

**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP**  
**Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição**  
**Disciplina LAN 0405 - Análise de Alimentos**  
**Profª. Gabriela Feltre**

**Aula Prática 6: Determinação de Compostos Fenólicos**

**PROCEDIMENTOS PRÁTICOS:**

A turma será dividida em 2 grupos. Trabalharemos com extrato de própolis e cada turma fará a leitura da curva padrão e da amostra.

**Fundamento**

Método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu descrito por Swain & Hillis, 1959, utilizando ácido gálico como padrão. O reagente de Folin Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. O  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  neutraliza o ácido do Folin e a cor da reação se desenvolve em meio alcalino.

As amostras sofrem extração em etanol.

**Equipamentos e Vidrarias utilizados**

- ◆ Balança
- ◆ Banho maria com agitação
- ◆ Espectrofotômetro
- ◆ Béquer
- ◆ Tubos de ensaio
- ◆ Pipetas
- ◆ Cubetas

**Reagentes necessários**

- ◆ Etanol 80%
- ◆ Folin-Ciocalteu (quando o reagente for da Sigma diluir 10 vezes)
- ◆ Solução Saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : pesar 20g de Carbonato de Sódio em 70 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada
- ◆ Ácido Gálico

**Procedimento**

**Extração**

- ◆ Pesar 2 g de amostra (extrato de própolis em pó);
- ◆ Colocar 25 ml de etanol 80%;
- ◆ Agitar em banho-maria a  $70^\circ\text{C}$  por 30 min;
- ◆ Retirar a amostra do banho-maria, esfriar e colocar em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  por 12 horas para decantação da cera;
- ◆ Filtrar em papel filtro;
- ◆ O extrato filtrado é a solução mãe com uma concentração de 0,08 g de amostra por ml (0,08 g/ml);
- ◆ Para a leitura de absorbância cair dentro da curva padrão diluir 250 vezes a solução mãe do extrato (preparar em balão de 25 ml)

### Procedimento de análise

- ◆ Adicionar 0.5 ml do extrato diluído em tubo de ensaio;
- ◆ Colocar 4 ml de H<sub>2</sub>O destilada;
- ◆ Colocar 0.5 ml da solução Folin-Ciocalteu;
- ◆ Aguardar 3 min. e adicionar 0.5 ml de Solução Saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;
- ◆ Manter os tubos sobre abrigo de luz por 2h e ler absorvância a 760 nm.

Para zerar o espectro usar a solução de 4 ml de H<sub>2</sub>O destilada + 0,5 ml de etanol 80% + 0,5 ml de Folin + 0,5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, passando por todos os procedimentos de análise (se basear no tubo 1 da curva, que é o branco).

### Curva Padrão

- ◆ **Padrão Ácido Gálico:** pesar 0,0025 g de Ácido Gálico e completar para volume de 25 ml com etanol 80%

Nº Tubo	Padrão	Etanol 80%	H <sub>2</sub> O	Folin		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
1	0.0 ml	0.5ml	4ml	0.5ml	3min.	0.5ml
2	0.1 ml	0.4ml	4ml	0.5ml		0.5ml
3	0.2 ml	0.3ml	4ml	0.5ml		0.5ml
4	0.3 ml	0.2ml	4ml	0.5ml		0.5ml
5	0.4 ml	0.1ml	4ml	0.5ml		0.5ml
6	0,5 ml	0.0ml	4ml	0.5ml		0.5ml

- ◆ Manter sobre abrigo de luz por 2h.
- ◆ Ler absorvância a 760 nm.

### Cálculo

Fazer a curva padrão e obter a equação da reta. Substituir a absorvância encontrada na equação da reta.

Obs.: Considerar as diluições no cálculo.

### Referência

SWAIN,T.; HILLIS,W. E. J. Sci. Food Agric., 10:63-68, 1959.

### Resíduos

Separar e etiquetar uma bombona para o resíduo de acordo com a tabela de resíduos de gerenciamento da ESALQ. Ao final da análise descartar e guardar a bombona em local apropriado.