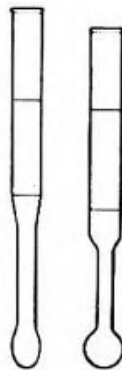


Determinação espectrofotométrica de amido

A adição de amido é permitida em algumas classes de salsichas, mortadelas e outros produtos cárneos, respeitados os limites estabelecidos pela legislação vigente, específicos para cada classe de produto. Além do amido, que é um extensor utilizado para reduzir custos do produto final e auxiliar na retenção de água, outros ingredientes são empregados na elaboração, tais como: carne, sangue, vísceras comestíveis, gordura, proteínas de soja, aditivos e condimentos. Alguns deles estão presentes em grandes quantidades, podendo acarretar interferência na extração e dosagem do amido; outros contêm teores consideráveis de açúcares simples e de amido em sua composição, superestimando o valor real. O método baseia-se na determinação espectrofotométrica a 500 nm do composto colorido formado pela reação entre os reativos de Somogyi-Nelson e a glicose proveniente da hidrólise do amido. Com o objetivo de minimizar interferências (gorduras, proteínas e açúcares simples) e aumentar a eficiência das determinações, procede-se a uma extração prévia da amostra com éter de petróleo e álcool, para posterior hidrólise ácida e clarificação com reagentes Carrez. Esse método, assim como o de Fehling, baseia-se na redução do cátion Cu^{++} a Cu^+ , e na oxidação do açúcar a ácido orgânico. O Cu^+ é complexado com arsenomolibdato (reativo de Nelson), que possui um agente cromóforo, originando um complexo estável de coloração azul. A intensidade dessa coloração é proporcional à quantidade de açúcares redutores.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, centrífuga, balança analítica, estufa, chapa de aquecimento com aparelho de refluxo acoplado, papel indicador de pH, banho-maria, dessecador, papel de filtro, termômetro, béqueres de 500 e 1000 mL, balões volumétricos de 100, 250 e 1000 mL, tubos de centrífuga de 15 mL, pipetas graduadas de 5 e 10 mL, pipeta volumétrica de 1 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL com boca esmerilhada, tubos de Folin-Wu de 25 mL (Figura 1), cubeta de vidro com caminho óptico de 10 mm, bureta de 10 mL e proveta de 25 mL.



tubos de Folin-Wu de 25 mL

Reagentes

Álcool

Éter de petróleo

Ácido clorídrico

Solução de hidróxido de sódio 40% m/v Ácido sulfúrico (D = 1,84 g/mL)

Reativo A - Dissolva 25 g de carbonato de sódio, 25 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 20 g de bicarbonato de sódio e 200 g de sulfato de sódio anidro em 800 mL de água. Transfira para balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Reativo B - Dissolva, em água, 15 g de sulfato de cobre penta-hidratado. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL. Adicione duas gotas de ácido sulfúrico (D = 1,84 g/mL) e complete o volume com água.

Reativo de Somogyi ou reativo cúprico - Adicione 1 mL do reativo B a 25 mL do reativo A em proveta no momento da análise.

Reativo de Nelson - Dissolva 25 g de molibdato de amônio em 450 mL de água. Adicione 21 mL de ácido sulfúrico e agite. Adicione 2 g de arseniato de sódio hepta-hidratado, dissolvido em 25 mL de água. Deixe em banho a 37°C, por um período de 24 a 48 h.

Solução de acetato de zinco di-hidratado a 12% m/v - Pese 120 g de $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, dissolva em 30 mL de ácido acético glacial e 600 mL de água. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 6% m/v - Pese 60 g de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ e dissolva em 800 mL de água. Transfira para balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão de glicose a 250 µg/mL - Seque uma quantidade arbitrária de glicose anidra em estufa a 80°C, por 2h. Deixe esfriar em dessecador. Pese 250 mg, transfira quantitativamente para balão de 1000 mL com água, complete o volume e homogeneíze. A concentração dessa solução-estoque é 250 mg/L ou 250 µg/mL.

Procedimento - Pese 1 g da amostra homogeneizada, em tubo de centrífuga. Adicione 10 mL de solução álcool-éter de petróleo (1:3), agite com a ajuda de uma fina haste de ferro e centrifugue a 2500 rpm, por 5 minutos. Despreze o sobrenadante e repita o procedimento anterior. Adicione 10 mL de álcool a 80% v/v a 80°C ao resíduo, agite com fina haste de ferro e centrifugue a 2500 rpm por 5 minutos. Despreze o sobrenadante e

repita a extração alcoólica. Seque o resíduo em estufa a 70°C, por 20 minutos. Transfira o resíduo obtido no tubo de centrífuga, com auxílio de 100 mL de água, para um frasco Erlenmeyer de 500 mL com boca esmerilhada. Adicione 5 mL de ácido clorídrico.

Hidrolise em refluxo por 90 minutos. Esfrie e neutralize o hidrolisado com solução de hidróxido de sódio a 40% até $pH \pm 7$ (volume gasto aproximado 6 mL), verificando com papel indicador de pH.

Transfira para um balão volumétrico de 250 mL e clarifique adicionando 5 mL de solução de acetato de zinco e 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio (reagentes Carrez). Complete o volume, tampe e agite com vigor. Deixe em repouso por 15 minutos, agitando vigorosamente varias vezes nesse período. Filtre para um frasco Erlenmeyer e reprecipite com hidróxido de sódio a 40% até $pH \pm 11$ (gasto aproximado 0,5 mL). Filtre, transfira 1 mL do filtrado para tubo de Folin-Wu e adicione 1 mL de reativo de Somogyi ou reativo cúprico, deixe imerso em banho-maria

fervente por 20 minutos. (Verifique se após 20 minutos de fervura a tonalidade azulada permanece nos tubos; caso contrário, dilua a amostra e proceda novamente à reação com reativo cúprico.) Esfrie, adicione 1 mL de reativo de Nelson e complete o volume com água até a primeira marca do tubo de Folin-Wu (12,5 mL) e homogeneíze. Proceda às leituras de absorvância das soluções contra o branco de reagentes, no comprimento de onda 500 nm.

Nota: caso as soluções estejam concentradas, isto é, a absorvância obtida ultrapasse o maior valor da curva-padrão, dilua a amostra e repita a reação colorimétrica com os reativos de Somogyi-Nelson, ou repita a reação completando o volume para a segunda marca do tubo de Folin-Wu (25 mL). Neste caso, o resultado final (% de amido) deverá ser duplicado.

Curva-padrão - Transfira alíquotas de 0 (branco); 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mL da solução padrão estoque de glicose para tubos de Folin-Wu. Adicione 1 mL de reativo de Somogyi ou reativo cúprico, deixe imerso em banho-maria fervente por 20 minutos. Esfrie, adicione 1 mL de reativo de Nelson, complete o volume com água até a primeira marca do tubo de Folin-Wu (12,5 mL) e homogeneíze. Proceda às leituras de absorvância das soluções contra o branco, no comprimento de onda 500 nm. Proceda à regressão linear dos valores de absorvância obtidos (eixo y) e das concentrações de glicose de 4, 8, 12, 16 e 20 µg/mL (eixo x). Utilize nos cálculos os valores dos coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1 cm).

Cálculos

$$(A-b) \times 0,3125 = \text{glicose, por cento} \\ a \times p$$

$$\text{Glicose (\%)} \times 0,9 = \text{amido por cento m/m}$$

A = absorvância da amostra

b = coeficiente linear da curva-padrão de glicose

a = absortividade (coeficiente angular da curva-padrão de glicose)

p = massa (g) da amostra

0,3125 = fator de diluição

0,9 = fator de conversão de glicose para amido

Referência bibliográfica

AUED, S.; CARVALHO; J. B. de; TAVARES, M.; ZANELATTO, A. M.; BACETTI, L. B. Determinação de amido em salsichas: comparação entre os métodos de Fehling e de Somogyi-Nelson e avaliação de metodologia para extração do amido. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 50, n. 1/2, p. 251-256, 1990.