

## Procedimento Operacional Padrão para Determinação de Fibras Solúvel e Insolúvel







ISSN 0103-6068 94

Dezembro, 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: (21) 3622-9600  
Fax: (21) 2410-1090 / 3622-9713  
Home Page: www.ctaa.embrapa.br  
E-mail: 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, Renata Torrezan, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, Nilvanete Reis Lima e André Luis do Nascimento Gomes

Secretária: Renata Maria Avilla Paldês

Revisor de texto: Comitê de Publicações

Normalização bibliográfica: Luciana Sampaio de Araújo

Ilustração da capa: André Guimarães de Souza

Tratamento das fotos e ilustrações: André Guimarães de Souza

Editoração eletrônica: André Guimarães de Souza

**1ª edição**

1ª impressão (2008): 200 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.

28p. ; 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, D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501 - Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (0xx21) 3622-9777 . 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) 3622-9777 E-mail: [taniass@ctaa.embrapa.br](mailto:taniass@ctaa.embrapa.br)

## **Patrícia Gonçalves Baptista de Carvalho**

Bióloga, D.Sc., 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) 3388-9898 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. 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) 3204-1000  
E-mail: [anavania@cpatu.embrapa.br](mailto:anavania@cpatu.embrapa.br)

**Carlos Farley Herbster Moura**

Engenheiro Agrônomo, DSc., Embrapa Agroindústria  
Tropical, Rua Dra Sara Mesquita, 2270, Bairro Pici.  
CEP 60511-110, Fortaleza, CE. Caixa Postal 3761.  
Telefone: (0xx85) 3299-1839  
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.

*Regina Celi Araujo Lago*

Chefe Geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos





# Sumário

<b>Introdução</b> .....	09
<b>Análise de Fibra Alimentar (FA)</b> .....	11
<b>Procedimento de Análise de Fibra Alimentar</b> .....	13
<b>Procedimento</b> .....	15
1 - Fibra Insolúvel .....	15
2 - Fibra Solúvel .....	17
3 - Análise de Proteína .....	19
4 - Análise de Cinzas .....	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*

## 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,  $\beta$ -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,  $\beta$ -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.

## 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 Glicídios:**

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 (?-amilase termo resistente), seguida de digestão enzimática com protease e posteriormente adição de enzima amiloglucosidase 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

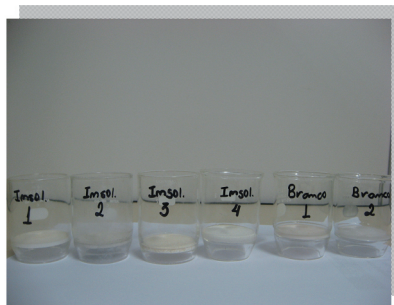
- Acetona -  $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$
- Etanol a 95% -  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})$
- Celite (auxiliar de filtração) - terra diatomácea com 87,5% de  $\text{SiO}_2$ , 1,0%;  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; 6,6%  $\text{CaO}$ ; 0,4%  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  e 1,5 %  $\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$ .
- 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% -  $(\text{NaOH})$
- Enzimas:



Banho Dubnoff



Kitasato



Cadinho com placa de vidro sinterizado

- alfa-amilase termo-estável - Termamyl - referência Sigma A-3306
- protease - referência Sigma P-3910
- 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.



**Fig. 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%.



**Fig. 2.** Montagem da vidraria para filtração



**Fig. 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

### • Preparo de Soluções

✓ Padronização da solução de Ácido sulfúrico 0,05M:

Pesar em erlenmeyer de 250 mL, ao décimo de miligramas, cerca de 0,1 g de carbonato de sódio previamente seco. Adicionar algumas gotas de solução indicadora. Titular com solução de ácido sulfúrico 0,05 molar.

$$M = \frac{m(\text{g}) \times \text{pureza}}{105,989 \times v(\text{mL})} \times 1000$$

Onde:

M = molaridade da solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$

m = peso de carbonato de sódio

105,989 = peso molecular do carbonato de sódio

V = volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gasto na titulação

✓ Catalisador

Triturar 350 g de sulfato de potássio P.A. e 0,35 g de selênio P.A., até obter mistura homogênea.

✓ Solução de hidróxido de sódio 40%:

Dissolver 800 g de NaOH em água destilada num balão volumétrico de 2 L.

✓ Solução de ácido bórico 5%:

Dissolver 50 g de ácido bórico grau reagente em aproximadamente 500mL de água destilada. Aquecer até que todo o ácido seja dissolvido. Esfriar e avolumar para 1000mL

✓ Solução indicadora:

Dissolver 0,1 g de verde de bromocresol e avolumar para 100 mL com etanol 95%. Dissolver 0,1 g de vermelho de metila e avolumar para 100 mL com etanol 95%. Juntar as duas soluções e homogeneizar.

### • Procedimento

Adicionar cerca de 0,7 g de catalisador no tubo de digestão. Transferir cuidadosamente, com o auxílio de uma espátula apropriada, o material do cadinho (celite + resíduo) para o tubo de digestão Kjeldhal. Acrescentar 12 mL de ácido sulfúrico P.A.



**Fig. 4.** Etapa de transferência de amostra para o tubo de digestão

Realizar a análise de um branco para cada bateria de amostras.

Colocar todos os tubos no bloco digestor e ajustar a temperatura para 100°C, depois elevar 50°C a cada 30 minutos até 350°C.

Deixar digerir até que o conteúdo do tubo se torne claro (verde ou azul claro e límpido). Após atingir este fase, deixar em digestão por mais 1 hora e esfriar até temperatura ambiente.

Levar o tubo de digestão ao destilador.

Adicionar 30 mL de solução de ácido bórico a 5% em erlenmeyer de 250 ou 300 mL, em seguida, no mínimo 4 gotas de indicador e colocar na saída do destilador.

Colocar 25 mL da solução de NaOH 40% no copo dosador do destilador, aguardar o início da produção de vapor e adicionar de uma só vez a solução de NaOH ao conteúdo do tubo de digestão.

Destilar até a virada da solução indicadora de rosa para verde. Após a virada, aguardar mais 10 minutos e interromper a destilação.

Titular o destilado com a solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05 molar padronizada até viragem de verde para rosa.

Desta etapa serão obtidos os seguintes valores: teor de proteínas do resíduo de fibra insolúvel da amostra; teor de proteínas do resíduo de fibra solúvel da amostra; teor de proteínas do resíduo de branco da análise de fibra insolúvel e teor de proteínas do resíduo de branco da análise de fibra solúvel.



**• Cálculo de Proteínas (Ptn)**

$$Ptn = M \times V \times 0,028 \times F_{\text{alimento}}$$

Onde:

M = molaridade do ácido sulfúrico utilizado

V = volume gasto de ácido

Falimento = fator de conversão de proteína para alimentos = 6,25

**4 - Análise de Cinzas****• Objetivo**

Determinação do teor de sais inorgânicos no resíduo de fibra.

**• Referências Normativas**

AOAC 2005, 18ª ed. - métodos: 923.03 (AOAC INTERNATIONAL, 2005)

**• Materiais**

- Cadinho de placa de vidro sinterizada com resíduo de fibra solúvel e insolúvel e branco
- Mufla a 525-550°C
- Dessecador com sílica gel
- Balança analítica (precisão de 0,1mg)
- Pinça tenaz

**• Procedimento**

Colocar os cadinhos em mufla, ligá-la e ajustar a temperatura para 525-550°C. Deixar aproximadamente por 5 horas, desligar a mufla e aguardar até que alcance 150°C. Retirar os cadinhos para dessecador, esfriar até temperatura ambiente e pesar.

**• Cálculo de cinzas**

$$Cz = P1 - P$$

Onde:

CZ = teor de cinzas

P1 = peso do cadinho com resíduo de cinzas das fibras

P = peso da tara do cadinho antes da determinação de fibra

### • Cálculo das Cinzas (Cza)

Para cada replicata:

$$Cz_a = Prc - P1$$

$Cz_a$  = massa de resíduo de cinzas

Prc = peso do cadinho mais resíduo de cinzas

P1 = peso do cadinho vazio

A correção de cinzas é dada pela média dos resultados obtidos das duas cinzas das replicatas e branco.

### • Cálculo da correção do branco da análise de fibra solúvel e insolúvel

$$\text{Correção do branco} = P_{Rb} - Ptn_b - Cz_b$$

Onde:

$P_{Rb}$  (cadinho de resíduo de branco - P1) = massa dos resíduos do branco após secagem em estufa

$Ptn_b$  = teor de proteína calculado para o branco

$Cz_b$  = massa de cinzas obtida do branco

### • Cálculo da Fibra Alimentar Solúvel ou Insolúvel

Onde:

$$\%FA = \frac{(P_{Ra} - Ptn_a - Cz_a - \text{correção do branco})}{Pa} \times 100$$

% FA - teor de fibra alimentar por 100 g de amostra

$P_{Ra}$  = Pr - P1 = média dos resíduos das amostras

$Ptn_a$  = correção de proteínas

$Cz_a$  = média das cinzas das amostras

Correção do branco = média dos resíduos obtidos

$Pa$  = média dos pesos da amostra em gramas

Fibra alimentar Total = fibra alimentar solúvel + fibra alimentar insolúvel

Os resultados devem ser expressos com duas casas decimais

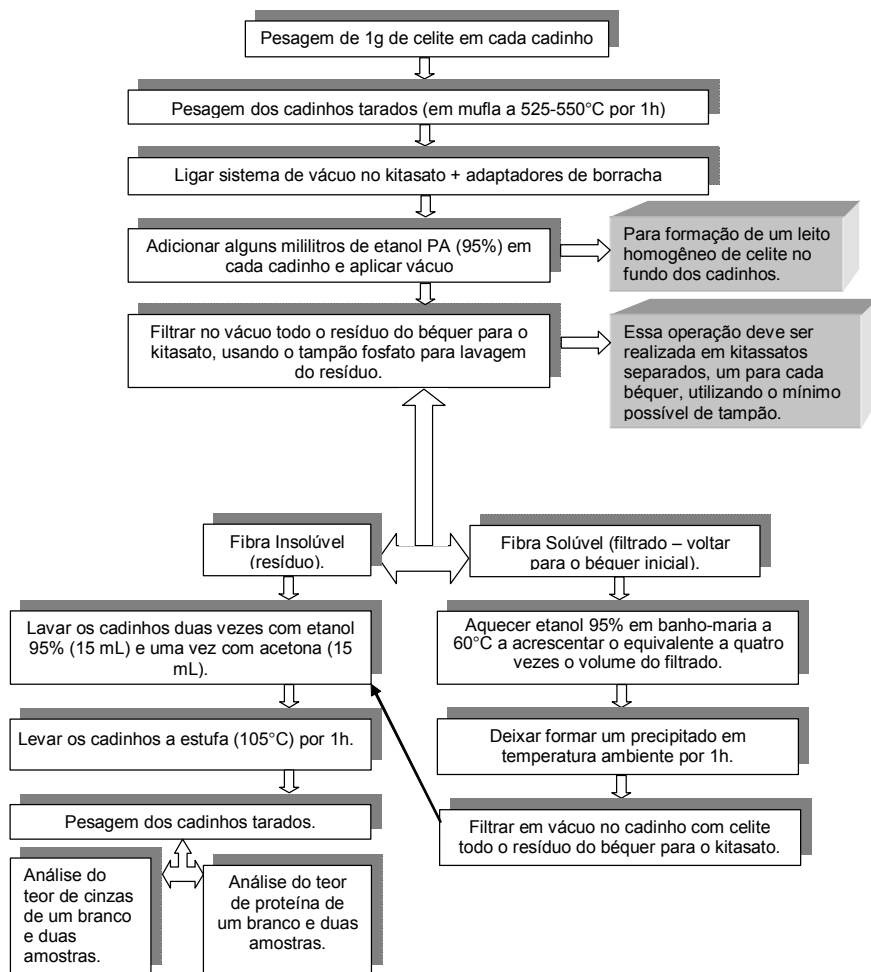


Fig. 5. Fluxograma das etapas do procedimento de análise de fibra alimentar solúvel e insolúvel

## Referências Bibliográficas

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists**. 9th ed. St. Paul, Minn.: AACC, 1995.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2005.

ASP, N. G.; JOHANSON, C. G. Techniques for measuring dietary fiber. Principal aims of methods and a comparison of results obtained by different techniques. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analysis of dietary fiber in food**. New York: M. Dekker, 1981. 276 p. p. 173-190. (Basic and clinical nutrition, v. 3).

BURKITT, D. P. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. **Cancer**, v. 28, n. 1, p. 3-13, 1971.

\_\_\_\_\_. Related disease - Related cause? **The Lancet**, v. 294, n. 7632, p.1229-1231, 1969.

BURKITT, D. P.; WALKER, A. R. P; PAINTER, N. S. Effect of dietary fibre on stools and transit-times, and its role in the causation of disease. **The Lancet**, v. 300, n. 7792, p. 1408-1411, 1972.

CLEAVE, T. L. The neglect of natural principles in current medical practice. **Journal of the Royal Navy Medical Service**, v. 42, p. 55-83, 1956.

FURDA, I. Fractionation and examination biopolymers from dietary fiber. **Cereal Foods World**, v. 22, p. 252-254, 1977.

HELLENDORRN, E. W.; NOORDHOFF, M. G.; SLAGMAN, J. Enzymatic determination of indigestible residue (dietary fiber) content of human food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, n. 10, p. 1461-1468, 1975.

HIPSLEY, E. H. Dietary 'fibre' and pregnancy toxæmia. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4833, p. 420-422, 1953.

LEE, S. C.; PROSKY, L.; DEVRIES, J. W. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods by enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 395-416, 1992.

LI, B. W.; CARDOZO, M. S. Determination of total dietary fiber in foods and products with little or no starch, non-enzymatic-gravimetric method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 3, p.687-689, 1994.

McCANCE, R. A. **McCance and Widdowson's the composition of foods**. 6th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. 537 p.

MONGEAU, R.; BRASSARD, R. Enzymatic-gravimetric determination in foods of dietary fiber as sum of insoluble and soluble fiber fractions: summary of collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 76, n. 4, p. 923-925, 1993.

PROSKY, L.; ASP, N. G.; FURDA, I.; DEVRIES, J. W.; SCHWEIZER, T. F.; HARLAND, B. F. The determination of total dietary fiber in foods, food products: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 68, n. 4, p. 677-679, 1985.

SOUTHGATE, D. A. T. Determination of carbohydrates in foods. II - unavailable carbohydrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 20, n. 6, p. 331-335, 1969.

SCHWEIZER, T. F.; WÜRSCH, P. Analysis of dietary fibre. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, n. 6, p. 613-619, 1979.

TROWELL, H. C. Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases, **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 417-427, 1976.







---

*Agroindústria de Alimentos*