



AULA PRÁTICA Nº - 02
03 / Março / 2016
Profª Solange Brazaca

DETERMINAÇÃO DE TANINOS

FUNDAMENTO:

Os taninos são determinados segundo metodologia descrita por Price, Hagerman e Buther (1980), que utiliza vanilina. A vanilina é um reagente específico para uma classe que apresenta uma ligação simples na posição 2,3 e grupo hidroxila alternados no anel. As catequinas e taninos reagem com a vanilina na presença de HCl produzindo cor, sendo uma coloração vermelha.

ESCOPO:

As amostras em análise devem ser moídas no momento antes da determinação de Taninos. Nesta atividade experimental temos como objetivo a Determinação de Taninos em amostras de feijão.

EQUIPAMENTOS UTILIZADOS:

- ◆ Balança
- ◆ Banho-maria com agitação
- ◆ Centrífuga
- ◆ Espectrofotômetro
- ◆ Mesa Agitadora
- ◆ Moinho para Grãos

VIDRARIAS UTILIZADAS:

- ◆ Balão Volumétrico de 10 mL
- ◆ Béquer 50 e 250 mL
- ◆ Erlenmeyer 125 mL



- ◆ Tubos de centrífuga
- ◆ Tubos de ensaio
- ◆ Pipetas de 1 e 5 mL
- ◆ Provetas 10, 50 e 100 mL

REAGENTES UTILIZADOS:

- ◆ HCL 4% em Metanol
- ◆ HCL 8% em Metanol
- ◆ Vanilina 1% em Metanol
- ◆ Mistura Vanilina-HCl 8% 1:1
- ◆ Catequina 0,05g/50 mL Metanol
- ◆ Metanol p.a.
- ◆ Papel Alumínio

PROCEDIMENTO:

- ◆ Pesar 0,6g ou 0,2g do grão moído, em erlenmeyer de 125 mL de capacidade;
- ◆ Adicionar, com o auxílio de uma proveta, 10 mL de metanol para extração;
- ◆ Cobrir o erlenmeyer com papel alumínio;
- ◆ Agitar por 20 minutos em mesa agitadora;
- ◆ Após este tempo, transferir quantitativamente para tubos de centrífuga;
- ◆ Centrifugar por 20 minutos a 4.000 rpm;
- ◆ Transferir o sobrenadante para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume do balão com metanol até marca de aferição;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Transferir a solução obtida para Becker de 50 mL de capacidade;
- ◆ Transferir 1 mL do extrato obtido para tubo de ensaio, tomando o cuidado de guardar a amostra restante até o final da análise, para caso necessário usar esta para novas diluições;
- ◆ Adicionar ao tubo 5 mL da Mistura Vanilina-HCl 8% 1:1;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Cobrir o tubo com papel alumínio;
- ◆ Agitar por 20 minutos em banho-maria a 30°C;
- ◆ Retirar do banho-maria e resfriar;



- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Realizar a leitura da amostra em Espectrofotômetro em λ 500 nm.

Observações Importantes:

- As leituras deverão ser efetuadas logo após a reação.
- As amostras devem ser moídas no momento da análise e conservadas sob refrigeração.

CÁLCULO:

Construir a Curva Padrão e obter a equação da reta. Fazer a equação da reta. Substituir a absorbância encontrada na equação da reta.

Exemplo:

Se pesar 600mg de amostra.

Diluição em 10 mL, então em 60mg/mL

$$\begin{array}{r} 60 \text{ mg} \text{ _____} \quad X \text{ mg/g} \\ 1000 \text{ mg} \text{ _____} \quad Y \text{ mg/g} \end{array}$$

RESÍDUOS:

O resíduo proveniente desta análise deverá ser estocado em bombona de 5 litros apropriada e identificada de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 003 e armazenada no entreposto do LAN para posterior encaminhamento para incineração de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 004.

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO DO RESÍDUO: R 075 - Resíduo do Método Folin-Ciocalteu.



BIBLIOGRAFIA:

PRICE, M. L.; Hagerman, A. E., Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon peas, and human mung beans. *J. Agric. Food Chemistry*, v.28, n.2, p.459-461,1980.



OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE TANINOS

FUNDAMENTO:

Através de uma série de diluições de uma solução padrão de concentração conhecida, é possível estabelecer uma curva de calibração para métodos colorimétricos, que relacione a concentração Taninos com valores de Absorbância.

OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO:

A partir da concentração da solução padrão a 0,05g/50mL de Catequina, realizar as diluições com conjuntos de adequados, segundo a Tabela I.

0,05g de Catequina _____ 50 mL Metanol
↓

Obtenção da Curva Padrão

TABELA I - Construção da Curva de Calibração

TUBO N°	mL da Solução Padrão	mL de Metanol	mL Mistura Vanilina 1:1	mL de HCl 4% em Metanol	Concentração de Catequina g/mL
Zero	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00
Branco	0,00	1,00	0,00	5,00	0,00
1	0,00	1,00	5,00	0,00	0,00
2	0,20	0,80	5,00	0,00	0,0002
3	0,40	0,60	5,00	0,00	0,0004
4	0,60	0,40	5,00	0,00	0,0006
5	0,80	0,20	5,00	0,00	0,0008
6	1,00	0,00	5,00	0,00	0,0010



PROCEDIMENTO:

- ◆ Em tubo de ensaio, transferir os volumes da solução padrão de Catequina e de Metanol indicados na Tabela I;
- ◆ Adicionar ao tubo 5 mL da Mistura Vanilina-HCl 8% 1:1;
- ◆ Cobrir o tubo com papel alumínio;
- ◆ Agitar por 20 minutos em banho-maria a 30°C;
- ◆ Retirar do banho-maria e resfriar;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Realizar a leitura da amostra em Espectrofotômetro em λ 500 nm.

Observação Importante:

- As leituras deverão ser efetuadas logo após a reação.

RESÍDUOS:

O resíduo desta análise deverá ser estocado em bombona apropriada e identificada de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 003 e armazenada no entreposto do LAN para posterior encaminhamento para tratamento de acordo com a Norma do Programa PGRQ - NR 004.

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO DO RESÍDUO: R 075 - Resíduo do Método Folin-Ciocalteu.

BIBLIOGRAFIA:

PRICE, M. L.; Hagerman, A. E., Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon peas, and human mung beans. J. Agric. Food Chemistry, v.28, n.2, p.459-461,1980.



PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE TANINOS

SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO 4%

Composição Química:

- ◆ Ácido Clorídrico - HCl - CAS 7647-01-0
- ◆ Álcool Metílico - Metanol - CH₄ - CAS 67-56-1

- ◆ Transferir cuidadosamente e em capela com o auxílio de uma proveta 5,4 mL de ácido Clorídrico p.a. (pureza mínima 37%), para balão volumétrico de 50 mL de capacidade contendo cerca de 20 mL de Metanol;
- ◆ Homogeneizar vagorosamente;
- ◆ Elevar o volume do balão *próximo* à marca de aferição com Metanol;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Deixar em repouso até esfriar;
- ◆ Completar o volume do balão até marca de aferição com Metanol;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Armazenar esta solução em frasco âmbar.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO 8%

Composição Química:

- ◆ Ácido Clorídrico - HCl - CAS 76-47-01-0
- ◆ Álcool Metílico - Metanol - CH₄ - CAS 67-56-1

- ◆ Transferir cuidadosamente e em capela com o auxílio de uma proveta 43,2 mL de ácido Clorídrico p.a. (pureza mínima 37%), para balão volumétrico de 200 mL de capacidade, já contendo cerca de 50 mL de Metanol;
- ◆ Homogeneizar vagorosamente;
- ◆ Elevar o volume do balão *próximo* à marca de aferição com Metanol;
- ◆ Homogeneizar bem;



- ◆ Deixar em repouso até esfriar;
- ◆ Completar o volume do balão até marca de aferição com Metanol;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Armazenar esta solução em frasco âmbar.

VANILINA 1%

Composição Química:

- ◆ Vanilina - $C_8H_8O_3$ - CAS 12-33-5
- ◆ Álcool Metílico - Metanol - CH_4 - CAS 67-56-1

- ◆ Pesar, em balança analítica, 2g de Vanilina p.a.;
- ◆ Transferir, quantitativamente para balão volumétrico de 200 mL de capacidade;
- ◆ Adicionar cerca de 50 mL de Metanol;
- ◆ Solubilizar bem;
- ◆ Completar o volume do balão à marca de aferição com Metanol;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Armazenar esta solução em frasco âmbar e em geladeira.

SOLUÇÃO DE VANILINA-HCl 8% 1:1

Composição Química:

- ◆ Solução de Vanilina 1%
- ◆ Solução de Ácido Clorídrico-Metanol 8%

- ◆ Transferir, com o auxílio de uma proveta, 100 mL da solução de ácido Clorídrico 8%-Metanol para becker de 250 mL de capacidade;
- ◆ Adicionar ao becker 100 mL da solução de Vanilina 1%;
- ◆ Homogeneizar bem;



Observação Importante:

- Esta mistura deverá ser efetuada momentos antes do uso, não podendo ser armazenada em geladeira.

SOLUÇÃO PADRÃO DE CATEQUINA - 0,001g/mL

Composição Química:

- ◆ Catequina - $C_{15}H_{14}O_6 \cdot xH_2O$ - CAS 225939-10-0
- ◆ Metanol - C_4H - CAS 67-56-1

- ◆ Pesar, em balança analítica 0,05g de Catequina;
- ◆ Transferir, quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL de capacidade;
- ◆ Adicionar cerca de 10 mL de Metanol, e;
- ◆ Solubilizar bem;
- ◆ Completar o volume do balão à marca de aferição com Metanol;
- ◆ Homogeneizar bem;
- ◆ Usar esta solução para a obtenção da Curva de Calibração para Determinação Colorimétrica de Taninos.



TABELA DE RESULTADOS:

CURVA PADRÃO:

PONTOS DA CURVA	CONCENTRAÇÃO DE CATEQUINA g/mL	LEITURA 1 $\lambda = 500 \text{ nm}$	LEITURA 2 $\lambda = 500 \text{ nm}$	LEITURA 3 $\lambda = 500 \text{ nm}$	MÉDIA LEITURA ABSORBÂNCIA $\lambda = 500 \text{ nm}$
Branco					
1					
2					
3					
4					
5					
6					

AMOSTRA:

AMOSTRA	LEITURA 1 $\lambda = 500 \text{ nm}$	LEITURA 2 $\lambda = 500 \text{ nm}$	LEITURA 3 $\lambda = 500 \text{ nm}$	MÉDIA LEITURA ABSORBÂNCIA $\lambda = 500 \text{ nm}$