

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Efeito da temperatura e tempo  
na determinação de proteínas  
em grãos, pela reação do biu-  
reto.

*Pedro Theis Maimone*  
Engenheiro Agrônomo

Orientador:

*Prof. Dr. Frederick Carl Strong III*

Dissertação apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência em Tecnologia de Alimentos.

- 1975 -

**UNICAMP**  
**BIBLIOTECA CENTRAL**

À memória de meu pai e irmão

PEDRO e GREGÓRIO

À minha mãe

MARIA

À minha esposa

CARMEN

À meus filhos.

## CONTEÚDO

	página
Resumo	
Summary	
1. Introdução .....	1
2. Revisão da Literatura .....	3
3. Materiais e Métodos .....	6
3.1. Amostras utilizadas .....	6
3.2. Reagentes .....	6
3.3. Equipamentos .....	7
3.4. Preparação das amostras .....	8
3.5. Efeito da temperatura e tempo na reação biuret to com proteína .....	9
3.5.1. Uso de Proteimax 90 .....	9
3.5.1.1. Uma amostra para cada tempera tura e tempo .....	9
3.5.1.2. Uma amostra para cada tempera tura e tomando uma alíquota - da solução para cada tempo ..	9
3.5.2. Uso de trigo integral .....	10
3.6. Provas de procedimentos.....	10
3.6.1. Prova de precisão com trigo integral .	10
3.6.2. Prova de precisão com Proteimax 90 ...	11
3.6.3. Prova de cumprimento da lei de Beer - com Proteimax 90 .....	11
3.7. Procedimento sugerido para grãos de cereais .	11
3.8. Aplicação do procedimento sugerido no arroz - integral e brunido .....	12
3.9. Determinação de umidade do arroz .....	13
3.10 Determinação do conteúdo de proteína do arroz pelo método microkjeldahl .....	13
3.11 Registro do espectro de absorção do complexo- proteína-cobre em Proteimax 90, trigo inte- - gral, arroz integral e arroz brunido .....	14

	página
3.12 Análise estatística .....	15
4. Resultados .....	17
5. Discussão dos resultados .....	41
6. Conclusões .....	46
7. Referências Bibliográficas .....	47
Agradecimentos .....	49

## R E S U M O

Algumas publicações recentes descrevem métodos rápidos (por exemplo 4 - 6 minutos de aquecimento com agitação) de determinação de proteína em trigo e farinha de soja desengordurada, utilizando a reação do biureto, seguidas de colorimetria ou espectrofotometria. O método depende do aquecimento a 60 ou 70°C durante curto espaço de tempo, com a finalidade de acelerar a dissolução e a formação de complexo. Os resultados dependem, criticamente, do tempo de agitação e da temperatura. Suspeitou-se que, elevando-se a temperatura com a finalidade de abreviar o tempo de reação, atingiria o ponto em que pudesse ocorrer desnaturação e hidrólise da proteína. Consequentemente, procedeu-se a um estudo destes fatores.

Os produtos empregados em primeiro lugar, foram um concentrado proteico de soja do comércio e trigo integral. Escolheram-se os reagentes de Deacon (sulfato cúprico e NaOH 0,5 M em isopropanol a 30%) devido à facilidade de remoção do excesso de cobre por filtração. Observou-se que à temperatura de 45°C e acima, foi impossível obter absorvância constante em função do tempo. Os melhores resultados foram obtidos a 40°C. A constância foi boa à temperatura ambiente e a 30°C, mas as absorvâncias foram menores que as obtidas a 40°C.

Baseados nos resultados obtidos, estabeleceu-se um procedimento geral para grãos de cereais, que emprega os reagentes de Deacon, agitação a 40°C durante 30 minutos, filtração e medição da absorvância a 550 nm contra um "branco" contendo a amostra, mas não o cobre. O método foi testado em várias amostras de arroz integral e brunido. As amostras foram também analisadas pelo método de microkjeldahl para determinação dos teores de nitrogênio. O coeficiente de correlação entre o método espectrofotométrico e o método de Kjeldahl foi 0,999 e o erro padrão da estimativa de linha de regressão foi de 0,019 unidades de absorvância.

## S U M M A R Y

A number of recent publications have described rapid methods (e.g. 4-6 minutes, exclusive of measurement) for determining protein in wheat and defatted soy meal using the biuret reaction and colorimetry or spectrophotometry. All depend on heating to 60° or 70° for a short, timed period to hasten dissolution and complex formation. Results are critically dependent on time of agitation and temperature. It was suspected that, in raising the temperature in order to shorten reaction time, the point had been reached where protein denaturation and hydrolysis may be occurring. Consequently a study of these factors was undertaken.

Materials used first were a commercial soy protein concentrate and whole wheat. The reagents of Deacon (copper sulfate and 0.5 M NaOH in 30% isopropanol) were chosen because of the ease of removal of excess copper by filtration. It was found that at temperatures of 45° and above, it was impossible to obtain absorbance that was constant with time. Best results were obtained at 40°. At room temperature and 30°, constancy was good, but absorbances remained less than those obtained at 40°.

From the experience of these results, a general procedure for cereal grains was devised, consisting of use of Deacon's reagents, agitation for 30 minutes at 40°, filtration, and measurement of absorbance at 550 nm against a blank containing sample but no copper. It was tested on a series of samples of brown rice and milled rice. They were also analyzed for total nitrogen by the microkjeldahl method. The coefficient of correlation between the spectrophotometric method and the Kjeldahl method was 0.999 and standard error of estimate of the regression line was 0.019 in absorbance units.

## 1. - INTRODUÇÃO

O conteúdo de proteínas em grãos e seus produtos é comumente determinado pelo método de Kjeldahl, ou qualquer uma de suas modificações. Este método apresenta inconvenientes, tanto em princípio, como na prática, pois determina o nitrogênio total, envolve procedimentos complicados, e requer tempo considerável. Por estas razões, vários métodos colorimétricos ou espectrofotométricos têm sido desenvolvidos, sendo o método de biureto o que maior atenção tem recebido por sua especificidade e simplicidade.

A reação de biureto baseia-se na formação, em meio alcalino, de um complexo de coordenação de cor violeta entre o íon cúprico e quatro átomos de nitrogênio das ligações peptídicas, dois de cada cadeia de peptídeos adjacentes.

Recentemente, vários métodos colorimétricos e espectrofotométricos, baseados na reação de biureto (4, 5, 8), que empregam alta-temperatura (70 - 60°C) para acelerar a reação, têm sido publicados. Um destes métodos rápidos foi testado pelo curso de pós-graduação, no Laboratório de Análises de Alimentos, e deu resultados variáveis. Pensou-se que a causa poderia ser a alta temperatura utilizada, pois nestas condições, é bem conhecido o fato que ocorre uma denaturação das proteínas. A partir daí iniciou-se uma pesquisa com os seguintes objetivos:

- a) - Estudar o efeito da temperatura e tempo de agitação na reação biureto com proteínas a fim de estabelecer a temperatura que dê suficiente velocidade de reação para obter absorbância constante num período de tempo conveniente;
- b) - Estabelecer um método para a determinação de proteínas em grãos de cereais, baseado na reação biureto, que seja rápido e preciso;

c) - Provar o método anteriormente estabelecido com uma série de amostras de um cereal, analisadas pelo método Kjeldahl.



## 2. - REVISÃO DA LITERATURA

A cor violeta-avermelhada, característica do complexo biureto-cobre em meio alcalino, foi primeiramente observada por Wiedemann - no ano de 1848, segundo citação de Kurzer (10).

Pinkney (14), informa que a reação de biureto foi adotada por Riegler em 1914, para estimar o conteúdo de proteínas em fluidos-biológicos, empregando albumina de ovo como padrão. Originalmente Pinkney (14) utilizou esta reação para determinar o conteúdo de proteínas em grãos e farinha de trigo, empregando solução alcalina de hidróxido de potássio 0,05 N, para peptizar as proteínas e tratando posteriormente o extrato com solução alcalina de sulfato cúprico e glicerol. A determinação foi feita à temperatura ambiente e com agitação. Os resultados obtidos foram correlacionados com as porcentagens de proteína determinadas pelo método Kjeldahl e com o volume de pão.

Jennings (7) modificou o método de Pinkney e aplicou-o para a determinação do conteúdo de nitrogênio de algumas variedades de trigo e cevada. Neste método modificado, a extração das proteínas e o desenvolvimento da cor do complexo biureto, ocorrem simultaneamente, numa solução alcalina de cobre e tartarato, empregando temperatura ambiente e agitação. O uso de tartarato de sódio e potássio, ao invés de glicerol, incrementou em 13% a sensibilidade do método. O principal fator que afeta a correlação entre o conteúdo de nitrogênio determinado pelo método Kjeldahl e a cor produzida, é a variação nas absorvidades das proteínas extraídas. Outro fator que diminui o grau de correlação anterior, é a presença da cor escura do grão de trigo e cevada.

Pinkney (15) modificou seu método biureto para estimar o conteúdo de proteínas em trigo e farinha, com a finalidade de fazê-lo mais simples e exato. Utilizou o reagente alcalino de cobre estabilizado com tartarato de sódio e potássio para a extração e reação simultâneas. Ele chegou à mesma conclusão que Jennings (7) de que o

tartarato é superior ao glicerol para estabilizar o cobre no reagente biureto.

Parial e Rooney (13) aplicaram o método modificado de Pinkney(14) para estimar o conteúdo de proteínas em arroz integral e brunido e estabeleceram equações de regressão e coeficientes de correlação entre proteína determinada pelo método Kjeldahl e absorvância do biureto.

Johnson e Crane (8), desenvolveram um método simples e rápido - para determinar o conteúdo de proteínas em grãos, empregando carbonato básico de cobre em pó como fonte de cobre na reação biureto. A determinação foi feita à temperatura ambiente e com agitação.

Crane (3) propôs o uso de liquidificador no método de Johnson e Crane (8), para acelerar a reação biureto na determinação de proteínas em trigo. Segundo este método, o tempo da determinação por amostra pode ser reduzida a 10 minutos.

Deacon (4) modificou o método de Johnson e Crane (8) e aplicou-o para a determinação de proteínas em soja desengordurada. As amostras foram agitadas em hidróxido de sódio 0,5 M, contendo álcool isopropílico ou normal e hidróxido de cobre a 70°C. A absorvância da solução filtrada foi lida a 550 nm contra água e o conteúdo de proteína foi obtido de uma curva de calibração de absorvância do biureto, e a porcentagem de proteína determinada pelo método Kjeldahl.

Greenaway e Johnson (5) estabeleceram um método baseado na reação biureto para determinar o conteúdo de proteínas em trigo em 5 minutos, empregando alta temperatura (60°C) e agitação magnética. O método utiliza os reagentes de Johnson e Crane (8).

Mitzuda e Mitsunaga (11) encontraram que o amido, substâncias coloridas e lipídeos extraíveis com solução alcalina do reagente biureto, interferem na determinação de proteínas em trigo, sendo o amido o que maior efeito teve no método biureto. Eles recomendam o uso de alguns solventes orgânicos para retardar a solubilização do amido e melhorar a correlação entre proteína determinada pelo método Kjeldahl e a absorvância do biureto.

Noll, Simmonds e Bushuk (12), reportaram refinamentos do método de Johnson e Crane (8), para melhorar a velocidade e conveniência de uso. Eles propõem o uso de um reagente biureto modificado, baseado na adição de isopropanol em igual volume ao reagente biureto de Jennings (7), melhorando assim a estabilidade, a velocidade de reação com proteína e a filtrabilidade. Recomendaram incubação a 40°C, sem agitação, durante 10 a 30 minutos, para proteínas em solução ou proteínas de farinhas. Para seu procedimento rápido, propuseram 60°C durante 1 minuto.

Greenaway e Davis (6) adaptaram ao colorímetro de Udy, o método biureto de 5 minutos para conteúdo de proteínas em trigo (5) e aplicaram-no a 50 amostras de sorgo, aveia, centeio, milho e trigo, analisadas pelo método Kjeldahl e calcularam seus coeficientes de correlação.

O sub-comitê de métodos em proteína da Associação Americana de Químicos de Cereais (The AACC Protein Methods Subcommittee) está cooperando na padronização desse método e o conteúdo de proteínas está sendo determinado em 10 amostras de trigo por todos os membros

### 3. - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras Utilizadas

- 3.1.1. Concentrado protéico de soja "Proteimax 90" produzido pela SANBRA (Sociedade Algodoeira do Nordeste Brasileiro).
- 3.1.2. Trigo integral, variedade IAC-5, cultivado em Maringá, Paraná.
- 3.1.3. Arroz integral e brunido das variedades: Batataes, Pratão precoce; IR-841-63-5-L-9-3-3-; IAC-47; IAC-1246; IAC-120; IR-665-4-5-5- e IAC-435. Todas estas variedades foram cultivadas na Fazenda Santa Eliza, Instituto Agronômico, Campinas, SP.

#### 3.2. Reagentes

- 3.2.1. Reagentes de Deacon (4):
  - 3.2.1.1. Solução alcoólica alcalina: Dissolver 20g. de hidróxido de sódio em água, agregar - 300 ml. de álcool isopropílico e diluir - a 1.000 ml.
  - 3.2.1.2. Solução de sulfato de cobre (25% p/v): - Dissolver 25 g. de sulfato de cobre penta hidratado em água morna e diluir a 100 ml.
  - 3.2.1.3. Álcool isopropílico
- 3.2.2. Reagentes para determinação de nitrogênio pelo método microkjeldahl:
  - 3.2.2.1. Ácido sulfúrico concentrado 96%.
  - 3.2.2.2. Catalizadores: sulfato de potássio e óxido de mercúrio.
  - 3.2.2.3. Solução concentrada de hidróxido de sódio 500 g/l.

- 3.2.2.4. Solução de tiosulfato de sódio 25%.
- 3.2.2.5. Solução de ácido bórico 2%.
- 3.2.2.6. Solução de ácido clorídrico 0,02 N.
- 3.2.2.7. Solução de verde de bromocresol mais vermelho de metila (0,06 g. de vermelho de metila, 0,15 g. de verde de bromocresol em 100 ml. de etanol absoluto.

### 3.3. Equipamentos

- 3.3.1. Descascador de amostras Mc Gill.
- 3.3.2. Brunidor de amostras Mc Gill nº 3.
- 3.3.3. Moinho Weber, equipado com peneira de 0,024 polegadas.
- 3.3.4. Banho-maria com temperatura controlada, W.A.T., - Krakow, Typ UTU, ao qual adaptou-se uma caixa de isopor de 20 X 20 X 20 cm., a fim de utilizar a agitação magnética.
- 3.3.5. Agitador magnético FisAtom.
- 3.3.6. Banho-maria com temperatura e agitação mecânica controláveis, B. Braun Messungen, AG.
- 3.3.7. Incubadora com agitação mecânica, New Brunswick - Scientific Co. Modelo G-27.
- 3.3.8. Chapa aquecedora com temperatura e agitação magnética controláveis, Fisher Scientific Co., Modelo 118.
- 3.3.9. Panela metálica de 5 l.
- 3.3.10 Cronômetro "Seiko"
- 3.3.11 Conjunto de filtração à vácuo, usando cadinho de porcelana porosa Halden-Wanger 84.2P2 H.
- 3.3.12 Espectrofotômetro UV-visible, Perkin-Elmer Coleman - 124 D, equipado com registrador Perkin-Elmer 56.

- 3.3.13. Espectrofotômetro Perkin-Elmer 402.
- 3.3.14. Estufa à vácuo, Fanem, modelo 099.
- 3.3.15. Digestor microkjeldahl, Fanem.
- 3.3.16. Destilador microkjeldahl de uma só peça, Thomas.
- 3.3.17. Outros equipamentos de uso comum no laboratório, como balança analítica, termômetro, erlenmeyers, tubos de ensaio, pipetas volumétricas, balões aferidos e de Kjeldahl, bureta, provetas, beckers, cápsulas de alumínio, dessecadores, etc.

#### 3.4. Preparação das amostras

-----

- 3.4.1. Concentrado protéico de soja, Proteimax 90, não requereu nenhuma preparação, pois vem da indústria, finamente pulverizado. Trabalhou-se à base de uma amostra de 250 g.
- 3.4.2. Trigo integral - foi obtida uma amostra de 1 kg. e 500 g. foram moidos no moinho Weber, de maneira a atravessar a peneira com orifícios de 0,024 polegadas de diâmetro. Conservou-se em um frasco de vidro tampado, à temperatura ambiente.
- 3.4.3. Arroz - uma amostra de 2 kg. de arroz em casca, de cada variedade, foi obtida da seção de Cereais do Instituto Agrônomo de Campinas. Estas amostras foram descascadas no descascador Mc Gill e a metade do arroz integral resultante, foi brunido no brunidor Mc Gill nº 3, empregando-se um peso de 1 libra durante 20 segundos. As amostras de arroz integral e brunido, foram moídas no moinho Weber, até atravessarem a peneira de 0,024 pol. e foram conservadas nas mesmas condições do trigo integral.

### 3.5. Efeito de temperatura e tempo na reação biureto com proteína

---

#### 3.5.1. Uso de Proteimax 90:

3.5.1.1. Uma amostra para cada temperatura e tempo. O seguinte procedimento foi ensaiado: Pesou-se exatamente uma amostra de 120 mg. em papel - parafinado e transferiu-se para um erlenmeyer de 250 ml.; agregou-se 2 ml. de álcool isopropílico, 100 ml. de solução alcoólica alcalina e 1 ml. de solução de sulfato de cobre. Colocou-se o erlenmeyer na panela com água (a qual estava sobre a chapa aquecedora) à temperatura desejada.

Agitou-se magnéticamente durante o tempo pré fixado, depois do qual removeu-se do banho e filtrou-se à vácuo, usando cadinho de porcelana porosa. A absorbância da solução foi lida a 550 nm contra água no espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman 124 D.

As temperaturas dos ensaios estiveram na faixa de 26 a 70°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e os tempos variaram segundo a temperatura utilizada de 1 a 60 minutos. Os ensaios foram variáveis em tempo para cada temperatura, porém usando uma amostra para cada tempo.

3.5.1.2. Uma amostra para cada temperatura e tomando uma alíquota da solução para cada tempo. O seguinte procedimento foi ensaiado: Pesou-se exatamente uma amostra de 120 mg. em papel parafinado e transferiu-se para um becker becker de 600 ml. Agregou-se 2 ml. de álcool isopropílico e 100 ml. de solução alcoólica-alcalina. Colocou-se o becker na caixa de isopor adaptada ao banho-maria "Krakow".

Aos 5 minutos agregou-se 1 ml. de solução de cobre (tempo zero). A cada tempo desejado, tomou-se alíquotas de aproximadamente 7 ml. usando-se pipetas na posição invertida, e de imediato, filtrou-se à vácuo, em porcelana porosa. A absorvância da solução filtrada foi lida a 550 nm contra água, no espectrofotômetro Perkin-Elmer 402.

As temperaturas dos ensaios estiveram na faixa de 25 a 70°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) e os tempos variaram segundo a temperatura utilizada de 1 a 112 minutos.

### 3.5.2. Uso de trigo integral:

Empregou-se o procedimento descrito em 3.5.1.2, exceto que o peso da amostra foi de 1.000 g. e a leitura da absorvância da solução filtrada foi feita contra branco sem cobre. (O branco sem cobre leva amostra e os reagentes, exceto solução de sulfato de cobre).

As temperaturas dos ensaios estiveram na faixa de 30 a 50°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) e os tempos variaram segundo a temperatura empregada de 1 a 60 minutos.

## 3.6. Provas de procedimentos

-----

### 3.6.1. Prova de precisão de um procedimento com trigo integral:

O procedimento foi o seguinte: Pesou-se exatamente 1.000 g. de amostra em papel parafinado e transferiu-se para um erlenmeyer de 250 ml. Agregou-se 2 ml. de álcool isopropílico, 100 ml. de solução alcoólica alcalina e 1 ml. de solução de sulfato de cobre. Tampou-se o erlenmeyer com papel de alumínio, e colocou-se na incubadora com agitação mecânica a 40°C, agitando-se a 200 rpm durante 60 minutos. Em seguida, filtrou-se a solução à vácuo em cadinho de porcelana porosa. A absorvância da solução filtrada foi lida a 550 nm., contra branco sem cobre no espectrofotômetro Perkin -



Elmer Coleman 124 D:

Foram efetuadas quatro repetições e calculou-se a absorvância média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (vide fórmulas em 3.12.).

3.6.2. Prova de precisão de um procedimento com Proteimax 90  
O procedimento foi descrito em 3.6.1., variando agora somente o peso da amostra (140 mg.) e as leituras de absorvância das soluções filtradas, que foram feitas contra água em lugar de branco sem cobre.

Foram feitas seis repetições e calculou-se a absorvância média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (vide fórmulas em 3.12.).

3.6.3. Prova de cumprimento da lei de Beer de um procedimento com Proteimax 90.

O procedimento foi descrito em 3.6.1., variando o peso das amostras empregadas (80; 100; 120; 140 e 160 mg.) e as leituras de absorvância das soluções filtradas que foram feitas contra água em lugar de branco sem cobre.

Foram feitas três repetições para cada peso, e calculou-se a absorvância média.

### 3.7. Procedimento sugerido para grãos de cereais

-----  
Moer a amostra representativa que atravessa a peneira com orifícios de 0,024 pol. de diâmetro. Pesar num erlenmeyer de 125 ml. o cereal peneirado (0,500 g. de trigo; 1,000 g. de arroz ou o peso correlacionado de outro cereal, de acordo com seu teor de proteína). Agregar 2 ml. de álcool isopropílico, 50 ml. de solução alcoólica alcalina e 1 ml. de solução de sulfato de cobre. Tampar o erlenmeyer, colocá-lo num banho-maria com temperatura e agitação mecânica controladas, a 40°C e agitar a 120 golpes/min. durante 30 minutos. (Pode-se também usar uma incubadora com agitação mecânica a 40°C e agitar a 200 rpm.) . Filtrar à vácuo, usando-

cadinhos de porcelana porosa e tirar os primeiros mililitros do filtrado. Recolher aproximadamente 15 ml. do filtrado num tubo de ensaio, colocado dentro do Kitasato. Ler a absorbância das soluções coloridas (que contêm o complexo proteína - cobre) contra o branco sem cobre, num espectrofotômetro a 550 nm. Corrigir as leituras por grama de matéria seca do ce real.

Relacionar as leituras corrigidas com o teor de proteína, me diante os seguintes passos:

- a) selecionar várias amostras do cereal analisado, com ampla faixa de teor de proteína;
- b) correlacionar as porcentagens de proteína em base seca pe lo método Kjeldahl, com as leituras de absorbância corrigidas por grama de matéria seca, e calcular a equação da linha de regressão;
- c) da equação, fazer o gráfico para converter as leituras de absorbância corrigidas a porcentagem de proteína.

### 3.8. Aplicação do procedimento sugerido no arroz integral e bruno

-----

O peso das amostras utilizadas, variou de 0,75 a 1,2 g. com exatidão de 0,1 mg. Empregou-se o banho-maria com temperatura e agitação mecânica controladas "Braun" e o espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman 124 D. As leituras de absorbância das soluções coloridas foram feitas contra água, e, à parte, foram lidas as absorbâncias dos brancos sem cobre contra água.

Para as soluções coloridas foram feitas, em geral, três repe tições, e para os brancos sem cobre, duas repetições.

Calculou-se a absorbância por grama em base úmida e por grama de matéria seca.

A diferença das absorbâncias corrigidas por grama de matéria seca das soluções coloridas e os brancos sem cobre, foi considerada a absorbância por grama de matéria seca do complexo proteína-cobre e calculou-se a média desta.

Foram empregadas as variedades de arroz indicadas em 3.1.3. nas quais determinou-se o conteúdo de umidade e de proteína pelo método microkjeldahl como descreve-se em 3.9. e 3.10. respectivamente.

Calculou-se a equação da linha de regressão para correlacionar a porcentagem de proteína em base seca pelo método microkjeldahl e a absorbância por grama de matéria seca do complexo proteína-cobre. Também foi feito o gráfico para converter as absorbâncias por grama de matéria seca do complexo proteína-cobre, em porcentagem de proteína em base seca e indicou-se os valores obtidos para arroz integral e brunido das oito variedades analisadas.

Calculou-se também o coeficiente de correlação entre a absorbância por grama de matéria seca do complexo proteína-cobre e a porcentagem de proteína em base seca pelo método microkjeldahl e o erro padrão da estimativa da linha de regressão.

As fórmulas empregadas nesta análise estatística, indicam-se em 3.12.

### 3.9. Determinação da umidade do arroz

Seguiu-se o método nº 14.003 da AOAC (1). As amostras foram pesadas em cápsulas de alumínio e levadas à estufa à vácuo de 25 mm. de Hg e 100°C até obtenção do peso constante (5 horas). Depois de alcançar a temperatura ambiente no dessecador, as amostras foram novamente pesadas, e a diferença de peso foi tomada como o conteúdo de umidade.

As determinações foram feitas em duplicata para arroz integral e arroz brunido de cada variedade.

### 3.10 Determinação do conteúdo de proteína do arroz pelo método microkjeldahl

Seguiu-se o método 42.014 da AOAC (1) trocando as quantidades de reagentes em forma proporcional ao peso de amostra utilizado.

Usou-se o fator 5.95 recomendado por Jones (9) para a conversão do nitrogênio total à proteína, e calculou-se a porcentagem de proteína em base seca.

As determinações foram feitas com três repetições para arroz integral e brunido de cada variedade.

3.11 Registro do espectro de absorção do complexo proteína-cobre em Proteimax 90, trigo integral, arroz integral e arroz brunido.

Seguiu-se o procedimento descrito em 3.7., variando o peso das amostras, segundo o material empregado. Utilizou-se o banho-maria com temperatura e agitação mecânica controladas "Braun".

Os pesos das amostras foram os seguintes:

Proteimax 90 : 0,1121 g.

Trigo integral : 0,7882 g.

Arroz integral

(var. IR-665-4-5-5) : 1,9075 g.

Arroz brunido

(var. IR-665-4-5-5) : 1,9277 g.

Para os brancos sem cobre, empregou-se os mesmos pesos de amostra.

O registro foi feito no espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman 124 D, equipado com registrador Perkin-Elmer 56, sob as seguintes condições:

Velocidade de varredura : Rápida (Fast)

Escala de absorbância : 0 - 1

Largura espectral : 1 nm.

Velocidade do cilindro

do registrador : 60 mm/min.

Potencial : 10 mV

### 3.12. Análise estatística segundo Alder e Roessler (2):

---

#### 3.12.1. Média

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

onde:

$\bar{X}$  = média

$x_i$  = observações individuais

$\Sigma$  = somatória

$n$  = número de observações

#### 3.12.2. Desvio padrão

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

onde:

$S$  = desvio padrão

$x_i$  = observações individuais

$\bar{X}$  = média

$n$  = número de observações

#### 3.12.3. Coeficiente de variação

$$C.V = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$$

onde:

$C.V$  = coeficiente de variação em %

$S$  = desvio padrão

$\bar{X}$  = média

#### 3.12.4. Equação da linha de regressão

$$Y = a + bX \quad (\text{para qualquer linha reta})$$

onde:

Y = variável dependente

a = intersecção sobre a ordenada Y.

b = pendente da linha

X = variável independente

Usou-se o método dos quadrados mínimos para calcular esta linha:

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

onde:

$\bar{Y}$  = média da variável dependente

$\bar{X}$  = média da variável independente

### 3.12.5. Coeficiente de correlação

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}$$

onde:

r = coeficiente de correlação

x = variável independente

y = variável dependente

### 3.12.6. Erro padrão da estimativa da linha de regressão

$$S_{\hat{e}} = \sqrt{\frac{\sum (y - y_e)^2}{n}}$$

onde :

$S_{\hat{e}}$  = erro standard da estimativa

y = variável independente (valores experimentais)

$y_e$  = variável independente (valores calculados pela equação de regressão)

n = número de pares de valores

#### 4. - RESULTADOS

##### 4.1. Efeito da temperatura e tempo na reação biureto com proteína.

Nas figuras 2 e 3 apresentam-se os resultados obtidos do efeito da temperatura e tempo na reação biureto com Proteimax 90, usando os procedimentos descritos em 3.5.1.1. e 3.5.1.2., respectivamente. A figura 6 mostra o efeito estudado com trigo integral, quando empregou-se o procedimento descrito em 3.5.1.2. com leves modificações (vide 3.5.2.)

Encontrou-se, deste estudo, que a temperatura de 40°C, deu a maior constância nas leituras de absorvância com respeito ao tempo de aquecimento.

##### 4.2. Provas de procedimentos

A Tabela I mostra os resultados obtidos da prova de precisão do procedimento descrito em 3.6.1. com trigo integral.

Na Tabela II estão os resultados da prova de precisão do procedimento descrito em 3.6.1. com leves modificações (vide 3.6.2.), quando foi aplicada a Proteimax 90.

Na Tabela III apresentam-se os resultados da prova de cumprimento da lei de Beer do procedimento descrito em 3.6.1., com as modificações indicadas em 3.6.3., quando foi aplicada a Proteimax 90. A Figura 4 refere-se à Tabela III, a fim de colocar em evidência a linealidade dos resultados.

##### 4.3. Aplicação do procedimento sugerido no arroz integral e brunido

Nas Tabelas IV, V e VI, encontram-se, respectivamente, os resultados das absorvâncias experimentais e calculadas das soluções coloridas, dos brancos sem cobre e do complexo proteína-cobre para o arroz integral, enquanto que as Tabelas IX, X e XI mostram o anterior para o arroz brunido.

As Tabelas VII e VIII mostram, respectivamente, os resultados de umidade e proteína pelo método microkjeldahl para o arroz integral; no entanto, as Tabelas XII e XIII apresentam o anterior para arroz brunido.

A Figura 9 corresponde à linha de regressão obtida entre os valores de absorvância por grama de matéria seca do complexo proteína-cobre e as porcentagens de proteína em base seca, pelo método microkjeldahl para o arroz brunido e integral.

A equação da linha de regressão foi:

$$Y = 0,055X - 0,116$$

O coeficiente de correlação ( $r$ ) e o erro padrão da estimativa da linha de regressão ( $S\hat{e}$  ou  $S_{y.x}$ ) em termos de absorvância foram  $0,999^{**}$  e  $0,019$ , respectivamente.

#### 4.4. Registro dos espectros de absorção

-----

Nas Figuras 1, 5, 7 e 8 apresentam-se os espectros de absorção do complexo proteína-cobre para Proteimax 90, trigo integral, arroz integral e arroz brunido, respectivamente.



TABELA I

PROVA DE PRECISÃO DE UM PROCEDIMENTO COM TRIGO INTEGRAL<sup>a)</sup>

nº repetições	absorbância	abs. média	desvio padrão	coeficiente de variação %
1	0,440	0,447	0,013	2,9
2	0,466			
3	0,438			
4	0,443			

a) vide procedimento em 3.6.1.

TABELA II

PROVA DE PRECISÃO DE UM PROCEDIMENTO COM PROTEIMAX 90<sup>a)</sup>

nº repetições	absorbância	abs. média	desvio padrão	coeficiente de variação %
1	0,437	0,441	0,005	1,1
2	0,444			
3	0,434			
4	0,448			
5	0,437			
6	0,444			

a) vide procedimento em 3.6.2.

TABELA III

PROVA DE CUMPRIMENTO DA LEI DE BEER DE UM PROCEDIMENTO COM  
PROTEIMAX 90 <sup>a)</sup>

nº repetições	peso (mg)	absorbância	absorbância média
1	80	0,246	0,249
2	80	0,256	
3	80	0,245	
4	100	0,344	0,329
5	100	0,333	
6	100	0,311	
7	120	0,353	0,376
8	120	0,379	
9	120	0,396	
10	140	0,475	0,457
11	140	0,445	
12	140	0,450	
13	160	0,511	0,512
14	160	0,513	
15	160	0,512	

a) vide procedimento em 3.6.3.

TABELA IV

APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO SUGERIDO NO ARROZ INTEGRAL. ABSORBÂNCIAS EXPERIMENTAIS E CALCULADAS DAS SOLUÇÕES COLORIDAS<sup>a)</sup>

Variedade	peso amostra umida (g)	A <sup>(b)</sup>	A/g <sup>(c)</sup>	fator base seca	A/g.m.s. <sup>(d)</sup>
Batataes	0,8171	0,538	0,658	1,139	0,749
	0,8852	0,650	0,734		0,836
	0,7508	0,537	0,715		0,814
	1,0791	0,682	0,632		0,720
	1,0894	0,724	0,665		0,757
Pratão Pre-coce	1,0421	0,695	0,667	1,135	0,757
	0,9276	0,569	0,613		0,696
	1,0079	0,653	0,648		0,735
	1,1145	0,710	0,637		0,723
	1,0460	0,670	0,641		0,727
IR-841-63-5-	1,1136	0,634	0,569	1,126	0,641
L-9-3-3	0,9726	0,562	0,578		0,651
	0,8261	0,504	0,610		0,687
	1,0285	0,561	0,545		0,614
	1,0994	0,632	0,575		0,647
IAC-47	1,1599	0,570	0,491	1,130	0,555
	0,9790	0,509	0,520		0,588
	0,9942	0,510	0,513		0,580
IAC-1246	0,9235	0,470	0,509	1,137	0,579
	0,8706	0,476	0,547		0,622
	0,8673	0,480	0,553		0,629
IAC-120	0,9181	0,467	0,509	1,138	0,579
	0,9594	0,484	0,504		0,574
	0,9768	0,484	0,495		0,563
IR-665-4-5-5	1,1835	0,502	0,424	1,141	0,484
	1,0270	0,479	0,466		0,532

	1,0268	0,426	0,415		0,474
IAC-435	1,0269	0,393	0,383	1,139	0,436
	0,9490	0,405	0,427		0,486
	1,0082	0,400	0,397		0,452
	1,0467	0,446	0,426		0,485
	1,0551	0,418	0,396		0,451

- a) vide procedimento em 3.7. e variações em 3.8.
- b) absorvância da solução colorida contra água.
- c) absorvância da solução colorida por grama em base umida.
- d) absorvância da solução colorida por grama de matéria seca.

TABELA V

APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO SUGERIDO NO ARROZ INTEGRAL. ABSORBÂNCIAS EXPERIMENTAIS E CALCULADAS DOS BRANCOS SEM COBRE<sup>a)</sup>

Variedade	peso amostra úmida (g)	A <sup>(b)</sup>	A/g <sup>(c)</sup>	A/g média	fator base seca	A/g.m.s <sup>(d)</sup>
Batataes	1,0221	0,111	0,109	0,103	1,139	0,117
	1,0091	0,097	0,096			
Pratão - Precoce	1,0928	0,120	0,110	0,104	1,135	0,118
	1,0675	0,105	0,098			
IR-841-63- 5-L-9-3-3	1,0000	0,096	0,096	0,089	1,126	0,100
	1,1176	0,092	0,082			
IAC-47	1,0233	0,081	0,079	0,067	1,130	0,076
	1,1718	0,064	0,055			
IAC-1246	1,0500	0,138	0,131	0,122	1,137	0,139
	1,1268	0,126	0,112			
IAC-120	1,0522	0,104	0,099	0,128	1,138	0,146
	1,0581	0,165	0,156			
IR-665-4- 5-5-	1,0690	0,052	0,049	0,047	1,141	0,054
	1,0566	0,048	0,045			
IAC-435	1,0461	0,143	0,137	0,139	1,139	0,157
	1,0402	0,146	0,140			

a) vide procedimento em 3.7. e variações em 3.8.

b) absorvância do branco sem cobre contra água.

c) absorvância do branco sem cobre por grama em base úmida

d) absorvância do branco sem cobre por grama de matéria seca.

TABELA VI

APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO SUGERIDO NO ARROZ INTEGRAL. ABSORBÂNCIAS CALCULADAS DO COMPLEXO PROTEÍNA-COBRE.

Variedade	A/g.m.s. (a) da solução colorida	A/g.m.s. (b) do branco sem cobre	A/g.m.s. do complexo proteína-cobre	Média (c)
Batataes	0,749	0,117	0,632	0,658
	0,836		0,719	
	0,814		0,697	
	0,720		0,603	
	0,757		0,640	
Pratão - Precoce	0,757	0,118	0,639	0,610
	0,696		0,578	
	0,735		0,617	
	0,723		0,605	
	0,727		0,609	
IR-841-63-5- L-9-3-3	0,641	0,100	0,541	0,548
	0,651		0,551	
	0,687		0,587	
	0,614		0,514	
	0,647		0,547	
IAC-47	0,555	0,076	0,479	0,498
	0,588		0,512	
	0,580		0,504	
IAC-1246	0,579	0,139	0,440	0,471
	0,622		0,483	
	0,629		0,490	
IAC-120	0,579	0,146	0,433	0,426
	0,574		0,428	
	0,563		0,417	
IR-665-4- 5-5	0,484	0,054	0,430	0,443
	0,532		0,478	
	0,474		0,420	
IAC-435	0,436	0,157	0,279	0,305
	0,486		0,329	
	0,452		0,295	
	0,485		0,328	
	0,451		0,294	

a) Vide última coluna da tabela IV.

b) vide última coluna da tabela V.

c) refere-se ao complexo proteína-cobre.

TABELA VII

## CONTEÚDO DE UMIDADE NAS VARIEDADES DE ARROZ INTEGRAL

Variedade	peso amostra úmida (g)	peso matéria seca (g)	umidade %	umidade média %	Fator base seca
Batataes	1,4478	1,2707	12,23	12,17	1,139
	1,4289	1,2558	12,11		
Pratão precoce	1,7030	1,4989	11,99	11,90	1,135
	1,6243	1,4327	11,80		
IR-841-63-5-L- 9-3-3	1,5443	1,3716	11,18	11,18	1,126
IAC-47	1,5245	1,3498	11,46	11,52	1,130
	1,3857	1,2253	11,58		
IAC-1246	1,4765	1,2986	12,05	12,06	1,137
	1,4485	1,2737	12,07		
IAC-120	1,4836	1,3029	12,18	12,16	1,138
	1,4036	1,2333	12,13		
IR-665-4-5-5	1,3181	1,1572	12,21	12,39	1,141
	1,2613	1,1029	12,56		
IAC-435	1,8021	1,5843	12,09	12,18	1,139
	1,9606	1,7202	12,26		

TABELA VIII

## CONTEÚDO DE PROTEÍNA EM ARROZ INTEGRAL PELO MÉTODO MICROKJELDAHL

Variedade	Peso amostra úmida (g)	Volume de HCl 0,02174 N gasto (ml)	Proteína <sup>a)</sup> %	Proteína <sup>b)</sup> média %	Fator base seca	Proteína <sup>c)</sup> média %																																																																																													
Batataes	0,3224	21,6	12,13	12,21	1,139	13,91																																																																																													
	0,3625	24,6	12,29				Pratão - Precoce	0,3123	20,0	11,60	11,61	1,135	13,18	0,2724	17,5	11,63		0,2730	17,5	11,61				IR-841-63-5-	0,2719	15,4	10,26	10,24	1,126	11,53	L-9-3-3	0,2627	14,8	10,20		0,2593	14,7	10,27				IAC-47	0,3734	20,2	9,80	10,15	1,130	11,47	0,3101	18,4	10,75	0,3309	18,1	9,91	IAC-1246	0,2814	14,4	9,27	9,25	1,137	10,52	0,2452	12,5	9,23	0,2487	12,7	9,25	IAC-120	0,3776	18,0	8,63	8,78	1,138	9,99	0,2961	14,6	8,93	0,3153	15,3	8,79	IR-665-4-5-5	0,2457	11,4	8,40	8,61	1,141	9,82	0,2424	11,8	8,82	IAC-435	0,3047	12,4	7,37	7,39	1,139	8,42	0,2886	11,7
Pratão - Precoce	0,3123	20,0	11,60	11,61	1,135	13,18																																																																																													
	0,2724	17,5	11,63					0,2730	17,5	11,61				IR-841-63-5-	0,2719	15,4	10,26	10,24	1,126	11,53	L-9-3-3	0,2627	14,8	10,20		0,2593	14,7	10,27				IAC-47	0,3734	20,2	9,80	10,15	1,130	11,47	0,3101	18,4	10,75		0,3309	18,1	9,91				IAC-1246	0,2814	14,4	9,27	9,25	1,137		10,52	0,2452	12,5				9,23	0,2487	12,7	9,25	IAC-120	0,3776		18,0	8,63	8,78				1,138	9,99	0,2961	14,6	8,93	0,3153	15,3	8,79	IR-665-4-5-5	0,2457	11,4	8,40	8,61	1,141	9,82	0,2424		11,8	8,82	IAC-435				0,3047	12,4
	0,2730	17,5	11,61																																																																																																
IR-841-63-5-	0,2719	15,4	10,26	10,24	1,126	11,53																																																																																													
L-9-3-3	0,2627	14,8	10,20																																																																																																
	0,2593	14,7	10,27																																																																																																
IAC-47	0,3734	20,2	9,80	10,15	1,130	11,47																																																																																													
	0,3101	18,4	10,75																																																																																																
	0,3309	18,1	9,91																																																																																																
IAC-1246	0,2814	14,4	9,27	9,25	1,137	10,52																																																																																													
	0,2452	12,5	9,23																																																																																																
	0,2487	12,7	9,25																																																																																																
IAC-120	0,3776	18,0	8,63	8,78	1,138	9,99																																																																																													
	0,2961	14,6	8,93																																																																																																
	0,3153	15,3	8,79																																																																																																
IR-665-4-5-5	0,2457	11,4	8,40	8,61	1,141	9,82																																																																																													
	0,2424	11,8	8,82																																																																																																
IAC-435	0,3047	12,4	7,37	7,39	1,139	8,42																																																																																													
	0,2886	11,7	7,34																																																																																																
	0,3157	13,0	7,46																																																																																																

a)  $N \times 5,95$ ; % em base úmida

b) % em base úmida

c) % em base seca



TABELA IX

APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO SUGERIDO NO ARROZ BRUNIDO. ABSORBÂNCIAS EXPERIMENTAIS E CALCULADAS DAS SOLUÇÕES COLORIDAS<sup>a)</sup>

Variedade	Peso amostra úmida (g)	A <sup>b)</sup>	A/g <sup>c)</sup>	fator base seca	A/g.m.s. <sup>d)</sup>
Batataes	0,9633	0,591	0,614	1,136	0,698
	0,9174	0,516	0,562		0,638
	1,2136	0,628	0,517		0,588
	1,0660	0,607	0,569		0,647
Pratão Precoce	1,3234	0,640	0,484	1,137	0,550
	0,9816	0,496	0,505		0,574
	1,0561	0,616	0,583		0,663
	1,1606	0,624	0,538		0,611
IR-841-63-5-L-9-3-3	1,0585	0,500	0,472	1,134	0,535
	0,9810	0,486	0,495		0,561
	1,0531	0,472	0,448		0,508
IAC-47	0,9800	0,471	0,481	1,136	0,546
	1,0298	0,473	0,459		0,521
	1,0117	0,487	0,481		0,546
IAC-1246	1,1643	0,444	0,381	1,134	0,432
	1,0798	0,488	0,452		0,513
	0,9836	0,410	0,417		0,473
IAC-120	1,0120	0,410	0,405	1,137	0,460
	1,1136	0,450	0,404		0,459
	1,1615	0,458	0,394		0,448
IR-665-4-5-5	0,9806	0,382	0,390	1,135	0,443
	0,9486	0,379	0,400		0,454
	1,0300	0,426	0,414		0,470
IAC-435	1,0557	0,328	0,311	1,141	0,355
	1,0706	0,350	0,327		0,373
	1,0653	0,350	0,329		0,375

a) vide procedimento em 3.7. e variações em 3.8.

b) absorvância da solução colorida contra água

c) absorvância da solução colorida por grama em base úmida

d) absorvância da solução colorida por grama de matéria seca

TABELA X

APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO SUGERIDO NO ARROZ BRUNIDO. ABSORBÂNCIAS  
EXPERIMENTAIS E CALCULADAS DOS BRANCOS SEM COBRE<sup>a)</sup>

Variedade	Peso amostra úmida (g)	A <sup>b)</sup>	A/g <sup>c)</sup>	A/g média	fator base seca	A/g.m.s. <sup>d)</sup>
Batataes	1,0511	0,050	0,048	0,044	1,136	0,050
	1,0310	0,040	0,039			
Pratão precoce	1,1477	0,041	0,036	0,035	1,137	0,040
	1,0941	0,036	0,033			
IR-841-63-5-L- 9-3-3	1,1063	0,028	0,025	0,047	1,134	0,053
	1,0402	0,072	0,069			
IAC-47	1,0454	0,066	0,063	0,058	1,136	0,066
	1,3705	0,071	0,052			
IAC-1246	1,1531	0,061	0,053	0,051	1,134	0,058
	1,0314	0,051	0,049			
IAC-120	1,0038	0,026	0,026	0,025	1,137	0,028
	1,2006	0,029	0,024			
IR-665-4-5-5	1,0654	0,030	0,028	0,024	1,135	0,027
	1,1819	0,024	0,020			
IAC-435	1,0494	0,040	0,038	0,049	1,141	0,056
	1,0163	0,060	0,059			

a) vide procedimento em 3.7. e variações em 3.8.

b) absorvância do branco sem cobre contra água

c) absorvância do branco sem cobre por grama em base úmida

d) absorvância do branco sem cobre por grama de matéria seca

TABELA XI

APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO SUGERIDO NO ARROZ BRUNIDO. ABSORBÂNCIAS  
CALCULADAS DO COMPLEXO PROTEÍNA-COBRE

Variedade	A/g.m.sa) da solução colorida	A/g.m.sb) do branco sem cobre	A/g.m.s do complexo proteína-cobre	Média <sup>c)</sup>
Batataes	0,698	0,050	0,648	0,593
	0,638		0,588	
	0,588		0,538	
	0,647		0,597	
Pratão precoce	0,550	0,040	0,510	0,560
	0,574		0,534	
	0,663		0,623	
	0,611		0,571	
IR-841-63-5-L- 9-3-3	0,535	0,053	0,482	0,482
	0,561		0,508	
	0,508		0,455	
IAC-47	0,546	0,066	0,480	0,472
	0,521		0,455	
	0,546		0,480	
IAC-1246	0,432	0,058	0,374	0,415
	0,513		0,455	
	0,473		0,415	
IAC-120	0,460	0,028	0,432	0,428
	0,459		0,431	
	0,448		0,420	
IR-665-4-5-5	0,443	0,027	0,416	0,429
	0,454		0,427	
	0,470		0,443	
IAC-435	0,355	0,056	0,299	0,312
	0,373		0,317	
	0,375		0,319	

a) vide última coluna da Tabela IX

b) vide última coluna da Tabela X

c) refere-se ao complexo proteína-cobre

TABELA XII

CONTEÚDO DE UMIDADE NAS VARIEDADES DE ARROZ BRUNIDO

Variedade	Peso amostra úmida (g)	Peso matéria seca (g)	Umidade %	Umidade média %	Fator base seca
Batataes	2,1147	1,8620	11,95	11,95	1,136
Pratão precoce	2,1227	1,8648	12,15	12,07	1,137
	1,5608	1,3739	11,98		
IR-841-63-5-L-	1,9982	1,7715	11,35	11,78	1,134
9-3-3	2,2804	2,0020	12,20		
IAC-47	1,4377	1,2661	11,94	11,95	1,136
	1,6314	1,4364	11,95		
IAC-1246	1,4536	1,2792	12,00	11,82	1,134
	1,3481	1,1912	11,64		
IAC-120	1,7612	1,5496	12,01	12,02	1,137
	1,6140	1,4198	12,03		
IAC-665-4-5-5	1,6512	1,4539	11,95	11,93	1,135
	1,8765	1,6532	11,90		
IAC-435	2,1634	1,8974	12,30	12,32	1,141
	1,6074	1,4091	12,34		

TABELA XIII

## CONTEÚDO DE PROTEÍNA EM ARROZ BRUNIDO PELO MÉTODO MICROKJELDAHL

Variedade	Peso amostra úmida (g)	Volume de HCl 0,02174 N gasto (ml)	Proteína <sup>a)</sup> %	Proteína <sup>b)</sup> média %	Fator base seca	Proteína <sup>c)</sup> média %
Batataes	0,2600	17,1	11,91	11,86	1,136	13,47
	0,2648	17,35	11,87			
	0,2303	15,0	11,80			
Pratão precoce	0,2419	14,5	10,86	10,74	1,137	12,21
	0,2782	16,2	10,55			
	0,2767	16,5	10,80			
IR-841-63-5-L-	0,3142	17,3	9,97	9,87	1,134	11,20
9-3-3	0,2669	14,4	9,77			
IAC-47	0,2588	13,1	9,17			
	0,2485	12,6	9,18			
	0,2073	10,5	9,17			
IAC-1246	0,2504	11,8	8,53	8,56	1,134	9,71
	0,2829	13,5	8,64			
	0,3181	14,95	8,51			
IAC-120	0,2969	12,4	8,41	8,48	1,137	9,64
	0,1986	9,4	8,57			
	0,2722	12,7	8,45			
IR-665-4-5-5	0,2776	13,1	8,55	8,44	1,135	9,58
	0,3133	14,4	8,32			
	0,2164	10,1	8,45			
IAC-435	0,2381	8,8	6,69	6,78	1,141	7,73
	0,2880	10,85	6,82			
	0,2519	9,5	6,83			

a)  $N \times 5,95$ ; % em base úmida

b) % em base úmida

c) % em base seca

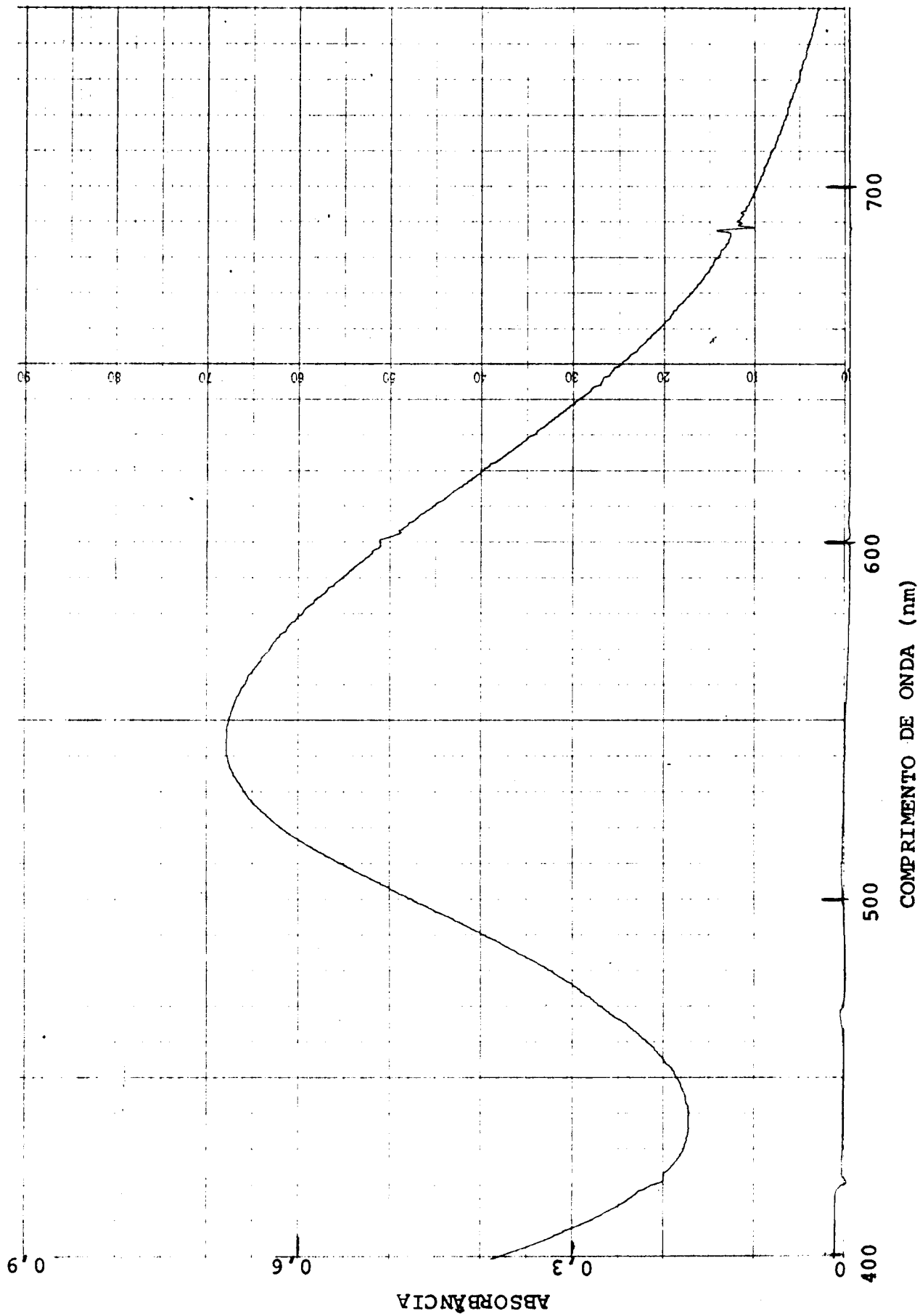


FIGURA 1.- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO PROTEÍNA-COBRE PARA PROTEIMAX 90

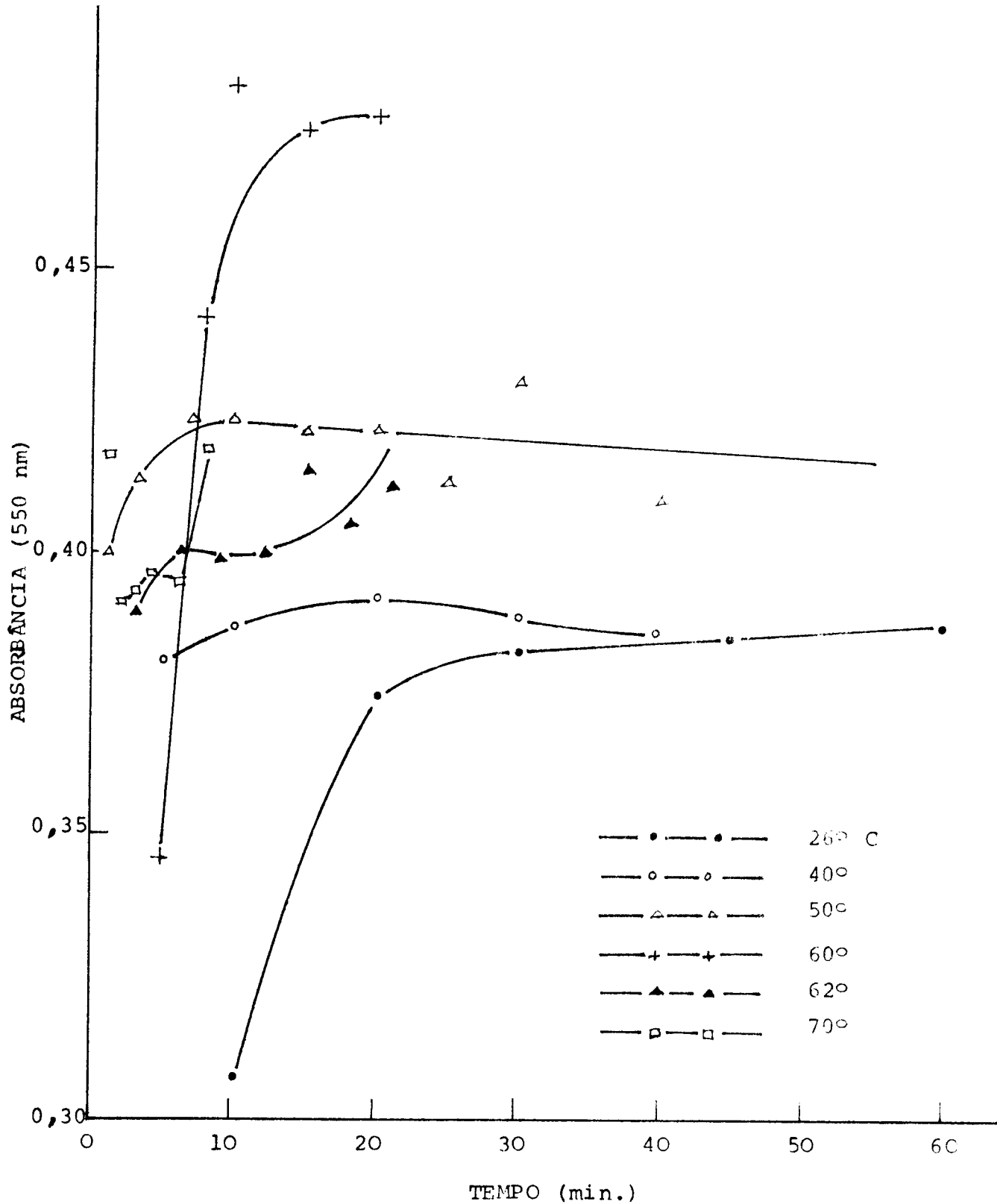


FIGURA 2.- EFEITO DA TEMPERATURA E TEMPO NA REAÇÃO BIURETO COM PROTEIMAX 90, USANDO UMA AMOSTRA PARA CADA TEMPERATURA E TEMPO

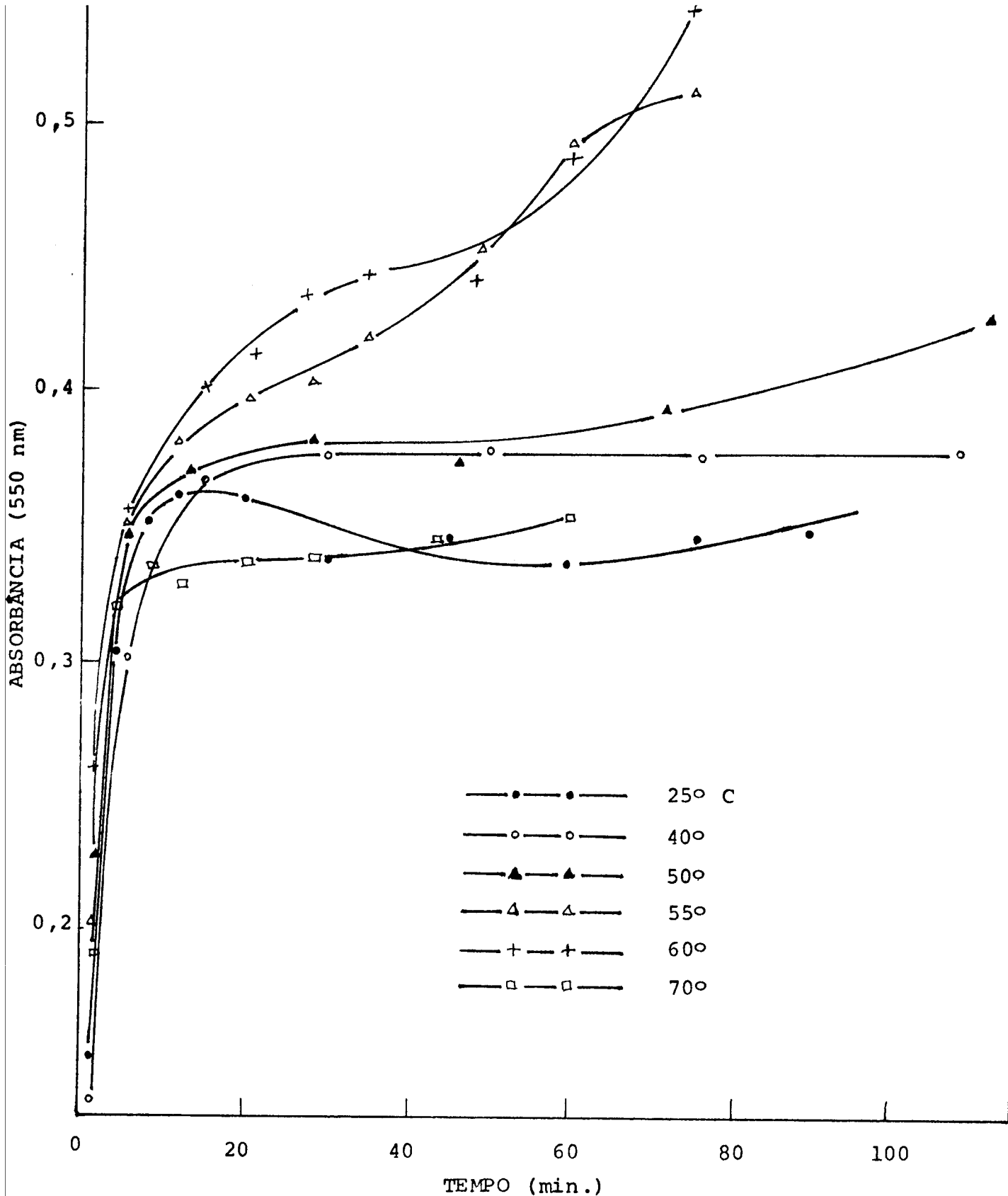


FIGURA 3.- EFEITO DA TEMPERATURA E TEMPO NA REAÇÃO BIURETO COM PROTEIMAX 90, USANDO UMA AMOSTRA PARA CADA TEMPERATURA E TOMANDO ALIQUOTA PARA CADA TEMPO



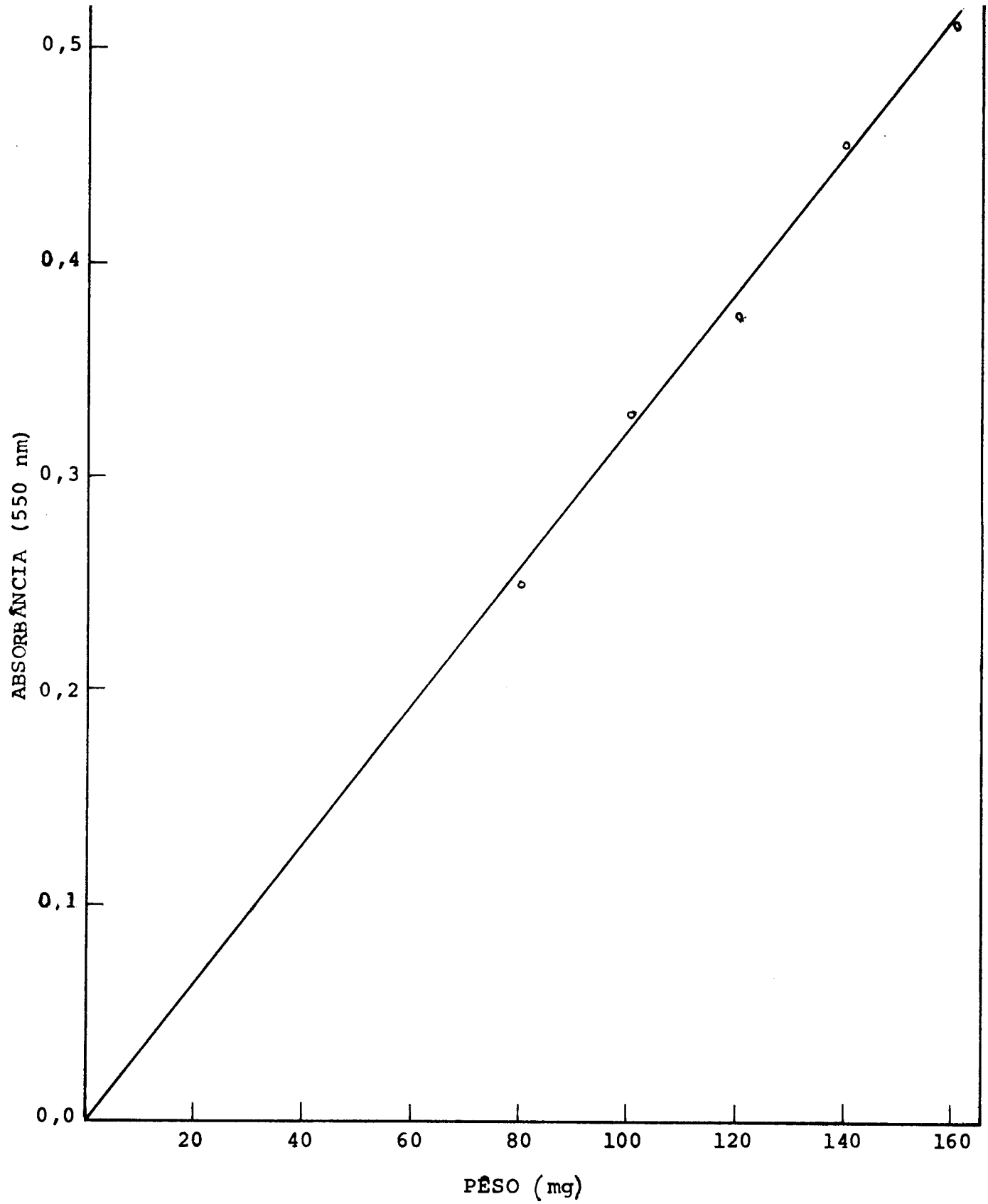


FIGURA 4.- ABSORBÂNCIAS MÉDIAS CONTRA PÊSOS DE PROTEIMAX 90,  
SEGUNDO TABELA III

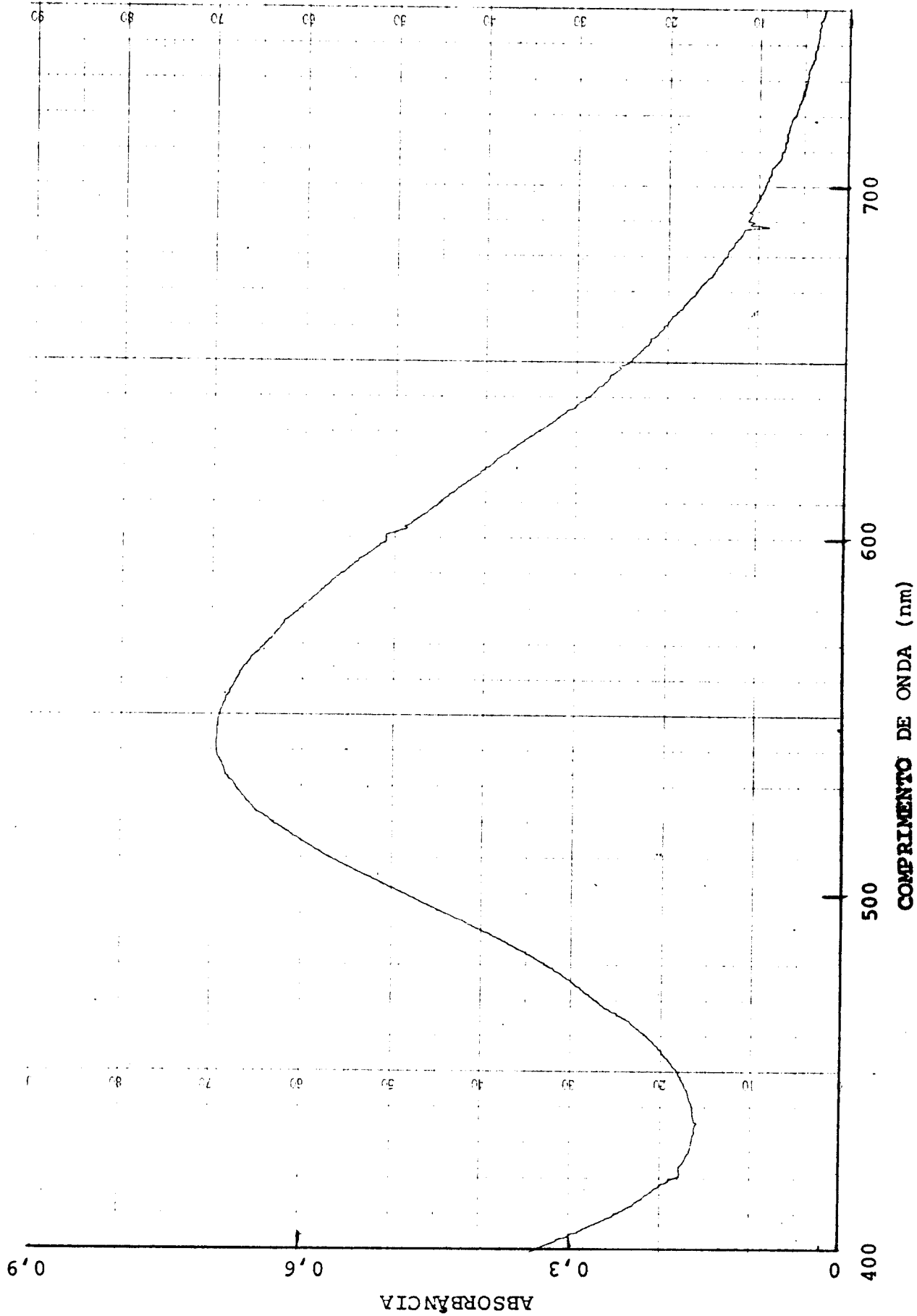


FIGURA 5.- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO PROTEÍNA-COBRE PARA TPIGG INTEGRAL

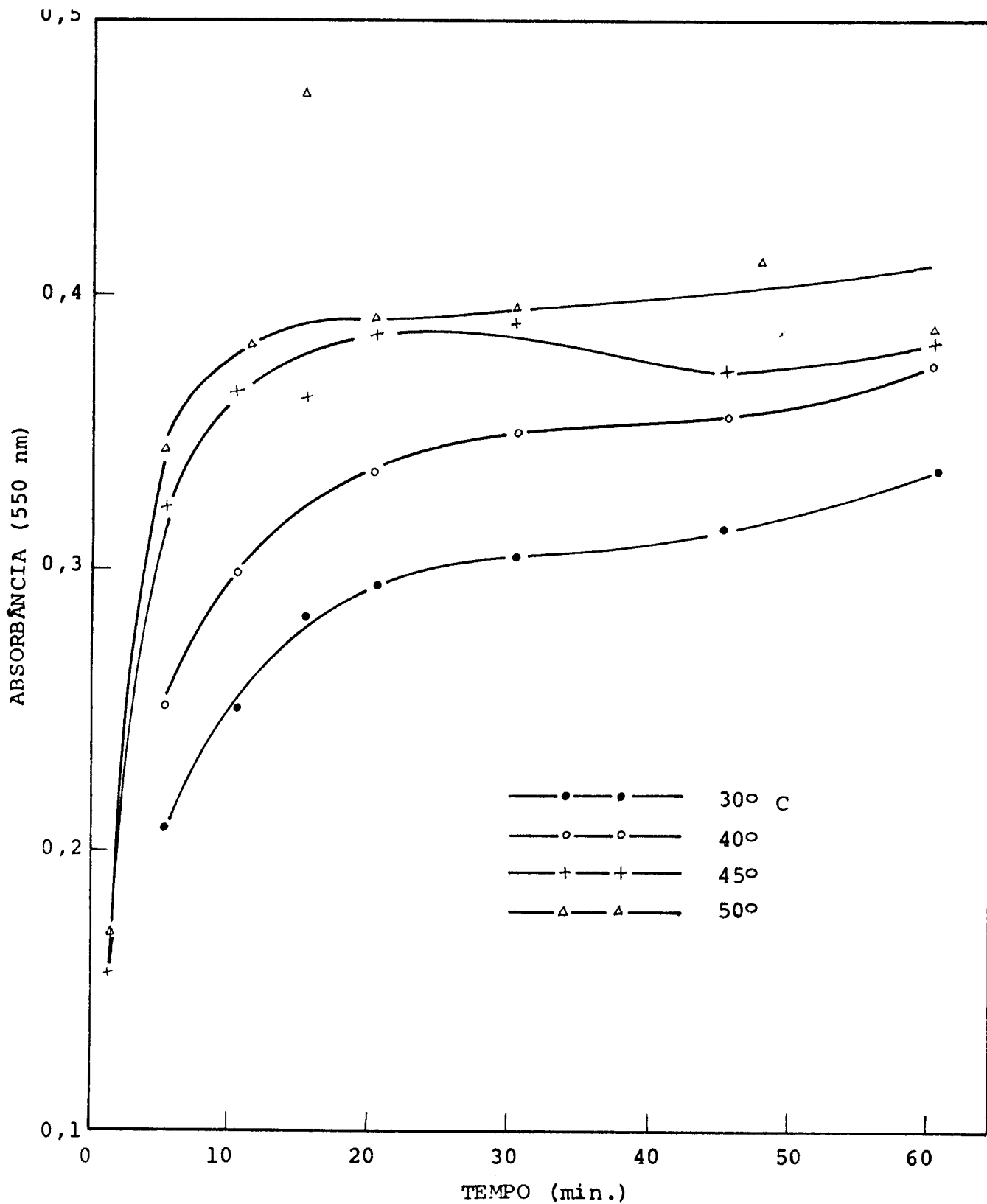


FIGURA 6.- EFEITO DA TEMPERATURA E TEMPO NA REAÇÃO BIURETO COM TRIGO INTEGRAL

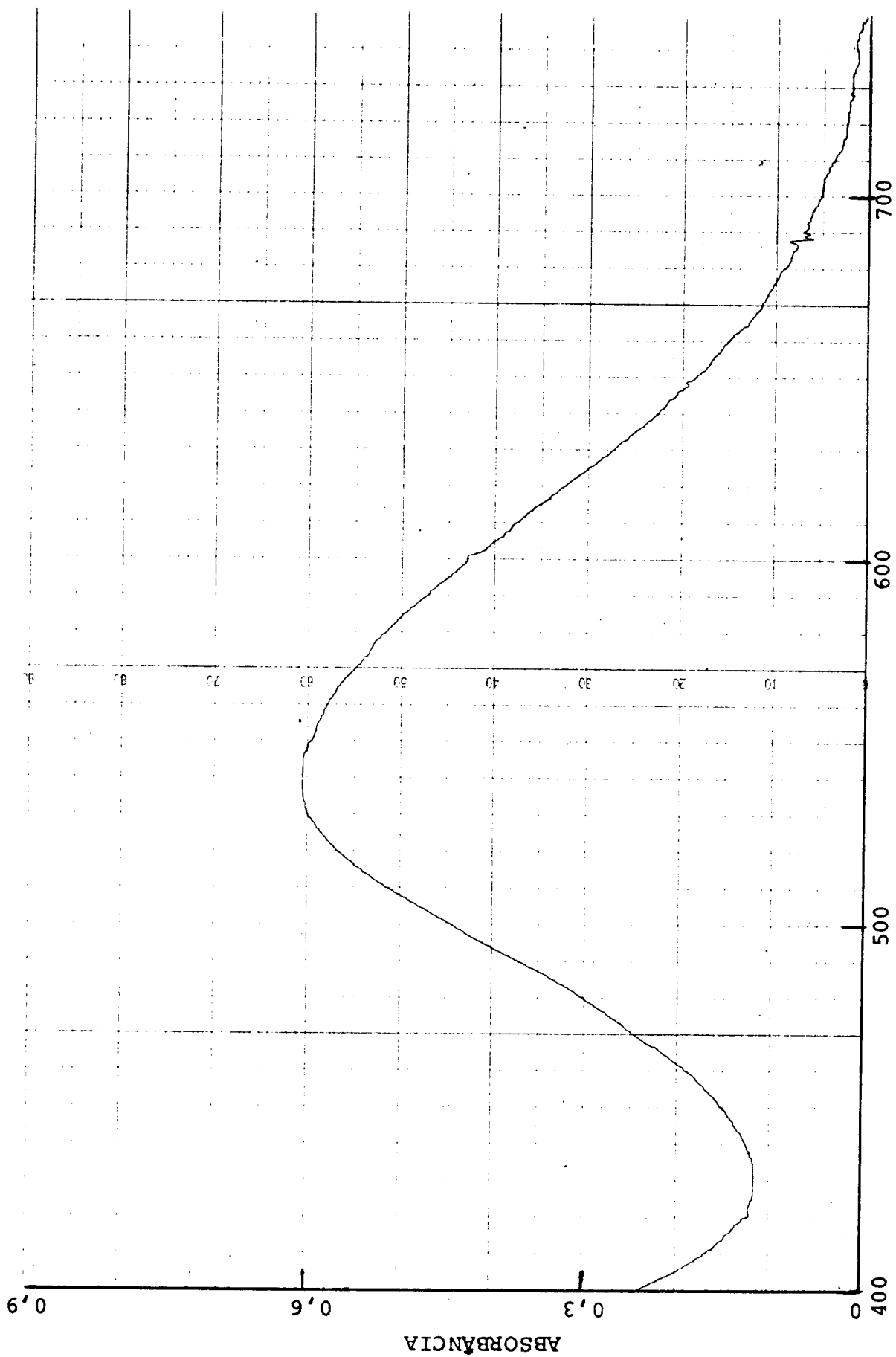


FIGURA 7.- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO PROTEÍNA-COBRE PARA ARROZ INTEGRAL

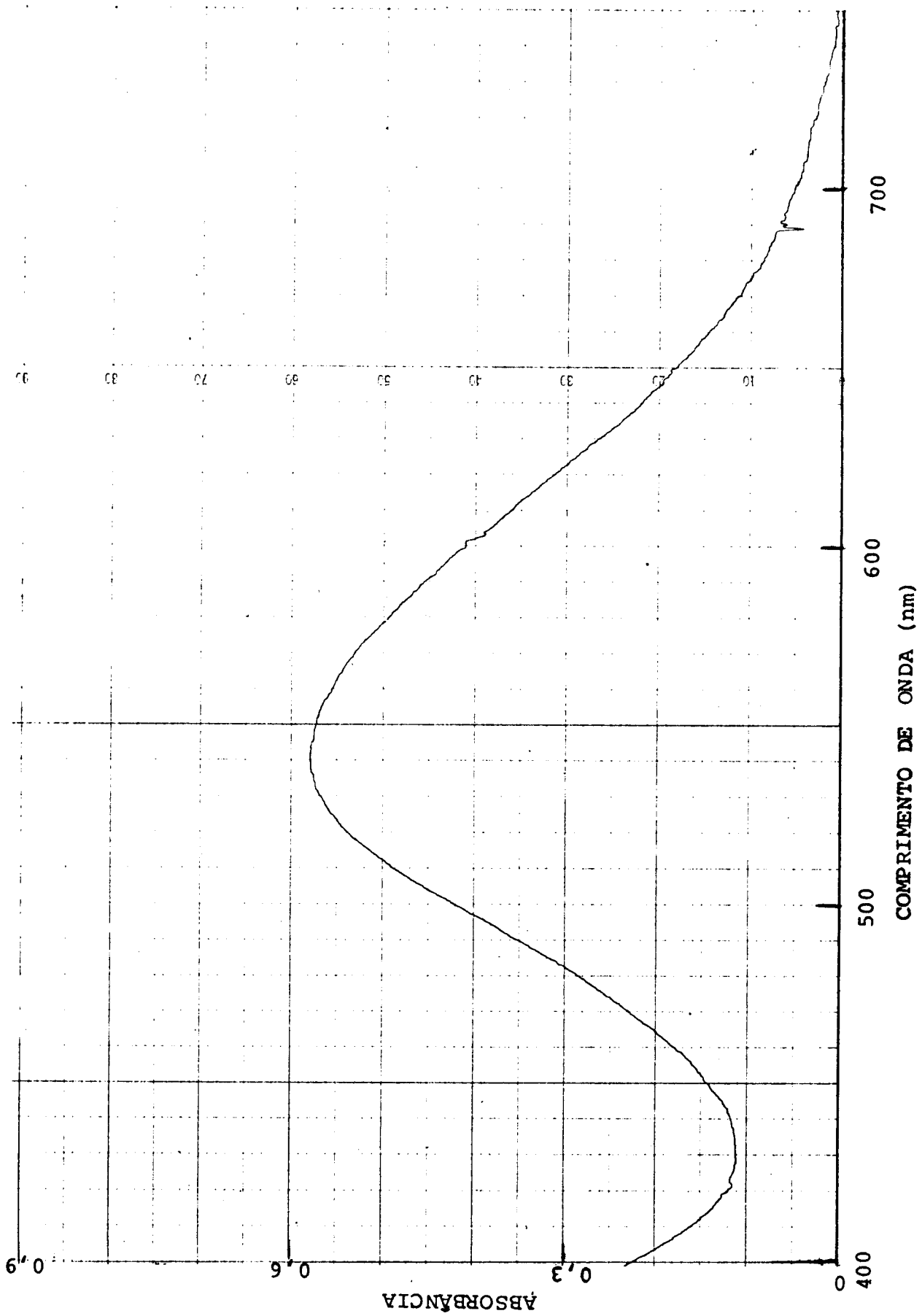


FIGURA 8 .- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO COMPLEXO PROTEÍNA-COBRE PARA ARROZ BRUNIDO

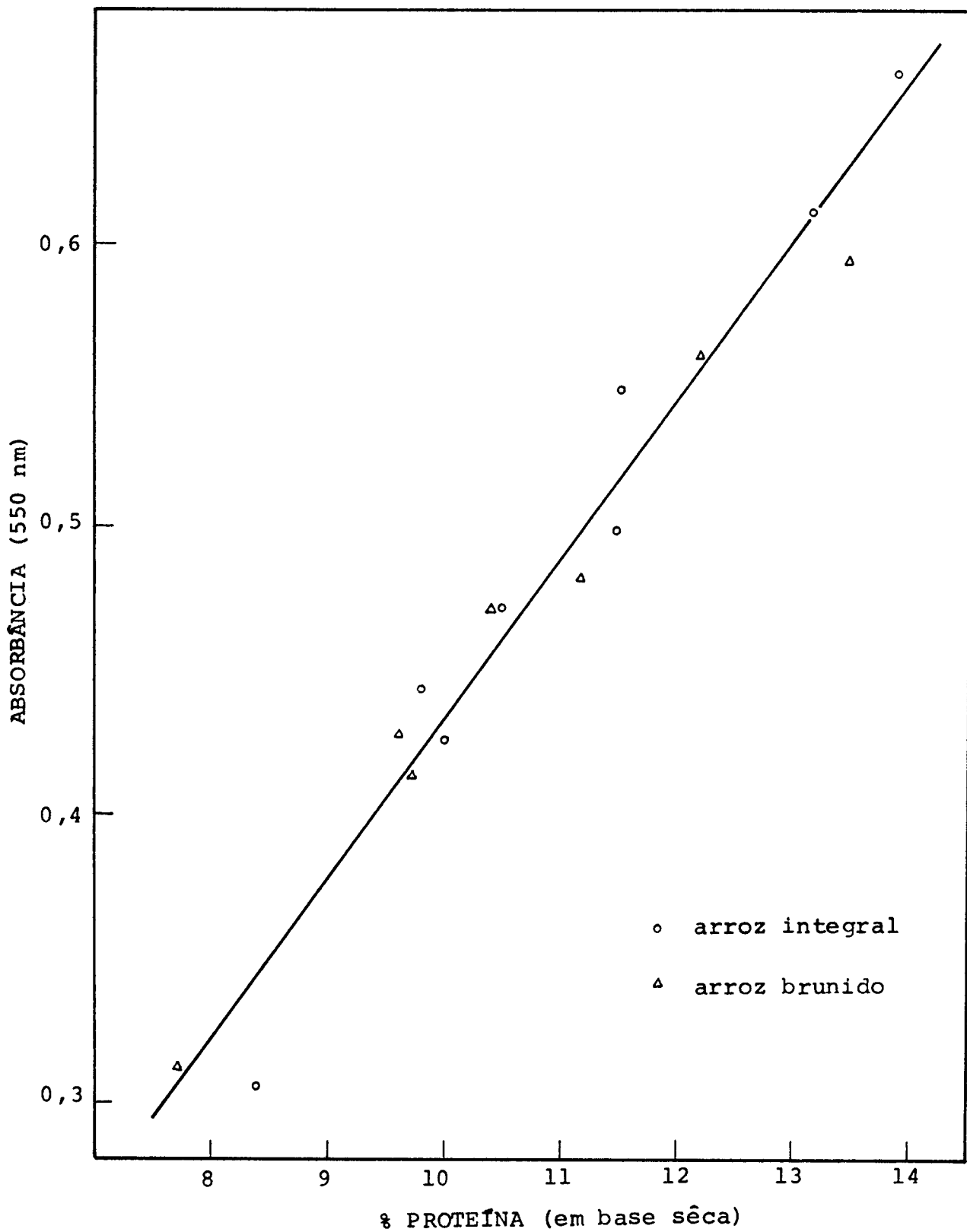


FIGURA 9 .- ABSORBÂNCIA DO COMPLEXO PROTEÍNA-COBRE CONTRA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA PELO MÉTODO MICROKJEL-DAHL .  $Y = 0,055X - 0,116$  (  $Sê = 0,019$ ;  $r = 0,999^{**}$ )

## 5. - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.1. Efeito da temperatura e tempo na reação biureto com proteína. -----

Os reagentes de Deacon foram escolhidos pela facilidade de remoção do excesso de cobre por filtração.

Nas Figuras 2, 3 e 6 pode-se observar que a absorvância aumenta com incremento de temperatura até um certo limite, devido, provavelmente, à maior reatividade entre proteína e cobre, e pela maior facilidade de extração ou solubilização das proteínas. Entretanto, a partir de uma certa temperatura, ou de um determinado tempo, a absorvância diminui, devido, possivelmente, ao fenômeno de desnaturação, que abaixa a solubilidade das proteínas. Com o fim de explicar o novo incremento de absorvância a partir de um certo tempo, deve-se pensar que o meio do reagente é fortemente alcalino, o qual produzirá hidrólise das proteínas, e, por tanto, expondo maior número de ligações peptídicas que causarão aumento de reatividade.

É importante fazer notar que a 45°C, ou temperaturas mais elevadas, não foi possível obter constância nos resultados de absorvância com relação ao tempo de agitação. No entanto, foi a 40°C que se obteve os melhores resultados.

A temperatura ambiente e a 30°C, também encontrou-se boa constância, mas sempre menor do que a a 40°C.

Este estudo demonstra que a temperatura e o tempo de agitação têm um efeito significativo na reação biureto com proteínas, e que o uso de temperaturas elevadas (60-70°C), como alguns autores propõem (4, 5, 6, 8) não são adequadas para fazer a determinação de proteínas baseada na reação biureto.

Nolls, Simmonds e Bushuk (12), recomendam também empregar temperatura de 40°C para proteínas de farinhas, mas para maior rapidez, propõem 60°C.

Outros autores (7, 14, 15), têm desenvolvido métodos de determinação de proteínas baseados na reação biureto e recomendam o uso de temperatura ambiente.

Craney (3) propõe o uso de liquidificador a uma velocidade e tempo determinados. No entanto, encontrou-se que, o tempo de liquidificação foi crítico, pois a temperatura da solução variou com o tempo de agitação (dados não apresentados)

## 5.2. Provas de procedimentos

-----

O procedimento descrito em 3.6.1., apresentou com trigo integral, boa precisão (Tabela I), pois o desvio padrão e o coeficiente de variação das leituras de absorbância foram 0,013 e 2,9% respectivamente.

Aplicando o procedimento anteriormente citado, com as modificações descritas em 3.6.2., a Proteimax 90 (Tabela II), apresentou melhor precisão, como indicam os valores de desvio padrão (0,005) e o coeficiente de variação (1,1%). Ademais, pode-se observar na Figura 4, o cumprimento da lei de Beer (vide valores individuais na Tabela III).

Isto parece confirmar os resultados obtidos no estudo de efeito da temperatura e tempo, pois, em geral, foi obtida maior constância a 40°C com Proteimax 90, do que com trigo integral (Vide Figuras 3 e 6).

## 5.3. Procedimento sugerido para grãos de cereais

-----

Depois de ter estabelecidas as condições de temperatura e tempo mais adequadas para fazer a determinação de proteínas baseada na reação de biureto e de ter testado procedimentos com Proteimax 90 e trigo integral, sugeriu-se um procedimento, que pode ser aplicado para a determinação do conteúdo de proteínas em qualquer cereal.

O procedimento toma em consideração a eliminação de interferências devidas a outras substâncias que podem dissolver-se no reagente nas condições usadas, pois, fazendo-se as leitu



ras das soluções coloridas (que contêm o complexo proteína-cobre e substâncias interferentes) contra o branco sem cobre (que contêm as substâncias interferentes), obtêm-se a leitura correspondente ao complexo proteína-cobre. Por outro lado, encontrou-se que o branco normal (que contêm todos os reagentes, mas sem amostra) forneceu leituras insignificantes de absorvância contra água (dados não apresentados) e portanto, a quantidade de  $[\text{Cu}(\text{OH})_4]^{-2}$ , que fica na solução colorida, interfere muito pouco na determinação.

O tempo sugerido para a determinação é de 30 minutos, ao invés de 1 hora, como foi testado nas provas de procedimentos Mas, também foi demonstrado no estudo do efeito da temperatura e tempo na reação biureto com proteína, que o tempo de 30 minutos é suficiente para obter-se absorvância constante

#### 5.4. Aplicação do procedimento sugerido no arroz integral e brunido

---

A fim de mostrar que a absorvância das soluções coloridas não só se deve ao complexo proteína-cobre, mas também a substâncias interferentes, extraídas com o reagente alcoólico alcalino, acreditou-se conveniente, fazer, por separado, as leituras contra água das soluções coloridas e dos brancos sem cobre. A diferença destas leituras corresponde à absorvância do complexo proteína-cobre, como recomendado por Mitzuda e Mitsunaga (11).

No caso do arroz integral, das oito variedades estudadas, obteve-se, para as soluções coloridas e os brancos sem cobre, maiores valores de absorvância por grama de matéria seca (vide última coluna das Tabelas IV e V), que os correspondentes para arroz brunido (vide última coluna das Tabelas IX e X).

As médias das absorvâncias por grama de matéria seca, relativas ao complexo proteína-cobre, de arroz integral (quarta coluna da Tabela VI), foram levemente maiores do que as correspondentes para o arroz brunido (quarta coluna da Tabela XI) em cada uma das oito variedades.

A porcentagem de proteína em base seca pelo método microkjeldahl, para arroz integral (Tabela VIII) variou de 13,91% na variedade Batataes até 8,42% na variedade IAC-435. Para arroz brunido (Tabela XIII) esteve entre 13,47% (variedade Batataes) e 7,73% (variedade IAC-435).

No arroz integral encontrou-se porcentagens de proteína - levemente maiores que no arroz brunido, o qual indica a - distribuição heterogênea das proteínas no grão, pois ao brunir o arroz integral a proporção de proteína baixou. O coeficiente de correlação entre as absorvâncias por grama de matéria seca do complexo proteína-cobre e as porcentagens de proteína em base seca pelo método microkjeldahl do arroz integral e brunido das oito variedades analisadas, foi altamente significativo ( $r = 0,999^{**}$ ). O erro padrão da estimativa da linha de regressão ( $S\bar{e}$ ) em termos de absorvância foi 0,019.

Parial e Rooney (13) aplicaram para o arroz, o método biureto modificado por Pinckney (15) e encontraram que os coeficientes de correlação entre proteína pelo método Kjeldahl e a absorvância do biureto foi 0,981<sup>\*\*</sup> para arroz integral e 0,964<sup>\*\*</sup> para arroz brunido.

Pode-se dizer que o procedimento desenvolvido neste trabalho dá resultados satisfatórios quando é aplicado para arroz integral e brunido, com as seguintes vantagens:

- a) É relativamente rápido, pois pode-se fazer muitas determinações ao mesmo tempo, sem ter que filtrar de imediato. Se um técnico dispõe de materiais e equipamentos suficientes, pode fazer em média, uma determinação em 10 minutos, quando previamente já tem preparada a equação de regressão.
- b) As interferências devidas a outras substâncias solúveis no reagente alcoólico alcalino são eliminadas.

### 5.5. Registro de espectros de absorção

-----

Com a finalidade de comprovar o comprimento de onda, onde obtêm-se a máxima absorbância, foram feitos os registros dos espectros de absorção para Proteimax 90, trigo integral, arroz integral e arroz brunido (Figuras 1, 5, 7 e 8, respectivamente). Encontrou-se que a máxima absorbância está entre 540 e 550 nm; porém, 550 nm é comumente utilizado, e foi selecionado para fazer as leituras. Os picos foram muito largos, e portanto, o comprimento de onda utilizado não é muito crítico.

## 6. - CONCLUSÕES

- a) Demonstrou-se que a temperatura é o fator mais importante para se obter resultados bons na determinação de proteínas pela reação do biureto.
- b) Escolheu-se a temperatura de 40°C, pela suficiente velocidade de reação para obter absorvância constante num período de tempo conveniente.
- c) Encontrou-se que o procedimento sugerido para fazer a determinação de proteínas em grãos de cereais, deu correlação altamente significativa com a porcentagem de proteína pelo método microkjeldahl, quando foi aplicado no arroz integral e brunido.
- d) O procedimento sugerido, elimina as interferências devidas a outras substâncias solúveis no reagente alcoólico alcalino.

## 7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 11th ed. Washington, D.C. The Association, 1970.
2. - ALDER, H.L. & ROESSLER, E.B. Introduction to probability and statistics. 5th ed. San Francisco, W.H. Freeman & Co., 1972.
3. - CRANEY, C.E. A quick biuret method for protein in wheat. Cereal Chem. 49(4):496-497, 1972.
4. - DEACON, B.D. Rapid determination of protein in soybean meals. J. Am. Oil Chem. Soc. 49(11):660-661, 1972
5. - GREENAWAY, W.T. & JOHNSON, R.M. Five minute biuret method for protein content of wheat. Bakers Digest, 48(2):38, 39, 72, 1974.
6. - \_\_\_\_\_ & DAVIS, G. An improved 5 minute biuret protein method for wheat and other grains. (In Press)
7. - JENNINGS, A.C. Determination of the nitrogen content of cereal grain by colorimetric methods. Cereal Chem., 38(6): 467-479, 1961.
8. - JOHNSON, R.M. & CRANEY, C.E. Rapid biuret method for protein content in grains. Cereal Chem., 48(3):276-282, 1971
9. - JONES, D.B. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. U.S.D.A. Circular n<sup>o</sup> 183, 1941.
10. - KURZER, F. Biuret and related compounds. Chem. Reviews. 56:95-197, 1956

11. - MITZUDA, H. & MITSUNAGA, T. Evaluation and elimination of the interference by starch in the biuret determination of wheat protein. *Agr. Biol. Chem.*, 38(9):1649-1655, 1974.
12. - NOLL, J.S., SIMMONDS, D.H. & BUSHUK, W. A modified biuret reagent for determination of protein. *Cereal Chem.*, 51(5):610-616, 1974.
13. - PARIAL, L.C. & ROONEY, L.W. Use of dye-binding and biuret techniques for estimating protein in brown and milled rice. *Cereal Chem.*, 47(1):38-43, 1970
14. - PINCKNEY, A.J. Wheat protein and the biuret reaction. *Cereal Chem.*, 26(6):423-439, 1949
15. - \_\_\_\_\_ The biuret test as applied to the estimation of wheat protein. *Cereal Chem.*, 38:501-506, 1961

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor *Frederick Carl Strong III*, por sua valiosa orientação durante a realização deste trabalho.

À *Direção da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas*, pelas possibilidades oferecidas para o desenvolvimento desta tese.

À *Organização dos Estados Americanos*, patrocinadora do curso.

À *Facultad de Agronomia e Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico da Universidad Central de Venezuela*, por seu apoio moral e econômico.

À *Seção de Cereais do Instituto Agrônomo de Campinas*, pelo obsêquio das amostras de arroz.

À *Seção de Armazenamento de Grãos do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas*, pelo auxílio prestado no beneficiamento das amostras de arroz.

À *Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos*, pelas facilidades proporcionadas para os serviços gráficos e datilográficos da tese.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para o bom êxito deste trabalho.

Serviços Gráficos Executados pela:

FUNDAÇÃO CENTRO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Rua Dr. Pelágio Lobo, 63      Tel. 8-7822

13.100 - Campinas - SP. - BRASIL