

## Procedimento Operacional padrão para determinação de Fibras Solúvel e Insolúvel





ISSN 0103-6068 94

Novembro, 2008

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## **Documentos94**

### **Procedimento Operacional padrão para determinação de Fibras Solúvel e Insolúvel**

Sidinéia Cordeiro de Freitas  
Tania dos Santos Silva  
Patrícia Gonçalves Baptista de Carvalho  
Daiva Domenech Tupinambá  
Selma Nakamoto Koakuzu  
Ana Vânia Carvalho  
Carlos Farley Herbster Moura

Rio de Janeiro, RJ  
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agroindústria de Alimentos**

Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba

CEP: 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Telefone: (0xx21)2410-9500

Fax: (0xx21)2410-1090

Home Page: [www.ctaa.embrapa.br](http://www.ctaa.embrapa.br)

E-mail: [sac@ctaa.embrapa.br](mailto:sac@ctaa.embrapa.br)

**Comitê Local de Publicações e Editoração da Unidade**

Presidente: Virgínia Martins da Matta

Membros: Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, Renata Torrezan e André Luis do Nascimento Gomes

Secretárias: Renata Maria Avilla Paldês e Celia Gonçalves Fernandes

Revisor de texto: Comitê de Publicações

Normalização bibliográfica: Luciana Sampaio de Araújo

Revisão editorial: Soraya Pereira

Ilustração da capa: Hector Oscar Casares (artista plástico)

Fotos e Ilustrações: Hector Oscar Casares, Sonia Couri e banco de imagens

Tratamento das fotos e ilustrações: Felipe Loureiro Rebello

Editoração eletrônica: André Luis do Nascimento Gomes

**1ª edição**

1ª impressão (2008): 100 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Agroindústria de Alimentos**

---

Procedimento operacional padrão para determinação de fibras solúvel e insolúvel / Sidinéa Cordeiro de Freitas... [et al.]. — Rio de Janeiro : Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2008.

X p. ; 21 cm. — (Documentos / Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 0103-6068 ; 94).

1. Fibra na nutrição humana. I. Freitas, Sidinéa Cordeiro de. II. Silva, Tania dos Santos. III. Carvalho, Patrícia Gonçalves Baptista de. IV. Tupinambá, Daiva Domenech. V. Koakuzu, Selma Nakamoto. VI. Carvalho, Ana Vânia. VII. Moura, Carlos Farley Herbster. VIII. Série.

CDD 613.2 (21. ed.)

---

**Embrapa 2008**

---

## **Autores**

### **Sidinéia Cordeiro de Freitas**

Eng. Química, Dra, Embrapa Agroindústria de Alimentos  
Av. das Américas, 29501 Guaratiba, CEP 23020-470, Rio  
de Janeiro, RJ.

Telefone: (0xx21) 36229777.

E-mail: [sidi@ctaa.embrapa.br](mailto:sidi@ctaa.embrapa.br)

### **Tania dos Santos Silva**

Eng. Química, Embrapa Agroindústria de Alimentos  
Av. das Américas, 29501 Guaratiba, CEP 23020-470, Rio  
de Janeiro, RJ.

Telefone: (0xx21) 36229777.

E-mail: [taniass@ctaa.embrapa.br](mailto:taniass@ctaa.embrapa.br)

### **Patrícia Gonçalves Baptista de Carvalho**

Bióloga, Dra, Embrapa Hortaliças  
Rodovia BR 060 km 09 (Brasília Anápolis) Fazenda  
Tamanduá - CEP 70359-970, Ponte Alta Gama, DF. Caixa  
Postal 218

Telefone: (0xx61) 33859083

E-mail: [patricia@cnph.embrapa.br](mailto:patricia@cnph.embrapa.br)

### **Daiva Domenech Tupinambá**

Farmacêutica, M. Sc, Embrapa Cerrados  
Rodovia BR 020, km 018 (Brasília Fortaleza). CEP 73310-  
970, Planaltina, DF - Caixa Postal 8223.

Telefone: (0xx61) 33889898

E-mail: [daiva@cpac.embrapa.br](mailto:daiva@cpac.embrapa.br)

### **Selma Nakamoto Koakuzu**

Química, M. Sc, Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia GO 462, km 12, Fazenda Capivari. CEP 75375-000, Santo Antonio de Goiás, GO.

Telefone: (0xx62)

E-mail: [selma@cnpaf.embrapa.br](mailto:selma@cnpaf.embrapa.br)

**Ana Vânia Carvalho**

Agrônoma - Embrapa Amazônia Oriental

Travessa Dr. Enéas Pinheiro, s/nº, Bairro Marcos. CEP 66095-100, Belém, PA. Caixa Postal 48.

Telefone: (0xx91) 32041000

E-mail: [anavania@cpatu.embrapa.br](mailto:anavania@cpatu.embrapa.br)

**Carlos Farley Herbster Moura**

Engenheiro Agrônomo. Dr Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra Sara Mesquita, 2270, Bairro Pici. CEP 60511-110, Fortaleza, CE. Caixa Postal 3761.

Telefone: (0xx85) 32991839

E-mail: [farley@cnpat.embrapa.br](mailto:farley@cnpat.embrapa.br)

## **Apresentação**

Alimentos ricos em fibras alimentares podem ser considerados como parte da categoria de funcionais, pois os seus componentes interferem em uma ou mais funções do corpo humano de forma positiva.

A hipótese do papel terapêutico e preventivo das fibras ganhou impulso na década de 70 com as publicações de Burkitt (1969, 1971) e Cleave (1956).


A ação das fibras no organismo depende essencialmente de sua natureza (solúvel / insolúvel), quantidade consumida e da presença na dieta de compostos associados, entre outros.

A estimativa qualitativa e quantitativa das fibras em alimentos in natura presente na dieta da população brasileira é uma pesquisa pouco explorada, e poderá contribuir para o conhecimento de espécies nativas, na avaliação da saúde de determinadas populações e no julgamento da qualidade de um alimento.

Buscou-se através deste documento mostrar o procedimento de análise de fibras solúveis e insolúveis de maneira simples, fácil e acessível, para o analista iniciante. Nele estão descritas todas as etapas, cuidados indispensáveis, incluindo figuras mostrando as vidrarias e equipamentos necessários.

# Sumário

<b>1) Introdução</b> .....	10
<b>2) Análise de fibra alimentar (fa)</b> .....	12
<b>3) Análise de proteína</b> .....	20
<b>4) Análise de cinzas</b> .....	23
<b>Referências bibliográficas</b> .....	26



## **Procedimento Operacional padrão para determinação de Fibras Solúvel e Insolúvel**

---

*Sidinéia Cordeiro de Freitas*

*Tania dos Santos Silva*

*Patrícia Gonçalves Baptista de Carvalho*

*Daiva Domenech Tupinambá*

*Selma Nakamoto Koakuzu*

*Ana Vânia Carvalho*

*Carlos Farley Herbster Moura*



## 1) Introdução

A primeira citação histórica sobre fibra é atribuída a Hipócrates, que viveu a 500 a.C, dentre as suas recomendações, constava a ingestão de dietas com elevado conteúdo de fibra devido ao seu efeito laxativo benéfico.

No final do século XIX e início XX intensificou-se o processamento de alimentos e na maioria dos processos industriais as fibras eram descartadas. Atualmente as pesquisas mostram que a fibra interfere no funcionamento do sistema digestivo, inclusive no intestino grosso.

Especificamente o termo “dietary fibre” fibra da dieta ou alimentar foi proposto por Hipsley (1953). Cleave (1956) foi o primeiro pesquisador a associar muitas das doenças do homem moderno com a ingestão de alimentos com baixo conteúdo de fibra.

Burkitt, Walker e Painter (1972) foram os primeiros pesquisadores a elaborar estudos epidemiológicos e clínicos sobre a relação quantidade de fibra na dieta e doenças do homem moderno.

Em 1976, Trowell definiu a fibra alimentar como sendo as substâncias remanescentes de células de plantas que são resistentes as enzimas humanas, resultando na preliminar definição fisiológica (TROWELL, 1976).

A fibra alimentar ou fibra da dieta, não pode ser considerada como uma substância única, ela é composta, principalmente, de polissacarídeos interligados (celulose, hemicelulose, â-glicanos, pectinas, gomas, mucilagens e exsudados), proteínas de parede celular não digeridas, lignina, compostos fenólicos, fitatos, oxalatos e substâncias fenólicas, amido modificado, inulina, oligofrutose e quitosanas, compostos não digeríveis pelas secreções endógenas do trato gastrointestinal. Polissacarídeos de origem animal, como a quitina e seus derivados, também podem ser incluídos como parte da fibra alimentar.

As fibras alimentares se distinguem por suas funções no organismo e são classificadas, de acordo com a sua solubilidade em água, em solúveis e insolúveis.

As fibras insolúveis incluem a celulose, lignina, hemiceluloses e algumas pectinas. Suas funções são diminuir o tempo do trânsito intestinal, aumentar o volume do bolo fecal, retardar a absorção de glicose e a hidrólise do amido. Não alteram a glicemia pós prandial e nem os níveis de colesterol sanguíneo.

As fibras solúveis incluem a pectina, as gomas, mucilagens, gomas, â-glicanos, exsudados e hemiceluloses solúveis. São encontradas em frutas, aveia, cevada e leguminosas (feijão, grão de bico, lentilha e ervilha) e suas principais funções são de aumentar o tempo do trânsito intestinal, diminuir o esvaziamento gástrico, retardar a absorção de glicose, diminuir a glicemia pós prandial e diminuir o colesterol sanguíneo. As fibras solúveis ajudam a controlar o colesterol pelas suas propriedades físico-químicas, ou seja, retenção de água, solubilidade aparente, capacidade de ligação e degradação.

Quando agem no trato gastrointestinal, as fibras solúveis e insolúveis têm efeitos diferentes, atuando nos diversos sítios intestinais de maneira a promover diferentes características digestivas.

#### **Princípio do Método:**

A determinação de fibra deve ser realizada sempre em triplicata, usando-se no mínimo dois brancos, a fim de que sejam realizadas nos resíduos de fibra e de branco as determinações de proteína e cinzas.

Consiste no tratamento da amostra com solução tampão fosfato na faixa de temperatura entre 95-100°C, a fim de promover a solubilização de carboidratos solúveis. Primeiramente a amostra é tratada com  $\alpha$ -amilase, a fim de promover a gelatinização do amido, seguida da adição da enzima protease para desnaturação das proteínas presentes e finalizando o tratamento com enzima amiloglucosidase para remoção do amido. Com este processo tem-se uma mistura de fibra solúvel na fase aquosa e fibra insolúvel precipitada. Faz-se a filtração em cadinho de vidro sinterizado tarado. O cadinho é então seco em estufa, pesado e logo depois colocado em mufla para determinação de cinza. O filtrado é tratado com solução de álcool etílico a 95%, com a finalidade de precipitar a fibra solúvel. A fibra precipitada é filtrada em cadinho de vidro sinterizado tarado. O cadinho é então seco em estufa, pesado e logo depois colocado em mufla para determinação de cinza.

## 2 - Análise de fibra alimentar (fa)

A partir de 1998, o Ministério da Saúde, através da Secretária Nacional de Vigilância Sanitária, por necessidade de internalização de Resoluções Mercosul e Recomendações do Codex Alimentarius, iniciou a publicação de uma série de portarias referentes à Rotulagem Nutricional de Alimentos.

O uso das informações nutricionais obrigatórias nos rótulos dos alimentos e bebidas embalados foi então publicado na Portaria N° 41 de 14 de janeiro de 1998, sob o título de Regulamento Técnico para ROTULAGEM NUTRICIONAL DE ALIMENTOS EMBALADOS. Neste documento é descrito o procedimento para cálculo do valor calórico de glicídios ou carboidratos metabolizáveis, através do uso do valor de fibra alimentar.

Cálculo de Glicídeos:

Calculado como a diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, lipídios, fibra alimentar, umidade e cinzas.

A partir de então os laboratórios de alimentos iniciaram a implantação de métodos de análise de fibra alimentar total.

Em geral dois tipos de métodos são usados: o enzimático-gravimétrico e o enzimático-químico. Ambos têm sofrido modificações e melhoramentos ao longo dos anos com o propósito de atender à rotulagem nutricional de alimentos. Esses métodos também foram sofrendo adaptações à medida que a definição de fibra foi evoluindo. O método enzimático-gravimétrico remove amido, proteína e gordura obtendo um resíduo que é seco e pesado. Este método tenta reproduzir o processo que ocorre no intestino grosso. Após a obtenção do resíduo, é realizada correção do resultado, pela remoção de resíduos de proteína e de cinzas, que poderiam ainda estar presentes. O método enzimático químico caracteriza quimicamente os carboidratos contidos na fibra após remoção dos carboidratos disponíveis (monossacarídeos, dissacarídeos e amido). Vários métodos podem ser usados para quantificar os diferentes compostos contidos nos carboidratos disponíveis e determinar os carboidratos constituintes da fibra alimentar.

O método Southgate (SOUTHGATE, 1969), que consiste no fracionamento dos carboidratos e a quantificação das várias etapas foi usado por muitos anos e os resultados foram publicados em tabelas de Composição de Alimentos de McCance & Widdowson (McCANCE, 2002).

Com o crescimento do interesse em fibra alimentar nos anos 70 e o desenvolvimento do papel fisiológico para este componente da dieta, houve necessidade de se medir fibra solúvel e insolúvel. Inúmeros pesquisadores como Asp e Johanson (1981), Furda (1977), Hellendoorn, Noordhof e Slagman (1975) e Schweizer e Würsch (1979) desenvolveram métodos analíticos que refletiam a fração não digerível da dieta, incluindo o material solúvel e insolúvel. Prosky et al. (1985) publicaram um método que foi baseado no trabalho destes vários pesquisadores, e que foi adotado do compêndio Official methods of analysis of AOAC International (Association of Official Agricultural Chemists) como método 985.29. Neste método é quantificado o teor de fibra alimentar total em alimentos por gelatinização do amido presente com enzima Termamyl (á-amilase termo resistente), seguida de digestão enzimática com protease e posteriormente adição de enzima amiloglicosidase para remover proteína e amido. A esta solução são adicionados 4 volumes de álcool etílico para precipitar a fibra solúvel. A solução com o resíduo deve ser filtrada em vácuo através de um cadinho de filtro de vidro sinterizado, previamente tarado. O precipitado é lavado com álcool etílico e acetona. Depois de seco em estufa a 100°C, o resíduo é pesado. Uma duplicata é analisada para proteína e outra é incinerada a 525-525-550°C para a determinação de cinzas. O teor de fibra alimentar total é calculado tomando-se o resíduo total obtido e diminuindo-se do somatório do valor de proteína mais cinzas.

Posteriormente, este método também foi usado para determinar fibra solúvel e insolúvel. Outros métodos relacionados foram subseqüentemente validados por estudo colaborativo da AOAC e aprovados como métodos oficiais da AOAC. Lee, Prosky e Devries (1992) substituíram o tampão fosfato pelo MÊS-TRIS, difundindo um novo método AOAC 991.43. Li e Cardozo (1994) introduziram um método mais simples para alimentos que contenham teor de amido menor que 2% em base seca (AOAC método 993.21), tais como frutas e alguns vegetais. Mongeau e Brassard (1993) realizaram uma pequena modificação, usando um método modificado de fibra detergente neutra para medir fibra insolúvel e outra modificação para analisar fibra solúvel, surgindo então o método AOAC 992.16.

A fim de se padronizar a técnica de determinação de fibra alimentar e torná-la mais compreensível e funcional, o procedimento é detalhado em minúcias, mostrando os cuidados que se deve ter nas diversas etapas. Além disso, foram adicionadas figuras para melhor visualização dos equipamentos e vidrarias usadas.

## PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE FIBRA ALIMENTAR

### Objetivo

Determinar o teor de fibra alimentar solúvel e insolúvel em produtos alimentícios

### Referências Normativas

AOAC 2005, método 985.29 (AOAC INTERNATIONAL, 2005)

### Materiais:

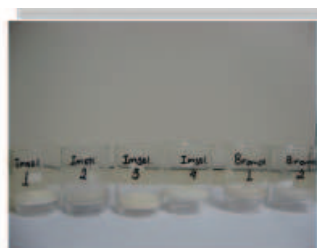
- Balança analítica (precisão de 0,1 mg)
- Banho Dubnoff com regulagem de temperatura até 100°C
- Refrigerador mantido de 0-5°C
- Potenciômetro (pHmetro ou titulador automático) e padrões de calibração (pH=7 e pH=4)
- Sistema de filtração à vácuo
- Estufa à 105°C
- Mufla a 525-550°C
- Placa de aquecimento
- Bécher de 400 mL de forma alta
- Bécher de 1000 mL de forma alta
- Papel de alumínio
- Dessecador
- Pipetador para 0,1 mL e 1 mL e ponteiras
- Provetas graduadas de 50 mL e 500 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Kitasato
- Cadinho com placa de vidro sinterizado Marca Pyrex de porosidade 40-60 ASTM, capacidade de 50 mL
- Água destilada
- Acetona -  $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$
- Etanol a 95% - ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )
- Celite (auxiliar de filtração) terra diatomácea com 87,5% de  $\text{SiO}_2$ ,  $\cong 1,0\%$ ;  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ;  $\cong 6,6\%$   $\text{CaO}$ ;  $\cong 0,4\%$   $\text{Fe}_2\text{O}_3$  e  $\cong 1,5\%$   $\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$ .
- Fosfato dibásico de sódio - ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- Fosfato monobásico de sódio - ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- Solução de ácido clorídrico 5% - ( $\text{HCl}$ )
- Solução de hidróxido de sódio 5% - ( $\text{NaOH}$ )



Banho Dubnoff



Kitasato



Cadinho com placa de vidro sinterizado

- Enzimas:
  - a) alfa-amilase termo-estável - Termamyl - referência Sigma A-3306
  - b) protease - referência Sigma P-3910
  - c) amiloglucosidase - referência Sigma A-9913 ou kit Sigma contendo as 3 enzimas TDF 100A

## Procedimento

### 1 - Fibra Insolúvel

Amostras que contêm mais de 10% de lipídios devem ser desengorduradas previamente com éter de petróleo. Caso se tenha necessidade de extrair a gordura de amostras úmidas, deve-se, primeiramente, realizar a determinação de umidade e registrar o resultado. Em seguida, deve-se determinar o teor de gordura por extração Soxhlet. O resultado do extrato etéreo obtido deve ser registrado.

Lembrar que este procedimento deve ser computado no cálculo final.

Ligar o banho Dubnoff, e fixá-lo em uma temperatura entre 95 e 100°C. Verificar o nível da água, completando, se necessário, sempre com água destilada.

Separar 10 cadinhos para a análise (5 para fibra insolúvel e 5 para fibra solúvel) e adicionar 1g de celite em cada cadinho. Colocá-los na mufla, ligá-la e ajustar a temperatura para 525-550°C. Deixar na mufla por 1 hora, desligá-la e aguardar até que temperatura alcance 150°C. Retirar os cadinhos para dessecador, esfriar até temperatura ambiente e pesar.

Observar que, para manter a vida útil do cadinho, deve-se ter cuidado em seu manuseio. O cadinho não deve ser exposto a mudanças bruscas de temperatura. O aquecimento deve ocorrer de maneira gradual, assim como o resfriamento. Sugere-se o uso de mufla com programação de aquecimento e resfriamento.

Pesar, no mínimo 3 replicatas de amostra de 1 g, com precisão de 0,1 mg, em bécher de forma alta de 400 mL. As pesagens das porções teste não devem diferir mais do que 20 mg. Adicionar 50 mL da solução tampão fosfato (pH = 6) em cada bécher e cobrir com papel alumínio. Usar mais 2 bécheres para o branco

Colocar os 5 bécheres no banho-maria à 95-100°C e ligar a agitação (100 rpm) por 20 minutos para gelatinizar o amido.

Parar a agitação, retirar o papel de alumínio e adicionar 0,1 mL da enzima Termamyl com o auxílio do pipetador. Cobrir novamente os bécheres com a folha de alumínio, ligar a agitação (100 rpm) e mantê-los a 95-100°C por 35 minutos.

Remover as amostras do banho e deixar esfriar à temperatura ambiente. Caso necessite acelerar o resfriamento, colocar os bécheres em um banho de gelo em bandeja.

Obs.: No caso do laboratório só possuir um banho Dubnoff ajustá-lo para a temperatura de 60°C e adicionar água para resfriar, se necessário.

Calibrar o potenciômetro de acordo com o manual de calibração do equipamento. Remover os papéis de alumínio e mergulhar o eletrodo no bécher contendo a amostra. Ajustar o pH de cada amostra para  $7,5 \pm 0,1$ . Usar inicialmente 2,0 a 2,5 mL de NaOH 5% para que se aproxime o máximo do valor desejado, depois ajustar gota a gota.

Obs.: caso seja necessário ajustar o pH com HCl 5%.

Adicionar 0,1 mL da solução de protease.

Cobrir os bécheres com papel de alumínio incubando sob contínua agitação (100 rpm), em banho-maria à 60°C por 30 minutos.

Remover as amostras do banho e resfriar à temperatura ambiente. Caso necessite acelerar o resfriamento, colocar os bécheres num banho de gelo em bandeja.

Remover os papéis alumínio. Mergulhar o eletrodo no bécher contendo a amostra.

Ajustar o pH de cada amostra para  $4,3 \pm 0,3$ . Usar inicialmente 2,0 mL de HCl 5%, para que se aproxime o máximo do valor desejado, depois ajustar gota a gota.

Obs.: caso seja necessário ajuste o pH com NaOH 5%.

Adicionar 0,1 mL da solução de amiloglucosidase sob agitação e cobrir o bécher com papel de alumínio.

Incubar por 30 minutos com agitação (100 rpm) em banho-maria à 60°C.

Instalar o sistema de filtração conforme mostrado na figura 1: kitasato, funil, adaptadores de borracha e cadinhos filtrantes com celite tarados. Ligar o sistema na tubulação de vácuo.



**Figura 1 - Sistema de filtração à vácuo.**

Antes de iniciar a filtração das amostras, adicionar (aplicando vácuo) em cada cadinho etanol suficiente para formar um leito homogêneo de celite no interior do mesmo.

Filtrar as amostras através do sistema de filtração com o cadinho com filtro sinterizado + celite usando vácuo. Transferir quantitativamente todo o resíduo do bécher usando solução tampão fosfato. Usar o menor volume possível, a fim de prevenir um grande aumento do volume final.

Obs.: em algumas amostras um filme parecido com uma goma pode se formar impedindo a filtração. Caso isto ocorra, deve-se romper este filme com o auxílio de uma espátula ou bastão, sem, no entanto, alterar o leito de celite.

Nesta etapa obteremos 2 tipos de resíduos: 2 provenientes do branco e 3 provenientes da amostra.

## 2 - Fibra Solúvel

Transferir quantitativamente o filtrado do kitasato para um bécher de 1000 mL.

Lavar o resíduo 2 vezes com 15 mL de etanol 95%, e depois 2 vezes com 15 mL de acetona. Colocar os cadinhos com os resíduos obtidos em estufa convencional a 100-105°C por 1 hora. Esfriar e pesar. Manter os cadinhos em dessecador para posterior determinação de cinzas e proteína.



Aquecer etanol 95% em banho-maria em placa de aquecimento ou em banho Dubnoff a 60°C.

Adicionar o etanol aquecido em volume equivalente a 4 vezes o volume do filtrado.

Cobrir todos os bécheres com novas folhas de alumínio e deixar o precipitado se formar à temperatura ambiente por 1 hora.

Instalar o sistema de filtração conforme mostrado nas figuras 2 e 3: kitasato, funil, adaptadores de borracha e cadinhos filtrantes com celite tarados. Ligar o sistema na tubulação de vácuo. Antes de iniciar a filtração das amostras, adicionar alguns mililitros de etanol (aplicando vácuo) em cada cadinho de modo a formar um leito homogêneo de celite no interior do mesmo.

Filtrar as amostras através do sistema de filtração com o cadinho com filtro sinterizado + celite usando vácuo. Transferir quantitativamente todo o resíduo do bécher usando etanol 95%.



Figura 2 – Montagem da vidraria para filtração



Figura 3 – Etapa de filtração

Lavar o resíduo 2 vezes com 15 mL de etanol 95% e depois 2 vezes com 15 mL de acetona.

Obs.: em algumas amostras um filme parecido com uma goma pode se formar impedindo a filtração. Caso isto ocorra, deve-se romper este filme com o auxílio de uma espátula ou bastão, sem, no entanto, alterar o leito de celite.

Transferir o filtrado do kitasato para a bombona de resíduos de solventes orgânicos.

Colocar os cadinhos com os resíduos obtidos em estufa convencional a 100°C por 1 hora. Esfriar e pesar.

Da precipitação da fibra insolúvel, selecionar 2 cadinhos de resíduo e 1 de branco para determinação de cinzas. Da precipitação da fibra solúvel, selecionar 2 cadinhos de resíduo e 1 de branco para determinação de cinzas. Da mesma forma serão selecionados os resíduos das fibras e brancos para a determinação de proteína.

Desta etapa serão obtidos os seguintes valores: peso do cadinho contendo cinzas do resíduo de fibra insolúvel da amostra; peso do cadinho contendo cinzas do resíduo de fibra solúvel da amostra; peso do cadinho contendo cinzas do resíduo de branco da análise de fibra insolúvel e peso do cadinho contendo cinzas do resíduo de branco da análise de fibra solúvel. Nos demais resíduos de fibra solúvel, fibra insolúvel, branco da fibra insolúvel e branco da fibra solúvel, serão obtidos os respectivos valores de proteína.

### 3 - ANÁLISE DE PROTEÍNA

#### • Objetivo

Determinar o teor de proteína total nos resíduos de fibra solúvel, insolúvel, branco de fibra insolúvel e branco de fibra solúvel e respectivos alimentos em geral.

#### • Referências Normativas

AACC 1995 (AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 1995), método 46-13 modificado (catalisador sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) e selênio(Se); titulante ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05M).

#### • Materiais

- Balança analítica (precisão 0,1 mg)
- Papel vegetal
- Bloco digestor (até 400°C)
- Tubos de digestão macro
- Dispensete
- Destilador de Nitrogênio/Proteína
- Bureta digital de 25 ou 50 mL
- Cilindro graduado de 1000 mL
- Ácido sulfúrico concentrado P.A. - ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- 200g de sulfato de sódio P.A. - ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- 20g de sulfato de cobre P.A. - ( $\text{CuSO}_4$ )
- 2g de selênio P.A - (Se)
- Solução de hidróxido de sódio 40% - (NaOH)
- Solução fatorada de ácido sulfúrico 0,05M - ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- Solução indicadora: 0,1% de verde de bromocresol + 0,2% de vermelho de metila
- Solução de ácido bórico 5% - ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )



Bloco Digestor



Destilador de Nitrogênio/Proteína



Bureta Digital de 25/50 mL