

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (FOLIN-CIOCALTEU) - ESPECTROFOTOMETRIA

MATERIAIS

Reagentes

- Carbonato de sódio P.A. (PM= 106)
- Reagente Folin Ciocalteu
- Padrão de ácido gálico anidro (PM= 170,2) - pureza 99%
- Solventes usados na extração das amostras
- Água destilada ou água Mili-Q
- Extratos das amostras

Equipamentos e Vidrarias

- Balança analítica
- Balão volumétrico
- Papel alumínio
- Pipeta automática (100-1000 µL e 1000-5000 µL)
- Tubos de ensaio
- Agitador de tubos de ensaio (vortex)
- Cubetas de vidro
- Espectrofotômetro

PREPARO DAS SOLUÇÕES

A. Solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 10% - Volume: 100 mL

Pesar 10,06 g de Na_2CO_3 e diluir com água destilada para 100 mL, em balão volumétrico. Agitar bem, até a diluição completa da amostra. Armazenar em frasco de vidro âmbar.

B. Solução de Folin Ciocalteu 3% - Calcular o volume necessário antes do preparo.

Para preparar 100 mL, dilua 3 mL do reagente Folin Ciocalteu, com água, para um volume final de 100 mL em um balão volumétrico. Misturar bem a solução e armazenar em frasco de vidro âmbar.

C. Solução mãe de ácido gálico (200 mg/L) – Volume: 50 mL

Diluir 0,0101 g de ácido gálico 99% para um volume final de 50 mL com o solvente usado na extração da amostra, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar. Armazenar na geladeira por até 5 dias.

Método	Descrição	Versão	Elaboração	Data	Página
001	Fenólicos Totais – Folin Ciocalteu	2	Tiago Dias	25/05/2016	Página 1 de 6

CURVA DE CALIBRAÇÃO

- 1 Em cinco balões volumétricos de 10 mL, pipetar os volumes listados abaixo da solução mãe e completar com o solvente usado na extração da amostra.

Padrão	Solução mãe (mL)	Completar para* (mL)	Concentração final (mg AG/L)
P1	1,0	10	20
P2	2,0	10	40
P3	3,0	10	60
P4	4,0	10	80
P5	5,0	10	100

* Completar com o solvente que será usado para extrair as amostras

- 2 Em 15 tubos de ensaio de 5 a 10 mL cor âmbar ou envolvidos em papel alumínio, adicionar (em triplicata):
 - 0,25 mL das soluções de ácido gálico (P1 a P5)
 - 2,75 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 3%
- 3 Fazer dois tubos em branco contendo
 - 0,25 mL do solvente usado na extração
 - 2,75 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 3%
- 4 Agitar por 10 s no vortex;
- 5 Repousar por 5 minutos;
- 6 Acrescentar 0,25 mL da solução de carbonato de sódio a 10%
- 7 Agitar por 10 segundos no vortex;
- 8 Repousar por 60 minutos, à temperatura ambiente (na ausência de luz);
- 9 Ligar o espectrofotômetro 30 minutos antes da leitura, no comprimento de onda adequado (765 nm);
- 10 Zerar o espectrofotômetro (auto zero) e colocar os brancos nas duas cubetas. Deixar a cubeta de referência (R) com o branco durante a leitura.
- 11 Realizar leitura em espectrofotômetro a 765 nm, colocando a cubeta com solução para leitura na posição das amostras (S) do espectrofotômetro.

Método	Descrição	Versão	Elaboração	Data	Página
001	Fenólicos Totais – Folin Ciocalteu	2	Tiago Dias	25/05/2016	Página 2 de 6

- 12 A partir dos valores de concentração e absorbância das soluções padrão, construir a curva de calibração e obter os parâmetros a (coeficiente angular), b (coeficiente linear) e r^2 (coeficiente de correlação) da reta de regressão, conforme exemplo abaixo.

Tubo	Conc (mg/L)	Abs
1	20	0,1481
2	20	0,1571
3	20	0,1567
4	40	0,3106
5	40	0,3126
6	40	0,3114
7	60	0,4493
8	60	0,4414
9	60	0,4529
10	80	0,5931
11	80	0,6005
12	80	0,5996
13	100	0,7153
14	100	0,7476
15	100	0,7304

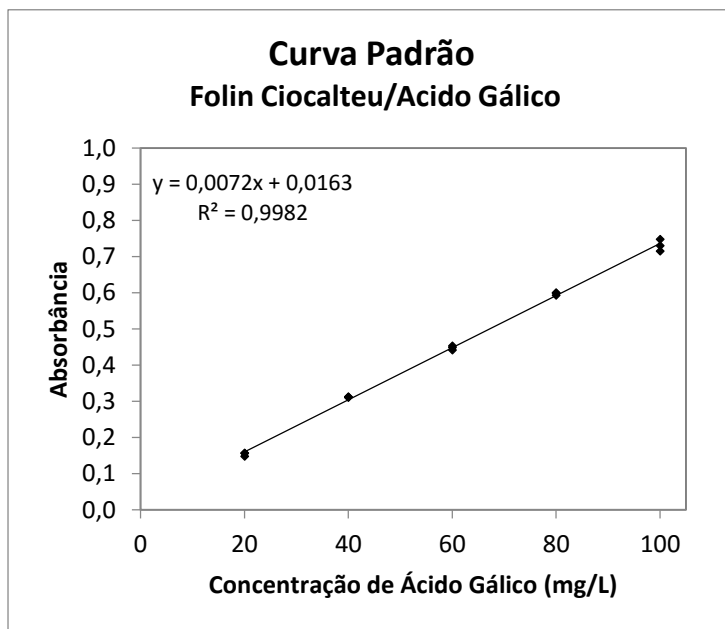


Figura 1. Curva padrão de ácido gálico (20-100 mg/L)
(Os valores são fictícios, apenas para ilustração)

- A curva de calibração é obtida no Excel após inserir um gráfico de dispersão e adicionar linha de tendência. Os parâmetros da curva são calculados usando as seguintes funções do Excel:

a	=INCLINAÇÃO ("Abs"; "Conc")
b	=INTERCEPÇÃO ("Abs"; "Conc")
r^2	= (CORREL ("Abs"; "Conc")) ^ 2

- "Abs" foi definido como o nome das células contendo os valores de absorbância, e "Conc" foi definido como o nome das células contendo valores de concentração (mg/L)
 - Para definir o nome para um intervalo de células no Excel, selecione o intervalo, clique em "Fórmulas" > "Definir nome", insira o nome do intervalo e clique em "OK".
- Caso r^2 seja menor que 0,99, deve-se refazer a curva de calibração.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS

- 1 **Realize a extração da amostra de acordo com um procedimento conveniente**
- 2 Em tubos de ensaio de 5 a 10 mL cor âmbar ou envolvidos em papel alumínio, adicionar (em triplicata):
 - 0,25 mL do extrato obtido da amostra
 - 2,75 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 3%
- 3 Fazer dois tubos em branco contendo
 - 0,25 mL do solvente usado na extração
 - 2,75 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 3%
- 4 Agitar por 10 s no vortex;
- 5 Repousar por 5 minutos;
- 6 Acrescentar 0,25 mL da solução de carbonato de sódio a 10%;
- 7 Agitar por 10 segundos no vortex;
- 8 Repousar por 60 minutos, à temperatura ambiente (na ausência de luz);
- 9 Ligar o espectrofotômetro 30 minutos antes da leitura, no comprimento de onda adequado (725 nm);
- 10 Zerar o espectrofotômetro (auto zero) e colocar os brancos nas duas cubetas. Deixar a cubeta de referência (R) com o branco durante a leitura.
- 11 Realizar leitura em espectrofotômetro a 765 nm, colocando a cubeta com solução para leitura na posição das amostras (S) do espectrofotômetro.
- 12 Anotar os valores de absorbância (Abs) para cada amostra e realizar os cálculos para determinar a concentração de ácido gálico equivalente (AGE) no extrato e o teor de AGE no alimento

Método	Descrição	Versão	Elaboração	Data	Página
001	Fenólicos Totais – Folin Ciocalteu	2	Tiago Dias	25/05/2016	Página 4 de 6

CÁLCULOS

Concentração de ácido gálico equivalente no extrato da amostra (C)

$$y = ax + b$$

Sendo y = Abs, x = Concentração (C):

$$Abs = a \cdot C + b \therefore C = (Abs - b)/a$$

Teor de ácido gálico equivalente no alimento

- Em base úmida

$$AGE \text{ (mg/100 g b.u.)} = \frac{(C \times V_E)/1000}{m} \times M \quad (\text{Eq. 1})$$

- Em base seca

$$AGE \text{ (mg/100 g b.s.)} = \frac{AGE(b.u.)}{100 - \%U} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo:

C	Concentração (mg/L) de ácido gálico equivalente no extrato
V _E	Volume do extrato (mL)
m	Massa (g) de amostra usada na extração (g)
M	Massa (g) obtida a partir da liofilização de 100 g de amostra úmida, para amostra analisada sem liofilizar (ou desidratar por outros métodos), M = 100;
%U	Teor de umidade do alimento úmido.

Observação

1. A absorbância lida para as amostras deve estar compreendida entre o menor e o maior valor de absorbâncias da curva de calibração (preferencialmente no meio) caso esteja fora dessa faixa, deverá ser feita uma nova extração, reduzindo ou aumentando a massa da amostra para que os valores lidos fiquem dentro da curva de calibração

Método	Descrição	Versão	Elaboração	Data	Página
001	Fenólicos Totais – Folin Ciocalteu	2	Tiago Dias	25/05/2016	Página 5 de 6

EXEMPLO

100 g de tomate foram liofilizados resultando em 10,25 g de produto liofilizado. Três porções de 0,5 g desse produto foram extraídas resultando em três extratos com 50 mL cada. Os extratos foram analisados pelo método de Folin-Ciocalteu, onde se obteve Abs(1) = 0,5741; Abs(2) = 0,5595 e Abs(3) = 0,5661, já descontado o valor do branco. Qual o teor de fenólicos totais (em base úmida e base seca) desse tomate, sabendo que: $a = 0,0072$; $b = 0,0163$ e Umidade = 92 %. Expresse o resultado como média $\pm$ desvio padrão.

Cálculos no Excel

Amostra úmida		Amostra liofilizada (M)	Secagem completa: sólidos				
100 g	Liofiliz. →	10,25 g	8,0 g				
↓							
		Amostragem	Extração	Leitura	Cálculos		
		m (g)	V_E (mL)	Abs	C (mg/L)	AGE (mg/100g b.u.)	AGE (mg/100g b.s.)
		0,5	50	0,5741	77,47	79,41	992,61
		0,5	50	0,5595	75,44	77,33	966,63
		0,5	50	0,5661	76,36	78,27	978,38
		Média				78,3	979,21
		D.P				1,04	13,01
		CV (%)				1,33	1,33%