M. B.; ELIAS, M. F.; PHILIPPI, S. T. **Alimentos funcionais e compostos bioativos**. 1<sup>a</sup>. ed. Barueri, SP: Manole, 2019.

PUTNIK, P.; LORENZO, J. M.; BARBA, F. J.; ROOHINEJAD, S.; JAMBRAK, A. R.; GRANATO, D.; MONTESANO, D.; KOVAČEVIĆ, D. B. Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. **Foods**, v. 7, e106, 2018.

SILVA, A. P. G., Fighting coronaviruses with natural polyphenols. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, 102179, 2021.

## Métodos de extração de compostos bioativos

### Procedimento experimental para extração com metanol

- a) Pesar 35 g de amostra previamente triturada e diluir em 25 mL de metanol;
- b) Homogeneizar a amostra cada 5 min durante 1 hora à temperatura ambiente;
- c) Filtrar com algodão, e transferir o homogeneizado para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com metanol,
- d) Clarificar o extrato aquoso, adicionando 5 mL de solução de hidróxido de bário  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 5mL de solução de sulfato de zinco a 5 %;
- e) Deixar em repouso por 20 min e posteriormente realizar acentrifugação (15 min, 5000 rpm).

### Procedimento experimental para extração com metanol 50 %

- a) Pesar as amostras em tubos de centrífuga;
- b) Adicionar 40 mL de solução metanol:água (50:50, v/v);
- c) Armazenar os extratos em ambiente por 1 h;
- d) Centrifugar os tubos (10,000 rpm) e recolher o sobrenadante;
- e) Adicionar 40 mL de solução acetona:água (70:30, v/v) ao resíduo dos tubos;
- f) Extrair por 60 min, centrifugar (15 min, 5000 rpm) e recolher o sobrenadante;
- g) Misturar os dois sobrenadantes obtidos, e completar para 100 mL com água destilada.

### Procedimento experimental para extração com etanol 95 %

- a) Homogeneizar as amostras *in natura* em Ultra-Turrax;
- b) Adicionar solução 95 % de etanol e homogeneizar por 5 min;
- c) Seguir a proporção (1:3, m/v), ou seja, 1 g de amostra e 3 mL de solução etanólica;
- d) Deixar em repouso por 30 min e centrifugar (10,000 rpm) por 5 min;
- e) Coletar o sobrenadante e repetir a extração;
- f) Concentrar os sobrenadantes em rotaevaporador (40 °C);
- g) Reconstituir o extrato em água;

- h) Armazenar o extrato em  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

### **Procedimento experimental para extração com metanol acidificado**

- a) Dissolver 5 g da amostra macerada em 30 mL de metanol;
- b) Posteriormente adicionar 4,9 mL de HCl  $1,2\text{ mol L}^{-1}$  para a estabilizar os compostos fenólicos;
- c) Em seguida completar o volume em balão volumétrico de 50 mL com metanol;
- d) Homogeneizar o extrato em banho-maria à  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz por 24 h;
- e) Após este período, filtrar a mistura e concentrar o sobrenadante em rotaevaporador a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por cerca de 30 min;
- f) Redissolver o extrato concentrado em metanol até o volume final de 5 mL, e centrifugar (7000 rpm por 10 min).

### **Procedimento experimental para extração com etanol 70%**

- a) Pesar 5 g de amostra *in natura*;
- b) Completar com 50 mL de solução hidroetanólica (70 % v/v);
- c) Armazenar os extratos em ambiente refrigerado por 7 dias;
- d) Filtrar os extratos em papel filtro qualitativo;
- e) Armazenar em frasco âmbar sob refrigeração.

### **Procedimento experimental para extração com solvente – água 1**

- a) Pesar 5 g de amostra *in natura*;
- b) Completar com 50 mL de água destilada;
- c) Armazenar os extratos em ambiente refrigerado por 7 dias;
- d) Filtrar os extratos em papel filtro qualitativo;
- e) Armazenar em frasco âmbar sob refrigeração.

### **Procedimento experimental para extração com solvente – água 2**

- a) Pesar 10 g de frutos íntegros e congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- b) Triturar sob nitrogênio líquido com gral e pistilo;
- c) Extrair com 20 mL de água ultra pura;
- d) Homogeneizar em agitador orbital a 200 rpm por 1 h à temperatura ambiente ( $20 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ );

- e) Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C e concentrar o sobrenadante em liofilizador;
- f) Recuperar os extratos concentrados em 10 mL de água e armazenar em -80 °C até o momento das análises.

## Referências

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D.S.; BAISCH, A.L.M.; SOUZA-SOARES, L.A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, v.13, p.105-114, 2003.

DENARDIN, C. C.; HIRSCH, G. E.; ROCHA, R. F.; VIZZOTTO, M.; HENRIQUES, A.T.; MOREIRA, J.C.F.; GUMA, F.T.C.R.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 387–398, 2015.

HÄKKINEN, S. H.; KÄRENLAMPI, S. O.; HEINONEN, M.; MYKKÄNEN, H.M.; TÖRRÖNEN, A.R. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, p. 543-551, 1998.

JACQUES, A.C.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; ZAMBIAZI, R.C.; CHIM, J.F. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1720-1725, 2010.

MEDINA, A. L.; HAAS, L. I. R.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R.C.; SILVA, W.P.; NORA, L.; ROMBALDI, C.V. Araçá (*Psidium cattleianum*Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, 2011.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.

SGANZERLA, W. G.; BELING, P. C.; FERRAREZE, J. P.; KOMATSU, R.A.; NUNES, M.R.; VEECK, A.P.L. Nutritional, physicochemical and antimicrobial properties of uvaia pulp (*Eugenia pyriformis*Cambess). **Communications in Plant Sciences**, v. 8, p. 1–7, 2018.

## Determinação de compostos fenólicos totais

### 1) Reagentes e Soluções

- Carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )  $1 \text{ mol L}^{-1}$ : Pesar 26,497 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e completar com água deionizada em um balão volumétrico de 250 mL. Dissolver utilizando um ultrassom.

- Ácido gálico  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ : Pesar 20 mg (0,02 g) de ácido gálico e completar em um balão de 50 mL utilizando água deionizada. Armazenar em frasco escuro, sob refrigeração.

### 2) Procedimento Experimental

- Em um tubo de ensaio adicionar  $104 \mu\text{L}$  do extrato (ou ácido gálico para a curva de calibração) e  $1667 \mu\text{L}$  de água deionizada;
- Preparar um branco com  $104 \mu\text{L}$  de água destilada. Obs: O branco da reação consiste na substituição do extrato por água e/ou solvente utilizado na reação.
- Adicionar  $104 \mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu (0,25 N);
- Agitar manualmente os tubos de ensaio;
- Deixe agir por 3 min e em seguida adicione  $208 \mu\text{L}$  da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 1 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Deixe reagir por mais 2 h;
- Zerar o espectrofotômetro com o branco da reação.
- Leia em espectrofotômetro a  $725 \text{ nm}$  em cubeta de vidro.

### 3) Curva Padrão

Prepare a curva padrão com a solução de ácido gálico  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para isso, seguir as concentrações indicadas na Tabela 1, a seguir:

**Tabela 1:** Diluições da curva padrão de ácido gálico.

Ponto	Volume de ácido gálico 0,4 mg mL <sup>-1</sup>	Concentração de ácido gálico (mg mL <sup>-1</sup> )	Absorbância
1	30	0,115	
2	25	0,096	
3	20	0,076	
4	15	0,057	
5	10	0,038	
6	5	0,019	

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

## Referência

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal Science Food Agriculture**, v. 10, p. 135-144, 1959.

## Determinação de flavonoides totais – método 1

### 1) Reagentes e Soluções

- Solução 5 % (m/v) de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ): Pesar 5 g de  $\text{NaNO}_2$  e completar em um balão volumétrico de 100 mL com água deionizada;

- Solução 10 % de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ): Pesar 10 g de  $\text{AlCl}_3$  e completar em balão volumétrico de 100 mL com água deionizada;

- Solução 1 mol  $\text{L}^{-1}$  de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ): Pesar 10 g de  $\text{NaOH}$  e completar em balão volumétrico de 250 mL com água deionizada;

- Solução padrão de quercetina 0,2 mg  $\text{mL}^{-1}$ : Pesar 5 mg de quercetina e completar com etanol absoluto em um balão volumétrico de 25 mL. Deixar a solução num frasco âmbar no freezer.

### 2) Procedimento Experimental

- Transferir 500  $\mu\text{L}$  do extrato (ou quercetina para a curva de calibração) para um tubo de ensaio;
- Adicionar 2 mL de água deionizada e 150  $\mu\text{L}$  de solução 5 % de  $\text{NaNO}_2$  deixar em repouso por 5 min;
- Posteriormente, adicionar 150  $\mu\text{L}$  de solução 10 % de  $\text{AlCl}_3$ ;
- Deixar em repouso por 5 min;
- Adicionar 1 mL de solução 1 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaOH}$ ;
- Realizar as leituras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 510 nm.

### 3) Curva Padrão

Prepare a curva padrão com a solução de quercetina 0,2 mg  $\text{mL}^{-1}$ . Para isso, seguir as concentrações indicadas na Tabela 2:

**Tabela 2:** Diluições da curva padrão de quercetina.

Pontos	Volume de quercetina 0,2 mg mL <sup>-1</sup>	Concentração de quercetina (mg mL <sup>-1</sup> )	Absorbância
1	500	0,2	
2	300	0,12	
3	200	0,08	
4	100	0,04	
5	50	0,02	
6	25	0,01	
7	10	0,004	

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

## Referência

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

## Determinação de flavonoides totais – método 2

### 1) Reagentes e Soluções

- **Solução etanol 80 %**: Medir 80 mL de etanol e completar em um balão volumétrico de 100 mL com água deionizada;

- **Solução de nitrato de alumínio ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ) 10 %**: Pesar 10 g de  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  e completar em balão volumétrico de 100 mL com água deionizada;

- **Solução de acetato de potássio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ ) 1 mol L<sup>-1</sup>**: Pesar 24,5375 g de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  e completar com água deionizada para um balão de 250 mL.

- **Solução padrão de quercetina 0,4 mg mL<sup>-1</sup>**: Pesar 10 mg (0,01 g) de quercetina e completar com etanol absoluto em um balão volumétrico de 25 mL. Deixar a solução num frasco âmbar no freezer.

### 2) Procedimento Experimental

- Pipetar 250  $\mu\text{L}$  do extrato (ou quercetina para a curva de calibração) para um tubo de ensaio;
- Preparar um branco com 250  $\mu\text{L}$  de água deionizada.
- Adicionar 2150  $\mu\text{L}$  de etanol 80 %;
- Agitar os tubos manualmente;
- Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  10%;
- Agitar os tubos manualmente;
- Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  1 mol L<sup>-1</sup>;
- Agitar os tubos manualmente;
- Deixar 40 min em incubação à temperatura ambiente;
- Realizar a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 415 nm.

### 3) Curva de Calibração

Prepare a curva padrão com a solução de quercetina 0,4 mg mL<sup>-1</sup>. Para isso, seguir as concentrações indicadas na Tabela 3, a seguir:

**Tabela 3:** Diluições da curva padrão de quercetina.

Pontos	Volume de quercetina 0,4 mg mL <sup>-1</sup>	Concentração de quercetina (mg mL <sup>-1</sup> )	Absorbância
1	250	0,4	
2	200	0,32	
3	150	0,24	
4	100	0,16	
5	50	0,08	
6	25	0,04	
7	10	0,016	

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

## Referência

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N.M.F.; Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

## Determinação de flavonoides totais – método 3

### 1) Reagentes e Soluções

- **Solução etanol 50 %**: Medir 50 mL de etanol e completar em um balão volumétrico de 100 mL com água deionizada;

- **Solução de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>)5 %**: Pesar 5 g de AlCl<sub>3</sub> e completar em balão volumétrico de 100 mL com água deionizada;

- **Solução padrão de quercetina 0,1 mg mL<sup>-1</sup>**: Pesar 1 mg (0,001 g) de quercetina e completar com etanol absoluto em um balão volumétrico de 10 mL. Deixar a solução num frasco âmbar no freezer.

### 2) Procedimento Experimental

- Pipetar 500 µL dos extratos (ou quercetina para a curva de calibração) para um tubo de ensaio;
- Preparar um branco com água deionizada.
- Adicionar 1800 µL de solução etanol 50 %;
- Agitar os tubos manualmente;
- Pipetar 200 µL de AlCl<sub>3</sub> 5 %;
- Agitar os tubos manualmente;
- Deixar 30 min de incubação em temperatura ambiente;
- Realizar a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 425 nm.

### 3) Curva de Calibração

Prepare a curva padrão com a solução de quercetina 0,1 mg mL<sup>-1</sup>. Para isso, seguir as concentrações indicadas na Tabela 4:

**Tabela 4:** Diluições da curva padrão de quercetina.

Pontos	Volume de quercetina 0,1 mg mL <sup>-1</sup>	Concentração de quercetina (mg mL <sup>-1</sup> )	Absorbância
1	500	0,1	
2	250	0,05	
3	150	0,03	
4	100	0,02	
5	50	0,01	
6	25	0,005	
7	10	0,002	

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

## Referência

RAMOS, R. T. M.; BEZERRA, I. C. F.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L.A.L. Spectrophotometric quantification of flavonoids in herbal material, crude extract, and fractions from leaves of *Eugenia uniflora* Linn. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 3, p.253-260, 2017.

## Determinação de antocianinas totais por pH diferencial – método 1

### 1) Reagentes e Soluções

- **Tampão pH 1,0 (cloreto de potássio (KCl) 0,025 mol L<sup>-1</sup>):** Pesar 1,86 g de KCl e adicionar 800 mL de água em um béquer. Medir o pH e ajustar com solução de ácido clorídrico HCl (1 mol L<sup>-1</sup>) até pH 1. Transferir para um balão volumétrico de 1 L e completar o volume com água deionizada.

- **Tampão pH 4,5 (acetato de sódio (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na) 0,4 mol L<sup>-1</sup>):** Pesar 54,43 g de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na e solubilizar em 900 mL de água deionizada em um béquer. Medir o pH e ajustar com ácido clorídrico HCl (1 mol L<sup>-1</sup>) até pH 4.5. Transferir para um balão volumétrico de 1 L e completar com água deionizada.

### 2) Procedimento Experimental

Obs: Preparar 2 diluições de cada extrato em triplicata (1 extrato resultará em 6 tubos).

- Diluição 1: Pipetar 200 µL do extrato e completar com 2800 µL da solução tampão pH 1;
- Diluição 2: Pipetar 200 µL de extrato e completar com 2800 µL de solução tampão pH 4,5;
- Deixar a reação ocorrer por 15 min em ambiente escuro;
- Realizar a leitura de cada tubo em 510 nm e 700 nm. Obs: para cada tubo de ensaio será obtido 2 leituras diferentes, uma em 520 nm e outra em 700 nm;
- Zerar o espectrofotômetro com água deionizada.

### 3) Cálculos

$$\text{Fator de Correção (FC)} = \frac{\text{Volume total da reação (mL)}}{\text{Volume de amostra pipetado (mL)}}$$

$$\text{Absorbância (A)} = (A_{\lambda=510} - A_{\lambda=700})_{\text{pH 1}} - (A_{\lambda=510} - A_{\lambda=700})_{\text{pH 4,5}}$$

$$\text{Antocianinas monoméricas (AM)} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A \times \text{PM} \times \text{FC} \times 1000}{\epsilon \times 1}$$

Obs : Para cianidina-3-glicosídeo (PM: 449,2 g mol<sup>-1</sup> e ε: 26,900 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Correlacionando com a massa do extrato:

$$FC_2(\text{g}) = \frac{\text{massa pesada de fruta (g)} \times 1000 (\text{mL})}{\text{Volume do extrato original (mL)}}$$

Corrigindo os dados para Antocianinas Totais:

$$\text{Antocianinas Totais} \left( \frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{AM \times 100}{FC_2}$$

## Referência

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. **Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy.** In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, Inc., New York, 2001.

## Extração e determinação de antocianinas totais – método 2

### 1) Reagentes e Soluções:

- **Solução de ácido clorídrico (HCl) 1,5 mol L<sup>-1</sup>:** Pipetar 125,26 mL de HCl concentrado (pureza de 37% e densidade de 1,18 g mL<sup>-1</sup>) e diluir em um balão volumétrico de 1 L com água deionizada.

- **Solução de etanol em HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup> (85:15):** Misturar 850 mL de etanol absoluto com 150 mL da solução 1,5 mol L<sup>-1</sup> de HCl, preparada acima.

### 2) Procedimento Experimental:

- Pesar de 2,5 g de amostra homogeneizada (em béquer) e anotar a massa;
- Adicionar 50 mL de solução de etanol em HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup> (85:15);
- Homogeneizar as amostras;
- Selar o béquer com *parafilm* e papel alumínio;
- Deixar em repouso sob refrigeração por 12 h;
- Filtrar a solução em balão volumétrico de 50 mL, avolumado com a solução de etanol em HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup> (85:15). Obs: anotar o volume do balão volumétrico.
- Deixar em repouso por 60 min;
- Realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro (535 nm);
- Zerar o equipamento com a solução de etanol em HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup> (85:15);
- Realizar os cálculos com base nas equações abaixo.

### 3) Cálculos:

$$\text{AntocianinaTotal} \left( \frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{\text{Abs}_{535\text{nm}} \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000}{\epsilon \times 1} \times 100$$

Onde:  $\text{Abs}_{535\text{ nm}}$  = absorbância do extrato filtrado lida a 535 nm; PM = peso molecular da cianidina-3-glucosídeo (449,38 g mol<sup>-1</sup>); FD = fator de diluição (razão volume do extrato (L) pela massa pesada (g));  $\epsilon$  = coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glucosídeo em solução etanólica acidificada à

528 nm, cujo valor é de  $29.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; 1000 = transformar os valores para mg de antocianinas; e 100 = transformar para 100 g de amostra.

## Referência

FULEKI, T.; FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in Cranberries. **Journal of Food Science**, v.33, n.1, p.72-77, 1968.

## Extração e determinação de carotenoides totais – método 1

### 1) Procedimento Experimental

- Pesar 5 g de amostra e 2 g de celite.
- Adicionar 20 mL de acetona gelada, agitando-se o conteúdo por 10 minutos no almofariz.
- O material deve ser filtrado em funil de buchner com papel filtro, lavando a amostra com acetona até que o extrato fique incolor.
- O filtrado deve ser transferido para um funil de separação, onde acrescentam-se 30 mL de éter de petróleo e em torno de 100 mL de água destilada.
- Descartar a fase inferior e repetir o procedimento por 4 vezes para ocorrer a remoção total da acetona.
- Transferir o extrato superior para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com éter de petróleo.
- A leitura deve ser realizada em espectrofotômetro a 450 nm, usando éter de petróleo como branco.

### 2) Cálculo

O conteúdo de carotenoides pode ser determinado pela equação abaixo:

$$\text{Carotenoides} \left( \frac{\text{mg } \beta\text{-caroteno}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{\text{Abs}_{450\text{nm}} \times \text{Volumedo Extrato} \times 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times \text{massa de amostra(g)}}$$

Onde:  $\text{Abs}_{450\text{nm}}$  = Absorbância em 450 nm; Volume do extrato = 50 mL;  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  = coeficiente de absortividade molar do  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo = 2592.

## Referências

RODRIGUES-AMAYA, B.B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILST Press. 2001. 64p.

JACQUES, A.C.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; ZAMBIAZI, R.C.; CHIM, J.F. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubusfruticosus*) cv. Tupy. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1720-1725, 2010.

## Extração e determinação de carotenoides totais – método 2

### 1) Procedimento Experimental

- a) Em um tubo falcon pesar 2 g de amostra de fruta homogeneizada (anotar a massa);
- b) Adicionar 5 mL de água deionizada;
- c) Adicionar 5 mL de acetona gelada e homogeneizar em turrax (1 minuto);
- d) Adicionar 10 mL de éter de petróleo. Agitar bruscamente durante 1 min;
- e) Centrifugar as amostras por 10 min (4000 rpm);
- f) Ler a fase orgânica em 450 nm.

### 2) Cálculo

O conteúdo de carotenoides pode ser determinado pela equação abaixo:

$$\text{Carotenoides} \left( \frac{\text{mg } \beta\text{-caroteno}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{\text{Abs}_{450\text{nm}} \times \text{Volume de éter} \times 1000}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{massa de amostra(g)}}$$

onde:  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  = coeficiente de absorção do carotenoide no solvente utilizado. Ex.: para  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo no comprimento de onda de 450 nm a  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$

## Referências

RODRIGUES-AMAYA, B.B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILST Press. 2001. 64p.

TALCOTT, S. T.; HOWARD, L. R. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 2109-2115, 1999.

VINHOLES, J.; LEMOS, G.; BARBIERI R. L.; FRANZON, R.C.; VIZZOTTO, M. *In vitro* assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. **Food Bioscience**, v. 19, p. 92-100, 2018.

## Extração e determinação de clorofilas e carotenoides em folhas

### 1) Reagentes e Soluções

- **Solução acetona: água (80 %):** Em uma proveta de 100 mL, medir 80 mL de acetona P.A. e completar com 20 mL de água deionizada.

### 2) Procedimento Experimental

- Pesar 10 gramas de folhas (base seca ou úmida) e adicionar 10 mL de solução acetona: água 80 % (v/v);
- Extrair os pigmentos em Ultra-Turrax por 30 segundos (ou até completa extração);
- Centrifugar o extrato (1500 rpm for 5 min);
- Descartar o precipitado;
- Em um espectrofotômetro medir a absorvância do sobrenadante em 663.6, 646.6, e 440.5 nm. Caso seja possível, fazer a varredura da solução para obter o espectro.
- Realizar os cálculos.

### 3) Cálculos

$$\text{Clorofila } \alpha = 12,25 \text{ Abs}_{663,6} - 2,55 \text{ Abs}_{646,6}$$

$$\text{Clorofila } \beta = 20,31 \text{ Abs}_{646,6} - 4,91 \text{ Abs}_{663,6}$$

$$\text{Clorofila total} = 17,76 \text{ Abs}_{646,6} + 7,34 \text{ Abs}_{663,6}$$

$$\text{Carotenoides } \left( \frac{\text{g}}{\text{kg}} \right) = 4,69 \text{ Abs}_{440,5} - 0,267 \cdot \text{Clorofila Total}$$

## Referências

YANG, C. M.; CHANG, K.; YIN, M.; HUANG, H.M. Methods for the Determination of the Chlorophylls and their Derivates. **Taiwania**, v. 43, p. 116–122, 1998.

VARGAS, F. C.; ARANTES-PEREIRA, L.; COSTA, P. A.; MELO, M.P.; SOBRAL, P.J.A. Rosemary and pitanga aqueous leaf extracts on beef patties stability under cold storage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

## Avaliação da atividade antioxidante pela inibição do radical livre ABTS

### 1) Reagentes e Soluções

- **Solução estoque de ABTS 7 mmol L<sup>-1</sup>**: Dissolver 192 mg de ABTS em água destilada e completar o volume para 50 mL em um balão volumétrico. Homogeneizar e transferir a solução para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Armazenar sob refrigeração por até um mês.

- **Solução de persulfato de potássio 140 mmol L<sup>-1</sup>**: Dissolver 378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada e completar o volume para 10 mL em um balão volumétrico. Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por até um mês.

- **Solução do radical ABTS<sup>+</sup>**: Misturar 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. Manter a mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, diluir 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter uma absorbância de  $0,70 \pm 0,05$  nm a 734 nm. Preparar e usar apenas no dia da análise.

- **Solução padrão de Trolox 2 mmol L<sup>-1</sup>**: Dissolver 25 mg de trolox em álcool etílico e completar o volume para 50 mL em um balão volumétrico com álcool etílico. Homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Preparar e usar apenas no dia da análise.

### 2) Procedimento Experimental

- a) Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 30 µL do extrato para tubos de ensaio. Fazer um branco com água deionizada;
- b) Adicionar 3,0 mL do radical ABTS<sup>+</sup> e homogeneizar em agitador de tubos.
- c) Realizar a leitura a 734 nm após 6 minutos da mistura e utilizar o álcool etílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

### 3) Curva Padrão

**Tabela 5:** Diluições da curva padrão de trolox e análise da atividade antioxidante pelo método ABTS.

Ponto	Volume Trolox 2 mM (µL)	Massa Trolox na reação (mg)	Absorbância
1	30	0,015018	
2	20	0,010012	
3	15	0,007509	
4	10	0,005006	
5	5	0,002503	
6	3	0,0015018	

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

## Referências

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, M. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

## Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

### 1) Reagentes e Soluções

- **Ácido clorídrico (HCl) 0,05 mol L<sup>-1</sup>**: Pipetar 2 mL de ácido clorídrico e completar com água destilada em balão volumétrico de 500 mL.

- **Ácido cítrico 5 mmol L<sup>-1</sup>**: Pesar 0,2625 g de ácido cítrico e completar com água destilada em balão volumétrico de 250 mL.

- **Cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) 3 mmol L<sup>-1</sup>**: Pesar 0,1216 g de FeCl<sub>3</sub> e completar com a solução de ácido cítrico 5mM em balão volumétrico de 250 mL.

- **TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine)**: Pesar 0,078 g de TPTZ e completar com a solução de HCl 0,05 molL<sup>-1</sup> em balão volumétrico de 250 mL.

- **Trolox 1 mmol L<sup>-1</sup>**: Pesar 2,503 mg de Trolox e dissolver em 100-200 µL de etanol P.A., esperar até desaparecer os cristais. Adicionar o Trolox sobre aproximadamente 9,0 mL de água deionizada. Completar o volume para 10,0 mL, com água deionizada em balão volumétrico.

### 2) Procedimento Experimental

- a) Pipetar 100 µL da amostra nos tubos de ensaio;
- b) Adicionar 100 µL da solução de cloreto férrico 3 mmol L<sup>-1</sup>;
- c) Fazer um tubo de ensaio com o branco, utilizando somente o cloreto férrico 3 mmol L<sup>-1</sup>;
- d) Adicionar 1800 µL da solução de TPTZ nas amostras e no branco;
- e) Deixar em repouso por 30 minutos em banho-maria a 37 °C;
- f) Deixar em repouso, no escuro, por 10 minutos, e medir a absorbância a 620 nm.

### 3) Curva padrão de Trolox

Pipetar, com o auxílio de uma micropipeta, diferentes concentrações de Trolox. Pode ser feito em um béquer de 10 mL. O volume final deve ser de 1000µL, ou 1 mL.

**Tabela 6:** Diluições da curva padrão de trolox e análise da atividade antioxidante pelo método FRAP.

Pontos da Curva	1	2	3	4	5	6	7
Trolox - Concentração final ( $\mu\text{M}$ )	100	200	300	400	600	800	1000
Trolox 1 mM ( $\mu\text{L}$ )	100	200	300	400	600	800	1000
H <sub>2</sub> O deionizada ( $\mu\text{L}$ )	900	800	700	600	400	200	0

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

## Referências

ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 6, p. 655-665, 2002.

BENZIE, I.; STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

## Avaliação da atividade antioxidante pela inibição do radical livre DPPH

### 1) Procedimento experimental

- a) Zerar o espectrofotômetro com etanol;
- b) Verificar se a absorbância da solução de DPPH é de aproximadamente  $1,1 \pm 0,02$ . Quando o valor ultrapassar 1,12, diluir a solução DPPH com etanol e, quando a leitura for menor do que 1,08 deve-se acrescentar mais DPPH.
- c) Em um tubo de ensaio adicionar 150  $\mu\text{L}$  do extrato (ou solução com antioxidante) e 2850  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH diluída. Fazer um branco com 150  $\mu\text{L}$  de etanol para obter o fator de correção da diluição.
- d) Guardar os tubos de ensaios com os reagentes fechados, no escuro (envolver com papel laminado) e em temperatura ambiente por 24 horas.
- e) Fazer as leituras, sem esquecer de zerar o espectrofotômetro com etanol. Realizar a leitura em cubeta de vidro a um comprimento de onda de 515 nm. Se as leituras forem menores do que 0,2, voltar ao passo “c” e diluir mais o extrato e repetir os passos que seguem.

### 2) Cálculo do $\Delta\text{DPPH}$

$$\Delta\text{DPPH} = \text{ADPPH}_d - [a_{515}]$$

Onde:  $\Delta\text{DPPH}$  = é a diminuição na absorbância devido principalmente ao efeito do antioxidante;  $\text{ADPPH}_d$  = é a absorbância do DPPH após a diluição com etanol; e  $[a_{580}]$  é a absorbância da amostra após a reação em 515nm

### 3) Curva padrão de Trolox

**Tabela 7:** Diluições da curva padrão de trolox e análise da atividade antioxidante pelo método DPPH.

Ponto	Volume Trolox (µL)	Concentração de Trolox no tubo da reação (mg)	Absorbância (515 nm)
1	150	0,0375	
2	100	0,025	
3	50	0,01285	
4	25	0,00625	
5	15	0,00375	
6	10	0,002503	
7	5	0,00125	
8	1	0,0002503	

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

## Referência

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

## Cálculos para expressar os resultados de atividade antioxidante – métodos DPPH, ABTS e FRAP

Para determinar a concentração do Trolox (mg) no tubo da reação, deve-se utilizar a seguinte relação matemática:

Em uma solução 1 mM ou 0,001 M:

0,2503 mg → 1000mL

x (massa de trolox) → z (volume pipetado em mL)

x = \_\_\_\_ g (massa de Trolox na reação) \* 1000

x = \_\_\_\_ mg (massa de Trolox na reação)

### Cálculo de conversão na planilha

Para determinar o valor da atividade antioxidante expresso em (mg Trolox equivalente/ 100g de polpa), deverá seguir a seguinte sequência lógica, exemplificada conforme os passos abaixo:

Amostras	Extrato	Leitura	$\Delta$ DPPH/ $\Delta$ ABTS	a + Bx (mg de trolox equivalente no tubo de leitura - que corresponde ao volume de amostra que foi usado para a leitura)	mg Trolox equivalente/mL de solução (extrato)	mg Trolox equivalente/100g de polpa
---	1	2	3	4	5	6

**1:** Deve-se conhecer em que meio a amostra está diluída, bem como a concentração. Por exemplo: extrato aquoso 10% → 1 g de polpa para 10 mL de água → Extrato 1:10

**2:** Seguir o procedimento experimental conforme as metodologias de atividade antioxidante descritas anteriormente e anotar a leitura da absorbância da amostra.

**3:** Realizar o cálculo do  $\Delta\text{DPPH} \rightarrow \Delta\text{DPPH} = \text{ADPPHd} - [\text{a580}]$ . (Este passo não se aplica para o método FRAP).

**4:** Realizar a curva padrão com Trolox (descrito acima), e obter o valor da equação da reta  $\rightarrow y = a.x + b$ , onde o “y” é a absorbância e “x” é a concentração de Trolox equivalente no tubo da leitura.

**5:** Conversão para mg Trolox equivalente/mL de solução ou por massa de amostra.

Resultado obtido no passo 4 (mg Trolox Equivalente)  $\rightarrow$  volume de extrato pipetado (em  $\mu\text{L}$ )

$$1\mu\text{L} \rightarrow 0,001\text{mL}$$
$$\text{volume de extrato pipetado } (\mu\text{L}) \rightarrow x \text{ mL}$$

Resultado obtido no passo 4 (mg Trolox Equivalente)  $\rightarrow$  volume de extrato pipetado (em mL)

$$y(\text{mg Trolox Equivalente}) \rightarrow 1\text{mL de extrato}$$
$$y = \text{___ mg de Trolox Equivalente/ mL de extrato}$$

**6:** Conversão para mg Trolox equivalente/100 g de polpa

Extrato 10%:

1 g de polpa → 10 mL de solução

x g de polpa → 1 mL de solução

x = 0,1 g de polpa

Resultado obtido no passo 5 (y) → 1mL extrato = 0,1g de polpa

y → 0,1 g de polpa

**Z** → 100 g de polpa

**z = \_\_\_ mg de Trolox/ 100 g de polpa**

## Avaliação da atividade anti-hiperglicêmica *in vitro* pela inibição da enzima $\alpha$ -glucosidase

### 1) Reagentes e Soluções

$\alpha$ -glucosidase (0.5 U/mL), tampão fosfato de potássio pH 7, pNPG 5 mM (p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) em tampão fosfato pH 7, carbonato de Sódio - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1 M).

### 2) Procedimento Experimental

- a) Pipetar 400  $\mu$ L de extrato de fruta (10 %, 1:10 m/v); Nas diluições apresentadas na **Tabela 8**, utilizar tampão fosfato de potássio (pH 7);
- b) Realizar um branco com 400  $\mu$ L do solvente ou utilizar tampão fosfato de potássio (pH 7);
- c) Adicionar 400  $\mu$ L da enzima  $\alpha$ -glucosidase (0.5 U/mL);
- d) Incubar a reação durante 6 minutos a 25 °C;
- e) Adicionar 200  $\mu$ L de pNPG 5 mM (p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside);
- f) Incubar a reação por 8 minutos a 37 °C (banho-maria);
- g) Adicionar 1000  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1 M);
- h) Realizar a leitura em 405 nm.

### 3) Cálculos

Inicialmente, realizar os cálculos de % inibição:

$$\% \text{ inibição} = \left( 1 - \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

Em seguida, realizar os cálculos de IC<sub>50</sub>.

**Tabela 8:** Diluições para verificar o percentual de inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidade.

Volume de extrato a ser pipetado de extrato a 10% ( $\mu\text{L}$ )	Concentração ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% inibição
400	0,04	40	
200	0,02	20	
100	0,01	10	
50	0,005	5	
10	0,001	1	

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

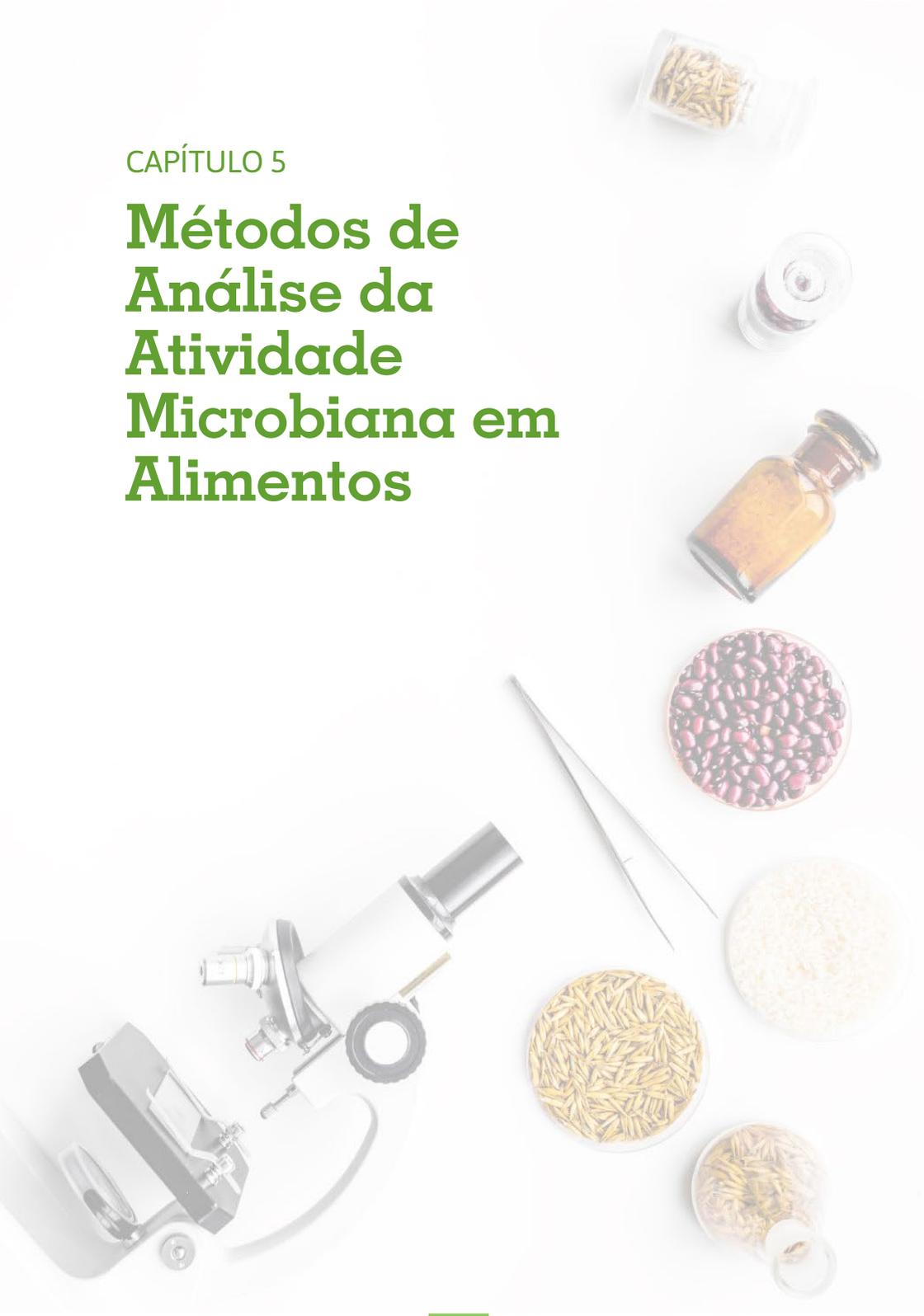
Plotar no Excel a concentração do extrato na reação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Eixo X) versus % inibição (Eixo Y). Realizar a equação da reta linear.

## Referências

QUAN, N. V.; XUAN, T. D.; TRANS, H.; THUY, N.T.D.; TRANG, L.T.; HUONG, C.T.; ANDRIANA, Y.; TUYEN, P.T. Antioxidant,  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities and Potential Constituents of *Canarium tramdenum* Bark. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 605, 2019.

CAPÍTULO 5

# Métodos de Análise da Atividade Microbiana em Alimentos



## CAPÍTULO 5

# Métodos de Análise da Atividade Microbiana em Alimentos

**Natiele Correia Veloso**  
**Rosane Schenkel de Aquino**

## Determinação da atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais

Os materiais utilizados nas análises microbiológicas devem ser esterilizados, conforme metodologia escolhida de esterilização ou deverão ser materiais estéreis descartáveis. Toda a execução da técnica deverá ser realizada próxima ao bico de Bunsen aceso e em capelas de fluxo laminar, devidamente limpa, sanitizada e esterilizada com luz U.V.

### 1) Preparo dos meios de cultura

Para teste de sensibilidade antimicrobiana por difusão, usar ágar MüellerHinton (AMH) e caldo Brain Heart Infusion (BHI).

#### 1.1 Ágar Müeller Hinton

- a) O AMH deve ser preparado conforme as instruções do fabricante do meio, na proporção desejada. O pH deverá estar entre 7,2 – 7,4, a temperatura ambiente após solidificação. Medir o pH através de maceração do AMH em quantidade suficiente de ágar para submergir a ponta de um eletrodo do pHmetro ou, solidificar uma pequena quantidade de ágar em torno da ponta de um eletrodo do pHmetro num béquer ou ainda, usar um eletrodo de superfície devidamente calibrado.

- b) Imediatamente após passar pela autoclave, deixar resfriar em banho-maria entre 45 e 50 °C ou manter em geladeira até o momento do uso. Quando resfriado, fundir o meio em banho-maria a 45 – 50 °C ou em micro-ondas.
- c) Despejar o meio AMH em placas de Petri de vidro ou plástico, até a altura aproximada de 4 mm, numa superfície horizontal.
- d) O meio AMH deve esfriar em temperatura ambiente e ser armazenado em geladeira (de 2 a 8 °C), preferencialmente em sacos plásticos descartáveis, exceto quando a placa for usada no mesmo dia. Não utilizar placas com AMH ressecadas.
- e) No momento do teste uma placa de AMH, sem inoculação de amostra, deverá ser incubada a 30-35 °C, durante 24 h ou mais, para confirmar a esterilidade do lote do meio a ser utilizado na análise.
- f) Se, antes do uso, o meio apresentar gotículas de água na superfície do meio ou na tampa da placa de Petri, as placas devem ser colocadas em uma incubadora (35° C) ou capela de fluxo laminar a temperatura ambiente, com as tampas entreabertas ou próximas do bico de bunsen até que o excesso de umidade superficial evapore (10 - 30 min).

### 1.2 Meio líquido (caldo) – BHI, MH, tríplice soja

- g) O AMH deve ser preparado conforme as instruções do fabricante do meio, na proporção desejada. O pH deverá estar entre 7,2 – 7,4, a temperatura ambiente após solidificação. Medir o pH através de maceração do AMH em quantidade suficiente de ágar para submergir a ponta de um eletrodo do pHmetro ou, solidificar uma pequena quantidade de ágar em torno da ponta de um eletrodo do pHmetro num béquer ou ainda, usar um eletrodo de superfície devidamente calibrado.
- h) Imediatamente após passar pela autoclave, deixar resfriar em banho-maria entre 45 e 50 °C ou manter em geladeira até o momento do uso. Quando resfriado, fundir o meio em banho-maria a 45 – 50 °C ou em micro-ondas.

- i) Despejar o meio AMH em placas de Petri de vidro ou plástico, até a altura aproximada de 4 mm, numa superfície horizontal.
- j) O meio AMH deve esfriar em temperatura ambiente e ser armazenado em geladeira (de 2 a 8 °C), preferencialmente em sacos plásticos descartáveis, exceto quando a placa for usada no mesmo dia. Não utilizar placas com AMH ressecadas. Devem ser retiradas 10-15 min antes do teste e colocadas na capela Fluxo Laminar.
- k) No momento do teste uma placa de AMH, sem inoculação de amostra, deverá ser incubada a 30-35 °C, durante 24 h ou mais, para confirmar a esterilidade do lote do meio a ser utilizado na análise.
- l) Se, antes do uso, o meio apresentar gotículas de água na superfície do meio ou na tampa da placa de Petri, as placas devem ser colocadas em uma incubadora (35 °C) ou capela de fluxo laminar a temperatura ambiente, com as tampas entreabertas ou próximas do bico de bunsen até que o excesso de umidade superficial evapore (10 - 30 min).

## 2) Preparo do inóculo bacteriano

2.1 Controle de Turbidez para a Preparação do Inóculo - Controle de turbidez de  $BaSO_4$  = solução padrão de McFarland 0,5.

- a) Acrescentar 0,5 mL de  $BaCl_2$  0,048 mol L<sup>-1</sup> (1,175 % m/v  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) em 99,5 mL de  $H_2SO_4$  0,18 mol L<sup>-1</sup> (1 % v/v), homogeneizar constantemente, mantendo a suspensão.
- b) Verificar a turbidez da solução através da leitura de absorbância em espectrofotômetro com fonte de luz de 1-cm. em comprimento de onda de 625 nm. A solução de McFarland a 0,5 deverá apresentar absorbância de 0,08 a 0,10.
- c) A suspensão de sulfato de bário deve ser transferida, em alíquotas de 4 a 6 mL, para tubos com tampas de rosca do mesmo tamanho usados para preparar o inóculo bacteriano.
- d) Selar hermeticamente e armazenar em local escuro, à temperatura ambiente.
- e) A solução deverá ser agitada vigorosamente num misturador mecânico tipo vórtex antes de cada uso, verificando se está

uniformemente turbido. Se apresentar partículas maiores, deverá ser substituído.

- f) A densidade deverá ser verificada a cada mês.

## 2.2 Preparação do Inóculo Bacteriano:

### 2.2.1 Método de Crescimento

- a) Selecionar de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico, da placa de ágar em que cresceu o microrganismo a ser testado.
- b) Suavemente, com alça bacteriológica, retirar do ágar as colônias selecionadas, transferindo-os para um tubo contendo 4-5 mL de meio líquido estéril escolhido.
- c) Incubar a cultura em caldo, a 35 °C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (2 - 6 h).
- d) Ajustar a turbidez da cultura em crescimento com solução salina estéril ou caldo, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5 - suspensão contendo aproximadamente de 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/mL de *E. coli* ATCC® 25922. Aferir a turbidez em espectrofotômetro ou a olho nu, com luz suficiente para comparar com o inóculo do tubo ao da solução padrão de McFarland a 0,5. Verificar contra luz com cartão de fundo branco com linhas contrastantes pretas ao fundo.

### 2.2.2 Método de Suspensão Direta das Colônias

- a) Selecionar e suavemente retirar três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico, da placa de ágar não seletivo de 18-24 h em que cresceu o microrganismo a ser testado.
- b) Suspendê-las em caldo ou solução salina estéril.
- c) Ajustar a concentração da suspensão para a turbidez coincidente da solução padrão de McFarland 0,5, conforme descrito no item 2.2.1 letra (d).

## 3) Teste de sensibilidade antimicrobiana por disco-difusão

### 3.1 Preparação dos discos com extratos

- a) Com a ajuda de furador de papel, obter discos de papel filtro de gramatura de  $250 \text{ g m}^{-2}$  ( $170 - 300 \text{ g m}^{-2}$ ), de aproximadamente 6 mm de diâmetro.
- b) Acondicionar os discos em placas de Petri pequena ou em frascos pequenos com tampa, estilo discos para antibiograma.
- c) Esterilizar os discos em autoclave,  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 atm, por 15-20 min.

Obs: Todos os procedimentos a seguir deverão ocorrer próximo de bico de Bunsen ou dentro da câmara de Fluxo Laminar:

- d) Para cada concentração a ser testada: colocar a quantidade de discos necessários para o teste em uma placa de Petri estéril, vazia. Embeber o disco com o extrato, pingando vagarosamente o extrato sobre o disco esterilizado, sem haver excesso de líquido. Os discos podem secar por 5 – 15 min.
- e) Escolher um antibiótico comercial controle positivo e um controle negativo para o teste. Os discos são obtidos comercialmente em concentrações pré-determinadas e com halos de inibição definidos pela NCLLS.
- f) Testar o solvente utilizado para obter o extrato. Utilizar o mesmo volume/concentração de solvente (aquoso, etanólico, hidroetanólico, metanólico, etc) presente nos discos com extrato. A preparação se dá da mesma forma que o do extrato a ser testado.

### 3.2 Inoculação das Placas de Teste

- a) Mergulhar um swab de algodão estéril na suspensão ajustada e girar várias vezes até 15 min após o ajuste da turbidez da suspensão de inóculo. Apertar firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido.
- b) Sobre a superfície da placa de ágar Müeller-Hinton esfregar o swab em forma de cruz e ainda com o swab, espalhar a suspensão bacteriana por toda a superfície do ágar. Gira-se a placa no sentido horário aproximadamente  $60^\circ$  cada vez e, repete-se o procedimento esfregando mais 3 vezes. Para finalizar, esfregar o swab nas bordas do meio, fazendo o círculo completo, por 2 vezes.
- c) A tampa pode ser deixada entreaberta de três a no máximo quinze minutos, para absorção total de qualquer excesso de

umidade antes da aplicação dos discos com a substância a ser testada.

### 3.3 Aplicação de Discos com a substância a ser testada nas Placas de AMH Inoculadas

- a) Colocar os discos predeterminados e preparados na superfície da placa de ágar semeada, utilizando-se pinça esterilizada e flambada antes e após a colocação dos discos. Pressionar levemente o disco, de encontro à placa, sem furar o meio de cultura, assegurando contato completo do disco com a superfície de ágar. Os discos devem ser distribuídos igualmente, a distância do centro para centro do disco não deve exceder 24 mm. Colocar aproximadamente 12 discos numa placa de 150 mm, ou cinco discos numa placa de 100 mm.

Obs: O disco não deve ser reaplicado após ter entrado em contato com a superfície de ágar, pois as drogas se difundem instantaneamente no ágar. Se necessário, colocar um novo disco em outra parte da placa.

- b) Inverter a placa e colocar em estufa, em temperatura de melhor crescimento para o grupo bacteriano a ser testado, mesófilas a 35 °C, até 15 min após a aplicação dos discos.

Obs: Com exceção de bactérias que necessitem, as placas não devem ser incubadas em atmosfera com CO<sub>2</sub>, pois os padrões de interpretação são de incubação em ar ambiente. O CO<sub>2</sub> altera significativamente o tamanho dos halos de inibição.

### 3.4 Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados

- a) O halo de inibição será considerado a área sem crescimento detectável a olho nu.
- b) De 16-24 h de incubação, os halos de inibição deverão ser uniformemente circulares e haverá um tapete confluyente de crescimento microbiano.
- c) Os diâmetros dos halos de inibição total devem ser medidos em milímetros, no centro e de uma borda a outra da circunferência, incluindo o disco, usando um paquímetro ou uma régua, que é encostado na parte de trás da placa de Petri invertida, iluminando-a com luz refletida. Se tiver sido acrescentado sangue à base de ágar, por exemplo com os

estreptococos, os halos deverão ser medidos a partir da superfície superior do ágar iluminada com luz refletida, com a tampa retirada e sem encostar no meio.

Obs 1: Se colônias individuais se formarem, o inóculo era muito leve e o teste deverá ser repetido.

Obs 2: Se oxacilina estiver sendo testada contra *Staphylococcus* spp., ou vancomicina contra *Enterococcus* spp., esperar 24 h de incubação para realizar a leitura. Emprega-se luz transmitida (colocando a placa na contraluz) nos halos de inibição de oxacilina e vancomicina para verificar se há crescimento discreto de colônias resistentes à metilicina ou à vancomicina, respectivamente. Qualquer crescimento discernível dentro do halo de inibição é indicativo de resistência à metilicina ou à vancomicina.

Obs 3: O crescimento de pequenas colônias, detectável apenas com lente de aumento, na margem do halo de inibição do crescimento deve ser ignorado. Entretanto, no caso de crescimento discreto de colônias dentro de um halo de inibição evidente, o teste deverá ser repetido com uma cultura ou subcultura pura de uma única colônia, isolada da placa de cultura primária. Se pequenas colônias continuarem a crescer no halo de inibição, o halo de inibição livre de colônias deve ser medido.

Obs 4: As cepas de *Proteus* spp. podem espalhar o “swarming” para as áreas do halo de inibição de certos agentes antimicrobianos. O tênue véu de crescimento, dentro do halo de inibição deve ser ignorado.

Obs 5: Em ágar com sangue, o halo de inibição do crescimento deve ser medido, desconsiderar a zona de hemólise.

Obs 6: Trimetoprim e as sulfonamidas, podem permitir um crescimento discreto no halo; portanto, não considere qualquer crescimento discreto (20 % ou menos da zona de crescimento). Medir a margem mais aparente para determinar o diâmetro do halo de inibição.

#### **4) Teste de sensibilidade antimicrobiana por diluição**

##### *4.1 Teste de Diluição em Ágar*

O AMH é o recomendado para o teste. O agente antimicrobiano é incorporado ao meio ágar, sendo que cada placa contém uma concentração diferente do agente, a ser escolhido pelo responsável do experimento.

Os inóculos podem ser aplicados rápida e simultaneamente às superfícies de ágar usado um aparelho de replicação de inóculo. A maioria dos aplicadores de inóculo disponíveis transferem de 32 a 36 inóculos para cada placa. Aplicadores com pontas de 3mm de diâmetro aplicam

aproximadamente 2  $\mu\text{L}$  (faixa de 1 a 3  $\mu\text{L}$ ) na superfície de ágar, aplicadores com pontas menores, de 1mm, aplicam dez vezes menos, aproximadamente de 0,1 a 0,2  $\mu\text{L}$ .

#### 4.1.1 Preparação da diluição da solução antimicrobiana em placas de ágar

- a) Acrescentar as diluições escolhidas de solução antimicrobiana a ágars derretidos a temperaturas de 45 °C a 50 °C, na proporção de uma parte de solução antimicrobiana a nove partes de ágar líquido.
- b) Misturar completamente o ágar com cada solução e colocar em placas de Petri até uma profundidade de 3-4 mm de ágar. Evitar a formação de bolhas e a solidificação do ágar sem a completa homogeneização.
- c) Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas devem ser usadas imediatamente, ou armazenadas em sacos de plástico a temperatura de 2 a 8 °C, durante até três dias.

Obs: Não se pode presumir que todos os agentes antimicrobianos manterão sua potência nessas condições de armazenamento.

- d) As placas armazenadas a temperaturas de 2 a 8 °C devem ser mantidas à temperatura ambiente no mínimo por 10 min, antes de serem utilizadas e verificar se a superfície do ágar está seca. Se necessário, manter as placas semiabertas, por até 30 min, para a secagem da superfície de ágar.
- e) Preparar placas com o diluente sem a substância antimicrobiana com o ágar base como controles positivo e negativo

#### 4.1.2 Diluição da Suspensão de Inóculo

O inóculo final necessário é de  $10^4$  UFC por ponto de 5 a 8 mm de diâmetro.

- a) Aplicador com pontas de 3 mm, aplicação de 2  $\mu\text{L}$ : a suspensão de McFarland 0,5 deve ser diluída 1:10 em caldo ou solução salina estéril para obter uma concentração de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. O inóculo final em ágar terá, então, aproximadamente  $10^4$  UFC por ponto.
- b) Aplicadores com pontas de 1mm, aplicação de 0,1 a 0,2  $\mu\text{L}$ : não realizar suspensão inicial.

Obs 1: É imprescindível diluir adequadamente a suspensão de inóculo em função do volume de inóculo aplicado, para obter a concentração final de  $10^4$  UFC por ponto.

Obs 2: As suspensões ajustadas devem ser usadas até 15 min após a preparação.

#### 4.1.3 Aplicação do Inóculo, Incubação em Placas de Ágar e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

- a) Marcar as placas de ágar para orientar os pontos de aplicação.
- b) Acrescentar uma alíquota do inóculo bem misturada à superfície de ágar, pelo aparelho de aplicação de inóculos ou alças ou pipetas padronizadas. Iniciar com a placa de controle do crescimento (sem agente antimicrobiano) e, a seguir, da menor concentração para a maior, inocular as placas contendo as diferentes concentrações de antimicrobiano. Por último, inocular uma segunda placa de controle do crescimento (sem agente antimicrobiano), para verificar se houve contaminação ou transferência significativa de antimicrobiano durante a inoculação.
- c) Inocular por streakplate, uma amostra de cada inóculo numa placa de AMH, sem agente antimicrobiano, incubando-a por 18 – 24 h para detectar culturas mistas e fornecer colônias recém isoladas, caso seja necessário realizar novamente o teste.
- d) Manter as placas inoculadas em temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inóculo tenha sido absorvida pelo ágar (secagem dos pontos de inoculação), nunca mais de 30 min. A seguir, as placas são invertidas e incubadas, a temperatura adequada de crescimento do inóculo (mesófilos a 35 °C), por um período de 16 a 24 h.

Obs: Não se deve incubar as placas numa atmosfera com maior concentração de  $\text{CO}_2$ , pois há variação de pH da superfície do meio. As bactérias fastidiosas devem ser incubadas em atmosfera de  $\text{CO}_2$ , de acordo com cada grupo bacteriano.

- e) Colocar as placas numa superfície escura, não refletiva, para determinar os pontos finais de crescimento microbiano.
- f) Registrar a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento microbiano,

descartando qualquer colônia única ou turvação leve causada pelo inóculo - CIM.

Obs 1: Trimetoprim e as sulfonamidas, os antagonistas no meio podem permitir um pequeno crescimento e, portanto, o ponto final deve ser lido na concentração em que houver uma redução de 80 %, ou mais, no crescimento, em comparação com o controle.

Obs 2: Se duas ou mais colônias persistirem em concentrações do agente além do ponto final óbvio, ou se não houver crescimento em concentrações mais baixas, e sim em concentrações mais altas, será necessário verificar a pureza da cultura e, possivelmente, repetir o teste.

#### 4.2. Testes de Diluição em Caldo (*Macrodiluição e Microdiluição*)

O caldo de Mueller-Hinton é o meio de primeira escolha para organismos facultativos ou organismos aeróbios de crescimento rápido. Pode-se utilizar também meio BHI para o teste. O caldo pode ser suplementado com sangue lisado de cavalo (SLC) de 2 a 5 % (v/v).

##### 4.2.1 Preparo de SLC

- a) Congelar e descongelar o sangue desfibrinado de cavalo até que o sangue esteja totalmente lisado (de cinco a sete vezes, aproximadamente).
- b) Misturar, assepticamente, volumes iguais de sangue lisado e água destilada esterilizada (50 % SLC).

Obs: A solução de caldo e SLC deve estar transparente, o que pode ser conseguido centrifugando o SLC a 50 % a 12.000×g, durante 20 min. Decantar o sobrenadante e centrifugar novamente, se necessário.

- c) Acrescentar quantidade de SLC a 50 % ao meio caldo para obtenção de concentração final de SLC de 2 a 5 %.
- d) Medir o pH após acrescentar assepticamente o SLC ao meio autoclavado e resfriado. Quando acrescentado após a preparação das placas, o sangue deve ser acrescentado junto com o inóculo, de maneira a evitar diluição adicional do agente antimicrobiano na placa e assegurar uma concentração final de SLC no poço de 2 a 5 %.

##### 4.2.2 Preparação e Armazenagem de Agentes Antimicrobianos Diluídos

###### 4.2.2.1 Método de Macrodiluição (*Tube*) em Caldo

- a) Usar tubos de ensaio esterilizados, de 13 × 100 mm.

- b) Usar um tubo de controle contendo caldo sem agente antimicrobiano para cada organismo testado.
- c) Fechar os tubos de ensaio com tampas de rosca ligeiramente soltas, tampas de plástico ou metal, ou tampões de algodão.
- d) Preparar volumetricamente as diluições 2 vezes (ou outras) finais de antibióticos em caldo, 10 mL.

Obs: Haverá uma diluição de 1:2 das drogas quando for acrescentado um volume equivalente de inóculo, assim as diluições de antimicrobiano deverão ser preparadas, em concentrações 2 vezes a concentração final desejada.

- e) O volume mínimo final necessário para o teste é de 1 mL de cada diluição.
- f) Colocar 2 mL de solução antimicrobiana preparada em caldo no primeiro tubo e 1 mL de caldo nos tubos seguintes, em quantidade necessária para as diluições escolhidas.
- g) Retirar do primeiro tubo 1 mL de solução antimicrobiana e adicionar no segundo tubo, e assim sucessivamente até o último tubo de diluição escolhido. Desprezar o último 1 mL em recipiente a ser autoclavado.
- h) Preparar um tubo de controle negativo e um tubo de controle positivo

Obs: A preparação pode permanecer na geladeira por no máximo 3 dias. Não há garantia de perda de eficiência de atividade antimicrobiana em preparos prévios.

#### 4.2.2.2 Método de Microdiluição em Caldo

Utilizar placas de plástico de 96 poços estéreis. Cada poço deverá conter 0,1 mL de solução final.

- a) Preparar as placas de microdiluição dos agentes antimicrobianos conforme descrito em 4.2.2, letra d.
- b) Cada placa deverá incluir um poço de controle de crescimento microbiano e um poço negativo (não inoculado).
- c) Colocar 0,1 mL da solução antimicrobiana no primeiro poço da placa. Retirar 0,05 mL deste poço e adicionar no segundo poço e assim sucessivamente até a última diluição desejada.
- d) Desprezar 0,05 mL da solução antimicrobiana do último poço em recipiente autoclavável.

Obs: A preparação pode permanecer na geladeira por no máximo 3 dias. Não há garantia de perda de eficiência de atividade antimicrobiana em preparos prévios.

#### 4.2.3 Testes de Diluição em Caldo

Diluir o inóculo preparado, para que após a inoculação, cada tubo de ensaio ou poço contenha aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Obs 1: A diluição para obtenção desse inóculo final varia conforme o método de aplicação do inóculo em cada poço ou tubo de ensaio e do organismo a ser testado. É indispensável saber o volume exato de inóculo aplicado nos poços para fazer o cálculo.

Exemplo: Se o volume do meio no poço for 0,1 mL e o volume de inóculo, 0,005 mL, a suspensão McFarland 0,5 ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) deverá ser diluída 1:10 para conseguir uma diluição de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Quando 0,005mL dessa suspensão for inoculado no caldo, a concentração final de bactérias do teste será aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> (ou  $5 \times 10^4$  UFC por poço, no método de microdiluição).

Obs 2: Realizar periodicamente contagem de colônias nas suspensões de inóculo para verificar se a concentração final de inóculo está próxima de  $5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>: Colocar 0,01 mL do poço ou tubo de ensaio de controle de crescimento, imediatamente após a inoculação, e diluir em de solução salina a 0,9 % (diluição 1:1000). Após misturar, estriar uma alíquota de 0,1 mL sobre a superfície de um meio ágar apropriado. Após incubação, a presença de aproximadamente 50 colônias indicará uma densidade de inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4 Inoculação do Caldo em Tubos de Ensaio ou Placas de Microdiluição

##### 4.2.4.1 Método de Macrodiluição (Tubo de Ensaio) em Caldo e Incubação

- a) Acrescentar 1mL de inóculo ajustado a cada tubo contendo 1mL de agente antimicrobiano na série de diluições (e a um tubo de controle positivo contendo apenas caldo) até 15 min após a normatização do inóculo. Homogeneizar. Terá uma diluição 1:2 de cada concentração de antimicrobiano e uma diluição 1:2 do inóculo.

- b) Verificar a pureza da suspensão de inóculo estriando no meio de cultura de uma alíquota numa placa de AMH para incubação simultânea.
- c) Como controle negativo, deixar apenas o meio de cultura acrescido de aditivos para diluição do agente antimicrobiano.
- d) Os tubos de macrodiluição ou as placas de microdiluição, inoculados devem ser incubados em estufa bacteriológica a 35 °C durante 16-24 h

#### 4.2.4.2 Método de Microdiluição em Caldo e Incubação

- a) Até 15 min após o ajuste da concentração do inóculo, pipetar 0,05 mL em cada poço. Terá diluição 1:2 de diluição do conteúdo de cada poço (contendo 0,05 mL), como no teste de macrodiluição.
- b) Verificar a pureza da suspensão de inóculo estriando no meio de cultura de uma alíquota numa placa de AMH para incubação simultânea.
- c) Como controle negativo, deixar apenas o meio de cultura acrescido de aditivos para diluição do agente antimicrobiano.
- d) Os tubos de macrodiluição ou as placas de microdiluição, inoculados devem ser incubados em estufa bacteriológica a 35 °C durante 16-24 h.

#### 4.2.4.3 Determinação dos Pontos Finais da CIM

- A CIM é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo nos tubos ou poços de microdiluição, detectado a olho nu.

- Pode-se usar a espectrofotometria para realizar a leitura dos testes de microdiluição e registrar os resultados.

- a) Comparar o crescimento microbiano dos poços ou tubos contendo o agente antimicrobiano com o crescimento nos poços ou tubos de controle de crescimento (sem antibiótico).  
Obs.: Para o teste ser considerado válido, é necessário que haja crescimento ( $\geq 2$ mm turbidez definitiva) no poço de controle positivo.
- b) Depois da análise visual, coletar uma alçada de cada tubo e semear em AMH e incubar 35 °C por 24 h.

- c) Nos tubos ou nos poços, adicionar 25 µL de resazurina sódica 0,01 % nos tubos e 10 µL da solução em cada poço. Aguardar uma hora para a leitura dos resultados.

A coloração azul demonstra a inatividade bacteriana e a vermelha, a atividade bacteriana.

Pode-se fazer a leitura em espectrofotômetro.

Obs 1: Não se deve relatar os resultados dos testes de drogas das quais mais de um poço foi pulado. Em geral, as CIMs de microdiluição para os bacilos gram-negativos são iguais ou uma diluição 2× mais baixos do que as CIMs de testes de macrodiluição comparáveis.

Obs 2: Organismos Fastidiosos devem ser tratados de forma diferenciada, utilizando meios de cultura e metodologia apropriados para tal.

Obs 3: Realizar os testes em duplicata.

## Referências

Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada M2-A8 Vol. 23 No 1 Substitui a Norma M2-A7 Vol. 20 No. 1 – Oitava Edição.

Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada M7-A6 Vol.23 No. 2 Substitui a Norma M7-A5 Vol. 20 No. 2 Metodologia dos Testes de Sensibilidade a - Sexta Edição.

OSTROSKY, E.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p.301-307, 2008.

ARAUJO, M. M., LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, e0702014, 2016.

## **Análise de *Staphylococcus aureus*, coliformes e *Salmonella* spp**

### **1) Preparo da amostra e diluições**

Pesar 25 g de amostra e homogeneizar com 225 mL de água peptonada (diluição  $10^{-1}$ ). Esta diluição corresponde a uma proporcionalidade de 1:10, ou seja, 10 g do homogeneizado contém 1 g de amostra. Realizar mais duas diluições ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ).

1.1) *Preparação das diluições a partir da amostra (diluição  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ):*

- a) Transferir 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para o tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% identificado. Esta será a diluição  $10^{-2}$  da amostra. Homogeneizar a suspensão.
- b) Transferir 1 mL da diluição  $10^{-2}$  para o tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% identificado. Esta será a diluição  $10^{-3}$  da amostra. Homogeneizar a suspensão.

Obs: O número de diluições dependerá do alimento e da situação em que se encontra.

## Contagem de *Staphylococcus aureus* em alimentos

### 1) Inoculação da amostra e contagem das colônias presuntivas em Ágar Baird-Paker

- a) Transferir 0,1 mL de cada diluição do alimento para as placas de Petri com o meio “Ágar Baird-Paker (BP)” suplementado, espalhando com a alça de Drigalsky;
- b) Após a completa secagem da superfície do ágar, inverter as placas e incubá-las a 35 – 37 °C durante 45 - 48 h.
- c) Decorrido o tempo de incubação, selecionar para a contagem as placas com 20 a 200 colônias típicas e/ou atípicas. Contar as colônias típicas e multiplicar pela diluição correspondente.
- d) O resultado final multiplica-se por 10, pois foram utilizados 0,1 mL do inóculo na semeadura da placa de Petri para contagem presuntiva.

#### Observações importantes

- Colônias típicas de *S. aureus* são circulares, pretas ou cinza escuras, lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por um halo claro transparente em redor. Um anel opaco pode se formar na parte mais interna deste halo, na região imediatamente em contato com a colônia.
- Colônias atípicas podem ser de dois tipos: cinzentas sem o halo claro ou pretas brilhantes, com o sem massa de células esbranquiçadas nas bordas, com halo transparente pouco visível ou ausente e anel opaco também pouco visível ou ausente.
- Colônias que não se enquadram nas características típicas ou atípicas são consideradas como flora acompanhante.

### 2) Cálculo

Calcular o número de UFC g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e porcentagem de colônias confirmadas.

### 3) Inoculação da amostra e isolamento de colônias presuntivas em Ágar sangue

O ágar sangue é um meio não seletivo, indicador de hemólise que pode ser utilizado para triagem ou isolamento de colônias suspeitas de *S. aureus*.

### 3.1 Preparação do meio

- a) Preparar meio base, seletivo para bactérias (AMH, Ágata Nutriente), conforme determinação do fabricante.
- b) Homogeneizar o sangue de carneiro e adicionar 5% de sangue ao meio a temperatura de 45 – 50 °C.
- c) Esperar solidificar com a tampa entreaberta por no máximo 30 min.
- d) Armazenar em sacos plásticos, sob refrigeração, caso não utilize logo após o preparo.

### 3.2 Isolamento de colônias

- a) Identificar colônias com suspeita de *S. aureus* e estriar com alça bacteriológica, por estriamento.
- b) Incubar por 18-24h a 35° C.
- c) Colônias branco ou amareladas, brilhosas, com formação de hemólise são indicativos de estafilococos.
- d) Realizar teste de catalase.
- e) Caso positivo, realizar teste de coagulase e/ou Dnase.

## 4. Testes confirmatórios

### 4.1 Teste de Catalase

- a) Em uma lâmina adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio a 10-20 v/v.
- b) Passar alça bacteriológica na colônia suspeita de Estafilococo, sem encostar no meio e colocar sobre a gota de peróxido de hidrogênio.

Interpretação de resultado: Grupo Estafilococo - formação de bolhas

### 4.2) Teste de coagulase

- a) Selecionar 5 colônias típicas (no mínimo).
- b) Inocular cada colônia em caldo BHI e incubar a 35 – 37 °C por 18 - 24 h.
- c) Transferir 0,2 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA. Misturar cuidadosamente.

- d) Incubar a 35 – 37 °C e observar durante 6 h se há a formação de coágulo.

Pode-se realizar teste direto com a colônia bacteriana e reagente de coagulase:

- a) Colocar uma gota do reagente em lâmina.  
b) Selecionar colônias típicas, retirá-las do meio de cultura com a ajuda de uma alça bacteriológica e misturar com o reagente de coagulase por 30 a 60 segundos.

### **Interpretação de resultados** -Verificar a formação de coágulo

- **Reação negativa:** não formação do coágulo - Estafilococos não aureus
- **Reação positiva:** Formação de coágulo - *S. aureus*

Para a reação positiva, que requerem testes confirmatórios adicionais:

- **Reação positiva de nível 2+:** formação de um pequeno coágulo organizado.
- **Reação positiva de nível 1+:** formação de pequenos coágulos desorganizados.

## **5) Teste Confirmatório *S. aureus***

### *5.1 Teste de DNase*

Este não é um meio de cultura para isolamento primário, é um meio de cultura para a diferenciação e/ou auxílio na identificação de microrganismos.

É necessário o uso de sementeira a partir de culturas puras e que não tenham mais do que 36 h de incubação.

Não é recomendado a sementeira direta da amostra neste meio de cultura, devido à falta de nutrientes para este fim.

- a) Inocular na superfície do meio ágar DNase uma alçada (10 µL), proveniente de uma colônia isolada, preferencialmente oriunda de uma sementeira primária em meio ágar sangue. Pode ser num pequeno espaço da placa.

- b) Incubar as placas entre 18 e 24 h em condições aeróbias entre 35 e 37 °C.
- c) Após a incubação, realizar interpretação do crescimento.
- d) Se possível, utilizar uma cepa DNase positiva como controle positivo (*Staphylococcus aureus*) e uma cepa DNase negativa como controle negativo.

### Interpretação dos resultados

- DNase positiva: mudança de cor do azul para púrpura rosado ao redor do crescimento.
- DNase negativa: Ausência de alteração de cor ao redor da colônia bacteriana.

### Referências

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001. Publicada em DOU n° 7, de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 60 p.

PICOLI, S. U.; BESSA, M. C.; CASTAGNA, S. M. F.; GOTTARDI, C.P.T.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 64-69, 2006.

# Contagem de coliformes totais e bactérias termotolerantes em alimentos - técnica do número mais provável

## 1) Procedimento Inicial

### 1.1) Teste Presuntivo

- a) Transferir 1 mL de cada diluição para 3 tubos contendo 10 mL de caldo Lauril Sulfato de Sódio.
- b) Incubar os tubos a  $35 \pm 0,5$  °C por  $24 \pm 2$  h e observar se há crescimento com produção de gás.

### 1.2) Interpretação dos resultados iniciais

- **Em caso positivo**, crescimento e produção de gás, passar aos itens subsequentes.
- **Em caso negativo**, sem crescimento e/ou produção de gás, reincubar até completar  $48 \pm 2$  h e repetir a leitura, passando para os itens subsequentes em caso de crescimento com produção de gás.

## 2) Contagem de coliformes totais

- a) A partir dos tubos de Lauril sulfato de sódio com produção de gás, transferir uma alçada bem carregada de cada cultura para tubos de caldo Verde Brilhante.
- b) Incubar a  $35 \pm 0,5$  °C por  $24 \pm 2$  h e observar se há crescimento com produção de gás.
- c) Em caso negativo, sem crescimento e/ou produção de gás, incubar mais  $24 \pm 2$  h e repetir a leitura.
- d) Anotar o número de tubos de VB com crescimento e produção de gás, confirmativos da presença de coliformes fecais.

## 3) Contagem de coliformes termotolerantes

- a) A partir dos tubos de Lauril Sulfato de sódio com produção de gás, transferir uma alçada bem carregada de cada cultura para tubos de caldo EC.

- b) Incubar por 24 h em banho-maria a  $45 \pm 0,2$  °C (maioria dos alimentos) ou  $44 \pm 0,2$  °C (água, crustáceos e moluscos) e observar se há crescimento com produção de gás.
- c) Anotar o número de tubos de EC com produção de gás, confirmativo da presença de coliformes termotolerantes. Determinar o NMP  $\text{g}^{-1}$  ou  $\text{mL}^{-1}$  conforme tabelas de NMP.

## Referências

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC N° 331, Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada, 23 DE DEZEMBRO DE 2019. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO .

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 40. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 12 de dezembro de 2005.

PICOLI, S. U.; BESSA, M. C.; CASTAGNA, S. M. F.; GOTTARDI, C.P.T.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 64-69, 2006.

## Contagem de *Salmonella* em alimentos

### 1) Preparação do caldo Tetrionato (TT) e do Caldo Reppaport-Vassiliadis Soja (RVS)

Preparar o caldo Tetrionato (TT) conforme instruções do rótulo. Não autoclavar. Estocar sob refrigeração. Preparar o caldo Reppaport-Vassiliadis Soja (RVS) conforme instruções do rótulo.

### 2) Enriquecimento em caldo seletivo

Transferir 1 mL da amostra ( $10^{-1}$ ) para um tubo contendo 10 mL de Caldo Tetrionato (acrescentar ao tetrionato 0,2 mL de iodo e 0,1 mL de verde brilhante no momento do uso) e incubar os tubos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  em banho-maria por  $24 \pm 3$  h. Transferir e 0,1 mL para um tubo contendo 10 mL de Caldo selenitecystine e incubar os tubos a  $41,5 \pm 1$  °C em banho-maria por  $24 \pm 3$  h.

### 3) Isolamento – Semeadura em ágar seletivo - Ágar Xilose Lisina Desoxicolato e/ou Salmonella Shigella

Para cada caldo seletivo de enriquecimento, semear uma alçada de cada cultura em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e / ou Salmonella Shigella (SS) com a técnica streak-plate, para obtenção de colônias isoladas. Incubar as placas invertidas a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 3$  h.

As colônias características de *Salmonella* devem ser confirmadas através de provas bioquímicas de identificação de Gram negativos fermentativos.

### 4) Provas confirmatórias e de Identificação de Salmonellaspp

Ágar ferro triplo açúcar – Ágar TSI, Ágar dois açúcares ferro, Ágar Lisina Ferro – LIA, Meio de Costa e Vernin – CV, Meio IAL, Ágar Motilidade-Indol-Lisina – MILi, Ágar Motilidade-Indol-Ornitina – MIO, Meio EPM.

Obs: Outras provas bioquímicas poderão ser utilizadas para a identificação e confirmação da presença de *Salmonella*. Provas bioquímicas comerciais podem ser utilizadas e devem seguir as indicações do fabricante.

### 5) Provas Sorológicas

A sorotipificação é um importante dado complementar na identificação de *Salmonella* spp. Epidemiologicamente, permite determinar a

prevalência/emergência ou apontar tendências de um sorovar em distintas zonas geográficas, bem como identificar surtos, conhecer as fontes de infecção e vias de transmissão. O teste envolve a identificação dos antígenos somáticos e flagelares da *Salmonella*.

#### Principais cuidados para a execução do teste

- Nunca utilizar crescimento a partir de meios de cultura que contenham carboidratos, ex. ágar nutriente.
- Preparar suspensão utilizando solução salina (0.85% NaCl).
- A suspensão deverá apresentar turbidez semelhante ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. Usualmente, o volume de solução salina adicionada é de aproximadamente 1,5 mL.
- Realizar o teste somente a partir de cultivos recentes (máximo de 18 a 24 h de crescimento a 37 °C).
- Em amostras com antígeno de envoltório, efetuar a retirada, por meio do aquecimento da suspensão em (100 °C por 15 min).
- Observar se a suspensão se apresenta homogênea antes de realizar o teste, certificando-se de que esteja em sua forma lisa.
- Cepas que apresentarem grumos que se depositam após um período em repouso são consideradas auto aglutinadas e devem ser submetidas a um isolamento para tentativa de isolamento de cepas lisas. Estas deverão ser avaliadas e, caso persista o perfil de autoaglutinação, encaminhadas ao laboratório de referência.

#### 5.1 Execução do teste de soroaglutinação rápida

- a) Semear a cepa isolada em Ágar nutriente inclinado e incubar 37 °C por 18h-24 h.
- b) Preparar a suspensão bacteriana adicionando à solução salina (0,85 % NaCl) colônias suficientes para atingir a concentração 0,5 da escala de Mac Farland.
- c) Homogeneizar a suspensão.

- d) Observar a homogeneidade da suspensão e, no caso de dúvidas, observar ausência de aglutinação em lâmina e dar prosseguimento para a confirmação do gênero *Salmonella*.
- e) Em uma lâmina de vidro, adicionar uma gota (10 µL) de antissoro polivalente OH ou antissoro polivalente somático e uma gota da suspensão bacteriana, homogeneizando com o auxílio de uma alça bacteriológica ou com um palito de madeira.
- f) Impelir movimentos rotatórios e observar, até o período de um minuto, em caixa de Huddleson, a presença de aglutinação (grumos).
- g) Repetir o procedimento, empregando antissoros polivalentes flagelares.
- h) No diagnóstico de *S. Typhi*, empregar inicialmente o antissoro Vi para caracterização do antígeno de envoltório. Caso a reação seja positiva, aquecer a suspensão em (100 °C por 15 min) reavaliar com antissoro Vi e, caso não seja observada aglutinação, confirmar a estrutura somática por meio do antissoro "OD". Para identificação conclusiva de *S. Typhi*, efetivar a caracterização do antígeno flagelar Hd.

Obs: Se necessário, as cepas de *Salmonella* spp. podem ser encaminhadas para o Laboratório de Referência.

## Contagem total de bolores e leveduras e bactérias mesófilas em alimentos

A quantificação de bolores e leveduras em alimentos é feita pelo método de contagem padrão em placas, determinando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC). A técnica de plaqueamento em superfície é o método mais recomendado para essa análise, para aumentar a exposição ao oxigênio e evitar o “stress” causado pelo meio de cultura quente.

### 1) Preparo de soluções

- **Preparo tampão de fosfato pH 7,2:** Adicionar 250 mL de fosfato de potássio monobásico  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e 175 mL de hidróxido de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  em um balão volumétrico de 1 L. Completar com água e aferir o menisco. Ajustar o pH se necessário.

- **Preparo da água peptonada tamponada (BPW):** Preparar a água peptonada conforme instruções do rótulo; Dissolver os ingredientes em água destilada e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade requerida; Esterilizar a  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min.

- Preparo do meio Ágar Batata e Ágar para Contagem seguirão as recomendações do fabricante.

### 2) Preparação da amostra (diluição $10^{-1}$ )

Pesar 10 g da amostra com uma espátula estéril em uma bolsa de homogeneização estéril; Adicionar 100 mL de água peptonada e homogeneizar no Stomacher; Identificar o erlenmeyer como diluição  $10^{-1}$  (Esta diluição corresponde a uma proporcionalidade de 1:10, ou seja, 10 g do homogeneizado contém 1 g de amostra).

2.1) *Preparação das diluições a partir amostra (diluição  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ):*

- a) Transferir 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para o tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1 % identificado. Esta será a diluição  $10^{-2}$  da amostra. Homogeneizar a suspensão.
- b) Transferir 1 mL da diluição  $10^{-2}$  para o tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1 % identificado. Esta será a diluição  $10^{-3}$  da amostra. Homogeneizar a suspensão.

- c) Transferir 1 mL da diluição  $10^{-3}$  para o tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1 % identificado. Esta será a diluição  $10^{-4}$  da amostra. Homogeneizar a suspensão.

### 3) Contagem total de bolores e leveduras

#### 3.1 Inoculação de Amostras

- a) Inocular, em superfície, 0,1 mL de cada diluição nas placas de Petri contendo o meio BDA já solidificado.
- b) Incubar as placas por 5 dias em temperatura de 22-25 °C, sem inverter e em pilhas de não mais do que 3 placas, no escuro.
- c) Recomenda-se não contar as colônias antes de 5 dias pois a movimentação das placas pode resultar em crescimento secundário (devido ao deslocamento de esporos), invalidando a contagem final.

#### 3.2 Contagem de colônias e cálculo dos resultados

As leveduras crescerão na coloração creme a branco. Os bolores irão crescer em colônias filamentosas de cores variadas.

- a) Selecionar as placas com 15 a 150 colônias e contá-las com o auxílio de uma lupa, em um contador de colônias. Na placa selecionada, contar separadamente as colônias com aspecto filamentoso, cotonoso ou pulverulento, características de bolores, anotando os resultados.
- b) Na mesma placa, contar as demais colônias que podem ser de leveduras ou bactérias, eventualmente capazes de crescer.
- c) Selecionar essas colônias e verificar a morfologia das células ao microscópio.
- d) Colocar uma pequena porção das colônias a serem cheçadas, separadamente, em solução salina ou através de coloração de GRAM, observando se as células da colônia selecionadas são de leveduras ou de bactérias.
- e) Considerar as colônias de leveduras na contagem de colônias.
- f) Determinar o número de colônias de leveduras em função da porcentagem confirmada. Por exemplo, de 30 colônias contadas, 5 foram submetidas à confirmação e 3 foram confirmadas (60%). Assim, o número de colônias de leveduras na placa é  $30 \times 0,60 = 18$ .

Exemplo: Diluição  $10^{-2}$  (inoculados 0,1 mL); Total de colônias típicas de bolores na placa = 30; Colônias presuntivas de leveduras na placa = 40, 5 submetidas à confirmação, 4 confirmadas (80%)

$$\text{Total de leveduras na placa} = 40 \times 0,8 = 32$$

$$\text{UFC g}^{-1} \text{ ou mL}^{-1} \text{ de bolores} = 30 \times 10 \times 10^2 = 3 \times 10^4$$

$$\text{UFC g}^{-1} \text{ ou mL}^{-1} \text{ de leveduras} = 32 \times 10^2 \times 10 = 3,2 \times 10^4$$

$$\text{UFC g}^{-1} \text{ ou mL}^{-1} \text{ de bolores e leveduras} = (30+32) \times 10^2 \times 10 = 6,2 \times 10^4$$

#### 4) Contagem de mesófilos

- a) Semear 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis;
- b) Adicionar o Ágar para Contagem (PCA) fundido e mantido em banho-maria a 46 – 50 °C, até 4-6 mm de profundidade da placa. Homogeneizar o ágar com o inóculo com movimentos suaves em forma de oito (cerca dez vezes). Deixar solidificar em superfície plana. Incubar as placas invertidas em estufa bacteriológica a  $35,5 \pm 0,5$  °C por 24 - 48 h.
- c) Após a incubação das placas e aparecimento das colônias as mesmas serão contadas e será feita a média que será multiplicada pelo fator de diluição para obter-se o número de microrganismos no material original diluído. Considerar para contagem somente as placas da mesma diluição que apresentarem de 30 a 300 colônias. Expressar os resultados em UFC  $\text{g}^{-1}$  ou  $\text{mL}^{-1}$ .

CAPÍTULO 6

# Análise da Atividade Enzimática em Alimentos Vegetais



## CAPÍTULO 6

# Análise da Atividade Enzimática em Alimentos Vegetais

**Gabriel Bachega Rosa**

**Leandra Oliveira Xavier**

**Jhonatan da Silva**

**Jocleita Peruzzo Ferrareze**

## Procedimentos gerais para análises enzimáticas

Para garantir a confiabilidade dos dados de atividade enzimática, todas as etapas descritas devem ser rigorosamente seguidas. Todo o material deve ser solubilizado com sua respectiva solução tampão. A extração deve ser realizada a uma temperatura de 4 °C, ou menos. Após obter o extrato, utilizá-lo imediatamente para as análises de atividade enzimática, e deixar por no máximo duas horas sob refrigeração. Não deixar o extrato sob exposição intensa e direta de luz. Nas análises, a proporção de extrato pode variar; caso a absorbância da reação seja maior que 3, utilizar uma proporção menor de extrato em relação a solução tampão. Anote esses volumes para o cálculo de atividade enzimática.

### Extração das enzimas de material vegetal

OBS.: Toda a extração deve ser realizada a uma temperatura de 4 °C.

- a) Pesar 1 g de material vegetal. Anotar a massa.
- b) Completar com 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 7,5)
- c) Triturar em Turrax por 1 min;
- d) Centrifugar a 10.000 rpm por 5 min (4 °C);
- e) Guardar o sobrenadante do extrato em geladeira;
- f) Utilizar o extrato para atividade enzimática apenas no momento da extração.

## Cálculos de atividade enzimática em material vegetal (APX, PPO, CAT e POD)

Utilizar a tabela, a seguir, para anotar os dados de absorvância das amostras, no período de 1 até 5 min.

**Tabela 1:** Dados de absorvância a serem coletados para verificar a atividade enzimática de vegetais.

Tempo (min)	Absorvância		
	Repetição a	Repetição b	Repetição c
1			
2			
3			
4			
5			

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

Realizar uma equação da reta linear tendo o tempo no eixo “x” e a absorvância no eixo “y”. O coeficiente de determinação da reta ( $R^2$ ) deverá ser maior que 0.8.

Em seguida, realizar os cálculos de atividade enzimática para cada repetição, e usar o teor de proteínas solúveis, previamente analisadas pelo método de Bradford.

Para as enzimas que a absorvância aumenta conforme o tempo, utilizar a diferença entre a absorvância do maior com o menor tempo.

$$\Delta\text{Abs} = \frac{\text{Abs}_{5 \text{ min.}} - \text{Abs}_{1 \text{ min.}}}{2}$$

Caso a enzima diminua o valor conforme o tempo, utilizar a diferença entre a absorvância do menor com o maior tempo.

$$\Delta\text{Abs} = \frac{\text{Abs}_{1 \text{ min.}} - \text{Abs}_{5 \text{ min.}}}{2}$$

Em seguida, utilizar a seguinte equação, que relaciona o volume da reação e o coeficiente de extinção de cada reação.

$$x \text{ (mM/min)} = \frac{\Delta\text{Abs (1/min)} \times \text{Volume total da reação } (\mu\text{L})}{\text{Coeficiente de extinção (1/mM)} \times \text{Volume do extrato pipetado } (\mu\text{L})}$$

Por fim, relacionar com o teor de proteína no extrato.

$$\text{Atividade enzimática (mmol mL min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}\text{proteína)} = \frac{x \text{ (mM/min)}}{\text{Teor de proteínas}(\mu\text{g/mL})}$$

Os resultados da atividade enzimática serão expressos em: mmol min<sup>-1</sup> μg<sup>-1</sup> proteína.

## Atividade da enzima peroxidase - POD

### 1) Reagentes e Soluções

- **Solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5**: Dissolver 2,75 g de fosfato de sódio dibásico dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) e 4,5 g de cloreto de sódio (NaCl) em 500 mL de água. Ajustar o pH em 6,5.

- **Guaiacol 16 mmol L<sup>-1</sup>**: Pesar 1,9862 g de guaiacol e completar com solução tampão fosfato pH 6,5 para 1 L.

- **Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 %**: Pipetar 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e completar para 100 mL em um balão volumétrico.

### 2) Procedimento Experimental

- a) Pipetar 1830 µL de guaiacol 16 mmol L<sup>-1</sup>;
- b) Adicionar 136 µL de extrato enzimático do material vegetal;
- c) Adicionar 40 µL de peróxido de hidrogênio 1 %;
- d) Realizar a leitura em 460 nm de 1 em 1 min, até contabilizar 5 min.

### 3) Cálculos

Realizar os cálculos de atividade enzimática em material vegetal, conforme descrito nos procedimentos gerais para análise de atividade enzimática. Além disso, utilizar o coeficiente de extinção de 25,2 mmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para a enzima peroxidase. A enzima peroxidase é expressa em mmol min<sup>-1</sup> µg<sup>-1</sup> proteína.

## Referência

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

## Atividade da enzima catalase - CAT

### 1) Reagentes e Soluções

- **Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 1 %**: Pipetar 1 mL de  $H_2O_2$  e completar para 100 mL em um balão volumétrico.

- **Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) 1 mol  $L^{-1}$** : Pesar 17,42 g de  $K_2HPO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- **Fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ ) 1 mol  $L^{-1}$** : Pesar 13,608 g de  $KH_2PO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- **Solução tampão fosfato de potássio 0,1 mol  $L^{-1}$  (pH 7)**: Pipetar 61,5 mL de uma solução 1 mol  $L^{-1}$  de  $K_2HPO_4$  + 38,5 mL de uma solução 1 mol  $L^{-1}$   $KH_2PO_4$ . Ajustar ao volume de 1 L.

### 2) Procedimento Experimental

- Pipetar 1800  $\mu L$  de solução tampão fosfato de potássio 0,1 mol  $L^{-1}$  (pH 7);
- Adicionar 134  $\mu L$  de extrato enzimático do material vegetal;
- Iniciar a reação com 66  $\mu L$  de peróxido de hidrogênio 1%;
- Realizar a leitura em 240 nm de 1 em 1 min, até contabilizar 5 min.

### 3) Cálculos

Realizar os cálculos de atividade enzimática em material vegetal, conforme descrito nos procedimentos gerais para análise de atividade enzimática. Além disso, utilizar o coeficiente de extinção de 39,4  $mmol L^{-1} cm^{-1}$  para a enzima catalase. A enzima catalase é expressa em  $mmol min^{-1} \mu g^{-1}$  proteína.

## Referência

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

## Atividade da enzima polifenoloxidase - PPO

### 1) Reagentes e Soluções

- Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ )  $1 \text{ mol L}^{-1}$ : Pesar 17,42 g de  $K_2HPO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- Fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ )  $1 \text{ mol L}^{-1}$ : Pesar 13,608 g de  $KH_2PO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- Solução tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7): Pipetar 61,5 mL de uma solução  $1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $K_2HPO_4$  + 38,5 mL de uma solução  $1 \text{ M}$   $KH_2PO_4$ . Ajustar ao volume de 1 L.

- Catecol  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  em solução tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7): Pesar 33,03 g de catecol e solubilizar em um balão volumétrico de 1 L com a solução tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7).

### 2) Procedimento Experimental

- a) Pipetar  $1934 \mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7) com  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de catecol;
- b) Adicionar  $66 \mu\text{L}$  de extrato enzimático do material vegetal;
- c) Realizar a leitura em  $495 \text{ nm}$  de 1 em 1 min, até contabilizar 5 min.

### 3) Cálculos

Realizar os cálculos de atividade enzimática em material vegetal, conforme descrito nos procedimentos gerais para análise de atividade enzimática. Além disso, utilizar o coeficiente de extinção de  $24,9 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para a enzima polifenoloxidase. A enzima polifenoloxidase é expressa em  $\text{mmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  proteína.

## Referência

TARRAD, A. M.; EL-HYATEMY, Y. Y.; OMAR, S.A. Weyerone derivatives and activities of peroxidase and polyphenol oxidase in faba bean leaves as induced by chocolate spot disease. **Plant Science**, v. 89, p. 161–165, 1993.

## Atividade da enzima ascorbato peroxidase - APX

### 1) Reagentes e Soluções

- **Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) 1 mol L<sup>-1</sup>**: Pesar 17,42 g de  $K_2HPO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- **Fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ ) 1 mol L<sup>-1</sup>**: Pesar 13,608 g de  $KH_2PO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- **Solução tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,5)**: Pipetar 83,4 mL de uma solução 1 mol L<sup>-1</sup> de  $K_2HPO_4$  + 16,6 mL de uma solução 1 mol L<sup>-1</sup>  $KH_2PO_4$ . Ajustar ao volume de 1 L.

- **Solução tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,5) com 2.5 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico**: Pesar 0.4403 g de ácido ascórbico e completar com a solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,5 para 1 L.

- **Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 5 %**: Pipetar 5 mL de  $H_2O_2$  em um balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água deionizada.

### 2) Procedimento Experimental

- Pipetar 1830  $\mu$ L de solução tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,5) com 2.5 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico;
- Adicionar 130  $\mu$ L de extrato enzimático do material vegetal;
- Pipetar 40  $\mu$ L de  $H_2O_2$  5 %;
- Realizar a leitura em 290 nm de 1 em 1 min, até contabilizar 5 min.

### 3) Cálculos

Realizar os cálculos de atividade enzimática em material vegetal, conforme descrito nos procedimentos gerais para análise de atividade enzimática. Além disso, utilizar o coeficiente de extinção de 2,6 mmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para a enzima ascorbato peroxidase. A enzima ascorbato peroxidase é expressa em mmol min<sup>-1</sup>  $\mu$ g<sup>-1</sup> proteína.

## Referência

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

## Atividade da enzima superóxido dismutase - SOD

### 1) Reagentes e Soluções

- **Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) 1 mol L<sup>-1</sup>**: Pesar 17,42 g de  $K_2HPO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- **Fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ ) 1 mol L<sup>-1</sup>**: Pesar 13,608 g de  $KH_2PO_4$  e solubilizar com água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL

- **Solução tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,5)**: Pipetar 83,4 mL de uma solução 1 mol L<sup>-1</sup> de  $K_2HPO_4$  + 16,6 mL de uma solução 1 mol L<sup>-1</sup>  $KH_2PO_4$ . Ajustar ao volume de 1 L.

- **Solução SOD 1**: Pesar 2,3873 g de metionina + 1,7534 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) + 0,1429 g de NBT (nitroazul de tetrazólio) + 0,00602 g de riboflavina. Completar para 1 L com solução tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,5). A concentração final dessa solução será: 16 mmol L<sup>-1</sup> de metionina; 6 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA; 175 μmol L<sup>-1</sup> de NBT; e 16 μmol L<sup>-1</sup> de riboflavina.

### 2) Procedimento Experimental

- Pipetar 1900 μL da solução SOD 1;
- Adicionar 100 μL de extrato enzimático do material vegetal;
- Deixar por 10 min abaixo de uma lâmpada fluorescente (15 W), em temperatura ambiente;
- Realizar a leitura em 560 nm durante 1 em 1 min;
- Iniciar a reação quando ligar as luzes, e finalizar quando desligar;
- Realizar um branco no escuro por 10 min.

### 3) Cálculos

Realizar os cálculos de atividade enzimática em material vegetal, conforme descrito nos procedimentos gerais para análise de atividade enzimática. A enzima SOD é expressa em U.A. μg proteína<sup>-1</sup>

$$\text{SOD(U/min/}\mu\text{g proteína)} = \left( \frac{V_0}{V-1} \times \text{FD} \right) \div \text{Proteína}(\mu\text{g/mL})$$

Onde:

$V_0$  = mudança da absorbância sem a presença de extrato enzimática;  $V$  = mudança da absorbância com a presença de extrato enzimática; e FD (Fator de diluição) = Volume total da reação/ Volume de extrato pipetado;

## Referência

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

CAPÍTULO 7

# Aplicação das Metodologias Experimentais para Análise de Alimentos



## CAPÍTULO 7

# Aplicação das Metodologias Experimentais para Análise de Alimentos

**William Gustavo Sganzerla**  
**Ana Paula de Lima Veeck**

## Resultados Obtidos e Considerações Finais

As metodologias apresentadas neste livro foram padronizadas para a execução de diversos projetos de pesquisa do IFSC, Câmpus Lages. As análises de inúmeros alimentos foram conduzidas em laboratório e os resultados foram publicados em periódicos científicos. Inúmeros artigos foram publicados em periódicos científicos internacionais com elevado fator de impacto. Além disso, mais de 50 trabalhos foram divulgados em *proceeding* de eventos científicos como resumo simples, expandido e artigo completo. No final deste capítulo, elaboramos uma lista com as principais publicações envolvendo as metodologias em estudo. Baseado nos estudos publicados, elaboramos uma tabela para demonstrar uma fração dos dados obtidos a partir da aplicação das metodologias experimentais descritas neste livro.

Na **Tabela 1**, a seguir, é possível visualizar resultados de composição nutricional e algumas análises físico-químicas de diversas matrizes alimentares (sementes, polpas, castanhas, alimentos processados, cascas, dentre outros). A **Tabela 2**, por sua vez, apresenta os resultados das análises de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. As análises mencionadas foram avaliadas em extrato aquoso (100% água deionizada), etanólico (100% etanol) e hidroetanólico (mistura de 70% etanol e 30% água).

Portanto, por meio da análise de alimentos com base nas metodologias analíticas descritas neste livro, é possível obter informações acerca da composição dos alimentos *in natura* e dos alimentos processados. As metodologias descritas neste livro facilitam a execução de experimentos laboratoriais, auxiliando na tomada de decisões de projetos futuros.

**Tabela 1:** Resultados de composição nutricional e análises físico-químicas de diversas matrizes alimentares analisadas com base nas metodologias descritas neste livro.

Amostras		Umidade <sup>1</sup>	Cinzas <sup>1</sup>	Lípidios <sup>1</sup>	Proteínas <sup>1</sup>	Carboidratos <sup>1</sup>	Acidez Total <sup>2</sup>	pH
Linhaça Marrom	semente	7,47 ± 0,04	8,94 ± 0,75	27,61 ± 0,91	27,50 ± 0,45	28,48 ± 2,03	0,19 ± 0,03	6,33 ± 0,10
Linhaça Dourada	semente	6,91 ± 0,11	5,80 ± 0,10	32,63 ± 2,99	29,67 ± 0,23	24,99 ± 3,04	0,31 ± 0,05	6,33 ± 0,07
Araçá Vermelho	Polpa	85,08 ± 0,15	0,81 ± 0,07	0,31 ± 0,03	0,40 ± 0,04	13,40 ± 0,27	1,99 ± 0,04	3,28 ± 0,01
Uvaia	polpa	93,29 ± 0,04	0,44 ± 0,06	0,38 ± 0,02	1,69 ± 0,08	4,20 ± 0,01	0,75 ± 0,03	3,45
Amora Preta	polpa	91,17 ± 0,14	0,43 ± 0,02	1,24 ± 0,22	0,40 ± 0,08	6,74 ± 0,12	1,50 ± 0,14	3,33 ± 0,02
Baru	castanha	6,70 ± 0,08	3,21 ± 0,03	22,38 ± 0,37	31,80 ± 0,65	35,88 ± 0,35	–	–
Baru	casca	14,11 ± 0,02	4,01 ± 0,24	1,79 ± 0,01	10,05 ± 0,37	70,05 ± 0,09	–	–
Geleia de uvaia		33,50 ± 0,18	0,23 ± 0,08	0,73 ± 0,26	0,50 ± 0,11	65,04 ± 0,22	1,18 ± 0,04	2,98 ± 0,04
Geleia de amora preta		29,15 ± 0,22	0,35 ± 0,08	0,57 ± 0,20	0,28 ± 0,03	69,85 ± 0,31	1,31 ± 0,17	3,19 ± 0,15
Batata yacon	polpa	86,15 ± 0,07	0,55 ± 0,07	0,40 ± 0,14	1,20 ± 0,00	11,85 ± 0,07	–	–
Abóbora Cabotian	polpa	90,39 ± 0,08	0,89 ± 0,03	0,53 ± 0,01	1,06 ± 0,07	6,42 ± 0,06	–	–
Abóbora Cabotian	casca	84,66 ± 0,06	0,97 ± 0,09	1,50 ± 0,06	3,29 ± 0,06	5,08 ± 0,84	–	–
Amido de pinhão		9,37 ± 0,01	0,17 ± 0,04	0,30 ± 0,13	0,29 ± 0,06	89,89 ± 0,25	0,07 ± 0,01	6,19 ± 0,07
São João (Berberis laurina)	polpa	69,27 ± 0,36	1,34 ± 0,52	0,49 ± 0,09	3,53 ± 1,12	25,36 ± 0,70	0,55 ± 0,15	3,74 ± 0,00
Batata mandioquinha	tubérculo	78,68 ± 0,21	1,10 ± 0,08	0,44 ± 0,32	0,95 ± 0,16	18,82 ± 0,12	–	–
Aspargo	broto	91,74 ± 0,00	0,79 ± 0,00	0,42 ± 0,03	3,31 ± 0,11	3,71 ± 0,09	–	–

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3); <sup>1</sup> %; <sup>2</sup> g ácido cítrico 100 g<sup>-1</sup>; –, não determinado.

**Tabela 2:** Resultados de compostos bioativos (fenólicos e flavonoides) e atividade antioxidante de diversas matrizes alimentares analisadas com base nas metodologias descritas neste livro.

Amostras	Extrato	Compostos Bioativos		Atividade Antioxidante		
		Compostos Fenólicos <sup>1</sup>	Flavonoides <sup>2</sup>	DPPH <sup>3</sup>	ABTS <sup>3</sup>	FRAP <sup>3</sup>
Uvaia (polpa <i>in natura</i> )	Aquoso	34,70 ± 0,99	0,04 ± 0,00	249,45 ± 62,15	27,00 ± 0,57	64,74 ± 1,28
	Etanólico	107,14 ± 0,55	0,16 ± 0,01	579,03 ± 6,29	140,66 ± 6,36	243,11 ± 2,41
	Hidroetanólico	189,41 ± 3,98	0,42 ± 0,00	1600,50 ± 8,39	342,11 ± 1,82	227,99 ± 0,00
Goiaba Serrana (polpa <i>in natura</i> )	Etanólico	0,103 ± 0,016	–	1,05 ± 0,025	0,05 ± 0,00	0,15 ± 0,01
	Hidroetanólico	0,228 ± 0,004	–	2,09 ± 0,072	2,32 ± 0,05	1,78 ± 0,24
Goiaba Serrana (casca <i>in natura</i> )	Etanólico	5,35 ± 0,19	–	35,33 ± 1,12	5,22 ± 0,22	21,11 ± 3,30
	Hidroetanólico	1,85 ± 0,022	–	29,68 ± 0,45	5,48 ± 0,34	6,44 ± 0,51
Farinha da casca de goiaba serrana	Aquoso	0,36 ± 0,01	–	1,55 ± 0,05	1,17 ± 0,01	6,21 ± 0,02
Cogumelo <i>Boletus edulis</i> ( <i>in natura</i> )	Aquoso	84,55 ± 2,23	19,82 ± 2,03	143,43 ± 12,63	316,67 ± 2,22	106,46 ± 3,97
	Etanólico	32,94 ± 2,08	1,12 ± 0,33	32,13 ± 1,02	121,75 ± 7,11	35,60 ± 1,60
	Hidroetanólico	74,92 ± 3,42	1,99 ± 0,51	90,67 ± 3,08	269,03 ± 1,65	84,42 ± 3,06

Fonte: Elaborada pelos autores (2022).

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3); <sup>1</sup> mg Ácido Gálico Equivalente/100g (mg GAE/100g); <sup>2</sup> mg Quercetina Equivalente (mg QE/100g); <sup>3</sup> mg Trolox Equivalente/100g (mg TE/100g); –, não determinado.

## Publicações mais recentes dos autores utilizando as metodologias analíticas descritas neste livro

### Principais artigos publicados em revistas científicas

SGANZERLA, W.G.; KOMATSU, R.A.; PASSOS, J.F.M.; COSTA, M.D.; STROSCHIN, M.R.D.; SCHONS, P.F.; VEECK, A.P.L. Variability in the molecular, phenological, and physicochemical characteristics of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess - Myrtaceae) accessions from the Brazilian Atlantic rainforest. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, 102082, 2021.

SGANZERLA, W.G.; RIBEIRO, C.P.P.; ULIANA, N.R.; RODRIGUES, M.B.C.; ROSA, C.G.; FERRAREZE, J.P.; VEECK, A.P.L.; NUNES, M.R. Bioactive and pH-sensitive films based on carboxymethyl cellulose and blackberry (*Morus nigra* L.) anthocyanin-rich extract: a perspective coating material to improve the shelf life of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 33, 101989, 2021.

SCHMIT, R.; FERRAREZE, J.P.; SGANZERLA, W.G.; ROSA, G.B.; XAVIER, L.O.; VEECK, A.P.L.; FERREIRA, P.I.; PRIMIERI, S. Salicylic acid application in the initial development of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under water stress conditions: Agronomical and antioxidant parameters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, 101896, 2021.

XAVIER, L.O.; SGANZERLA, W.G.; ROSA, G.B.; ROSA, C.G.; AGOSTINETTO, L.; VEECK, A.P.L.; BRETANHA, L.C.; MICKE, G.A.; COSTA, M.D.; BERTOLDI, F.C.; BARRETO, P.L.M.; NUNES, M.R. Chitosan packaging functionalized with *Cinnamodendron dinisii* essential oil loaded zein: A proposal for meat conservation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 183–193, 2021.

ROSA, G.B.; SGANZERLA, W.G.; FERREIRA, A.L.A.; XAVIER, L.O.; VELOSO, N.C.; SILVA, J.; OLIVEIRA, G.P.; AMARAL, N.C.; VEECK, A.P.L.; FERRAREZE, J.P. Investigation of Nutritional Composition, Antioxidant Compounds, and Antimicrobial Activity of Wild Culinary-Medicinal Mushrooms *Boletus edulis* and *Lactarius deliciosus* (Agaricomycetes) from Brazil. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 22, p. 931-942, 2020.

SGANZERLA W.G.; ROSA, G.B.; FERREIRA, A.L.A.; ROSA, C.G.; BELING, P.C.; XAVIER, L.O.; HANSEN, C.M.; FERRAREZE, J.P.; NUNES, M.R.; BARRETO, P.L.M.; VEECK, A.P.L. Bioactive food packaging based on starch, citric pectin and functionalized with *Acca sellowiana* waste by-product: Characterization and application in the postharvest conservation of apple. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 147, p. 295–303, 2020.

SGANZERLA W.G.; FERREIRA, A.L.A.; ROSA, G.B.; AZEVEDO, M.S.; FERRAREZE, J.P.; KOMATSU, R.A.; NUNES, M.R.; ROSA, C.G.; SCHMIT, R.; COSTA, M.D.; CIOTTA, M.N.; VEECK, A.P.L. Feijoa [*Acca sellowiana* (Berg) Burret] accessions characterization and discrimination by chemometrics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 5373-5384, 2020.

SGANZERLA, W.G.; BELING, P.C.; FERREIRA, A.L.A.; AZEVEDO, M.S.; FERRAREZE, J.P.; KOMATSU, R.A.; NUNES, M.R.; VEECK, A.P.L. Geographical discrimination of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) by principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 6778-6787, 2019.

### Projetos de pesquisa executados

**Edital N° 01/2019/PROPPI/IFSC/PIBIC-EM.** Utilização do planejamento Simplex-Centróide para o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis para armazenamento de alimentos: otimização das propriedades físico-químicas e antioxidantes.

**Edital N° 02/2019/PROPPI/IFSC/UNIVERSAL:** Síntese verde de nanopartículas de prata para aplicação em biopolímeros: desenvolvimento de uma embalagem bioativa, biodegradável e inteligente para a conservação de alimentos.

**Edital N° 01/2018/PROPPI/IFSC/PIBIC-EM:** Avaliação nutricional e da atividade antioxidante em farinha do resíduo agroindustrial de baru (*Dipterix Alata* vog.) para aplicação em biscoitos tipo cookie.

**Edital N° 02/2018/PROPPI/IFSC/UNIVERSAL:** Estabilidade físico-química, de compostos bioativos e da atividade antioxidante em geleias produzidas com frutas nativas do planalto serrano catarinense.

**Edital N° 02/2017/PROPPI/IFSC/UNIVERSAL:** Desenvolvimento de filmes biodegradáveis produzidos a base de amido de pinhão enriquecidos com

extratos de goiaba serrana (*Accasellowiana*) visando seu potencial antioxidante.

**Edital N° 02/2016/PROPPI/IFSC/UNIVERSAL:** Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato e do óleo essencial de uvaia (*Eugenia pyriformis*Cambess).

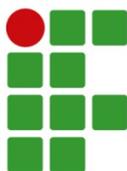
**Edital FAPESC N° 08/2016:** Caracterização físico-química de polpa de truta (*Oncorhynchusmykiss*) e derivados armazenados em embalagens ativas.

**Edital MCTI/MAPA/CNPq N° 02/2016:** Manutenção do Núcleo de Estudo em Agroecologia e Agrobiodiversidade do Planalto Catarinense (NEAAPlaC).

**Edital N° 04/2015/PROPPI/IFSC/PIBIC-EM:** Caracterização físico-química da polpa e casca da goiaba serrana (*Accasellowiana*).

**Edital N° 05/2015/PROPPI/IFSC/UNIVERSAL:** Atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos presentes em polpa e casca de goiaba serrana (*Accasellowiana*).

**Edital MCTI/CNPq/Universal N° 14/2014:** Avaliação da atividade antioxidante de compostos bioativos presentes em frutas nativas do Planalto Sul Catarinense.



**INSTITUTO  
FEDERAL**  
Santa Catarina

