Métodos físico-químicos para análise de alimentos

edição IV

1ª Edição Digital

SES - CCD -IAL
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz © 2008

Edições anteriores
1ª edição – 1967
Coordenação: Ariosto Büller Souto
Mário Sampaio Mello
2ª edição –1976
Coordenação: A. B. Walkyria H. Lara
Germínio Nazário
Maria Eliza Wohlers de Almeida
Waldomiro Pregnolatto
3ª edição – 1985
Coordenação: Waldomiro Pregnolatto
Neus Sadocco Pascuet
4ª **edição – 2005**
Coordenação: Odair Zenebon
Neus Sadocco Pascuet

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008
p. 1020

versão eletrônica

1. Análise de alimentos 2. Alimentos / métodos 3. Serviços laboratoriais de saúde pública

CDD 614.028
SES/CCD/CD 12/08 NLM QU50

Métodos físico-químicos para análise de alimentos

edição IV

1ª Edição Digital

Coordenadores

Odair Zenebon
Neus Sadocco Pascuet
Paulo Tiglea

IV edição
1ª Edição Digital

São Paulo, 2008

IAL - III

Agradecemos a todos os técnicos que colaboraram nas edições anteriores, desenvolvendo alguns dos métodos contantes desta edição.

Nosso especial agradecimento a:

Alex Sandro P. Oliveira – Diagramação

Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro - Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Célia Maria Pompeo Mome – Ilustrações nos métodos

Cristiano Correa de Azevedo Marques - Apoio Institucional

Fernanda L. Machado – Digitação, revisão editorial, colaboração e bom humor

Galdino Guttmann Bicho - pelo apoio incondicional na publicação e divulgação

Iris Cristina de Moura – Revisão editorial

Laurita Silveira de Brum – Revisão editorial

Maria Auxiliadora Chaves – Apoio logístico

Núcleo de Saúde Ocupacional e Biossegurança – Apoio logístico

Rafael Pascuet – Criação da capa e projeto gráfico

1ª Ed. Digital - 2008
Núcleo de Informação e Tecnologia - NIT /IAL
Paulo Padilha, Mario Medeiro, Valdevi Duarte, Ernesto Figueiredo, Patricia Abreu, Claudio Zenebon

APRESENTAÇÃO

"A saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação."

Apresentar uma obra de tamanho vulto é, sem sombra de dúvida, uma grande responsabilidade e um imenso prazer. Principalmente por se tratar de uma obra iniciada em 1967 e que desde seu lançamento teve todos os seus exemplares esgotados rapidamente, dado o interesse que desperta em profissionais da indústria, estudantes e profissionais de saúde pública do Brasil e de outros países da América Latina.

Esta Obra é o resultado da evolução e avanços científicos e tecnológicos, que refletem na elaboração de novos métodos Analíticos, personificando os esforços e dedicação dos pesquisadores e técnicos da Divisão de Bromatologia e Química, elaborada sobre a coordenação do Dr. Odair Zenebon, Neus Sodocco Pascuet e Paulo Tiglea.

Com todos os avanços científicos e tecnológicos, também não poderia deixar de ser incorporado o modelo de publicação desta edição, agora na sua versão digital, disponível gratuitamente no site do Instituto Adolfo Lutz, no momento que comemoramos os 20 anos da criação do Sistema Único de Saúde - SUS.

São Paulo, 28 de outubro de 2008.
Marta Lopes Salomão
Diretora Geral do IAL

INTRODUÇÃO

A análise bromatológica, dentro do contexto da química analítica aplicada, desempenha importante papel avaliador da qualidade e segurança dos alimentos. Em determinados momentos, a sua utilização torna-se decisiva para equacionar e resolver problemas de saúde pública e também para definir e complementar ações de vigilância sanitária. Atua, também, como coadjuvante nas inovações tecnológicas de alimentos. Devido à complexidade da sua constituição orgânica, os alimentos muitas vezes são considerados matrizes difíceis de serem manipuladas; o analista deverá estar devidamente treinado, e somente a experiência apreendida ao longo dos anos poderá fornecer segurança analítica. Dentre os requisitos essenciais para evidenciar a qualidade de um trabalho laboratorial e fornecer confiabilidade aos resultados emitidos, a escolha adequada de metodologia analítica é, sem dúvida nenhuma, de grande relevância. De nada adianta um laboratório dispor de instalação e equipamentos de ponta, se o método analítico selecionado não for apropriado.

Em razão dos avanços tecnológicos na ciência dos alimentos, tanto nos aspectos toxicológico como de identidade e qualidade, tornam-se imperativas a necessidade da modernização e a contínua atualização dos métodos analíticos. Novas técnicas instrumentais, baseadas em determinados princípios físicos e químicos, freqüentemente são desenvolvidas, assim como, também, a utilização da biologia molecular, para cada vez mais quantificar analitos em concentrações muito baixas.

São inúmeros, na literatura científica corrente, os métodos de imunoensaios para detectar e quantificar níveis de contaminantes químicos e avaliar a autenticidade de alimentos. Muitas vezes, o laboratório fica incapacitado para acompanhar tão brusca modernidade. Há necessidade da disposição de métodos alternativos de análises, quando possível, que estejam ao alcance da maioria dos laboratórios, notadamente, os de saúde pública. Nem sempre o método que faz uso do equipamento sofisticado e dispendioso é o mais adequado; às vezes, dependendo do analito e da sua concentração em um dado alimento, a utilização de metodologia tradicional e de baixo custo torna-se mais eficiente. Por exemplo, os métodos volumétricos e espectrofotométricos na região do UV/VIS não devem ser considerados obsoletos e ultrapassados.

Em face à grande dinâmica na atualização da legislação de alimentos no Brasil, principalmente nos últimos anos, e à luz dos novos conhecimentos científicos mundiais, torna-se

inevitável a adequação de metodologia analítica para que os laboratórios possam cumprir as novas exigências legais. Como, por exemplo, no caso da Portaria nº 518 de 25/03/04, sobre potabilidade de água para consumo humano, onde as análises de alguns novos parâmetros de verdadeiro significado para a saúde pública devem ser atendidas. Nos últimos anos, foram publicadas várias resoluções e Decretos a respeito de alimentos, tanto no Ministério da Agricultura como no da Saúde.

O objetivo primordial do livro de métodos analíticos, elaborado pelo Instituto Adolfo Lutz, desde as três edições passadas, sempre foi o de fornecer aos analistas de alimentos metodologia físico-química testada, de confiabilidade e de fácil acesso à maioria dos laboratórios. Isto resultou do fruto de trabalho e da tradição do Instituto em análise de alimentos, um dos laboratórios pioneiros, na América Latina, nesta modalidade analítica. São metodologias amplamente testadas e referendadas e com muitas adequações que emergiram, ao longo dos anos, da vivência do seu corpo técnico.

Nesse aspecto, ressaltamos os trabalhos pioneiros de seus dignos mestres, desde o Laboratório de Análises Bromatológicas, criado em 1892, passando pela criação do Instituto Adolfo Lutz, em 1940, até a presente data. Tantos foram os colaboradores, que não vamos mencionar nomes para não incorrer em nenhum esquecimento. A idéia da publicação do livro foi elaborar um compêndio de métodos físico-químicos implantados e amplamente testados pelo IAL, tornando possível a sua utilização pela rede de laboratórios de saúde pública.

A IV edição deste livro, agora publicada, inclui métodos tradicionais que ainda são eficientes e adequados para análise de alimentos, substituição daqueles considerados obsoletos e a implantação de métodos para atender às novas exigências legais quanto à qualidade e segurança de alimentos. Por exemplo, análises de fibra alimentar, gorduras saturadas e sódio como exigência obrigatória da rotulagem nutricional. A adição de métodos de determinação de outras micotoxinas, além das aflatoxinas que constavam da edição anterior, de embalagens para alimentos, de bebidas, de água potável, entre outras, visam a atender aos desafios da legislação resultante do Mercosul e internalizadas em nosso país.

O método para a determinação de histamina em pescados também foi introduzido por exigência legal. Alguns capítulos da edição anterior foram fundidos por se tratarem de produtos semelhantes.

Os métodos alternativos apresentados têm o objetivo de oferecer aos analistas a possibilidade de escolha dos que mais se adaptem às condições de seus laboratórios;

às vezes mais trabalhosos, mas de precisão e exatidão equivalentes aos métodos que utilizam equipamentos sofisticados; por exemplo, os colorimétricos para a determinação de ferro e cobre, respectivamente, em água e aguardente; os volumétricos, como, para a determinação de cálcio, como alternativas opcionais viáveis aos laboratórios que não dispõem de espectrômetro de absorção atômica. A determinação de fósforo em alimentos, em substituição ao método com ICP OES, poderá ser efetuada por técnica colorimétrica. Da mesma maneira, a determinação de colesterol em produtos alimentícios com ovos, em substituição ao método Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.

Neste livro apresentamos, como novidade em relação à edição anterior, um capítulo de análise de elementos traços (nutrientes inorgânicos) em alimentos.

O Laboratório de Alimentos, como qualquer outro que realiza análises físico-químicas, para configurar a confiabilidade de seus resultados, deverá estar engajado em Programas de Garantia da Qualidade, envolvendo o controle de qualidade analítica e também a biossegurança. Levando-se em conta que os critérios para seleção e escolha de uma determinada metodologia analítica estão dentro da contextualização da qualidade laboratorial, achamos por bem fazer constar neste livro um capítulo sobre a qualidade.

A conscientização sobre biossegurança, felizmente, está cada vez mais incorporada nas atividades dos laboratórios analíticos; neste escopo, o nosso objetivo foi o de apresentar os conceitos básicos de segurança no laboratório, tais como cuidados na manipulação e descarte de reagentes químicos, principais providências em casos de acidentes com produtos químicos, entre outros.

Finalizando e com o propósito de brindar os 20 anos da implantação do SUS, comemorado neste ano, estamos disponibilizando, gratuitamente, na página eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, a IV edição revisada deste livro para que toda comunidade interessada em análise bromatológica possa ter acesso a esta importante obra.

Odair Zenebon

SUMÁRIO

CAPÍTULO I GESTÃO DA QUALIDADE LABORATORIAL..... .33-62

Apresentação 35
Introdução 39
Siglas, Sites e Definições 40
Implantação do Sistema da Qualidade 51
Motivação 51
Capacitação 52
Pessoal 55
Elaboração dos Documentos da Qualidade 55
Controle dos Documentos 56
Treinamento nos documentos da qualidade 57
Preparação das unidades organizacionais 57
Controle de acesso 58
Calibração, controle e manutenção de equipamentos 58
Apresentação dos resultados 59
Auditorias internas 59
Critérios para qualificação de auditores internos 60
Garantia da qualidade dos resultados de ensaio 60
Análise crítica pela alta administração 61
Referências bibliográficas 62

CAPÍTULO II GENERALIDADES..... .63-72

Grandezas, unidades e símbolos 65
Fatores, prefixos e símbolos 66
Tabela periódica dos elementos 66
Características de concentração de alguns reagentes 70
Siglas 71
Referências bibliográficas 72

CAPÍTULO III COLHEITA DE AMOSTRAS..... .73-82

Amostragem para análise fiscal e de controle 76
Acondicionamento 76
Lacração 77
Rotulagem 77
Transporte 77
Termo de colheita 77
Colheita de amostras de produtos não homogêneos em grandes estoques 78
Conduta para obtenção da amostra de produtos pré-embalados 79
Colheita de água para determinações físico-químicas gerais 80
Colheita e preservação de amostra de água para a determinação de metais totais 80

Colheita e preservação de amostra de água para a determinação de solventes orgânicos 81
Colheita e preservação de amostra de água para determinação de agrotóxicos 81
Referências bibliográficas 81

CAPÍTULO IV PROCEDIMENTOS E DETERMINAÇÕES GERAIS 83-158

Pré-tratamento da amostra 85
Inspeção da amostra 85
Preparo da amostra para análise 86
001/IV Determinação de espaço livre – Recipiente de forma regular 86
002/IV Determinação de espaço livre – Recipiente de forma irregular 87
003/IV Sólidos drenados em relação ao peso total 88
004/IV Reação para gás sulfídrico – Prova de Éber 88
005/IV Reação para amônia – Prova de Éber 90
006/IV Ponto de fusão – Substâncias facilmente reduzíveis a pó 91
007/IV Ponto de fusão – Substâncias não facilmente reduzíveis a pó 92
008/IV Ponto de fusão com aparelho elétrico 93
009/IV Ponto de congelamento 93
010/IV Índice de refração 94
011/IV Densidade 97
012/IV Perda por dessecação (umidade) – Secagem direta em estufa a 105ºC 98
013/IV Perda por dessecação (umidade) – Secagem em estufa a vácuo 99
014/IV Perda por dessecação (umidade) – Determinação pelo método Karl Fischer 99
015/IV Resíduo Seco 102
016/IV Acidez 103
017/IV Determinação eletrométrica do pH 104
018/IV Resíduo por incineração – Cinzas 105
019/IV Cinzas sulfatizadas 106
020/IV Cinzas insolúveis em água 107
021/IV Cinzas solúveis em água 108
022/IV Alcalinidade das cinzas insolúveis em água 108
023/IV Alcalinidade das cinzas solúveis em água 109
024/IV Cinzas insolúveis em ácido clorídrico a 10% v/v 109
025/IV Cinzas solúveis em ácido clorídrico a 10% v/v 110
026/IV Sulfatos pelo método gravimétrico 110
027/IV Sulfatos por titulação com EDTA 111
028/IV Cloretos por volumetria 112
029/IV Cloretos por potenciometria 114
030/IV Fosfatos por titulação 114
031/IV Fosfatos por espectrofotometria 115
Lipídios 116
032/IV Lipídios ou extrato etéreo – Extração direta em Soxhlet 117
033/IV Lipídios ou extrato etéreo com hidrólise ácida prévia – Método A 118
034/IV Lipídios ou extrato etéreo com hidrólise ácida prévia – Método B 119
035/IV Extrato alcoólico 121
Protídios 122
036/IV Protídios – Método de Kjeldahl clássico 123
037/IV Protídios – Método de Kjeldahl modificado 124
Glicídios 125

038/IV Glicídios redutores em glicose 126
039/IV Glicídios não-redutores em sacarose 127
040/IV Glicídios totais em glicose 129
041/IV Glicídios por cromatografia descendente em papel – Prova qualitativa 130
042/IV Glicídios por cromatografia circular em papel - Prova qualitativa 132
043/IV Amido 133
Fibras 135
044/IV Fibra bruta 136
045/IV Fibra alimentar total – Método enzimático-gravimétrico 137
046/IV Fibra alimentar solúvel e insolúvel – Método enzimático-gravimétrico 139
047/IV Pectinas – Prova qualitativa 140
048/IV Pectinas – Determinação por gravimetria 140
049/IV Dióxido de enxofre – Prova qualitativa 142
050/IV Dióxido de enxofre – Método quantitativo de Monier-Williams 143
051/IV Corantes artificiais orgânicos – Prova qualitativa 144
052/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa 146
053IV Determinação da composição de ácidos graxos saturados e insaturados por cromatografia em fase gasosa 148
054/IV Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos – Método 1 154
055/IV Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos – Método 2 156
056/IV Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos – Método 3 157
057/IV Pesquisa de compostos voláteis por cromatografia em fase gasosa com detector de massas e técnica de *headspace* 158

CAPÍTULO V ADITIVOS 161-278

Aditivos 163
Acidulantes/Reguladores de acidez 164
Antioxidantes 164
Aromatizantes 164
Conservadores 164
Corantes 165
Edulcorantes 165
Gomas 165
Espessantes 165
Geleificantes 165
Estabilizantes 166
Emulsificantes 166
058/IV Acidulantes – Identificação de ácido cítrico, láctico e tartárico por cromatografia em papel 166
059/IV Acidulantes – Identificação de ácido cítrico 167
060/IV Acidulantes – Quantificação de ácido cítrico 168
061/IV Antioxidantes – Titulação de ácido ascórbico e isômeros com solução de iodo 169
062/IV Antioxidantes – Determinação de ácido ascórbico e isômeros pelo método de Tillman´s 170
063/IV Antioxidantes – Titulação de ácido ascórbico e isômeros com solução de iodo na presença de polissorbato 80 171
064/IV Antioxidantes – Identificação de ácido ascórbico por redução da solução de Fehling 172
065/IV Antioxidantes – Identificação de ácido ascórbico por redução de solução de Tillmans 173
066/IV Antioxidantes – Identificação de ácido ascórbico pela reação com bicarbonato de sódio e sulfato ferroso 174

067/IV Antioxidantes – Determinação de butil-hidroxianisol (BHA) 174
068/IV Antioxidantes – Identificação de butil-hidroxianisol (BHA) 176
069/IV Antioxidantes – Determinação de butil hidroxitolueno (BHT) 177
070/IV Antioxidantes – Identificação de butil hidroxitolueno (BHT) 178
071/IV Antioxidantes – Identificação de galatos 179
072/IV Aromatizantes – Identificação e quantificação 180
073/IV Aromatizantes – Teor alcoólico a 20°C 181
074/IV Aromatizantes – Identificação de óleos essenciais 181
075/IV Aromatizantes – Quantificação dos óleos essenciais 182
076/IV Aromatizantes – Rotação óptica a 20°C 183
077/IV Aromatizantes – Índice de refração a 20°C 183
078/IV Aromatizantes – Densidade relativa a (20/20)°C 184
079/IV Aromatizantes – Vanilina e correlatos 185
080/IV Conservadores – Determinação espectrofotométrica simultânea de nitrito e nitrato 186
081/IV Conservadores – Determinação de nitrato após redução em coluna de cádmio e de nitrito 187
082/IV Conservadores – Determinação de propionatos 188
083/IV Conservadores – Identificação de ácido sórbico e sorbatos 189
084/IV Conservadores – Determinação de ácido sórbico e sorbatos por espectrofotometria no UV 191
085/IV Conservadores – Determinação de ácido sórbico e sorbatos por espectrofotometria no visível 192
086/IV Corantes artificiais – Identificação por cromatografia em papel 194
087/IV Corantes artificiais – Identificação por espectrofotometria 196
088/IV Corantes artificiais – Quantificação por espectrofotometria 196
089/IV Corantes artificiais – Quantificação por titulação com cloreto de titânio 198
090/IV Corantes artificiais – Determinação de eritrosina por gravimetria 201
091/IV Corantes artificiais – Determinação de substâncias insolúveis em água 202
092/IV Corantes artificiais – Determinação de substâncias voláteis a 135°C 203
093/IV Corantes artificiais – Determinação de sulfatos 204
094/IV Corantes artificiais – Determinação de cloretos 205
095/IV Corantes artificiais – Determinação de corantes subsidiários 205
096/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de amarelo crepúsculo e bordeaux S.. 207
097/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de indigotina e bordeaux S 209
098/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de tartrazina, bordeaux S, indigotina e azul brilhante 210
099/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de tartrazina, indigotina e azul brilhante 211
100/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de tartrazina e amarelo crepúsculo 212
101/IV Teobromina e cafeína – Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência 213
102/IV Corantes naturais – Identificação de antocianinas de cascas de uva por espectrofotometria 215
103/IV Corantes naturais – Determinação da intensidade de cor em enocianinas por espectrofotometria.. 216
104/IV Corantes naturais – Identificação de carmim de cochonilha 217
105/IV Corantes naturais – Determinação de ácido carmínico em carmim de cochonilha 219
106/IV Corantes naturais – Identificação de cúrcuma 219
107/IV Corantes naturais – Determinação do teor de curcumina na cúrcuma 220
108/IV Corantes naturais – Identificação de curcumina 221
109/IV Corantes naturais – Identificação de curcumina por cromatografia em camada delgada 222
110/IV Corantes naturais – Determinação do teor de curcumina 223
111/IV Corantes naturais – Identificação de urucum lipossolúvel 223

112/IV Corantes naturais – Determinação do teor de bixina 225
113/IV Corantes naturais –Identificação do urucum hidrossolúvel 226
114/IV Corantes naturais – Determinação do teor de norbixina 227
115/IV Corantes naturais – Identificação de corante caramelo 228
116/IV Corante caramelo processo amônio – Determinação da intensidade de cor 229
117/IV Corante caramelo processo amônio – Determinação de sólidos 230
118/IV Corante caramelo processo amônio – Determinação do 4-metilimidazol (MEI) 231
119/IV Corante caramelo processo sulfito/amônio – Determinação da intensidade de cor 233
120/IV Corante caramelo processo sulfito/amônio – Determinação de sólidos 234
121/IV Corante caramelo processo sulfito/amônio – Determinação do 4-metilimidazol (MEI) 234
122/IV Corantes naturais – Identificação de beta-caroteno 234
123/IV Carotenóides lipossolúveis (preparações a 30%) – Determinação do teor de beta-caroteno 235
124/IV Carotenóides hidromiscíveis (preparações com 10%) – Determinação do teor de beta-caroteno 236
125/IV Edulcorantes – Determinação de acesulfame-K por cromatografia líquida de alta eficiência 237
126/IV Edulcorantes – Determinação de aspartame por cromatografia líquida de alta eficiência 238
127/IV Edulcorantes – Determinação de ciclamatos 240
128/IV Edulcorantes – Determinação de esteviosídeo por cromatografia líquida de alta eficiência 240
129/IV Edulcorantes – Determinação de polióis (manitol e sorbitol) por cromatografia líquida de alta eficiência 242
130/IV Edulcorantes – Determinação de sacarina por cromatografia líquida de alta eficiência 243
131/IV Edulcorantes – Determinação de sucralose por cromatografia líquida de alta eficiência 245
132/IV Espessantes – Extração de gomas em alimentos 246
133/IV Espessantes – Extração de gomas em formulações de aditivos 247
134/IV Espessantes – Identificação de goma guar 247
135/IV Espessantes – Identificação de goma carragena (musgo irlandês) 248
136/IV Espessantes – Identificação de goma arábica (acácia) 249
137/IV Espessantes – Identificação de alginato de sódio 250
138/IV Espessantes – Identificação de goma Konjak 251
139/IV Espessantes – Identificação de agar-agar 252
140/IV Espessantes – Identificação de goma jataí 253
141/IV Espessantes – Identificação de carboximetilcelulose 253
142/IV Espessantes – Identificação de pectina 254
143/IV Espessantes – Identificação de goma xantana 255
144/IV Estabilizantes – Determinação de fosfatos, em P_2O_5, por gravimetria 256
145/IV Estabilizantes – Determinação de fosfatos, em P_2O_5, por espectrofotometria 258
146/IV Estabilizantes – Determinação de fluoretos em fosfatos por potenciometria 259
147/IV Estabilizantes – Determinação de mono e diglicerídios e glicerol livre 262
148/IV Realçador de sabor – Identificação de glutamato de sódio 264
149/IV Identificação de bromatos pelo método direto 265
150/IV Identificação de bromatos pelo método indireto com o reativo fucsina-bissulfito 266
151/IV Identificação de bromatos por método indireto com fluoresceína 267
152/IV Determinação de arsênio em aditivos 268
153/IV Determinação de benzo(a)pireno em aromas de fumaça e alimentos defumados 273

CAPÍTULO VI ANÁLISE SENSORIAL 279-320

Análise sensorial 281
Visão 281
Olfato 281

Audição 282
Tato 282
Gosto 282
Preparo e apresentação de amostras 283
Formação da equipe sensorial 284
Características sensoriais 285
154/IV Análise das características sensoriais 290
Testes discriminativos 290
155/IV Testes discriminativos – Teste triangular 291
156/IV Testes discriminativos – Teste duo-trio 294
157/IV Testes discriminativos – Teste de ordenação 296
158/IV Testes discriminativos – Teste de comparação pareada 300
159/IV Testes discriminativos – Teste de comparação múltipla 302
160/IV Testes com escalas 307
Testes sensoriais descritivos 309
161/IV Testes descritivos – Perfil de sabor 310
162/IV Testes descritivos – Perfil de textura 311
163/IV Testes descritivos – Análise descritiva quantitativa 311
Testes afetivos 314
164/IV Testes afetivos – Testes de preferência 314
165/IV Testes afetivos – Testes de aceitação por escala hedônica 315
166/IV Testes afetivos – Testes de aceitação por escala do ideal 316
167/IV Testes afetivos – Testes de escala de atitude ou de intenção 317
Referências bibliográficas 318

CAPÍTULO VII AÇÚCARES E PRODUTOS CORRELATOS 321-343

Açúcares e produtos correlatos 323
168/IV Preparação da amostra de açúcares para análise 325
169/IV Açúcares – Sacarose por desvio polarimétrico direto 325
170/IV Açúcares – Determinação da cor ICUMSA 327
171/IV Açúcares – Determinação da umidade por secagem à pressão atmosférica 329
172/IV Açúcares – Determinação de anidrido sulfuroso pelo método modificado de Monier-Williams 330
173/IV Méis – Determinação da umidade por refratometria 330
174/IV Méis – Determinação da acidez livre, lactônica e total 332
175/IV Méis – Determinação de hidroximetifurfural 333
176/IV Méis – Determinação de açúcares redutores pelo método A 335
177/IV Méis – Determinação de açúcares redutores pelo método B 337
178/IV Méis – Determinação de sacarose aparente pelo método A 337
179/IV Méis – Determinação de sacarose aparente pelo método B 338
180/IV Méis – Determinação de sólidos insolúveis em água por gravimetria 338
181/IV Méis – Determinação da atividade diastásica 339
182/IV Méis – Reação de Lund 341
183/IV Méis – Reação de Fiehe 342
184/IV Méis – Reações de Lugol 343

CAPÍTULO VIII ÁGUAS 345-404

Águas 347

185/IV Determinação de dureza 347
186/IV Determinação de dureza de carbonatos e de não carbonatos 349
187/IV Determinação da alcalinidade total por método volumétrico com indicador visual 349
188/IV Determinação de amônia por método potenciométrico 352
189/IV Determinação de amônia por método espectrofotométrico 353
190/IV Determinação de cloreto 355
191/IV Determinação da cor pelo método de comparação óptica por via instrumental 357
192/IV Determinação de ferro 358
193/IV Determinação de fluoreto pelo método colorimétrico 361
194/IV Determinação de fluoreto pelo método potenciométrico 364
195/IV Determinação de nitrato pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta 366
196/IV Determinação de nitrato pelo método espectrofotométrico com desenvolvimento de cor 367
197/IV Determinação de nitrIto pelo método espectrofotométrico com desenvolvimento de cor 370
198/IV Determinação de nitrogênio albuminóide 372
199/IV Determinação do oxigênio consumido em meio ácido 373
200/IV Determinação de sódio e potássio 375
201/IV Determinação do pH 377
202/IV Determinação de sólidos totais secos a (103-105)°C 379
203/IV Determinação de sólidos dissolvidos, secos a 180°C, pelo método gravimétrico 381
204/IV Determinação de sólidos dissolvidos, secos a 180°C, pelo método condutivimétrico 382
205/IV Determinação da turbidez pelo método nefelométrico 383
206/IV Determinação da turbidez pelo método turbidimétrico 385
207/IV Determinação de resíduos de pesticidas e bifenilas policloradas pelo método multrresíduo 386
208/IV Determinação de arsênio total por espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos .. 391
209/IV Determinação de metais totais por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado 394
210/IV Determinação de metais totais por espectrometria de absorção atômica com chama 395
211/IV Determinação de mercúrio total por espectrometria de absorção atômica com gerador de vapor frio 398
212/IV Determinação de metais totais por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite 400
213/IV Identificação de cianeto – Prova de Pertusi-Gastaldi 402
214/IV Determinação de sulfatos 402

CAPÍTULO IX... BEBIDAS ALCOÓLICAS.....405-460

Bebidas alcoólicas 407
215/IV Bebidas fermento-destiladas – Densidade relativa a 20ºC/20ºC com picnômetro 407
216/IV Bebidas fermento-destiladas – Densidade relativa a 20ºC/20ºC com densímetro de leitura direta 408
217/IV Bebidas fermento-destiladas – Álcool em volume a 20ºC ou grau alcoólico real 409
218/IV Bebidas fermento-destiladas – Extrato seco ou resíduo seco 415
219/IV Bebidas fermento-destiladas – Glicídios totais em sacarose 416
220/IV Bebidas fermento-destiladas – Componentes secundários 417
221/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação da acidez total 417
222/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação da acidez fixa 418
223/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação de ácidos voláteis por diferença 419
224/IV Bebidas fermento-destiladas – Ésteres totais 420

225/IV Bebidas fermento-destiladas – Aldeídos totais 421
226/IV Bebidas fermento-destiladas – Furfural..... 423
227/IV Bebidas fermento – destiladas – Metanol 432
228/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação de metanol e componentes secundários 434
229/IV Bebidas fermento – destiladas – Determinação de carbamato de etila ou uretana por cromatografia a gás e detecção por espectrometria de massa 439
230/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação de cobre 440
Bebidas fermentadas..... .. 441
231/IV Bebidas fermentadas – Exame preliminar de vinhos 442
232/IV Bebidas fermentadas – Preparação da amostra de vinhos 442
233/IV Vinhos – Álcool em volume ou grau alcoólico..... 442
234/IV Vinhos – Álcool em peso..... 443
235/IV Vinhos – Acidez total..... 444
236/IV Vinhos – Acidez volátil 444
237/IV Vinhos – Acidez fixa..... 445
238/IV Vinhos – Extrato seco 445
239/IV Bebidas fermentadas – Açúcares redutores em glicose..... 449
240/IV Bebidas fermentadas – Açúcares não redutores em sacarose 450
241/IV Bebidas fermentadas – Sulfatos pelo método aproximativo de Marty..... 450
242/IV Bebidas fermentadas – Extrato seco reduzido 452
243/IV Vinhos – Relação entre álcool em peso e extrato seco reduzido..... 452
244/IV Bebidas fermentadas – Metanol 452
245/IV Cervejas – Preparação da amostra 453
246/IV Cervejas – Álcool em volume a 20ºC 453
247/IV Cervejas – Álcool em peso..... 454
248/IV Cervejas – Extrato real pelo método 1..... 455
249/IV Cervejas – Extrato real pelo método 2..... 456
250/IV Cervejas – Extrato aparente..... 459
251/IV Cervejas – Extrato primitivo ou original..... 460
Bebidas alcoólicas por mistura..... 460

CAPÍTULO X BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS.....461-475

Bebidas não alcoólicas..... 463
252/IV Determinação de dióxido de carbono em refrigerantes 464
253/IV Determinação de acidez total 464
254/IV Determinação de cafeína por método espectrofotométrico 465
255/IV Determinação de tanino 467
256/IV Determinação de quinina pelo método espectrofotométrico 469
257/IV Determinação de acessulfame K, sacarina e aspartame, ácidos benzóico e sórbico e cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência 470
258/IV Determinação de ciclohexilsulfamato (sais de ciclamato) em bebidas dietéticas e de baixa caloria pelo método gravimétrico..... 472
259/IV Determinação do resíduo seco pelo método gravimétrico..... 473
260/IV Determinação de glicídios redutores em glicose..... 473
261/IV Determinação de glicídios não redutores em sacarose..... 474
262/IV Corantes orgânicos artificiais – Análise qualitativa..... 474

CAPÍTULO XI CACAU E CHOCOLATE.....477-483

Cacau 479
Chocolate e produtos à base de chocolate 479
263/IV Determinação de lipídios com hidrólise prévia 479
264/IV Pesquisa de gorduras estranhas em chocolate 481

CAPÍTULO XII CAFÉ, CHÁ E DERIVADOS 485-498

Café 487
265/IV Café – Extrato aquoso 487
266/IV Café – Determinação de cafeína pelo método espectrofotométrico 488
Infusão do café 490
267/IV Infusão do café – Determinação do resíduo seco 490
268/IV Infusão do café – Determinação de cinzas 491
269/IV Infusão do café – Determinação de lipídios 491
270/IV Infusão do café – Determinação de protídios 491
Café solúvel 491
271/IV Café solúvel – Determinação do pH 492
272/IV Café solúvel – Determinação de cafeína 492
273/IV Café solúvel – Determinação de glicídios redutores e não redutores em glicose 492
Café solúvel preparado 496
274/IV Café solúvel preparado – Determinação do resíduo seco 496
Chá 496
Infusão do chá 497
Mate 497
275/IV Mate – Determinação de cafeína 497
Infusão do mate 497
Mate solúvel 497
Mate solúvel preparado 498

CAPÍTULO XIII CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS 499-531

Carnes 501
Preparo da amostra 502
Características sensoriais 503
276/IV Prova de cocção 504
277/IV Prova para sulfito com verde de malaquita 504
278/IV Prova para nitritos 505
Produtos cárneos 506
279/IV Reação de Kreis 507
280/IV Prova para formaldeído 508
281/IV Determinação espectrofotométrica de amido 509
282/IV Determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina 512
283/IV Determinação espectrofotométrica de nitritos 515
284/IV Determinação espectrofotométrica de nitratos 517
285/IV Determinação de proteínas de soja pelo método ELISA 522

CAPÍTULO XIV

EMBALAGENS E EQUIPAMENTOS EM CONTATO COM ALIMENTO 533-566

Embalagens e equipamento em contato com alimentos 535
Terminologia 537

286/IV Embalagens e equipamentos – Classificação dos alimentos 538
287/IV Embalagens e equipamentos – Seleção dos simulantes de alimentos 540
288/IV Embalagens e equipamentos – Condições dos ensaios de migração 541
289/IV Embalagens plásticas – Preparo das amostras 542
290/IV Embalagens plásticas – Determinação da migração total com simulantes aquosos e n- heptano 545
291/IV Embalagens plásticas – Determinação da migração total com n-heptano após extração com clorofórmio 547
292/IV Embalagens plásticas – Determinação de metais em corantes e pigmentos 548
293/IV Embalagens plásticas – Determinação da migração de corantes e pigmentos 549
294/IV Embalagens plásticas – Determinação da migração específica de metais e outros elementos 549
295/IV Embalagens de vidro e cerâmica – Determinação da migração global 550
296/IV Embalagens de vidro e cerâmica – Determinação da migração específica de metais pesados 551
297/IV Embalagens metálicas – Determinação da migração global 553
298/IV Embalagens metálicas – Resíduo solúvel em clorofórmio corrigido 553
299/IV Embalagens metálicas – Resíduo solúvel em clorofórmio corrigido para zinco 554
300/IV Embalagens metálicas – Determinação da migração específica de metais em embalagens de folhas de flandres 555
301/IV Embalagens celulósicas – Determinação da migração global 556
302IV Embalagens celulósicas – Extração em materiais contendo pigmentos minerais 558
303/IV Embalagens celulósicas – Extração em materiais revestidos ou tratados superficialmente com parafinas e/ou laminados 559
304/IV Embalagens celulósicas – Determinação do resíduo solúvel em clorofórmio 560
305/IV Embalagens celulósicas – Determinação do resíduo solúvel em clorofórmio corrigido para zinco 561
306/IV Embalagens celulósicas – Determinação do resíduo solúvel em clorofórmio corrigido para ceras, vaselinas e óleos minerais 562
0307/IV Embalagens elastoméricas – Determinação de ditiocarbamatos, tiouramas e xantogenatos 565

CAPÍTULO XV CONSERVAS VEGETAIS, FRUTAS E PRUDUTOS DE FRUTAS..... 567-587

Conservas vegetais 569
Preparo das amostras de conservas vegetais 570
Frutas e derivados 570
Preparo das amostras de produtos de frutas 573
308/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação do peso das frutas drenadas 573
309/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação da umidade em frutas secas em estufa a vácuo 574
310/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação da acidez titulável por volumetria com indicador 575
311/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação da acidez titulável por volumetria potenciométrica 576
312/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação da acidez titulável em ácido orgânico 577
313/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação dos sólidos totais 578
314/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação dos sólidos insolúveis em água 579
315/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação dos sólidos solúveis por refratometria 579
316/IV Frutas e produtos de frutas – Relação Brix/acidez total para sucos 582
317/IV Coco ralado – Determinação da acidez titulável 582
318/IV Coco ralado – Determinação de glicídios redutores em glicose 583
319/IV Coco ralado – Determinação de glicídios não redutores em sacarose 584

320/IV Leite de coco – Determinação da acidez titulável 586
321/IV Leite de coco – Determinação de lipídios pelo método de Soxhlet 586
322/IV Leite de coco – Determinação de lipídios pelo método de Gerber 586
323/IV Leite de coco – Determinação de glicídios redutores em glicose 587
324/IV Leite de coco – Determinação de glicídios não redutores em sacarose 587

CAPÍTULO XVI ÓLEOS E GORDURAS 589-625

Óleos e gorduras 591
325/IV Determinação da acidez 591
326/IV Determinação do índice de peróxido 593
327/IV Determinação do índice de refração 594
328/IV Determinação do índice de saponificação 596
329/IV Determinação do índice de iodo pelo método de Wijs 597
330/IV Determinação do índice de iodo por cálculo 599
331/IV Determinação do índice de Bellier 599
332/IV Determinação do ponto de fusão 600
333/IV Reação de Kreis 601
334/IV Determinação de umidade e matéria volátil 602
335/IV Determinação de impurezas insolúveis em éter 603
336/IV Determinação de resíduo de por incineração (cinzas) 604
337/IV Determinação da densidade relativa 605
338/IV Teste do frio 605
339/IV Determinação de matéria insaponificável 606
340/IV Prova de Halphen-Gastaldi 608
341/IV Prova de Holde 609
342/IV Prova de Villavecchia-Fabris 610
343/IV Determinação da extinção específica por absorção na região do ultravioleta 610
344/IV Análise por cromatografia em fase gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos 613
345/IV Determinação de tocoferóis e tocotrienóis por cromatografia líquida de alta eficiência 621
346/IV Determinação de tocoferóis e tocotrienóis por cromatografia líquida de alta eficiência em produtos processados contendo ésteres de tocoferóis 624

CAPÍTULO XVII OVOS E PRODUTOS DE OVOS.....627-631

Ovos e produtos de ovos 629
Ovo desidratado 629
347/IV Prova da solubilidade 629
348/IV Determinação dos sólidos da gema do ovo 630

CAPÍTULO XVIII PESCADOS E DERIVADOS.....633-643

Pescados e derivados 635
349/IV Reação de Éber para gás sulfídrico 635
350/IV Determinação do pH 636
351/IV Determinação de bases voláteis totais 633
352/IV Determinação de histamina por espectrofluorimetria 637
353/IV Determinação de lipídios totais pelo método de Bligh-Dayer modificado 640
354/IV Determinação de lipídios totais pelo método de Folch 642
Conservas de pescado 643

CAPÍTULO XIX VITAMINAS.....645-682

0355/IV Determinação de carotenóides em produtos naturais 647
0356/IV Determinação de ß-Caroteno em massas alimentícias 650
0357/IV Determinação de vitamina A em alimentos 652
0358/IV Determinação de vitamina A em matéria-prima 654
0359/IV Determinação de vitamina B_1 em alimentos 656
0360/IV Determinação da concentração da vitamina B_{12} em matéria-prima 658
0361/IV Doseamento microbiológico de vitamina B_{12} 660
0362/IV Determinação de vitamina B_2 em alimentos 662
0363/IV Determinação de vitamina B_6 em matéria-prima 665
0364/IV Determinação de vitamina C com iodato de potássio 666
0365/IV Determinação de vitamina C pelo método de Tillmans 668
0366/IV Determinação espectrofotométrica de vitamina C por redução de íons cúpricos 670
0367/IV Determinação de vitamina E (tocoferóis totais) 673
0368/IV Determinação de vitamina E em matéria-prima 675
0369/IV Determinação de niacina e nicotinamida 676

CAPÍTULO XX RESÍDUOS DE PESTICIDAS 683-701

Resíduos de pesticidas 685
370/IV Método multi-resíduo para determinação de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais 687
371/IV Método mult-iresíduo para determinação de resíduos de pesticidas e bifenilas policloradas em ..... produtos gordurosos 694
372/IV Método para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em frutas e vegetais 697

CAPÍTULO XXI FERMENTOS 703-711

Fermentos biológicos 705
373/IV Fermentos biológicos – Determinação de amido 705
374/IV Fermentos biológicos – Poder fermentativo 706
Fermentos químicos 708
375/IV Fermentos químicos – Determinação de CO_2 total pelo método gasométrico 1 708
376/IV Fermentos químicos – Determinação de CO_2 total pelo método gasométrico 2 710

CAPÍTULO XXII. SAL 713-734

Sal 715
377/IV Determinação da granulometria 716
378/IV Determinação da umidade 717
379/IV Determinação de insolúveis totais em água 717
380/IV Determinação de insolúveis inorgânicos em água 719
381/IV Determinação de cloretos em cloreto de sódio 719
382/IV Determinação de iodo adicionado na forma de iodeto 720
383/IV Determinação de iodo adicionado na forma de iodato 721
384IV Determinação da turbidez 722
385/IV Determinação de cálcio por permanganometria 723
386/IV Determinação de cálcio por titulação com EDTA 724
387/IV Determinação de magnésio por precipitação 726
388/IV Determinação de magnésio por titulação com EDTA 727
389/IV Determinação de sulfatos por precipitação 728
390/IV Determinação de sulfatos por titulação com EDTA 730

391/IV Determinação da composição provável 731
392/IV Sal hipossódico 734

CAPÍTULO XXIII MINERAIS E CONTAMINANTE INORGÂNICOS.....735-754

Minerais e contaminantes inorgânicos 737
Tratamento da amostra 737
393/IV Digestão da amostra 738
394/IV Determinação de minerais por espectrometria de absorção atômica com chama 740
395/IV Determinação de minerais por espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio ..... indutivamente acoplado 743
396/IV Determinação de cálcio por volumetria com EDTA 744
397/IV Determinação espectrofotométrica de ferro com α-α'-dipiridila 746
398/IV Determinação de fósforo por espectrofotometria na região do visível 748
399/IV Determinação de chumbo por espectrometria de absorção atômica com chama 750
400/IV Determinação de cádmio por espectrometria de absorção atômica com chama 752

CAPÍTULO XXIV MICOTOXINAS.....755-797

Micotoxinas 757
Riscos no manuseio de micotoxinas 758
As micotoxinas e a amostragem 758
401/IV Determinação de aflatoxina M_1 em leite por cromatografia em camada delgada 759
402/IV Determinação de aflatoxina M_1 em leite por CCD ou CLAE após separação em coluna de ..... imunoafinidade 760
403/IV Determinação de aflatoxinas por cromatografia em camada delgada 764
404/IV Determinação de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 por CCD, após separação em coluna de imunoafinidade 770
405/IV Determinação de desoxinevalenol 772
406/IV Determinação de fumonisina B_1 por CCD ou CLAE, após separação em coluna de imunoafinidade 775
407/IV Determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona por cromatografia em camada delgada.... 778
408/IV Determinação de ocratoxina A em café verde por CCD ou CLAE após separação em coluna de ..... imunoafinidade – Método 1 784
409/IV Determinação de ocratoxina A em café verde por CCD ou CLAE após separação em coluna de ..... imunoafinidade – Método 2 787
410/IV Determinação de ocratoxina A em café cru em grão por cromatografia em camada delgada 790
411/IV Determinação de patulina em suco de maçã 795

CAPÍTULO XXV GELADOS COMESTÍVEIS.....799-803

Gelados comestíveis 801
412/IV Determinação de gorduras pelo método de Rose Gottlieb 802

CAPÍTULO XXVI CEREAIS, AMILÁCEOS E EXTRATO DE SOJA.....805-818

Cereais e amiláceos 807
Farinhas e produtos similares 807
413/IV Farinhas e produtos similares – Determinação de umidade a 130°C 808
414/IV Farinhas e produtos similares – Determinação de umidade a 105°C 809
415/IV Farinhas e produtos similares – Determinação de acidez álcool solúvel 809
416/IV Determinação da acidez da gordura extraída da farinha de trigo 810

417/IV Farinhas e produtos similares – Determinação do pH 811
418/IV Farinhas e produtos similares – Determinação de glúten 811
419/IV Pesquisa de bromato em massa fresca para pão (prova de triagem) 812
420/IV Prova confirmatória de bromato por cromatografia em camada delgada 813
421/IV Colesterol em massas alimentícias 815
Malte 817
422/IV Malte – Determinação do extrato 817
Extrato de soja e bebida com extrato de soja 818

CAPÍTULO XXVII LEITES E DERIVADOS 819-877

Leite fluido: in natura, pasteurizado e UHT 821
423/IV Leites – Determinação da densidade a 15ºC 821
424/IV Leites – Determinação do grau refratométrico do soro cúprico a 20ºC 824
425/IV Leites – Determinação da adição de água por crioscopia eletrônica 825
426/IV Leites – Determinação da acidez em ácido láctico 827
427/IV Leites – Determinação da acidez em graus Dornic 828
428/IV Leites – Estabilidade ao etanol a 68% (teste do álcool) 829
429/IV Leites – Determinação do extrato seco total (resíduo seco a 105°C) 829
430/IV Leites – Determinação do extrato seco total por métodos indiretos 830
431/IV Leites – Determinação do extrato seco desengordurado 835
432/IV Leites – Determinação de glicídios redutores em lactose 835
433/IV Leites – Determinação de gordura pelo método de Gerber 836
434/IV Leites – Extração de gordura para determinação de ácidos graxos 837
435/IV Leites – Determinação de protídios 838
436/IV Leites – Determinação de caseína 838
437/IV Leites – Determinação de resíduo por incineração (cinzas) 838
438/IV Leites – Determinação da alcalinidade das cinzas em carbonato de sódio 839
439/IV Leites – Determinação da alcalinidade das cinzas em solução normal 840
440/IV Leites – Determinação de cloretos em cloreto de sódio 841
441/IV Leites – Identificação de amido 842
442/IV Leites –Identificação de sacarose com resorcina 843
443/IV Leites – Identificação de peróxido de hidrogênio com guaiacol 844
444/IV Leites – Identificação de peróxido de hidrogênio com pentóxido de vanádio 844
445/IV Leites – Identificação de peróxido de hidrogênio com iodeto 845
446/IV Leites – Identificação de formaldeído com floroglucina 845
447/IV Leites – Identificação de formaldeído com cloreto férrico 846
448/IV Leites – Identificação de formaldeído com ácido cromotrópico 846
449/IV Leites – Determinação de cloro e hipocloritos 847
450/IV Leites – Determinação de fosfatase 848
451/IV Leite e derivados – Prova de peroxidase 850
Leite em pó 851
452/IV Leite em pó – Prova de reconstituição 851
453/IV Leite em pó – Determinação da acidez em ácido láctico 851
454/IV Leite em pó – Determinação de substâncias voláteis 852
455/IV Leite em pó – Determinação de resíduo por incineração (cinzas) 853
456/IV Leite em pó – Determinação da alcalinidade das cinzas 853
457/IV Leite em pó – Determinação de gordura 853
458/IV Leite em pó – Extração de gordura para determinação de ácidos graxos 854

459/IV Leite em pó – Determinação de protídios 854
460/IV Leite em pó – Determinação de glicidios redutores em lactose 854
461/IV Leite em pó – Cromatografia de açúcares 854
Leite evaporado 854
462/IV Leite evaporado – Prova de reconstituição 855
Queijo 855
Preparo e conservação da amostra 855
463/IV Queijo – Determinação da acidez em ácido láctico 855
464/IV Queijo – Determinação de substâncias voláteis 856
465/IV Queijo – Determinação de gordura utilizando butirômetro especial 856
466/IV Queijo – Determinação de gordura utilizando butirômetro para leite 857
467/IV Queijo – Determinação de protídios 858
468/IV Queijo – Determinação de ácido sórbico e sorbato 858
469/IV Queijo – Reação de Kreis 858
Coalho 858
470/IV Coalho – Poder coagulante 859
Manteiga 860
471/IV Manteiga – Determinação de acidez em solução normal 860
472/IV Manteiga – Determinação de substâncias voláteis 860
473/IV Manteiga – Determinação de insolúveis em éter 861
474/IV Manteiga – Determinação da gordura 862
475/IV Manteiga – Determinação de resíduo por incineração (cinzas) 862
476/IV Manteiga – Determinação de cloreto em cloreto de sódio 863
477/IV Manteiga – Determinação do índice de refração 863
478/IV Manteiga – Determinação do índice de iodo 863
479/IV Manteiga – Determinação do índice de saponificação 863
480/IV Manteiga – Reação de Kreis 864
Margarina 864
Doce de leite 864
Preparo e conservação da amostra 864
481/IV Doce de leite – Determinação de acidez em solução normal 864
482/IV Doce de leite – Determinação de acidez em ácido láctico 865
483/IV Doce de leite – Determinação de substâncias voláteis 866
484/IV Doce de leite – Determinação de substâncias voláteis em estufa a vácuo 866
485/IV Doce de leite – Determinação de resíduo por incineração (cinzas) 867
486/IV Doce de leite – Determinação de gordura 868
487/IV Doce de leite – Determinação de protídios 869
488/IV Doce de leite – Determinação de glicídios redutores em lactose 869
489/IV Doce de leite – Determinação de glicídios não redutores em sacarose 870
490/IV Doce de leite – Determinação de glicídios não redutores em amido 872
491/IV Doce de leite – Cromatografia de açúcares 873
Leite condensado 873
Leites fermentados 874
492/IV Leites fermentados – Determinação do pH 874
493/IV Leites fermentados – Determinação de acidez em ácido láctico 874
494/IV Leites fermentados – Determinação de substâncias voláteis e extrato seco total 875
495/IV Leites fermentados – Determinação de resíduo por incineração (cinzas) 875
496/IV Leites fermentados – Determinação da gordura 875

497/IV Leites fermentados – Determinação da gordura com o butirômetro de Gerber ... 876
498/IV Leites fermentados – Determinação de protídios ... 876
499/IV Leites fermentados – Determinação de glicídios redutores em lactose ... 876
500/IV Leites fermentados – Determinação de glicídios não redutores em sacarose ... 876
Bebida láctea ... 876
Creme de leite ... 877
501/IV Creme de leite – Determinação de acidez em ácido láctico ... 877

CAPÍTULO XXVIII CONDIMENTOS E VINAGRES ... 879-888

Condimento vegetais ... 881
Condimentos preparados ... 882
502/IV Determinação de isotiocianato de alila em mostarda preparada ... 882
503/IV Condimentos – Determinação de óleos essenciais ... 883
Vinagres ... 885
504/IV Acidez total em vinagres e fermentados acéticos pelo método volumétrico ... 886
505/IV Acidez volátil em vinagres e fermentados acéticos pelo método volumétrico ... 886
506/IV Acidez fixa para vinagres e fermentados acéticos pelo método volumétrico ... 887
507/IV Vinagres e fermentados acéticos – Determinação de álcool em volume ... 888
508/IV Vinagres e fermentados acéticos – Determinação de extrato seco total ... 888
509/IV Vinagres e fermentados acéticos – Determinação de extrato seco reduzido ... 888

CAPÍTULO XXIX SEGURANÇA EM LABORATÓRIOS DE QUÍMICA ... 891-915

Introdução ... 893
Algumas regras de segurança ... 894
Noções de toxicologia, riscos e prevenções no manuseio de produtos químicos ... 897
O laboratório: projeto, construção e instalações ... 900
Acondicionamento de produtos químicos em laboratório ... 903
A água ... 905
Derramamento de produtos químicos ... 906
Cilindros de gás ... 907
Descarte de materiais ... 908
Cuidados com relação a alguns equipamentos ... 909
Materiais de vidro ... 912
Lavagem de vidrarias ... 913
Nota final ... 914
Referências bibliográficas ... 914

APÊNDICE I Soluções tituladas, indicadores, papel reativo e clarificadores ... **917-936**

Ácido clorídrico ... 919
Ácido oxálico ... 920
Ácido perclórico ... 921
Ácido sulfúrico ... 922
EDTA ... 923
Hidróxido de bário ... 924
Hidróxido de potássio ... 925
Hidróxido de sódio ... 926
Iodo ... 927

Nitrato de prata 928
Permanganato de potássio 929
Tiocianato de amônio 931
Tiossulfato de sódio 932
Solução de Dornic (NaOH 1/9 N) 933
Solução de Fehling 933
Indicadores 934
Papel reativo 935
Clareadores 935
Areia purificada para a determinação de substâncias voláteis 936

APÊNDICE II Guia para qualidade em química analítica **937-1002**

Índice 942
01. Metas e objetivos 943
02. Introdução 944
03. Definições e terminologia 945
Ensaios de proficiência 947
04. Acreditação 948
05. Escopo 953
06. A tarefa analítica 954
07. Especificação do requisito analítico 954
08. Estratégia analítica 955
09. Análises fora-de-rotina 955
10. Pessoal 957
11. Amostragem, manuseio e preparação de amostras 958
12. Ambiente 965
13. Equipamentos 966
14. Reagentes 969
15. Rastreabilidade 970
16. Incerteza de medição 972
17.Métodos/procedimentos para ensaios e calibração 976
18. Validação do método 977
19.Calibração 982
20. Materiais de referência (MR) 985
21.Controle de qualidade e ensaios de proficiência 987
22. Computadores e sistemas controlados por computador 989
23. Auditoria do laboratório e análise crítica 993
Referências bibliográficas 994
Siglas 1002

CAPÍTULO I

GESTÃO DA QUALIDADE LABORATORIAL

I

GESTÃO DA QUALIDADE LABORATORIAL

Apresentação

Internacionalmente, o processo de padronização das atividades dos laboratórios de ensaio e calibração teve início com a publicação da ISO/IEC Guia 25 em 1978, revisado posteriormente em 1993. Na Europa, em razão da não-aceitação da ISO Guia 25, vigorava a EN 45.001 como norma para reconhecer a competência dos ensaios e calibrações realizados pelos laboratórios.

Tanto a ISO Guia 25 como a EN 45.001 continham aspectos cujos níveis de detalhamento eram insuficientes para permitir uma aplicação/interpretação consistente e sem ambigüidades, como, por exemplo, o conteúdo mínimo a ser apresentado na declaração da política da qualidade do laboratório, a rastreabilidade das medições, as operações relacionadas às amostragens e o uso de meios eletrônicos. Para suprir essas lacunas, a ISO iniciou em 1995 os trabalhos de revisão da ISO Guia 25 através do Working Group 10 (WG 10) da ISO/CASCO (Committee on Conformity Assessment). Dessa revisão resultou a norma ISO/IEC 17.025 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, oficialmente datada de 15 de dezembro de 1999 e publicada internacionalmente no início do ano 2000. No Brasil, foi publicada pela ABNT a NBR/ISO/IEC 17.025, em janeiro de 2001.

A ISO/IEC 17.025 foi produzida como resultado de ampla experiência na implementação da ISO Guia 25 e da EN 45.001, que foram canceladas e substituídas de modo a serem utilizados textos idênticos nos níveis internacional e regional. Ela estabelece os critérios para aqueles laboratórios que desejam demonstrar sua competência técnica, que possuam um sistema de qualidade efetivo e que são capazes de produzir resultados tecnicamente válidos. Os principais objetivos da 17.025 são:

- Estabelecer um padrão internacional e único para atestar a competência dos laboratórios para realização de ensaios e/ou calibrações, incluindo amostragem. Tal padrão facilita o estabelecimento de acordos de reconhecimento mútuo entre os organismos de credenciamento nacionais;
- Facilitar a interpretação e a aplicação dos requisitos, evitando ao máximo opiniões divergentes e conflitantes. Ao incluir muitas notas que apresentam esclarecimentos sobre o texto, exemplos e orientações, a 17.025 reduz a necessidade de documentos explicativos adicionais;
- Estender o escopo em relação à ISO Guia 25, abrangendo também amostragem e desenvolvimento de novos métodos;
- Estabelecer uma relação mais estreita, clara e sem ambigüidade com a ISO 9.001 e 9.002 (a 17.025 é de 1999, portanto antes da publicação da 9.001:2000).

As principais modificações introduzidas pela 17.025 com relação à ISO Guia 25 podem ser divididas em dois grupos: mudanças estruturais e mudanças conjunturais. As estruturais dizem respeito à introdução de novos conceitos e enfoques, bem como ao ordenamento e à disposição dos requisitos listados na ISO/IEC 17.025, cuja apresentação difere completamente da estrutura existente na ISO Guia 25. São diferenças não apenas de forma, mas também de conteúdo, e que demonstram claramente a preocupação da nova norma em estabelecer orientações gerais e modernas para que os laboratórios desenvolvam um sólido gerenciamento das suas atividades segundo padrões de qualidade reconhecidos internacionalmente. Além disso, o aprofundamento de alguns requisitos de caráter técnico, antes superficiais na ISO Guia 25, propiciará melhores condições para que os laboratórios demonstrem de forma mais consistente sua competência técnica. Dentre as principais mudanças de caráter estrutural introduzidas pela 17.025, destacam-se:

- Na ISO/IEC 17.025 há uma nítida separação entre os requisitos gerenciais e os requisitos técnicos; a seção 4 contém os requisitos para a administração, e a seção 5 especifica os requisitos para a competência técnica dos ensaios e/ou calibrações que o laboratório realiza. Essa separação facilita a condução das avaliações, quer sejam internas ou externas;
- Maior atenção deve ser dada aos clientes do laboratório (item 4.7 – Atendimento ao cliente). Deverá ser privilegiada uma cooperação mais estreita com os clientes no que tange aos aspectos contratuais e ao acesso do cliente às áreas do laboratório para acompanhamento dos ensaios e/ou calibrações. Embora não sejam requisitos auditáveis, os laboratórios são encorajados a estabelecer canais de comunicação e obter *feedback* dos clientes;
- Foi incluído o requisito que trata das ações preventivas a serem tomadas pelo laboratório (item 4.11), pelo qual deverão ser identificadas oportunidades de melhoria;
- Como conseqüência da extensão do escopo com o desenvolvimento de novos métodos

pelo laboratório (item 5.4.3), critérios e orientações específicos foram estabelecidos para a validação de métodos (item 5.4.5);

- Compatibilidade e convergência com as normas ISO 9.001/9.002. Foram incorporados na ISO/IEC 17.025 todos os requisitos da 9.001 e 9.002 (ação preventiva, por exemplo) que são pertinentes ao escopo dos serviços de ensaio e calibração cobertos pelo sistema da qualidade do laboratório. Portanto, se os laboratórios de ensaio e calibração atenderem aos requisitos da 17.025, eles operarão um sistema da qualidade que também estará de acordo com os requisitos da 9.001 ou 9.002. Contudo, para efeitos de credenciamento do laboratório, a existência de um sistema da qualidade é condição necessária mas não suficiente para o pleno atendimento da 17.025, uma vez que os laboratórios terão que demonstrar ainda sua competência técnica para produzir dados e resultados tecnicamente válidos, o que não está presente na 9.001 nem na 9.002. Com a nova versão da ISO 9.001:2000, é provável que a ISO/CASCO forme um grupo de trabalho para estudar a possibilidade de serem feitos aditamentos técnicos para alinhar a ISO/IEC 17.025:1999 com a ISO 9.001:2000.

O segundo grupo de mudanças introduzidas pela 17.025, em comparação à ISO Guia 25, são as diferenças de natureza conjuntural, ou seja, melhorias e modificações pontuais que se constituem em ponto de partida para a evolução de aspectos gerenciais e de competência técnica abordados anteriormente na ISO Guia 25, mas que, por estarem redigidos de forma pouco abrangente, davam margem a dúvidas, omissões e conflitos. Dentre essas mudanças destacam-se:

- Definição do conteúdo mínimo a ser contemplado na declaração da política da qualidade do laboratório;
- Inclusão de um requisito específico (item 4.10) para a implementação de ações corretivas;
- Como conseqüência do alinhamento da ISO/IEC 17.025 com as ISO 9.001 e 9.002, o item 4.4 detalha em profundidade como deve ser desenvolvida a atividade de análise crítica dos pedidos, propostas e contratos, de modo a prover maior confiança na prestação dos serviços e no relacionamento entre o cliente e o laboratório;
- A rastreabilidade das medições é tratada no item 5.6 de modo detalhado e abrangente, contendo inúmeras notas explicativas e de orientação. Há um tratamento diferenciado na ISO/IEC 17.025 para a rastreabilidade a ser demonstrada pelos laboratórios de calibração (item 5.6.2.1) e pelos laboratórios de ensaio (item 5.6.2.2);
- Destaque maior é dado à apresentação dos resultados dos ensaios e/ou calibrações, sendo este tópico muito mais extenso do que aquele contido na ISO Guia 25. Há uma distinção clara entre a emissão de relatórios de ensaio (item 5.10.3) e a emissão de certificados de calibração (item 5.10.4). No item 5.10.5 são especificados os requisitos a serem cumpridos pelo laboratório quando forem incluídas opiniões e interpretações em um relatório de ensaio, o que antes não era abordado na ISO Guia 25.

À primeira vista, as modificações introduzidas pela ISO/IEC 17.025:1999 dão a impressão de tê-la tornado uma norma mais rigorosa e "pesada" do que a ISO Guia 25. De fato, aquela é agora mais extensa e descritiva do que esta. Entretanto, uma leitura cuidadosa da 17.025 nos permite afirmar que ela, por ser mais detalhada e explicativa, é de aplicação mais pragmática e menos ambígua do que a ISO Guia 25. As regras do jogo foram modernizadas, os requisitos ficaram mais claros, pontos obscuros foram mais bem explicitados e, por demanda dos laboratórios e como conseqüência da proliferação do uso de sistemas da qualidade, houve uma convergência completa com os requisitos das ISO 9.001 e 9.002. Como mencionado anteriormente, em um futuro não muito distante será necessário fazer um alinhamento entre a ISO/IEC 17.025 e a nova ISO 9.001:2000.

No mundo globalizado, a padronização é de fundamental importância para viabilizar e incrementar as trocas comerciais nos âmbitos regional, nacional e internacional. As organizações que desenvolvem suas atividades e operam os seus processos produtivos de acordo com normas e procedimentos harmonizados e aceitos como padrões estarão em condições mais favoráveis para superar possíveis barreiras não-tarifárias e atender a requisitos técnicos especificados. Nesse contexto, a aplicação da ISO/IEC 17.025 é de grande relevância econômica, pois confere um valor diferenciado aos certificados de calibração e aos relatórios de ensaio emitidos por laboratórios cuja competência técnica é reconhecida por um organismo de credenciamento. Esse reconhecimento poderá se reverter em vantagens econômicas para os laboratórios, tais como:

- Diferencial competitivo, fator de divulgação e marketing, o que poderá resultar em maior participação no mercado e, conseqüentemente, em maior lucratividade;
- Fidelização dos clientes atuais e conquista de novos clientes, uma vez que o credenciamento confirma e reconhece a competência técnica do laboratório para produzir dados e resultados tecnicamente válidos, o que aumenta a sua credibilidade perante o mercado;
- Laboratórios que fazem parte de organizações maiores e que operam em conformidade com os requisitos da ISO/IEC 17.025 poderão comprovar que os produtos da organização foram ensaiados e são tecnicamente capazes de atender às especificações de desempenho, segurança e confiabilidade;
- Crescimento das atividades de certificação de produtos representa um novo mercado a ser explorado pelos laboratórios de ensaio e/ou calibração;
- Os resultados de ensaio e calibração poderão ser aceitos em outros países, desde que o laboratório utilize os critérios da ISO/IEC 17.025 e seja credenciado por um organismo que estabeleça acordos de reconhecimento mútuo com organismos equivalentes de outros países. Este é o caso do INMETRO, que recentemente estabeleceu um acordo de reconhecimento mútuo com a European Co-operation for Acreditation (EA);
- Atender a exigências legais de autoridades regulamentadoras, como, por exemplo, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

- O uso da ISO/IEC 17.025 facilitará a cooperação entre laboratórios e outros organismos, auxiliando na troca de informações e experiências, bem como na harmonização de normas e procedimentos, o que poderá significar redução de custos.

Em suma, a adequação das atividades gerenciais e técnicas do laboratório de acordo com os critérios da ISO/IEC 17.025 deve ser vista não como um custo, mas como um investimento de médio e longo prazos, cujo retorno comercial e financeiro certamente será garantido pela comprovação da competência técnica do laboratório perante o mercado. (Valle & Bicho)

Introdução

Atualmente é indiscutível a importância do trabalho com qualidade, em qualquer esfera profissional. A demonstração da competência técnica alicerçada em regras internacionais consensuadas é pré-requisito para a sobrevivência de qualquer laboratório. O artigo que apresenta este capítulo é a prova cabal da importância da implantação da norma NBR ISO/IEC 17025.

O primeiro passo para a concretização de um Sistema de Qualidade em um laboratório é a criação de uma Comissão Permanente da Qualidade, capitaneada por um gerente ou coordenador da qualidade e um substituto ou vice-gerente, com a total aprovação da alta administração do laboratório.

Esta comissão deve desenvolver várias atividades no sentido de implementar o Sistema de Qualidade, de acordo com os requisitos da norma ABNT ISO/IEC 17.025, sendo que a maioria delas diz respeito à motivação, conscientização e capacitação dos funcionários, preparando-os para incorporar uma mentalidade pró-ativa, capaz de lidar com as mudanças de forma dinâmica e de enxergar as oportunidades de melhoria onde antes só viam problemas. Deve também, na medida do possível, prover os laboratórios dos meios necessários para o desenvolvimento das atividades relacionadas com a qualidade.

A grande maioria dos laboratórios que desenvolvem suas atividades no controle da qualidade de alimentos deve optar pela Norma ABNT ISO/IEC 17.025. Entretanto, aqueles que, além das atividades de rotina desenvolvem pesquisas como nos seguintes casos:
a) estudos que fundamentem a concessão, renovação ou modificação de registro de aditivos para alimentos, agrotóxicos, alimentos transgênicos, rações e outros afins, por organismos regulamentadores/fiscalizadores com fins de responsabilização para comercialização.
b) estudos conduzidos em resposta a questionamentos de organismos de qualquer setor governamental, deverão também seguir as Boas Práticas de Laboratório (BPL), além da norma descrita acima para suas atividades de rotina.

O Guia para Qualidade em Química Analítica - Uma Assistência à Acreditação, guia da EURACHEM traduzido para o português encontra-se no Apêndice 2. Ele é de grande valia para a implantação da qualidade nos laboratórios de ensaio e uma referência importante para consulta.

Siglas, Sites e Definições

Algumas siglas, sites e definições estão descritas a seguir e são úteis na compreensão deste capítulo e de outros textos relacionados com temas da qualidade.

Siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIPM – Bureau Internacional de Pesos e Medidas
CB – 25 – Comitê Brasileiro da Qualidade
GGLAS – Gerência Geral de Laboratórios em Saúde, da ANVISA
IEC – International Electromechanical Comission
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO − International Organization for Standardization.
LNM – Laboratório Nacional de Metrologia
NIG – Norma Geral – INMETRO.
NIST – National Institute of Standards and Technology
NIT – Norma Técnica – INMETRO.
NPL – The National Physical Laboratory
OIML – Organização Internacional de Metrologia Legal
PDCA – Plan, Do, Check, Act
POP – Procedimento Operacional Padrão.
PTB – Physikalisch -Technische Bundesanstalt
RBC – Rede Brasileira de Calibração.
REBLAS – Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde.
SI - Sistema Internacional de Unidade

Sites

Farmacopéia Brasileira
http://coralx.ufsm.br/farmacopeia

Farmacopéia Alemã
http://www.bfarm.de/de/Arzneimittel/azbuch/index.php

Farmacopéia Americana
http://www.usp.org

Farmacopéia Britânica
http://www.pharmacopoeia.org.uk

Farmacopéia Européia
http://www.pheur.org

Farmacopéia Francesa
http://agmed.sante.gouv.fr/htm/pharma/accueil.htm

Farmacopéia Japonesa
http://moldb.nihs.go.jp/jp/index.html

Farmacopéia Mexicana
http://www.ssa.gob.mx/unidades/dgcis/farmacopea/indexFEUM.htm
Index of Pharmacopoeias, by WHO

http://www.who.int/medicines/organization/qsm/activities/qualityassurance/pharmacopea/who-edm-qsm-2002_6.doc
Índice de farmacopéias mundiais, compilado pela Organização Mundial de Saúde - OMS.

Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT
http://www.abntdigital.com.br
Responsável pela normalização técnica no país, fornecendo a base necessária ao desenvolvimento tecnológico brasileiro.

Fundação Nacional de Saúde - Funasa
http://www.funasa.gov.br
Órgão executivo do Ministério da Saúde, tem como missão ser uma agência de excelência em promoção e proteção à saúde.

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
http://www.fiocruz.br
Fundação vinculada ao Ministério da Saúde do Brasil, desenvolve ações na área da ciência e tecnologia em saúde.

Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho - FUNDACENTRO
http://www.fundacentro.gov.br
Entidade vinculada ao Ministério do Trabalho e Emprego - é o centro brasileiro de pes-

quisas em segurança, saúde e meio ambiente no trabalho.

Fundação Bio-Rio
http://www.biorio.org.br
Instituição de direito privado sem fins lucrativos, foi instituída por duas Agências financiadoras de pesquisa e desenvolvimento, a FINEP e o CNPq.

Instituto Butantan - SP
http://www.butantan.gov.br
O Instituto Butantan é um centro de pesquisa biomédica vinculado à Secretaria da Saúde do Governo do Estado de São Paulo.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO
http://www.inmetro.gov.br
Organismos de Certificação e Inspeção ao mesmo tempo em que vem trabalhando para que o país ingresse competitivamente no mercado externo.

Rede Metrológica RS
http://www.redemetrologica.com.br
A Associação Rede de Metrologia e Ensaios do Rio Grande do Sul - Rede Metrológica RS, é uma Organização não-governamental de cunho técnico-científico.
A Rede é constituída por laboratórios especializados em Calibração e Ensaios, avaliados periodicamente de acordo com padrões internacionais.

Sociedade Brasileira de Metrologia - SBM
http://www.sbmetrologia.org.br
Tem como principal objetivo a persuasão de cientistas e profissionais de todos os níveis de formação acadêmica e profissional interessados na ciência e na tecnologia das medições.

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé - AFSSAPS
http://agmed.sante.gouv.fr
Site da Agência Francesa de Segurança Sanitária de Produtos para a Saúde; contém informações sobre a farmacopéia francesa, textos regimentais e monografias em consulta pública naquele país.

American National Standards Institute - ANSI
http://www.ansi.org
Instituição americana de normalização técnica, fornecendo a base necessária ao desenvolvimento tecnológico do país.

Asia Pacific Laboratory Accreditation Cooperation – APLAC

http://www.ianz.govt.nz
Instituição que conglomera os organismos da Ásia e Pacífico com responsabilidade de credenciamento de laboratórios, ensaios e calibração.

Association of Official Analytical Chemists - A.O.A.C. International
http://www.A.O.A.C..org
Instituição americana que trata de credenciamento de laboratórios de alimentos

Bundesnastait für Materialforachung und - prüfung - BAM
http://www.bam.de
Instituição pública alemã que trata de teste em materiais.

Bureau International des Poids et Mesures (BIPM)
http://www.bipm.fr
Organização Metrológica Internacional sediada em Paris-França, estabelecida pela Convenção do Metro (Convention of the Metre) com a a atribuição de assegurar a uniformidade mundial de pesos e medidas e sua rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades (SI).

Code of Reference Materials (COMAR)
http://www.comar.bam.de
Informações sobre o COMAR (Base de Dados de Materiais de Referência Certificados), criado com o intuito de auxiliar aos profissionais de laboratórios de ensaios na busca por materiais de referência (MR's) adequados aos seus trabalhos. Idealizado pelo Serviço de Materiais de Referência do Laboratório Nacional de Ensaios (Reference Materials Service of the Laboratoire National d'Essais), um dos 5 laboratórios básicos do Departamento Nacional de Metrologia Francês (French Bureau National de Métrologie), foi desenvolvido e é mantido com a colaboração de vários países.

Environment, Health and Safety - OECD
http://www.oecd.org
Organização econômica que trata das questões técnicas na comunidade européia e discute no Painel GLP os seus critérios.

EURACHEM
http://www.eurachem.bam.de
Instituição européia que conglomera instituições que tratam da química analítica na Europa.
European Co-operation for Accreditation – EA
http://www.european-accreditation.org
Instituição européia que conglomera instituições de organismos credenciadores na Europa e em outros continentes

European Federation of National Associations of Measurament, Testing and Analytical Laboratories – EUROLAB
http://141.63.4.16/maintext.html
Instituição européia com enfoque em química analítica na comunidade européia.

European Information System on Proficiency Testing Schemes - EPTIS
http://www.eptis.bam.de
Sistema de informação europeu de teste de proficiência.

Food Analysis Performance Assessment Scheme - FAPAS
http://ptg.csl.gov.uk/fapas.cfm
Organismo do Reino Unido que trata de credenciamento de laboratório de alimentos.

Indian Systems of Medicine & Homoeopathy
http://indianmedicine.nic.in
Site do Sistema Indiano de Medicina e Homeopatia.

Instituto Português da Qualidade – IPQ
http://www.ipq.pt
Organismo português destinado ao credenciamento de laboratórios.

International Laboratory Accreditation Cooperation – ILAC
http://www.ipq.pt
Instituição internacional que conglomera instituições credenciadoras de laboratórios de ensaio e calibração.

International Organization for Standardization
http://www.iso.ch
Organização não governamental estabelecida em 1947, tem por missão promover o desenvolvimento mundial da padronização e demais atividades relacionadas, visando facilitar o intercâmbio internacional de bens e serviços e fomentar a cooperação nas esferas intelectual, científica, tecnológica e da atividade econômica.

National Athletic Trainers' Association – NATA
http://www.nata.asn.au
Instituição privada australiana que trata do credenciamento de laboratórios microbiológicos.

National Committee for Clinical Laboratory Standards –NCCLS
http://www.nccls.org
Organismo normalizador na área laboratorial no E.E.U.U que desenvolve padrões que

melhoram os valores dos testes clínicos dentro da comunidade de saúde através do desenvolvimento e disseminação dos padrões, guias e melhores práticas.

National Conference of Standards Laboratories – NCSL
http://www.ncsli.org
Sociedade de normalização americana com interesse na ciência da medição e sua aplicação na pesquisa, desenvolvimento e educação nos laboratórios de análises clínicas.

National Institute of Health Sciences - NIHS (Japão)
http://www.nihs.go.jp
Instituição de saúde japonesa estabelecida em Tókio em 1874, originalmente com o nome de Tokyo Drug Control Laboratory (Laboratório de Controle de Drogas de Tókio), é hoje a principal organização dentro do Ministério da Saúde e Bem-Estar do Japão, sendo também o mais antigo instituto de pesquisa naquele país.

National Institute of Standards and Technology – NIST
http://www.nist.gov
Instituição pública americana que trata da metrologia, padrões e tecnologias de medição.

Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS
http://www.opas.org.br
Organismo internacional de saúde pública com um século de experiência, dedicado a melhorar as condições de saúde dos países das Américas. Ela também atua como Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) para as Américas e faz parte dos sistemas da Organização dos Estados Americanos (OEA/OAS) e da Organização das Nações Unidas (ONU/UN).

Panalimentos.org
http://www.panalimentos.org
Página mantida pelo Instituto Pan-americano de Proteção de Alimentos e Zoonose (INPPAZ), organização que tem a missão de fornecer cooperação técnica em inocuidade alimentar a todos os países das Américas, com o objetivo de diminuir os riscos para a saúde da população humana, originados pelas enfermidades transmitidas por alimentos, e considerando todas as etapas da cadeia alimentar.

Physikalisch Techaische Bundesanstalt – PTB
http://www.ptb.de
Instituição pública alemã que trata da política e guarda dos padrões primários e política de calibração.

The Centers for Disease Control and Prevention – CDC
http://www.cdc.gov
Agência federal estadunidense responsável pela segurança e proteção da saúde da população daquele país. O CDC trabalha no desenvolvimento e administração de medidas de prevenção e controle de enfermidades (incluindo doenças emergentes), na manutenção da saúde ambiental, e na promoção e planejamento de atividades educativas voltadas para a melhoria da saúde da população dos Estados Unidos da América.

United Kingdom Accreditation Service – UKAS
http://www.ukas.com
Organismo inglês privado que trata do credenciamento de laboratório de ensaio e de calibração.

U.S. Food and Drugs Administration – FDA
http://www.fda.gov
Órgão governamental norte americano responsável pela regulamentação de produtos das áreas médica, cosmética e alimentícia, produzidos e comercializados naquele país.

Definições

Ação corretiva – Ação implementada nas ocorrências de não conformidades em relação aos produtos, serviços associados e processos de acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade.

Ação preventiva – Ação implementada para eliminar ou prevenir as causas de possível não-conformidade, um defeito ou uma situação indesejável. Deve ser verificada sempre sua eficácia.

Acreditação – Procedimento pelo qual um organismo autorizado reconhece formalmente que um laboratório é competente para desenvolver os ensaios que realiza.

Alta administração – É o órgão ou pessoa que executa a política traçada pela administração superior, dirigindo, coordenando e controlando os recursos humanos e materiais que assegurem eficiência e bom desempenho administrativo e, é o executor das análises críticas do sistema de qualidade.

Análise crítica – Avaliação formal, feita pela alta administração de um sistema da qualidade quanto ao estado e adequação aos requisitos e política da qualidade.

Área de acesso controlado – Área em que somente pessoas autorizadas podem entrar e circular.

Auditado – Laboratório ou organização que está sendo auditada; deve concordar com os elementos da auditoria.

Auditor da qualidade – Pessoa qualificada para desenvolver uma auditoria da qualidade; deve conhecer as ferramentas da qualidade.

Auditoria da qualidade – Exame sistemático e permanente, independente, para verificar se as atividades da qualidade e seus objetivos e resultados estão de acordo com as disposições planejadas.

Calibração – Conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição ou sistema de medição ou valores representados por uma medida materializada ou um material de referência e os valores correspondentes das grandezas estabelecidas por padrões.

Cliente – Comprador firmado em contrato; destinatário de um produto ou serviço; consumidor final; usuário; segunda parte.

Comparações interlaboratoriais – Organização, desempenho e avaliação de ensaios nos mesmos itens ou em itens de ensaios similares, por dois ou mais laboratórios, de acordo com condições predeterminadas.

Competência – Capacidade demonstrada para aplicar conhecimento e habilidades.

Conformidade – Atendimento a requisitos especificados.

Contratado – Fornecedor firmado em contrato.

Documentos da qualidade – São todos os documentos gerados internamente ou obtidos de fontes externas e que fazem parte do sistema da qualidade. Ex.: manuais de equipamentos, legislações, pops, manual da qualidade, instruções, registros, dados brutos, etc.

Eficácia – Extensão na qual as atividades planejadas e os resultados planejados, alcançados.

Eficiência – Relação entre o resultado alcançado e os recursos usados.

Ensaio – Operação técnica que consiste na determinação de uma ou mais características de um dado produto, processo ou serviço, de acordo com procedimento especificado.

Ensaio de proficiência – Determinação do desempenho de ensaios de laboratórios, por meio de comparações interlaboratoriais.

Equipamento e Instrumento de medição – Dispositivo utilizado para uma medição, sozinho ou em conjunto com dispositivo(s) complementar(es).

Equipamentos críticos – Aqueles que interferem diretamente no resultado dos ensaios.

Equipamentos não críticos – São aqueles que não interferem no resultado dos ensaios.

Evidência objetiva – dados que apóiam a existência ou a veracidade de alguma coisa.

Exatidão da medição – Grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro do mensurando.

Fornecedor – Organização que fornece produtos ao cliente.

Garantia da qualidade – Conjunto das atividades que são implementadas pelo Sistema da Qualidade para prover a confiança adequada de que o laboratório ou a organização adere aos requisitos da qualidade que lhe são exigidos.

Gestão da qualidade – Conjunto de atividades da gerência de uma organização que determinam a política da qualidade, seus objetivos e responsabilidades. Deve ser liderada pela alta administração da organização.

Incerteza da medição – Parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentalmente atribuídos a um mensurando.

Item de ensaio – Material ou artefato apresentado ao laboratório para análise, amostra.

Laboratório de referência – Laboratório que fornece valores de referência para um item de ensaio.

Manual da qualidade – Documento que declara a política da qualidade e descreve o sistema da qualidade de um laboratório ou organização.

Manutenção corretiva – Manutenção não programada a ser conduzida quando for detectado desvio de funcionamento do equipamento.

Manutenção preventiva – Manutenção programada com determinada freqüência e definida pelo laboratório.

Material de referência – Material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos, para ser usado na calibração de

um aparelho, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais.

Material de referência certificado – Material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos. E cada valor certificado é acompanhado de uma incerteza para um nível de confiança estabelecido.

Medição – Conjunto de operações que têm por objetivo determinar o valor de uma grandeza.

Melhoria da qualidade – Parte da gestão da qualidade focada no aumento da capacidade de atender aos requisitos da qualidade, que podem estar relacionados com a eficácia e a eficiência ou a rastreabilidade do sistema.

Mensurando – Objeto da medição, grandeza específica submetida à medição.

Método de ensaio – Procedimento técnico especificado para realizar um ensaio.

Não-conformidade – Não-atendimento a requisitos especificados.

Organismos credenciadores – Organizações nacionais e internacionais que estabelecem, por um ciclo definido de avaliações e de auditorias, a competência técnica de um laboratório de ensaios ou de calibrações.

Organização – Grupo de instalações ou pessoas com um conjunto de responsabilidades, autoridades e relações.

Padrão de referência – Geralmente tem a mais alta qualidade metrológica disponível em um dado local ou em uma dada organização, a partir do qual as medições lá executadas são derivadas.

Padrão de trabalho – Padrão utilizado rotineiramente para calibrar ou controlar medidas materializadas, instrumentos de medição ou materiais de referência.

Parâmetros críticos – Grandezas ou faixas que interferem diretamente no ensaio.

Precisão – Grau de concordância entre os resultados independentes de ensaios obtidos conforme condições preestabelecidas.

Procedimento – Forma especificada de executar uma atividade. Podem ser chamados de procedimentos escritos ou documentados.

Processo – Conjunto de atividades inter-relacionadas ou interativas que transformam insumos (entradas) em produtos (saídas).

Qualidade – Grau no qual um conjunto de características inerentes satisfaz os requisitos. Totalidade das características de uma instituição que lhe confere a capacidade de satisfazer as necessidades explícitas e implícitas de seus clientes internos e externos.

Rastreabilidade de uma medição – Propriedade do resultado de uma medição ou do valor de um padrão estar relacionado a referências estabelecidas, geralmente padrão nacional ou internacional, por meio de uma cadeia contínua de comparações, todas tendo incertezas estabelecidas.

Rastreabilidade do Sistema da Qualidade – Capacidade de recuperação do histórico da aplicação ou da localização de um documento/amostra/ensaio por meio de registros.

Registro – Documentos que fornecem a evidência objetiva das atividades relacionadas aos resultados obtidos de um sistema de qualidade.

Regulagem – Ajuste realizado com os recursos disponíveis no instrumento.

Repetitividade – Grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições de medição.

Reprodutividade – Grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.

Requisito – Necessidade ou expectativa que é expressa, geralmente de forma implícita ou obrigatória.

Resultado de ensaio – Valor obtido de uma característica por um método de medição especificado realizado por completo.

Sistema – Conjunto de elementos inter-relacionados ou interativos.

Sistema de gestão – Sistema para estabelecer política e objetivos, e para atingir estes objetivos.

Sistema de gestão da qualidade – Sistema de gestão para dirigir e controlar uma organização no que diz respeito á qualidade.

Sub-contratado – Organização que fornece um produto ou serviço a um fornecedor; subfornecedor.

Verificação periódica – Conferência periódica das condições dos equipamentos.

Implantação do Sistema da Qualidade

Este capítulo não tem a pretensão de capacitar o leitor para implantar um Sistema de Qualidade Laboratorial. Nossa intenção é fornecer alguns subsídios da experiência do Instituto Adolfo Lutz que talvez possam ser úteis para iluminar um pouco mais o caminho daqueles laboratórios que estão iniciando a implantação de seu Sistema da Qualidade.

Para a implantação de um Sistema de Qualidade em um laboratório, independentemente de seu tamanho e número de análises realizadas, sugere-se seguir as seguintes etapas: motivação, capacitação, elaboração dos documentos da qualidade, treinamento nos documentos da qualidade, preparação do laboratório, auditorias internas, habilitação/acreditação.

Motivação

É difícil definir exatamente o conceito de motivação, uma vez que este termo tem sido utilizado com diferentes sentidos. De um modo geral, "motivo é tudo aquilo que impulsiona a pessoa a agir de determinada forma ou, pelo menos, que dá origem a uma propensão a um comportamento específico". Este impulso à ação pode ser provocado por um estímulo externo (provocado pelo ambiente) ou interno (provocado pelo próprio indivíduo).

O ponto de partida para a implantação da qualidade em um laboratório ou em qualquer organização é o fator motivacional. Estamos vivenciando uma época de mudanças constantes e velozes e as organizações e seus funcionários devem se moldar a esta realidade para competirem e sobreviverem. À medida que as organizações crescem, o número de níveis hierárquicos aumenta e ocorre um distanciamento entre a alta administração e os funcionários, o que conduz a um conflito entre os objetivos individuais (pessoais) e organizacionais (da alta administração).

A implantação da qualidade acarreta um volume de trabalho maior, o que ocasiona na maioria dos indivíduos desmotivação, desinteresse e desânimo, pois eles não conseguem perceber que, a longo prazo, seu trabalho será enormemente facilitado. A integração entre as pessoas e a alta administração é complicada e dinâmica e, para melhor resolver esta complicação e trabalhar este dinamismo, atividades motivacionais passam a ser um excelente meio

facilitador, não somente entre o indivíduo e a organização, mas entre os próprios indivíduos. O grande desafio é justamente despertar e desenvolver o fator motivacional existente no interior de cada ser humano.

Qualquer que seja a forma de motivação (curso, palestra, vivência, vídeo, etc.) ela deve deixar nos técnicos os seguintes principais conceitos:

- a qualidade implica em melhoria contínua.
- todos são igualmente importantes para a qualidade.
- a qualidade depende do trabalho em equipe.
- qualidade não se impõe, conquista-se por meio de motivação, treinamento e experiência.

A forma de motivação escolhida deve, também, provocar em seus colaboradores um comportamento positivo e produtivo, garantindo a vontade de aprimoramento, o prazer de produzir resultados com qualidade e a vontade de seguir os princípios básicos da qualidade:

- total satisfação do cliente (interno ou externo).
- gerência participativa.
- desenvolvimento dos recursos humanos.
- constância de propósito.
- aperfeiçoamento contínuo.
- gerência de processo.
- não-aceitação dos erros.
- delegação.
- disseminação de informações.
- garantia de qualidade.

Capacitação

O Programa da Qualidade deve ser implantado gradualmente, contemplando ações de produção de conhecimento, baseadas na análise sistemática dos resultados, gerando instrumentos que contribuam para obter êxito a médio e longo prazo ou de impacto, segundo o definido nos objetivos do Sistema da Qualidade.

Um dos passos mais importantes para a implementação da Qualidade no laboratório se refere à capacitação de seus funcionários.

O planejamento do treinamento para os recursos humanos deve ser estabelecido com muito critério, respeitando-se o grau de escolaridade de cada funcionário e suas atribuições dentro da qualidade.

A capacitação deve iniciar sempre com uma sensibilização de todos os funcionários da instituição, a fim de garantir a assimilação dos conceitos de qualidade; deve ficar claro o papel de cada funcionário com relação a todo o processo, para atingir a melhoria contínua da qualidade.

O pessoal técnico mais envolvido com o Programa da Qualidade e que realiza os ensaios que eventualmente serão habilitados ou acreditados, deve ser objeto de treinamentos específicos e mais aprofundados, para capacitação em qualidade.

O **Quadro 1** sugere alguns cursos que podem ser ministrados aos funcionários dos laboratórios, de acordo com suas funções e grau de escolaridade.

Quadro 1 - Relação de cursos de acordo com a escolaridade e funções dos funcionários.

CURSO/TREINAMENTO	NÍVEL	FUNÇÃO
Histórico da qualidade	Td	Td
Introdução à qualidade	Td	Td
A importância do trabalho com qualidade	Td	Td
Fatores motivacionais para o trabalho	Td	Td
Quais os benefícios da qualidade	Td	Td
Como obter a melhoria contínua no trabalho	Td	Td
Atitudes pessoais para a qualidade	Td	Td
Mudanças culturais nos trabalhadores	Td	Td
Princípios da qualidade em uma Instituição	Td	Td
Capacitação para o trabalho	Td	Td
Conceito sobre o PDCA e o aprimoramento contínuo	EM	ADM
Atendimento ao cliente	Td	Td
Conceitos sobre o modelo de gestão baseada em processos	EM	ADM
Como construir indicadores e apresentar resultados	EM	ADM/T
Indicadores de desempenho de qualidade	EM	ADM/T
Os desafios a serem enfrentados na implantação da qualidade	EM	ADM/T

CURSO/TREINAMENTO	NÍVEL	FUNÇÃO
Noções de acreditação pelo INMETRO	EM	ADM/T
Noções de habilitação pela GGLAS	MEM	ADM/T
Vantagens da acreditação / habilitação	MEM	ADM/T
Biossegurança (ênfase em resíduos)	MEM	T
Interface entre qualidade e biossegurança	MEM	T
Construção de mapas de risco	MEM	T
Segurança ocupacional e biossegurança	MEM	T
Regras universais de biossegurança	MEM	T
Níveis de biossegurança laboratorial	MEM	T
Equipamentos de proteção individual e coletiva	MEM	T
Segurança química e emergências químicas	MEM	T
Resíduos de serviços de saúde	MEM	T
Limpeza, descontaminação e esterilização	EF	T
Transporte de amostras dentro do laboratório	EF	T
Programa Cinco Esses	Td	Td
Norma ISO/IEC 17.025 – Apresentação	Td	Td
Norma ISO/IEC 17.025 – Requisitos gerenciais aprofundados	MEM	ADM
Norma ISO/IEC 17.025 – Inteira aprofundada	MEM	T
Auditorias internas	MEM	ADM/T
Formação de auditores	MEM	ADM/T
Elaboração de procedimentos	Td	ADM/T
Temporalidade de documentos e amostras	MEM	ADM/T
Comprando com qualidade	MEM	ADM/T
Validação de métodos	MEM	T
Estudos colaborativos	MEM	T
Organismos internacionais envolvidos na validação de métodos analíticos	MEM	T
Cálculo de incerteza de medição	MEM	T
Interpretação dos certificados de calibração	MEM	T
Boas Práticas de Laboratório / BPL	MEM	T

ADM = área administrativa
T = área técnica
Td = todos
EF = ensino fundamental
EM = ensino médio
MEM = no mínimo ensino médio

Pessoal

Além da capacitação para a qualidade, o pessoal técnico e administrativo tem que demonstrar sua competência na área em que atua. Isto é demonstrado por meio de seu currículo. Em cada laboratório ou setor administrativo, deve existir uma pasta, individual ou coletiva, com os currículos de todos os funcionários daquele local, com os seguintes principais dados: nome, tempo de atuação na área, escolaridade, pós-graduação (se for o caso), cursos, treinamentos, simpósios e seminários, publicações (se for o caso), experiência profissional, outras atividades profissionais relacionadas, assinaturas do funcionário e de seu chefe imediato e data. Além disso, se possível nesta mesma pasta, cada funcionário deve assinar um termo de confidencialidade, onde se compromete a manter o caráter confidencial das informações decorrentes das atividades por ele desenvolvidas no laboratório.

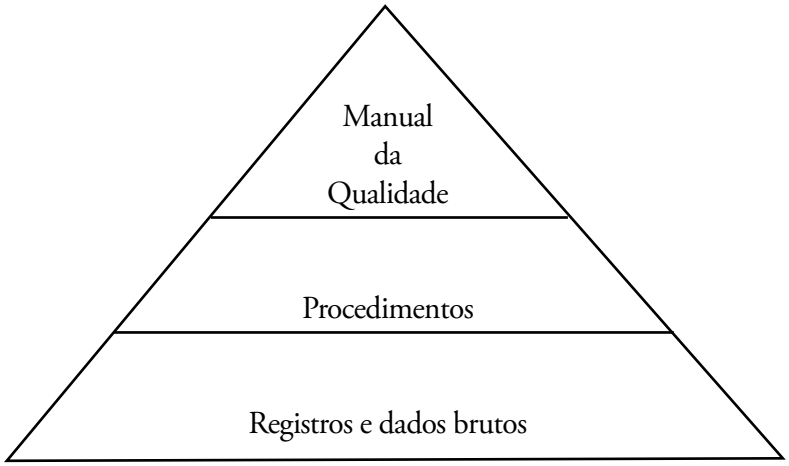
Elaboração dos Documentos da Qualidade

Uma das principais características de qualquer Sistema da Qualidade é documentar todas as atividades realizadas no laboratório ou organização, com a finalidade de padronizá-las.

A documentação da qualidade descreve e define políticas, diretrizes, procedimentos técnicos e administrativos, ações preventivas e corretivas, instruções de uso de equipamentos, planos de calibração, especificações técnicas, registros de dados brutos, planos de capacitação de pessoal, análises críticas do sistema da qualidade, entre outros, necessários para a implantação e implementação do Sistema da Qualidade em um laboratório ou organização.

Os documentos mínimos necessários para a implantação do Sistema da Qualidade são: o Manual da Qualidade, que contém a declaração formal da política da qualidade do laboratório e os componentes do seu Sistema da Qualidade, os procedimentos operacionais padrão – POPs, especificamente referidos na norma NBR ISO/IEC 17.025 e os documentos referentes aos ensaios realizados, como os registros dos dados brutos, os certificados de calibração dos equipamentos, a qualidade dos materiais de referência, entre outros.

Normalmente, costuma-se hierarquizar estes documentos na figura de um triângulo, onde, no vértice, estaria o Manual da Qualidade, pela sua importância, pois nele estão contidas todas as diretrizes e as políticas da qualidade. Na parte central, encontram-se os POPs, que são em maior número e descrevem todas as atividades técnico-administrativas do Sistema da Qualidade. Na base do triângulo, encontram-se as intenções de trabalho os dados brutos e os registros, que são aqueles em maior número no sistema.



Os procedimentos escritos têm por finalidade descrever as atividades a serem realizadas, passo a passo, com um texto claro, evitando o excesso de detalhamento, porém sem omitir etapas.

Sempre que possível, o funcionário que executa a tarefa deve escrever o procedimento; um outro companheiro que também conhece o trabalho deve revisar o texto para verificar possíveis omissões de etapas ou falta de clareza e o gerente da qualidade ou seu representante deve aprovar o POP, apenas quanto na forma padronizada para procedimentos da qualidade.

Podem haver casos em que o funcionário que executa a tarefa não tenha familiaridade com elaboração de textos. Nesta eventualidade, alguém do laboratório deve ajudá-lo nesta tarefa, não estando excluídas as demais etapas de revisão e aprovação.

Cabe ao pessoal técnico e administrativo definir quais os procedimentos que devem ser elaborados em cada área e que farão parte do Sistema da Qualidade.

Controle dos Documentos

Os documentos da qualidade devem possuir uma numeração unívoca para facilitar seu controle. Estes documentos devem ter em seu rodapé a inscrição "cópia controlada – reprodução proibida" ou frase de semelhante teor, para que não sejam reproduzidos e seja mantido um rigoroso controle das cópias distribuídas pelo sistema da qualidade. Periodicamente estes documentos devem ser objeto de uma análise crítica para atualização e melhoria. Caso hajam alterações, devem ser emitidos novos documentos com números atualizados de revisão e as cópias antigas segregadas, mantendo-se uma cópia em arquivo, como histórico de documentação.

O controle de toda a documentação deve ser efetivado por meio de uma lista mestra, onde constam todos os documentos do sistema da qualidade, com seu status de revisão.

Treinamento nos documentos da qualidade

Todos os documentos elaborados pelo sistema da qualidade, inclusive o manual da qualidade, devem ser apresentados a seus possíveis usuários mediante um treinamento, antes de serem distribuídos. Este treinamento garante que todos aqueles que forem usar aqueles documentos compreenderam os mesmos na sua totalidade e que não terão nenhuma dúvida na sua correta utilização.

Sempre que a gerência técnica do laboratório sentir necessidade, se houver alguma alteração significativa no procedimento, ou quando um novo funcionário ingressar no laboratório ou ainda quando o plano de treinamento assim o exigir, deverá ser iniciado um novo treinamento naquele procedimento. Nestes casos, deve-se também assegurar e manter todos os registros destes treinamentos.

A gerência da qualidade deve ainda garantir que os usuários dos documentos, dados e registros estejam utilizando sempre as últimas versões das cópias controladas. Deve ainda assegurar que uma cópia controlada de cada documento obsoleto seja armazenada como histórico, sendo as demais cópias inutilizadas.

Preparação das unidades organizacionais

Uma boa ferramenta para iniciar a preparação do laboratório e áreas administrativas para a sua inserção no sistema da qualidade é o Programa Cinco "S", criado inicialmente no Japão e que consiste em cinco conceitos simples:

Senso de descarte – deve-se separar, dentro do laboratório, os objetos e equipamentos úteis dos inúteis, identificando, dentro do útil, o que é usado com maior freqüência, mantendo-o próximo do usuário, do que é usado esporadicamente, armazenando-o em áreas de menor acesso. Quanto ao inútil, deve-se verificar se pode ser útil em algum outro local, se pode ser vendido ou doado. Caso contrário, deve-se descartar.

Senso de ordenação e organização – deve-se definir um arranjo simples, que permita obter apenas o que se precisa, na hora certa. Isto permite um menor tempo de busca do que é preciso para operar; evita a compra de matérias-primas e componentes desnecessários e os danos a materiais ou produtos armazenados. Aumenta a produtividade das pessoas e equipamentos e permite uma maior racionalização do trabalho, causando menor cansaço físico e mental,

melhoria no ambiente, facilitando o transporte interno, o controle de estoque e a execução do trabalho no prazo.

Senso de limpeza – deve-se eliminar o lixo, a sujeira e os materiais estranhos, tornando o local de trabalho mais limpo. Deve-se usar a limpeza como uma forma de inspeção de equipamentos, reagentes, vidrarias e materiais. Este procedimento facilita a credibilidade nos serviços e é fundamental para a imagem interna e externa das unidades organizacionais do laboratório.

Senso de asseio, higiene e saúde – deve-se manter os objetos e equipamentos organizados, arrumados e limpos, incluindo os aspectos pessoais e os relacionados à poluição. Este procedimento facilita a segurança e o melhor desempenho das pessoas e evita danos à saúde do funcionário e do cliente. Melhora a imagem do laboratório para os clientes internos e externos, além de elevar o nível de satisfação e motivação do pessoal para com o trabalho e o laboratório.

Senso de autodisciplina e ordem mantida – deve-se fazer naturalmente a coisa certa. Assim se reduz a necessidade de controle e se facilita a execução de toda e qualquer tarefa ou operação. Este procedimento evita perdas devido à falta de rotinas e traz previsibilidade do resultado final de qualquer operação.

Controle de acesso

Para garantir a confidencialidade e a confiabilidade dos resultados analíticos, além de assegurar a confidencialidade de processos e outros documentos sigilosos das áreas administrativas do laboratório, devem ser estabelecidos procedimentos para o controle de acesso de pessoal autorizado e não autorizado em todas as unidades organizacionais do laboratório.

Calibração, controle e manutenção de equipamentos

Os equipamentos críticos devem ser calibrados periodicamente e antes de serem colocados em uso, de modo a garantir a precisão e exatidão dos mesmos.

Os certificados de calibração devem ser fornecidos por empresas ou laboratórios credenciados pela Rede Brasileira de Calibração – RBC, sempre que possível.

A freqüência de calibração dos equipamentos críticos é estabelecida em função da utilização de cada equipamento. Em função disso, deve ser elaborado um plano de calibração e de manutenção dos mesmos.

Quando a temperatura for crítica para o ensaio, deve ser elaborado um controle periódico e mantido próximo aos equipamentos (estufas, banhos-maria, muflas, geladeiras etc.). O mesmo procedimento deve ser realizado para outros parâmetros críticos para os ensaios.

Apresentação dos resultados

Os certificados de análise devem ser descritos em documentos contendo as informações solicitadas pelo cliente e necessárias à interpretação dos mesmos, as referências e valores de referência, quando definidos e todas as informações requeridas pelo método utilizado, a partir das quais as interpretações do resultado podem ser realizadas. Além disso, devem constar: a data do recebimento da amostra, a data de realização do ensaio e as assinaturas e funções de pelo menos dois responsáveis pelo relatório. Para preservar os direitos do laboratório, é aconselhável que no relatório constem uma ou mais das seguintes observações: "O laboratório não se responsabiliza pela amostragem"; "os resultados se referem somente à amostra ensaiada" e "este relatório de análise somente deve ser reproduzido por completo".

O relatório de análise apresentado deve ser claro, objetivo, preciso, sem rasuras e não pode, em sua versão final, permanecer com campos em branco, para dificultar sua falsificação. O documento deve apresentar identificação unívoca que assegure que cada página seja reconhecida como parte integrante do relatório de ensaio e tenha, em seu final, uma clara identificação de término. Os resultados analíticos devem ser acompanhados da incerteza estimada e de suas unidades, de acordo com o Sistema Internacional.

Cuidados especiais devem ser tomados quando da entrega do resultado para terceiros ou quando enviados por fax ou meio eletrônico. Somente em casos de alerta sanitário ou de extrema urgência poderão ser utilizados estes meios, pois existe o risco de quebra de confidencialidade. Um procedimento escrito deve ser elaborado para estes casos, para evitar que isso ocorra.

Auditorias internas

Definição – Segundo a NBR ISO 8402, a auditoria é o "exame sistemático e independente para determinar se as atividades da qualidade e seus resultados estão de acordo com as disposições planejadas, se estas foram efetivamente implementadas e se são adequadas à consecução dos objetivos".

A realização de auditorias internas é requisito obrigatório para o atendimento da norma da qualidade. Para sua execução, é necessária a formação de uma equipe de auditores, capitaneada pelo auditor-líder, que é responsável por todas as fases da auditoria e também deve participar da seleção dos outros membros da equipe auditora, preparar o

plano de auditoria, representar a equipe auditora junto à gerência da qualidade e apresentar o relatório da auditoria.

É de responsabilidade da equipe auditora: cumprir os requisitos aplicáveis da auditoria, comunicar e esclarecer os requisitos da auditoria da mesma, planejar e realizar a auditoria sob sua responsabilidade, documentar as observações, relatar os resultados e verificar a eficácia das ações corretivas adotadas como resultado da auditoria.

Ao laboratório auditado cabe: informar aos técnicos envolvidos os objetivos e o escopo da auditoria, apontar os membros responsáveis para acompanhar a equipe auditora, prover a equipe auditora de todos os recursos necessários para assegurar um processo de auditoria eficaz e eficiente, prover o acesso às instalações e ao material comprobatório, conforme solicitado pelos auditores e determinar e iniciar ações corretivas baseadas no relatório de auditoria.

Critérios para qualificação de auditores internos

Os auditores devem, no mínimo, ter cursado até o segundo grau escolar e ter competência para expressar-se oralmente e por escrito. Possuir conhecimento e compreensão das normas nas quais se baseia a auditoria do sistema da qualidade. Habilidades adicionais necessárias na gestão de uma auditoria: planejamento, organização, comunicação, direção, facilidade na elaboração de questionários, avaliação e preparação de relatórios.

É aconselhável que tenham no mínimo, quatro anos de experiência profissional na área técnica a ser auditada (no caso dos auditores especialistas nos ensaios).

Atributos pessoais do auditor: mentalidade aberta e madura, julgamentos dignos de confiança, capacidade analítica e tenacidade, habilidade para perceber situações de maneira realista, compreensão das operações complexas sob uma perspectiva mais ampla, bem como o papel das unidades individuais dentro de um todo, auto-análise, objetividade, imparcialidade, persistência, cooperação, bom senso para revisão, maturidade, ética, confidencialidade, boa comunicação verbal e escrita, bom relacionamento interpessoal.

Garantia da qualidade dos resultados de ensaio

O laboratório deve ter procedimentos para monitorar a qualidade dos resultados dos ensaios. Essa monitorização deve ser planejada e analisada criticamente pela gerência técnica do laboratório.

Os dados devem ser registrados de forma sistemática para que tendências sejam detectáveis e sanadas. Quando possível deve ser aplicada técnica estatística para a análise crítica dos resultados. Este controle de qualidade pode ser interno ou externo.

O controle de qualidade interno pode ser realizado por meio de ensaios em replicata, análises utilizando-se material de referência, comparações intralaboratoriais, repetições do ensaio e amostra cega. Como o controle de qualidade externo, pode-se participar de ensaios de proficiência, que tem como principais vantagens: verificação da capacidade técnica, verificação de desempenho de metodologias, reagentes e equipamentos, tomadas de ações corretivas, entre outros.

Análise crítica pela alta administração

Pelo menos uma vez por ano, e visando a melhoria contínua do sistema da qualidade, deve ser realizada uma análise crítica do sistema. Os principais responsáveis por essa avaliação são: a alta administração e a gerência da qualidade. Nesta ocasião são avaliados os seguintes e principais indicadores:

- resultados de ensaio de proficiência
- auditorias internas
- auditorias externas
- reclamações de clientes
- sugestões de clientes
- quantidade de análises realizadas
- ações corretivas
- ações preventivas
- número de treinamentos realizados
- planejamento anual
- sugestões de melhoria do sistema
- principais não conformidades
- principais fontes de investimento
- opiniões dos diretores
- sugestões dos funcionários

Estas reuniões devem ser registradas, normalmente em forma de ata e as conclusões devem ser divulgadas e cumpridas.

Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 9.000**: Sistemas de gestão da qualidade – Fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC GUIA 2** 1995 Normalização e atividades relacionadas – Vocabulário geral - Vocabulário Internacional de Metrologia. Rio de Janeiro, VIM, 1995.

INMETRO - **DOQ-DQUAL - 007** - Orientações sobre acordos de reconhecimento mútuo. Abr. 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - **NBR 10.012-1**: Requisitos de garantia da qualidade para equipamentos de medição. Nov. 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, Ago. 2000.

INMETRO – Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia-VIM. 2. ed., Brasília, SENAI/DN, 2000. 75p.

INMETRO - Vocabulário de metrologia legal. 2. ed., Brasília, SENAI/DN, 2000. 27p.

REBLAS – Procedimentos operacionais da REBLAS, agosto, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **ISO GUIA 30:** Termos e definições relacionados com material de referência. 2000..

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **ISO/IEC GUIA 30**: Ensaios de proficiência por comparações interlaboratoriais. Parte 1: Dsenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência. 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **ABNT/ISO/IEC GUIA 2** Normalização e atividades relacionadas – *Vocabulário geral*. 1998.

VALLE, B.; BICHO, G.G. ISO/IEC 17.025: A Nova norma para Laboratórios de Ensaio e Calibração. **Laboratórios & Controle de Processos,** ano. 1, n. 5, abr. 2001.

Colaboradores:
Neus Sadocco Pascuet e Galdino Guttmann Bicho

CAPÍTULO **II**

GENERALIDADES

II GENERALIDADES

As unidades de pesos e medidas adotadas neste livro são as do Sistema Nacional de Metrologia.

Quadro 1 – Grandezas, unidades e símbolos de acordo com o SI

Grandeza	Unidade SI	
	Nome	Símbolo
Comprimento	Metro	m
Massa	Quilograma	kg
Tempo	Segundo	s
Corrente elétrica	Ampère	A
Temperatura termodinâmica	Kelvin	K
Quantidade de matéria	Mol	mol
Intensidade luminosa	Candela	cd
Força	Newton	N
Energia	Joule	J
Pressão	Pascal	Pa
Superfície	Metro quadrado	m^2
Volume	Metro cúbico	m^3
Concentração	Mol por metro cúbico	mol/m^3
Temperatura	Grau Celsius	°C
Diferença de potencial elétrico	Volt	V

Os múltiplos e sub-múltiplos decimais das unidades do Sistema Internacional constam no **Quadro 2**

Quadro 2 – Fatores, prefixos e símbolos de acordo com o SI

Fator	Prefixo	Símbolo
10^{24}	Yotta	Y
10^{21}	Zetta	Z
10^{18}	Exa	E
10^{15}	Peta	P
10^{12}	Tera	T
10^{9}	Giga	G
10^{6}	Mega	M
10^{3}	Quilo	k
10^{2}	Hecto	h
10^{1}	deca	da

Fator	Prefixo	Símbolo
10^{-1}	deci	d
10^{-2}	centi	c
10^{-3}	mili	m
10^{-6}	micro	m
10^{-9}	nano	n
10^{-12}	pico	p
10^{-15}	femto	f
10^{-18}	atto	a
10^{-21}	zepto	z
10^{-24}	yocto	y

Os elementos, seus símbolos, números e pesos atômicos estão relacionados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Tabela periódica dos elementos, seus respectivos números e pesos atômicos.

Elemento	Símbolo	nº atômico	Peso atômico
Actínio	Ac	89	227
Alumínio	Al	13	27
Amerício	Am	95	243
Antimônio	Sb	51	122
Argônio	Ar	18	40
Arsênio	As	33	75
Astatínio	At	85	210
Bário	Ba	56	137
Berquélio	Bk	97	247
Berílio	Be	4	9
Bismujto	Bi	83	209
Boro	B	5	11
Bromo	Br	35	80

Elemento	Símbolo	nº atômico	Peso atômico
Neodínio	Nd	60	144
NeônIo	Ne	10	20
Neptúnio	Mp	93	237
Níquel	Ni	28	58,5
Nióbio	Nb	41	93
Nitrogênio	N	7	14
Nobélio	No	102	259
Ósmio	Os	76	190
Oxigênio	O	8	16
Paládio	Pd	46	106
Fósforo	P	15	31
Platina	Pt	78	195
Plutônio	Pu	94	244

Elemento	Símbolo	nº atômico	Peso atômico
Cádmio	Cd	48	112
Cálcio	Ca	20	40
Califórnio	Cf	98	251
Carbono	C	6	12
Cério	Ce	58	140
Césio	Cs	55	133
Cloro	Cl	17	35,5
Cromo	Cr	24	52
Cobalto	Co	27	59
Cobre	Cu	29	63,5
Cúrio	Cm	96	247
Disprósio	Dy	66	162,5
Einstênio	Es	99	252
Érbio	Er	68	167
Európio	Eu	63	152
Férmio	Fm	100	257
Flúor	F	9	19
Frâncio	Fr	87	223
Gadolínio	Gd	64	157
Gálio	Ga	31	70
Germânio	Ge	32	73
Ouro	Au	79	197
Háfnio	Hf	72	178,5
Hélio	He	2	4
Holmio	Ho	67	165
Hidrogênio	H	1	1
Índio	In	49	115
Iodo	I	53	127
Irídio	Ir	77	192
Ferro	Fe	26	56
Kriptônio	Kr	36	84
Lantânio	La	57	139
Lawrêncio	Lr	103	262
Chumbo	Pb	82	207
Lítio	Li	3	7

Elemento	Símbolo	nº atômico	Peso atômico
Polônio	Po	84	209
Potássio	K	19	39
Praseodínio	Pr	59	141
Promécio	Pm	61	145
Protactínio	Pa	91	231
Rádio	Ra	88	226
Radônio	Rn	86	222
Rênio	Re	75	186
Ródio	Rh	45	103
Rubídio	Rb	37	85,5
Rutênio	Ru	44	101
Samário	Sm	62	150
Escândio	Sc	21	45
Selênio	Se	34	79
Silício	Si	14	28
Prata	Ag	47	108
Sódio	Na	11	23
Estrôncio	Sr	38	87,5
Enxofre	S	16	32
Tantâlio	Ta	73	181
Tecnécio	Tc	43	98
Telúrio	Te	52	127,5
Térbio	Tb	65	159
Tálio	Tl	81	204
Tório	Th	90	232
Túlio	Tm	69	169
Estanho	Sn	50	119
Titânio	Ti	22	48
Tungstênio	W	74	184
Unilquádio	Unq	104	261
Unilpêntio	Unp	105	262
Unilhexio	Unh	106	263
Unilseptio	Uns	107	262
Urânio	U	92	238
Vanádio	V	23	51

Elemento	Símbolo	nº atômico	Peso atômico	Elemento	Símbolo	nº atômico	Peso atômico
Lutécio	Lu	71	175	Xenônio	Xe	54	131
Magnésio	Mg	12	24	Itérbio	Yb	70	173
Manganês	Mn	25	55	Itrio	Y	39	89
Mendelévio	Md	101	258	Zinco	Zn	30	65
Mercúrio	Hg	80	200	Zircônio	Zr	40	91
Molibdênio	Mo	42	96	—	—	—	—

Baseada na tabela de pesos atômicos padrão da IUPAC de 1987.

A expressão "até peso constante" significa que os valores obtidos em duas pesagens sucessivas diferem, no máximo, em 0,0005 g por grama de substância.

As temperaturas são dadas em graus Celsius (centígrados). Quando não for especificada a temperatura em que devem ser feitas as determinações, subentende-se que seja à "temperatura ambiente", isto é, entre (20 - 25)°C.

Por "banho-maria" entende-se o processo de aquecimento no qual a substância é contida em recipiente mergulhado em água mantida em ebulição, ou em outras temperaturas, quando forem especificadas.

A expressão "mm de mercúrio", usada para as medidas de pressão, refere-se ao uso de manômetros ou barômetros calibrados em relação à pressão exercida por uma coluna de mercúrio de igual número de milímetros de altura, a uma temperatura de 0ºC, medida num ambiente em que a aceleração da gravidade é normal.

Densidade relativa é o termo empregado nos métodos analíticos como sinônimo de peso específico. Representa a relação entre a massa aparente de uma substância, ao ar, a 20ºC e a massa de igual volume de água mantém nas mesmas condições de temperatura e pressão.

Porcentagens são dadas, conforme as circunstâncias, em uma das quatro formas:

- por cento m/m (massa por massa), expressando o número de gramas de substâncias contido em 100 g do produto
- por cento m/v (massa por volume), expressando o número de gramas de substâncias contido em 100 mL do produto
- por cento v/v (volume por volume), expressando o número de mililitros de substâncias em 100 mL do produto
- por cento v/m (volume por massa), expressando o número de mililitros por 100 g do produto.

As concentrações das soluções de sólidos em líquidos são expressas em porcentagens de massa em volume (m/v), e as de líquidos em líquidos, em porcentagens de volume em volume (v/v) ou pela expressão soluções (a + b), indicando "a" o número de gramas ou mililitros da substância e "b" o número de mililitros de água adicionada. Por exemplo: HCl (1+2) significa uma solução preparada adicionando-se 1 volume de HCl a 2 volumes de água.

As soluções tituladas empregadas nas análises volumétricas são soluções de concentrações definidas. Todas as soluções contidas neste livro estão expressas em molaridade, de acordo com a recomendação da *International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC. Molar, M ou 1 M indica que a solução contém o peso do mol da substância de interesse por litro de solução. Entretanto, no caso de acidez titulável, o resultado pode ser expresso em: "acidez em solução Normal" ou em miliequivalentes por litro ou por quilo, quando a legislação vigente assim o indicar.

Soluções indicadoras ou indicadores são as substâncias que se empregam, em solução ou *in natura*, para estabelecer o ponto final desejado de uma reação química ou para medir a concentração de íons de hidrogênio, ou pH.

Os recipientes utilizados para as medidas volumétricas devem ser calibrados tendo-se em vista a temperatura em que foram graduados. Devem ser de vidro neutro e estar perfeitamente limpos. A limpeza pode ser feita com solventes orgânicos (éter, acetona); solução de hidróxidos ou detergentes; mistura sulfocrômica, seguida de lavagens sucessivas com água comum (8 vezes) e água (3 vezes).

Nas medições de volume, o nível inferior do menisco do líquido contido nos recipientes deve aflorar o traço de aferição; somente nos casos de líquidos fortemente corados é que se deve usar como referência a borda superior do menisco.

Os volumes medidos com vidraria de precisão (bureta, pipeta, balão volumétrico etc.) devem ser considerados com precisão até a 2ª casa após a virgula. O mesmo se aplica para pesagens em balança analítica, que devem ser feitas com precisão até a 4ª casa após a virgula. Neste livro não foram colocados, nos métodos, esses algarismos significativos.

O termo "água" refere-se a água destilada, exceto quando houver outra especificação e também no caso em que a água não fizer parte da análise, como por exemplo, no caso do banho–maria.

O termo "éter" refere-se a éter etílico, livre de peróxidos.

O termo "álcool" refere-se a álcool etílico a 95%, v/v. Soluções alcoólicas x% podem ser preparadas pela diluição de x mL de álcool a 95% e completadas a 100 mL com água. Álcool absoluto é aquele com 99,5% de álcool em volume.

Os ácidos e os hidróxidos utilizados são sempre os concentrados, a menos que, na técnica, seja indicada a diluição.

Tabela 2 – Características de concentração de alguns reagentes

Reagentes	Densidade (kg/L)	Porcentagem m/m
Ácido sulfúrico	1,84	95 – 98
Ácido clorídrico	1,19	36,5 – 38,0
Ácido nítrico	1,42	69,0 – 71,0
Ácido fosfórico	1,69	85,0
Ácido acético	1,05	99,7
Hidróxido de amônio	0,90	28 – 30

Se não houver outra especificação, solução de fenolftaleína usada como indicador é uma solução alcoólica a 1%; a solução de metilorange é uma solução aquosa a 0,1% e a de vermelho de metila usada, também, como indicador é uma solução alcoólica a 0,1%.

Soluções reagentes prontas, oferecidas no comércio, devem ser analisadas antes de sua utilização em metodologias específicas, pois podem conter tampões, agentes quelantes, estabilizantes ou outros compostos que podem interferir nas análises.

Solução sulfocrômica de limpeza é preparada a partir de uma das seguintes formas:

a) Adicione 1 L de ácido sulfúrico comercial a aproximadamente 35 mL de solução aquosa saturada de dicromato de sódio.

b) Dissolva cuidadosamente 200 g de dicromato de potássio e 170 mL de ácido sulfúrico comercial em água e leve a 1000 mL.

Estes reagentes podem ser de grau técnico. Use somente após uma primeira lavagem por meios convencionais, isto é, com detergente e após secagem. Esta mistura tem alto custo e é perigosa. Use repetidas vezes até que ela esteja diluída ou apresente uma coloração acinzentada ou esverdeada. Descarte cuidadosamente com bastante água. Estas operações devem ser realizadas por pessoal treinado.

As preparações das principais soluções tituladas e dos reagentes usualmente empregados neste livro estão descritos no apêndice.

Os métodos qualitativos e quantitativos descritos neste livro estão numerados em ordem seqüencial, independentemente do capítulo ao qual pertencem, objetivando facilitar sua utilização como referência, nos casos de habilitação, acreditação, ou mesmo troca de informações entre analistas de laboratórios distintos.

Ao final da descrição de cada método estão relacionadas as referências bibliográficas utilizadas.

Siglas

a – absortividade
A – absorbância
AAS – espectrômetro de absorção atômica
AFM_1 – aflatoxina M_1
A.O.A.C. – Association of Official Analytical Chemists
atm – atmosfera
CCD – cromatografia em camada delgada
CI – coluna de imunoafinidade
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
DAD – detector de aranjo de diodos
DIC – detector de ionização de chama.
$E^{1\%}_{1cm}$ – absortividade referente a absorbância de uma solução a 1% da espécie absorvente num solvente adequado, em cubeta de 1 cm.
EDL – electrodeless discharge lamp (lâmpada de descarga sem eletrodo)
ELISA – enzyme-linked immunisorbent assay
ETAAS – espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite
f – fator de correção
FAAS – espectrômetro de absorção atômica com chama
FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA – Food and Drug Administration
FID – detector de ionização de chama
GRAS – generally recognized as safe
HCL – hollow cathode lamp (lâmpada de catodo oco)
ICUMSA – International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis
ICP OES – espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado
ISO – International Organization for Standardization
IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
mμ – milimicron (10^{-6} mm)
NED – alfa-naftiletilenodiamina
ng – nanograma (10^{-9} g)
NIST – National Institute of Standards and Technology
OTA – ocratoxina A
PI – padrão interno
ppb – partes por bilhão ($1/10^9$)
ppm – partes por milhão ($1/10^6$)
Rf – quociente entre as distâncias percorridas simultaneamente desde o ponto de partida até o centro de maior concentração da mancha do soluto e até a frente da fase móvel - cromatográfia em papel ou em camada delgada.
rpm – rotações por minuto

SCAN – varredura completa na faixa de massas selecionadas
SIM – monitoramento de alguns íons selecionados com determinados valores da relação massa/carga.
Split – divisor de amostra
T – transmitância
TFS – solução-tampão salina
TSFT – solução-tampão salina de trabalho
TISSAB – total ion strenght adjustor buffer
UV/VIS – ultravioleta/visível
µg – micrograma (10^{-6} g)
µm – micron ou micrômetro (10^{-6} m)
WHO – Word Health Organization

Referências bibliográficas

BRASIL. Leis, Decretos etc, - Resolução nº 01/82 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Diário Oficial, Brasília, 10 maio 1982. Seção 1, p. 8384-8393.

INMETRO. Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia. Duque de Caxias, RJ, 1995. 52 p.

INMETRO. Sistema Internacional de Unidades. SI. 6. ed. Brasília, SENAI/DN, 2000.114 p. Convênio SENAI/DN/INMETRO.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes & solventes**: padronização, preparação, purificação. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. p. 279.

Colaboradores
Neus Sadocco Pascuet e Odair Zenebon

CAPÍTULO **III**

COLHEITA DE AMOSTRAS

III

COLHEITA DE AMOSTRAS

A colheita de amostras constitui a primeira fase da análise do produto. As amostras de produtos alimentícios destinadas à análise poderão ser colhidas nos locais de fabricação, preparo, depósito, acondicionamento, transporte e exposição à venda. A colheita deverá ser feita com observância das condições técnicas prescritas por estes procedimentos. A colheita adequada da amostra, cercada de todas as precauções, viabilizará as condições corretas para o processo de análise; caso contrário, este processo será comprometido ou impossibilitado. A amostra colhida em quantidade suficiente para a realização da análise deverá ser acondicionada de forma a resguardá-la de qualquer alteração e ser adequadamente identificada. A amostra, identificada e rotulada, será acompanhada de um relatório com as informações necessárias para a realização da análise e a emissão do laudo analítico. As amostras facilmente deterioráveis serão conservadas em refrigerador e, quando for o caso, em congelador. O seu processamento, desde a colheita até a análise, deverá ser efetuado o mais rápido possível. A amostra deverá ser representativa do lote, estoque ou partida, em proporção adequada à quantidade do produto existente no local da colheita. Daí a necessidade de que a colheita seja previamente planejada, não só no que se refere à quantidade das amostras, mas também com relação à espécie do produto e aos parâmetros a serem analisados. Dentro do conceito fundamental de que a análise começa com a colheita da amostra, torna-se necessário que este procedimento seja efetuado com todas as precauções necessárias. No laudo analítico, deverão ser registradas todas as condições em que a amostra foi recebida, tais como, embalagem, temperatura, entre outras. O agente responsável pela amostragem deverá ser a autoridade sanitária que tenha recebido treinamento, tanto na parte tecnológica como na analítica. O treinamento tecnológico, no que se refere ao processo de fabricação dos alimentos possibilitará a aquisição de informações úteis que devem ser registradas no termo de colheita da amostra a ser analisada, bem como instruir os produtores, visando corrigir possíveis deficiências nas instalações, no equipamento, enfim, concorrer para a melhoria do alimento a ser comercializado.

As amostras de alimentos devem ser colhidas segundo um plano particular de procedimentos. Sempre que possível esse plano deverá proporcionar amostras representativas do lote. Um dos problemas mais freqüentes a respeito da análise bromatológica é a determinação do tamanho da amostra a ser colhida. Quando nenhuma instrução específica é fornecida, a regra geral é colher amostras correspondentes a $\sqrt{x}+1$, sendo x igual ao número de unidades do lote. Ordinariamente, quando se refere a grandes cargas, por exemplo, existentes em indústrias e armazéns, devem ser colhidas não menos que 12 unidades e não mais que 36, sendo que cada unidade deverá ser proveniente de recipientes diferentes.

Amostragem para análise fiscal e de controle

As amostras para análise fiscal devem ser colhidas em triplicata: uma delas é deixada em poder do detentor ou depositário do produto para eventual perícia de contraprova e as outras duas são encaminhadas ao laboratório, respectivamente, para análise e perícia desempatadora, se necessário. Quando a quantidade ou a natureza do alimento não permitir a colheita das amostras em triplicata, a análise fiscal será realizada em amostra única. Os procedimentos para a realização das análises fiscais estão previstos em legislações específicas.

A análise de controle é efetuada no laboratório após o registro do alimento no órgão competente de Vigilância Sanitária e também para aqueles dispensados da obrigatoriedade de registro no Ministério da Saúde, quando de sua entrega ao consumo e serve para provar a conformidade do produto com o seu respectivo padrão de identidade e qualidade. Na análise de controle serão observadas as normas estabelecidas para a análise fiscal. A análise de controle também é realizada para a liberação de alimentos importados em postos alfandegários.

Acondicionamento

As amostras colhidas deverão ser imediata e devidamente acondicionadas. Este acondicionamento será considerado adequado se for capaz de impedir qualquer alteração na amostra. A escolha do tipo de acondicionamento ou do recipiente depende do estado físico do produto: líquido, sólido ou semi-sólido. Na escolha do acondicionamento deverá ser levado em conta o tipo de análise à qual vai ser submetida. Assim, se a amostra se destina a testes microbiológicos, tornar-se-à imprescindível acondicioná-la em recipiente ou material de embalagem estéril que impeça a sua eventual contaminação do produto. Os produtos industrializados poderão ser colhidos em suas embalagens originais. Recomenda-se o uso de recipientes de vidro, louça e outras embalagens semelhantes para gordura, frituras, produtos úmidos ou higroscópicos (carnes e outros). As amostras de substâncias líquidas são geralmente acondicionadas em frascos plásticos ou de vidro. Para

análise de resíduos de metais, não é aconselhável utilizar vidro para acondicionar amostras de alimentos; alternativamente, deve-se usar recipientes de polietileno. Diferentemente, para acondicionar amostras para análise de pesticidas utilize embalagens de vidro e, quando for possível, de papel.

Lacração

A lacração dos invólucros das amostra fiscais e de controle terá por objetivo evitar qualquer alteração deliberada do conteúdo da embalagem. Isto pode ser obtido não somente com o uso do lacre mas, ainda, por vedação hermética para que em caso de violação, esta se torne evidente. Assim, poderão ser empregados selos e botões de pressão que permitam seu uso por uma só vez ou engenhos semelhantes.

Poderão ser usados, como invólucros, sacos de plástico ou papel resistentes para acondicionar amostras de todos os tipos de alimentos, os quais poderão ser posteriormente lacrados pelos métodos acima citados. O uso de sacos de papel lacrado será especialmente recomendado quando o fechamento for dificilmente conseguido por outro método. Quando forem tomadas várias unidades da mesma partida, a lacração deverá ser feita juntando-se os recipientes como foi acima descrito. Quando a embalagem for constituída por saco plástico, torna-se importante que a parte da costura inferior fique presa ao lacre da amostra.

Rotulagem

Cada amostra colhida deverá ser rotulada de modo a não se confundida. O método mais simples é escrever as características da amostra diretamente no papel do invólucro do recipiente. Nos recipientes em que é difícil escrever, poderão ser fixados e amarrados rótulos ou etiquetas onde estejam descritas as características da amostra. No caso de amostras já acondicionadas em pacotes ou garrafas, será necessário tomar cuidado para que a descrição do produto e outros detalhes importantes na embalagem original não sejam ocultos pelo rótulo da amostra.

Transporte

A amostra deverá ser remetida para o laboratório de análise o mais rapidamente possível. Serão tomadas as devidas precauções para assegurar que o resultado da análise não seja comprometido pela utilização de um método inadequado de transporte que acarrete longas demoras ou no qual a amostra esteja sujeita à deterioração.

Termo de colheita

O agente responsável pela colheita da amostra deverá remetê-la ao laboratório de análise, juntamente com um termo de colheita contendo todas as informações necessárias

para o analista, por exemplo: a data da colheita e motivo de apreensão; origem da mercadoria e data de sua produção ou aquisição; tipo e duração da armazenagem; nome e endereço do fabricante ou detentor; quantidade em estoque da mercadoria, após a colheita da amostra; os números dos lacres das amostras colhidas; o tipo de exame necessário ou uma breve descrição do motivo que originou tal colheita. É aconselhável, também, fazer uma descrição sucinta do local onde foi apreendida a amostra. No caso de alimentos perecíveis que necessitem de refrigeração, é fundamental mencionar a temperatura em que se encontravam no momento da colheita.

Colheita de amostras de produtos não homogêneos em grandes estoques

Quando tiver que ser exarado um laudo sobre produtos que não apresentem homogeneidade ou com tendência a apresentar separação de fases, as amostras deverão ser tomadas em vários pontos ou de vários recipientes da partida. Para se obter uma amostra que permita chegar a uma conclusão da qualidade média de toda a partida (ou da parte adequada da partida, a ser misturada), deverá ser tomada precaução para que a amostra (em volume significante em comparação com o volume da mercadoria a ser analisada) seja semelhante, em qualidade, à que seria obtida se retirada da quantidade total da mercadoria após ser cuidadosamente misturada.

Quanto maior for a partida de mercadorias a serem testadas, para verificação de sua qualidade média, tanto maior o número de recipientes individuais dos quais as porções deverão ser retiradas. Essas serão depois perfeitamente misturadas e a quantidade de amostra a ser remetida para análise deverá ser tirada da mistura resultante.

Quando se tratar de amostras de alimentos armazenados em sacos, barris, engradados ou qualquer grande recipiente (inclusive produtos em grandes parcelas, tais como batatas, frutas e outros), será, por vezes, necessário esvaziar os recipientes, misturar bem e considerar o todo para obter uma amostra realmente média.

No caso de grandes estoques de alimentos assim armazenados, mas que, presumivelmente, apresentam homogeneidade, será necessário tomar a amostra média de 1 recipiente, se o número de recipientes não for superior a 5, de 10% dos recipientes com um mínimo de 5, se não excederem a 100; de 5%, com um mínimo de 10, se não excederem a 200; de 3% com um mínimo de 25, se excederem a 2000 , e de 1% com um mínimo de 50, se excederem a 2000. Um número de 5 amostras deve ser obtido de vários pontos da carga de um caminhão ou de uma grande pilha de mercadoria, tomando-se as devidas precauções para que unidades de diferentes tamanhos sejam reunidas proporcionalmente à composição da partida toda. Nos recipientes com produtos granulados (por exemplo:

cereais), os componentes não são igualmente distribuídos porque as partículas menores, terra, areia, pequenas sementes, ou as mais pesadas, caem no fundo do recipiente. Por essa razão, as diferentes camadas deverão ser levadas em conta para a obtenção da amostra média.

O conteúdo de pequenas gavetas ou caixas deverá, como medida prática, ser esvaziado e reunido em monte cuidadosamente misturado, e a amostra retirada do total. Em um produto ensacado, a amostra deverá ser obtida retirando-se partes do alto, centro e fundo do saco; estas partes devem ser misturadas e, a partir da mistura, retirada a amostra média. No caso de serem grandes os lotes de produtos ensacados, o número de sacos dos quais se retira a amostra, será determinado de acordo com o padrão acima descrito. A amostra retirada de um único ponto é casual, não permite avaliar a qualidade de um grande volume do alimento. Líquidos que se separam em camadas devem ser cuidadosamente misturados antes da tomada da amostra. Líquidos contidos em pequenos barris ficam melhor homogeneizados quando se rola o barril. O conteúdo de latas deve ser homogeneizado por agitação, antes da tomada da amostra para análise. Pequenas porções de líquido são homogeneizadas passando-as diversas vezes de um para outro recipiente, mexendo-as e agitando-as. A amostra de líquidos que não se separam em fases, sempre que possível, deve ser tomada do centro do recipiente, com sifão ou pipeta. Líquidos parcial ou completamente gelados deverão ser perfeitamente homogeneizados, como foi acima descrito, antes da retirada da amostra. O modo descrito para amostragem com líquidos pode ser adotado também para mercadorias de consistência oleosa, viscosa ou untuosa.

Contudo, se as mercadorias não puderem ser misturadas por rotação ou agitação do recipiente, deverá ser utilizada uma espátula ou equivalente para homogeneização da amostra. Obviamente, as informações explicativas que devem ser enviadas ao laboratório encarregado da análise, que acompanham as várias amostras obtidas de diferentes partes de uma grande partida de mercadoria, ou a amostra média de uma partida de mercadorias, que se supõe ser homogênea, devem conter, além dos informes usuais, particularidades de observação sobre as diferenças de qualidade entre várias partes que compõem a partida ou quaisquer outros detalhes que possam ser úteis aos analistas.

Conduta para obtenção da amostra de produtos pré-embalados

Em produtos pré-embalados ou acondicionados em vasilhames, deverá ser coletada como amostra o menor recipiente ou vasilhame exposto à venda ao consumidor, como item isolado e, quando necessário, mais de um. Quando as amostras forem tomadas de grandes vasilhames, o produto deverá ser perfeitamente misturado, se não for homogêneo ou apresentar tendência à separação de fases. O conteúdo de

cada vasilhame deverá corresponder ao respectivo padrão mínimo. No caso de ser necessário verificar a qualidade de uma grande partida de produtos pré-embalados, proceder como para colheita de amostras de produtos não homogêneos, em grandes estoques.

Colheita de água para determinações físico-químicas gerais

Para determinações físico-químicas gerais em água, como cor, turbidez, dureza e outros parâmetros, a colheita pode ser feita em frasco de água mineral de primeiro uso, com sua tampa original. O frasco e sua tampa devem ser enxaguados, com a água a ser coletada, por seis vezes. Se a colheita for feita em torneiras, deixe a água escorrer naturalmente durante três minutos aproximadamente. Após a colheita, fixe a tampa de modo a evitar vazamentos e identifique a amostra, que deve ser transportada sob refrigeração.

Colheita e preservação de amostra de água para a determinação de metais totais

Na colheita de água para a determinação de metais totais, deve-se utilizar frascos de polipropileno ou polietileno de alta densidade com tampa do mesmo material. A capacidade do frasco dependerá da técnica a ser utilizada para a quantificação dos metais, conforme **Tabela 1**. Frascos de vidro borossilicato poderão ser utilizados, porém cuidados devem ser observados para não utilizar frascos de vidro comum.

*Preparo dos frascos para colheit*a – Use frascos previamente lavados e descontaminados quimicamente com ácido nítrico e enxaguados em água destilada e deionizada, conforme orientação técnica do laboratório.

Colheita da amostra – No ponto de amostragem, abra o frasco e colha a água evitando o contato da boca do frasco com as mãos ou qualquer objeto metálico (incluindo torneiras), para evitar problemas de contaminação. No caso de torneiras, deixe-as abertas com a água escorrendo por cerca de três minutos. Feche o frasco imediatamente após a colheita da amostra e agite para homogeneizar o conservante. Para cada ponto de amostragem, colha dois frascos de água. Use 0,5 mL de HNO_3 a 40% para 100 mL de amostra. No caso da determinação de mercúrio, para cada frasco de colheita de 100 mL, coloque 2 g de NaCl (previamente testado para verificar a ausência de mercúrio) e adicione 5 mL de HNO_3 a 40%. O laboratório deve fornecer os frascos contendo o conservante. Em cada ponto de amostragem, colha dois recipientes para a determinação de mercúrio e outros dois para os outros metais.

Tabela 1 - Capacidade do frasco de colheita para cada tipo de técnica analítica

TÉCNICA ANALÍTICA	CAPACIDADE DO FRASCO (mL)
Absorção atômica com chama	1000
Absorção atômica com forno de grafite	100
ICP OES e gerador de hidretos	100
Absorção atômica com gerador de vapor frio	100

Colheita e preservação de amostra de água para a determinação de solventes orgânicos

Utilize frascos de vidro com capacidade de 500 mL, com tampas de vidro ou outro material inerte, à prova de vazamentos, lavados com detergente neutro, esfregando muito bem as paredes com gaspilhão; retire totalmente o detergente com água. Adicione aos frascos 1 mL de HCl 6 M, como conservante. Ajuste o fluxo da torneira em 500 mL/min. Se a amostra contiver cloro livre ou combinado, adicione, como agente redutor, 50 mg de tiossulfato de sódio ou 250 mg de ácido ascórbico para 500 mL de amostra de água. As amostras devem ser transportadas, o mais rápido possível, em caixas isotérmicas com gelo reaproveitável ou gelo embalado em saco plástico.

Colheita e preservação de amostra de água para a determinação de agrotóxicos

Utilize frascos de vidro com capacidade de 2000 mL, com tampas de vidro ou outro material inerte, como por exemplo tampa de rosca com batoque de teflon, à prova de vazamentos. Lave com detergente neutro, esfregando muito bem as paredes internas com gaspilhão e retire totalmente o detergente com água. Enxágüe o frasco e sua tampa com a água a ser analisada por seis vezes. Em cada ponto de amostragem, colha em um recipiente e feche-o imediatamente. Proceda a colheita evitando o contato da boca dos recipientes com a parte externa do ponto de amostragem, prevenindo a contaminação da amostra. As amostras devem ser conservadas refrigeradas e transportadas, o mais rápido possível, em caixas isotérmicas com gelo reaproveitável ou gelo embalado em saco plástico bem fechado.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods**

for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. Washington D.C.:A.P.H.A., Chapter 3,1995, p.5.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**. Guia de coleta e preservação de amostras de água**. 1. ed., São Paulo, 1987. 150 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Manuals of food quality control. 5. **Food inspection**. Chapter 3, Rome:FAO/WHO, 1981. p. 23-43. (FAO Food and Nutrition paper 14/5 prov.).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 4-9.

WEISS, H. V.; SHIPMAN, W. H.; GUTTMAN, M. A. effective storage of dilute mercury solutions in polyethylene. **Anal. Chim. Acta**, v. 81, p. 211-217, 1976.

Colaboradores

Alice Momoyo Sakuma; Maria Anita Scorsafava; Vera Regina Rossi Lemes; Odair Zenebon e Sabria Aued Pimentel

CAPÍTULO **IV**

PROCEDIMENTOS E DETERMINAÇÕES GERAIS

IV

PROCEDIMENTOS E DETERMINAÇÕES GERAIS

Pré-tratamento da amostra

Examine cuidadosamente as condições da amostra. Retire partes representativas dela e em quantidade suficiente para análise em triplicata e eventuais repetições do ensaio. Conserve ao abrigo de umidade, da luz e de contaminações. Quando necessário, mantenha em temperatura mais baixa que a do ambiente. Se houver necessidade, a amostra deve ser homogeneizada em liqüidificador ou multiprocessador.

Amostras sólidas – Quando possível, homogeneíze a amostra agitando a embalagem antes ou após abertura, neste último caso evite o uso de utensílios de metal. As amostras de carne e produtos de carne devem ser separadas dos ossos, pele ou couro. No caso de pescado, devem-se retirar os diferentes componentes não comestíveis da amostra (sem pele e espinhas), utilizando somente o filé. Dependendo do tipo de análise, quando as amostras forem hortaliças *in natura*, elas devem ser lavadas, descascadas (quando for o caso) e utilizadas somente as partes comestíveis.

Amostras líquidas – Agite a amostra a fim de homogeneizar completamente.

Inspeção da amostra

Inspecione cada amostra, anotando marcas, códigos, rótulos e outros fatores de identificação. Examine, cuidadosamente, cada amostra para verificar indicações de anormalidade que se manifestem em seu aspecto físico, formação de gás, cheiro, alteração de cor, condições da embalagem e anote o resultado. Antes de abrir os enlatados, observe se há tufamento das latas e, depois de abertos, o estado interno das mesmas.

Preparo da amostra para análise

A amostra para análise deve-se apresentar homogênea. Precisa ser conservada ao abrigo de umidade e de contaminações. Em certos casos, deverá ser conservada também ao abrigo da luz e em temperatura mais baixa que a do ambiente.

Amostras sólidas em pó ou em grânulos – Retire partes representativas da amostra (superfície, centro e lados). Triture em gral ou moinho, se necessário, e passe por um tamis de 144 furos por cm^2. Espalhe com uma espátula sobre uma folha grande de papel de filtro. Separe em quatro partes em forma de cruz. Retire dois segmentos opostos e devolva para o pacote. Misture as duas partes restantes e repita o processo de separação de quatro segmentos. Continue assim até obter quantidade suficiente de material, para análise em triplicata.

Amostras líquidas – Agite a amostra até homogeneizar bem. Filtre se necessário. Nos casos de produtos gaseificados, como refrigerantes e vinhos espumantes, transfira, antes de filtrar, para um béquer seco e agite com um bastão de vidro até eliminar o gás.

Sorvetes e gelados – Deixe em repouso à temperatura ambiente, até liquefazerem, para depois serem homogeneizados e guardados em frascos com rolha esmerilhada.

Produtos semi-sólidos ou misturas líquidas ou sólidas – Produtos como queijo e chocolate devem ser ralados grosseiramente. Tire a amostra por método de quarteamento.

Pastas semiviscosas e líquidos contendo sólidos – Produtos como pudins, sucos de frutas com polpa, geléias com frutas, doces de massa com frutas devem ser homogeneízados em liqüidificador ou multiprocessador.

No caso de se desejar a análise em separado dos diferentes componentes da amostra (balas, bombons, compotas, conservas e recheios), proceda inicialmente à separação dos componentes por processo manual ou mecânico.

Determinações Gerais

001/IV Determinação do espaço livre – Recipiente de forma regular

Nos produtos embalados, é de interesse a determinação do espaço livre, pois por meio deste procedimento pode-se controlar o conteúdo da embalagem e a tecnologia empregada neste envasamento.

Procedimento – Abra o recipiente e meça, com precisão de milímetros, a distância compreendida entre o nível superior do produto e o nível da altura da tampa. Retire o conteúdo e meça, com precisão de milímetros, a distância compreendida entre o fundo do recipiente e o nível da altura da tampa.

Cálculo

$$\frac{d_1}{d_2} \times 100 = \text{espaço livre do recipiente, por cento}$$

d_1 = distância entre o nível superior do produto e a tampa, em mm
d_2 = distância entre o fundo do recipiente e a tampa, em mm

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 13.

002/IV Determinação do espaço livre – Recipiente de forma irregular

Procedimento – Marque, com caneta de retroprojetor ou com fita crepe, os níveis da tampa e do conteúdo do recipiente. Transfira o conteúdo do recipiente para uma proveta e anote o volume com precisão de mL (V_1). Encha o recipiente com água até o nível da tampa, transfira o líquido para uma proveta e anote o volume com precisão de mL (V_2).

Cálculo

$$\frac{V_2 - V_1}{V_2} \times 100 = \text{espaço livre do recipiente, por cento}$$

V_2 = volume máximo do recipiente em mL
V_1 = volume da amostra em mL

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 13.

003/IV Sólidos drenados em relação ao peso total

Em conservas, compotas e similares, em que frutas, vegetais etc. se encontram misturados a líquidos, como caldas, óleo, vinagre etc., muitas vezes é importante o controle desta relação.

Procedimento – Pese o recipiente com todo o seu conteúdo, com precisão de 0,1 g. Abra o recipiente e escorra o conteúdo sobre um tamis, mantendo-o ligeiramente inclinado, durante cinco minutos. Pese o recipiente vazio, com precisão de 0,1 g. Coloque no recipiente o produto sólido e pese novamente, com precisão de 0,1 g. Calcule o conteúdo porcentual de sólidos em relação ao peso total.

Cálculo

$$\frac{P_1 - P_2}{P_3 - P_2} = \text{conteúdo porcentual de sólidos}$$

P_1 = peso do recipiente após ter escorrido o líquido, em g
P_2 = peso do recipiente vazio, em g
P_3 = peso do recipiente com todo seu conteúdo

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 13-14.

004/IV Reação para gás sulfídrico – Prova de Éber

O estudo da conservação de certos produtos protéicos poderá ser avaliado também por meio desta reação, onde se constata a presença de gás sulfídrico, proveniente da decomposição de aminoácidos sulfurados que normalmente são liberados nos estágios de decomposição mais avançados. O H_2S combinado com acetato de chumbo ou plumbito de sódio produz sulfeto de chumbo (PbS), revelando mancha preta espelhada em papel de filtro.

No caso de produtos embalados, estas reações deverão ser feitas ao abrir-se o recipiente. No de carnes, conservas de carne, pescados etc., tão logo se inicie o exame da amostra.

Material

Balança semi-analítica, banho-maria, espátula, elástico para papel, frasco Erlenmeyer de 125 mL, papel de filtro de 9 cm de diâmetro e pipeta graduada de 1 mL.

Reagentes

Solução de acetato de chumbo a 5% (m/v)
Ácido acético glacial
Solução saturada de acetato de chumbo (alternativa)
Solução de hidróxido de sódio a 10% (m/v)

Solução de acetato de chumbo – Prepare 100 mL de solução de acetato de chumbo a 5% (m/v). Adicione 1 mL ácido acético. Agite vigorosamente. Conserve a solução em frasco de vidro âmbar fechado.

Solução de plumbito de sódio (alternativa) – Prepare uma solução saturada de acetato de chumbo e adicione solução de hidróxido de sódio a 10% até dissolver o precipitado. Conserve a solução em frasco de vidro âmbar fechado.

Procedimento – Transfira 10 g da amostra homogeneizada para um frasco Erlenmeyer de 125 mL. Feche com dois discos sobrepostos de papel de filtro com auxílio de elástico. Com uma pipeta, embeba a superfície do papel com solução de acetato de chumbo (ou plumbito de sódio). Coloque o frasco em banho-maria de modo que o fundo do frasco fique a 3 cm acima do nível da água fervente. Aqueça por 10 minutos. O aparecimento de mancha preta no papel de filtro em contato com os vapores indica a presença de gás sulfídrico. Considere em bom estado de conservação – reação negativa – as amostras que apresentarem uma reação de gás sulfídrico inferior à produzida por 0,1 mg de $Na_2S.9H_2O$ em meio ácido, que corresponde a 0,014 mg de H_2S, nas condições do método adotado.

Notas
Em lugar da solução de acetato de chumbo pode-se usar a solução de plumbito de sódio.
A reação de Éber não se aplica no caso de alimentos muito condimentados, temperados com alho, cebola e de conservas de carne e pescado que foram processadas em alta temperatura e baixa pressão.
Em alguns casos, somente o conjunto desta e outras provas será decisório para uma avaliação do estado de conservação do produto.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 14-15.

005/IV Reação para amônia – Prova de Éber

O estado de conservação de alimentos protéicos pode ser avaliado por meio da reação de Éber para amônia. A liberação de amônia indica o início da degradação das proteínas. A amônia, ao reagir com o ácido clorídrico, forma cloreto de amônio (NH_4Cl) sob a forma de vapores brancos.

Material

Provetas de 50 e 150 mL, balão volumétrico de 250 mL, tubos de ensaio de 25 mL e arame de 20 cm de comprimento com extremidade recurvada tipo anzol.

Reagentes

Ácido clorídrico
Éter
Álcool

Reagente de Éber – Em balão volumétrico de 250 mL, misture 50 mL de ácido clorídrico e 150 mL de álcool. Resfrie e complete o volume com éter.

Procedimento – Transfira 5 mL do reagente de Éber para um tubo de ensaio de 25 mL. Fixe um pedaço da amostra na extremidade do arame tipo anzol e introduza no tubo de ensaio de modo que não toque nem nas paredes do tubo nem na superfície do reagente. O aparecimento de fumaças brancas e espessas indica que o produto está em início de decomposição.

Notas
Repita a prova com diferentes porções da amostra.
Em alguns casos somente o conjunto desta e outras provas será decisório para uma avaliação do estado de conservação do produto.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 15.

006/IV Ponto de fusão – Substâncias facilmente reduzíveis a pó

Ponto de fusão de um sólido é a faixa de temperatura em que este inicia a sua transformação para o estado líquido, até se fundir totalmente. A determinação é feita em aparelhos como o descrito abaixo ou em qualquer outro capaz da mesma precisão. Como todo aparelho, deve ser submetido à calibração empregando uma das substâncias puras da **Tabela 1**.

Tabela 1 – Relação de substâncias puras e seus pontos de fusão

Substâncias puras	Ponto de fusão
Vanilina	81 - 83°C
Acetanilida	114 - 116°C
Fenacetina	134 - 136°C
Sulfanilamida	164,5 - 166,5°C
Acido 5,5-dietilbarbitúrico	187 - 190°C
Cafeína	234 - 237°C

Material

O aparelho para determinação do ponto de fusão consiste essencialmente de um recipiente de vidro de capacidade apropriada para um banho de líquido incolor; um agitador, que poderá ser um bastão de vidro, convenientemente dobrado duas vezes em ângulo reto; um termômetro cuidadosamente calibrado e controlado de (-10 a 365)°C (em lugar deste termômetro único, pode-se usar, com vantagens, uma coleção de termômetros de escala curta, cada um abrangendo um intervalo de 50°C); um tubo capilar de 9 cm de altura, (0,9 a 1,1) mm de diâmetro interno, e paredes de espessura entre 0,2 a 0,3 mm; uma lente de aumento (cerca de dez vezes) e uma fonte de calor, elétrica ou chama direta.
Os líquidos empregados no banho são escolhidos, de acordo com a temperatura a ser determinada, pela **Tabela 2**.

Tabela 2 – Relação de líquidos empregados em banhos para determinação do ponto de fusão

Temperatura	Líquidos
até 100°C	água
até 150°C	glicerol
até 250°C	parafina líquida
até 400°C	silicone

O uso de silicone líquido torna mais simples esta escolha, uma vez que ele cobre todo o intervalo da temperatura acima.

Procedimento – A substância é reduzida a pó fino e seco no vácuo ou em estufa abaixo do ponto de fusão. É introduzida, em pequenas porções, no tubo capilar fechado numa das suas extremidades. Depois de colocar cada porção, insira o capilar com a ponta fechada para baixo dentro de um tubo de vidro de 50 cm, aberto nas duas extremidades e apoiado verticalmente de encontro a uma superfície dura. Repita esta operação várias vezes até obter uma coluna compacta de cerca de 2 mm da substância. Aqueça o banho com o líquido apropriado até que sua temperatura esteja 30°C abaixo do ponto de fusão da substância em exame. Introduza, então, o capilar preso ao termômetro com um fio de platina ou um anel de borracha, ou por simples adesão de ambos, no líquido do banho, ficando a substância no capilar na altura do bulbo do termômetro e este totalmente coberto pelo banho e a 2 cm do fundo do recipiente. Continue o aquecimento de modo a ter um grau de aumento de temperatura por minuto. A leitura é direta. Denomina-se início de fusão quando o sólido inicia a transformação para o estado líquido e final quando se torna inteiramente líquido. Estas duas temperaturas dão o intervalo de fusão da substância.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 16-17.

007/IV Ponto de fusão – Substâncias não facilmente reduzíveis a pó

Procedimento – O material é cuidadosamente fundido na temperatura mais baixa possível e introduzido numa altura de 10 mm no capilar aberto. Deixe o capilar a 0°C por duas horas ou a 10°C por 24 horas. Prenda o capilar ao termômetro e proceda como indicado em **006/IV**, verificando se o nível da substância está a 10 mm abaixo do nível do banho. Aqueça como indicado em **006/IV**, até 50°C abaixo do ponto esperado e, depois, numa velocidade de meio grau por minuto.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 17-18.

008/IV Ponto de fusão com aparelho elétrico

Procedimento – Para a determinação do ponto de fusão pelo método do capilar, são necessários alguns miligramas de amostra. A determinação de frações dessa quantidade poderá ser efetuada com um aparelho provido de uma câmara metálica aquecida eletricamente, adaptada a um microscópio para a observação da fusão.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 18.

009/IV Ponto de congelamento

Para as finalidades deste livro, ponto de congelamento de um líquido ou de um sólido fundido é a mais elevada temperatura em que o mesmo se solidifica.

Material

Aparelho – Um tubo de ensaio de aproximadamente 2 cm de diâmetro por 10 cm de comprimento mantido, mediante uma rolha de cortiça perfurada, num tubo de aproximadamente 3 cm de diâmetro por 12 cm de comprimento e um termômetro calibrado.

Procedimento – Salvo indicações especiais, coloque cerca de 10 mL de líquido ou 10 g de sólido fundido no tubo de ensaio seco. Esfrie o conjunto dos dois tubos em água ou numa mistura refrigerante apropriada, de modo que a temperatura do líquido alcance cerca de 5°C abaixo do ponto de congelamento indicado. Com o termômetro, agite suavemente o líquido até que ele comece a solidificar. O congelamento pode ser induzido, adicionando-se ao líquido pequenos cristais da substância ou atritando-se as paredes internas do tubo, com o termômetro. Tome como ponto de congelamento a temperatura mais elevada observada durante a solidificação e mantida constante por cerca de um minuto.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.18.

010/IV Índice de refração

O índice de refração de uma substância pura é uma constante, mantidas as condições de temperatura e pressão e, como tal, pode ser usado como meio de identificação da mesma. Em análise de alimentos, embora não se tratem de substâncias puras no estrito sentido, em certos casos, como o de óleos, gorduras e óleos essenciais, o índice de refração apresenta variação muito pequena e é então usado para uma avaliação do produto.

O índice de refração da água a 20°C é 1,333. A presença de sólidos solúveis na água resulta numa alteração do índice de refração. É possível determinar a quantidade de soluto pelo conhecimento do índice de refração da solução aquosa. Esta propriedade é utilizada para determinar a concentração de sólidos solúveis em soluções aquosas de açúcar.

As **Tabelas 3, 4** e **5** auxiliam na calibração dos equipamentos com escala de índice de refração e graus Brix para a determinação de sólidos solúveis. A medida do índice de refração pode ser feita diretamente em aparelhos como: refratômetro de Abbé ou refratômetro de imersão que possuem pequeno intervalo de leitura, mas grande precisão. Esses equipamentos devem ser previamente calibrados com água.

Tabela 3 – Variação do índice de refração da água com a temperatura

Temperatura ºC	Índice de refração	Temperatura ºC	Índice de refração
15	1,3334	21	1,3329
16	1,3333	22	1,3328
17	1,3332	23	1,3327
18	1,3332	24	1,3326
19	1,3331	25	1,3325
20	1,3330	-	-

Tabela 4 – Índices de refração de soluções de sacarose a 20ºC (% peso no ar)

Índice de refração	0	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009
1,33	-	-	-	0,000	0,697	1,393	2,085	2,774	3,459	4,140
1,34	4,818	5,492	6,163	6,831	7,495	8,155	8,812	9,466	10,117	10,765
1,35	11,409	12,050	12,687	13,322	13,953	14,582	15,207	15,830	16,449	17,065
1,36	17,679	18,289	18,897	19,502	20,104	20,704	21,300	21,894	22,485	23,074
1,37	23,660	24,243	24,824	25,407	25,987	26,565	27,140	27,713	28,282	28,849
1,38	29,413	29,975	30,534	31,090	31,644	32,195	32,743	33,289	33,832	34,373
1,39	34,912	35,448	35,982	36,513	37,042	37,568	38,092	38,614	39,134	39,651
1,40	40,166	40,679	41,190	41,698	42,204	42,708	43,210	43,710	44,208	44,704
1,41	45,197	45,688	46,176	46,663	47,147	47,630	48,110	48,588	49,064	49,539
1,42	50,011	50,481	50,949	51,416	51,880	52,343	52,804	53,263	53,720	54,176
1,43	54,629	55,091	55,550	56,008	56,464	56,918	57,371	57,822	58,271	58,719
1,44	59,165	59,609	60,051	60,493	60,932	61,370	61,807	62,241	62,675	63,107
1,45	63,537	63,966	64,394	64,820	65,245	65,669	66,091	66,512	66,931	67,349
1,46	67,766	68,182	68,596	69,009	69,421	69,832	70,242	70,650	71,058	71,464
1,47	71,869	72,273	72,676	73,078	73,479	73,879	74,278	74,675	75,072	75,469
1,48	75,864	76,258	76,651	77,044	77,435	77,826	78,216	78,605	78,994	79,381
1,49	79,768	80,154	80,540	80,925	-	-	-	-	-	-

Tabela 5 – Correção de temperatura para soluções de sacarose

Temp. °C	Conteúdo de sacarose em porcentagem															
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	
	Subtraia da porcentagem de sacarose															
10	0,50	0,54	0,58	0,61	0,64	0,66	0,68	0,70	0,72	0,73	0,74	0,75	0,76	0,78	0,79	
11	0,46	0,49	0,53	0,55	0,58	0,60	0,62	0,64	0,65	0,66	0,67	0,68	0,69	0,70	0,71	
12	0,42	0,45	0,48	0,50	0,52	0,54	0,56	0,57	0,58	0,59	0,60	0,61	0,61	0,63	0,63	
13	0,37	0,40	0,42	0,44	0,46	0,48	0,49	0,50	0,51	0,52	0,53	0,54	0,54	0,55	0,55	
14	0,33	0,35	0,37	0,39	0,40	0,41	0,42	0,43	0,44	0,45	0,45	0,46	0,46	0,47	0,48	
15	0,27	0,29	0,31	0,33	0,34	0,34	0,35	0,36	0,37	0,37	0,38	0,39	0,39	0,40	0,40	
16	0,22	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,28	0,29	0,30	0,30	0,30	0,31	0,31	0,32	0,32	
17	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24	
18	0,12	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16	
19	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	
°C	**Adicione à porcentagem de sacarose**															
21	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	
22	0,13	0,13	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	
23	0,19	0,20	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	
24	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,30	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32	0,32	0,32	
25	0,33	0,35	0,36	0,37	0,38	0,38	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	
26	0,40	0,42	0,43	0,44	0,45	0,46	0,47	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	
27	0,48	0,50	0,52	0,53	0,54	0,55	0,55	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	
28	0,56	0,57	0,60	0,61	0,62	0,63	0,63	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	
29	0,64	0,66	0,68	0,69	0,71	0,72	0,72	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	
30	0,72	0,74	0,77	0,78	0,79	0,80	0,80	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 18-21.

011/IV Densidade

A determinação da densidade é, geralmente, feita em análise de alimentos que se apresentam no estado líquido. Pode ser medida por vários aparelhos, sendo os seguintes os mais usados: picnômetros e densímetros convencionais e digitais. Os picnômetros dão resultados precisos e são construídos e graduados de modo a permitir a pesagem de volumes exatamente iguais de líquidos, a uma dada temperatura. Da relação destes pesos e volumes resulta a densidade dos mesmos à temperatura da determinação. Usando água como líquido de referência, tem-se a densidade relativa à água ou peso específico. Os densímetros, quase sempre de forma cilíndrica com um bulbo central terminando em haste fina e graduada, são construídos de modo que o ponto de afloramento indique, sobre a escala, a densidade do líquido no qual está imerso o aparelho. Existem vários tipos, com valores diversos, em função da sensibilidade exigida para sua aplicação. A leitura deve ser feita sempre abaixo do menisco.

As diferentes escalas usadas pelos densímetros podem dar a leitura direta da densidade ou graus de uma escala arbitrária como: Brix, Gay-Lussac, Baumé, Quevenne, correspondentes aos sacarômetros, alcoômetros e lactodensímetros, há tanto tempo utilizados em bromatologia. Os graus Brix referem-se à porcentagem em peso de sacarose em solução a 20°C. Os graus Gay-Lussac referem-se à porcentagem em volume de álcool em água. Os graus Baumé foram obtidos de modo empírico: para líquidos mais densos que a água, o zero da escala corresponde à água a 4°C e o grau 15 a uma solução de 15 g de cloreto de sódio em 85 g de água. Para os líquidos menos densos que a água, o zero da escala foi obtido com uma solução de 10 g de cloreto de sódio em 90 g de água e o grau 10, com água. Os lactodensímetros são, especialmente, calibrados de modo a abranger as variações de densidade de 1,025 a 1,035, mas apenas os 2 últimos algarismos são marcados na escala e, portanto, as leituras são de (25 a 35)°Quevenne.

Procedimento – Dependendo do tipo do alimento, proceda conforme descrito no capítulo correspondente deste livro.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 21.

012/IV Perda por dessecação (umidade) – Secagem direta em estufa a 105ºC

Todos os alimentos, qualquer que seja o método de industrialização a que tenham sido submetidos, contêm água em maior ou menor proporção. Geralmente a umidade representa a água contida no alimento, que pode ser classificada em: umidade de superfície, que refere-se à água livre ou presente na superfície externa do alimento, facilmente evaporada e umidade adsorvida, referente à água ligada, encontrada no interior do alimento, sem combinar-se quimicamente com o mesmo. A umidade corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Na realidade, não é somente a água a ser removida, mas outras substâncias que se volatilizam nessas condições. O resíduo obtido no aquecimento direto é chamado de resíduo seco. O aquecimento direto da amostra a 105°C é o processo mais usual. Amostras de alimentos que se decompõem ou iniciam transformações a esta temperatura, devem ser aquecidas em estufas a vácuo, onde se reduz a pressão e se mantém a temperatura de 70°C. Nos casos em que outras substâncias voláteis estão presentes, a determinação de umidade real deve ser feita por processo de destilação com líquidos imiscíveis. Outros processos usados são baseados em reações que se dão em presença de água. Dentre estes, o método de Karl Fischer é baseado na redução de iodo pelo dióxido de enxofre, na presença de água. Assim, a reação entre a água e a solução de dióxido de enxofre, iodo e reagente orgânico faz-se em aparelho especial que exclui a influência da umidade do ar e fornece condições para uma titulação cujo ponto final seja bem determinado. Em alimentos de composição padronizada, certas medidas físicas, como índice de refração, densidade etc., fornecem uma avaliação da umidade de modo rápido, mediante o uso de tabelas ou gráficos já estabelecidos.

Material

Estufa, balança analítica, dessecador com sílica gel, cápsula de porcelana ou de metal de 8,5 cm de diâmetro, pinça e espátula de metal.

Procedimento – Pese de 2 a 10 g da amostra em cápsula de porcelana ou de metal, previamente tarada. Aqueça durante 3 horas. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese. Repita a operação de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade ou substâncias voláteis a 105°C por cento m/m}$$

N = nº de gramas de umidade (perda de massa em g)
P = nº de gramas da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 21-22.

013/IV Perda por dessecação (umidade) – Secagem em estufa a vácuo

Material

Estufa a vácuo, bomba de vácuo, balança analítica, espátula de metal, pinça de metal, dessecador com sílica gel e cápsula de porcelana ou de platina de 8,5 cm de diâmetro.

Procedimento – Pese de 2 a 10 g da amostra em cápsula, previamente tarada, e aqueça durante 6 horas em estufa a vácuo a 70°C, sob pressão reduzida ≤ 100 mm de mercúrio (13,3 kPa) . Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese. Repita a operação de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Nota: podem ser utilizadas cápsulas de outros metais resistentes ao calor desde que as cinzas obtidas não sejam empregadas para posterior análise de metais.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade ou substâncias voláteis a 70°C por cento m/m}$$

N = nº de gramas de umidade (perda de massa em g)
P = nº de gramas da amostra

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 926.12) Arlington: A.O.A.C., 1996, chapter 33. p. 5.

014/IV Perda por dessecação (umidade) – Determinação pelo método de Karl Fischer

A determinação de umidade por Karl Fischer é baseada na reação quantitativa da água com uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo, na presença de uma base orgânica (imidazol) em

metanol, que adiciona os íons hidrogênio formados.

$$3\,C_5H_5N + I_2 + SO_2 + H_2O \rightarrow 2\,C_5H_5N{\cdot}H^+ + 2\,I^- + C_5H_5N{\cdot}SO_3$$

$$C_5H_5N{\cdot}SO_3^- + H_3COH \rightarrow C_5H_5NHSO_4CH_3$$

Com este reagente podem ser determinadas pequenas quantidades de água. Embora o método não seja universalmente aplicável, as limitações de dosagens diretas podem ser contornadas pelo tratamento preliminar adequado da amostra.

Na presença de água, o dióxido de enxofre é oxidado pelo iodo e o ponto final da reação é determinado por bi-amperometria (*dead stop*). Quando não houver mais água na amostra, um excesso de iodo livre agirá como despolarizador, causando aumento na corrente.

O método limita-se aos casos em que a amostra a ser analisada não reaja com os componentes do reagente de Karl Fischer ou com o iodeto de hidrogênio formado durante a reação com a água. Os seguintes compostos interferem na titulação: oxidantes como cromatos/dicromatos, sais de cobre (II) e de ferro (III), óxidos superiores e peróxidos; redutores como: tiossulfatos, sais de estanho (II) e sulfitos; compostos capazes de formar água com os componentes do reagente de Karl Fischer, como por exemplo, óxidos básicos e sais de oxiácidos fracos; aldeídos, porque formam bissulfito; cetonas, porque reagem com o metanol para produzir cetal.

Material

Titulador de Karl Fischer, agitador magnético, eletrodo duplo de platina e microsseringa de 25 µL.

Reagentes

Reagente de Karl Fischer, isento de piridina
Metanol com no máximo 0,005% de água
Tartarato de sódio dihidratado (padrão volumétrico para padronização do reagente de Karl Fischer, contendo 15,66 ± 0,05% H_2O)

Procedimento – O reagente de Karl Fischer deve ser padronizado no início de uma série de ensaios, de duas formas, utilizando água ou tartarato de sódio dihidratado como padrões, conforme descrito abaixo.

Padronização do reagente de Karl Fischer com água – Coloque uma quantidade de metanol na cela de titulação suficiente para cobrir os eletrodos. Para eliminar a água contida no solvente, pré-titule o metanol com o reagente de Karl Fischer, sob agitação, até o ponto final, seguindo as instruções do manual do aparelho. Em seguida, com o auxílio de uma

microsseringa, pese exatamente, por diferença, cerca de 20 mg (20 µL) de água; introduza a água na cela e realize a titulação.

Padronização do Reagente de Karl Fischer com tartarato de sódio dihidratado – Coloque uma quantidade de metanol na cela de titulação suficiente para cobrir os eletrodos. Para eliminar a água contida no solvente, pré-titule o metanol com o reagente de Karl Fischer, sob agitação, até o ponto final, seguindo as instruções do manual do aparelho. Em seguida, pese exatamente, por diferença, cerca de 200 mg de tartarato de sódio dihidratado; introduza na cela e realize a titulação.

Determinação de umidade na amostra – Caso a cela de titulação esteja cheia, esvazie o recipiente. Os procedimentos de descarte dos resíduos deverão ser efetuados de acordo com os procedimentos de biossegurança. Coloque uma quantidade de metanol na cela de titulação suficiente para cobrir os eletrodos. Para eliminar a água contida no solvente, pré-titule o metanol com o reagente de Karl Fischer, sob agitação, até o ponto final. Em seguida, pese com precisão, por diferença uma quantidade de amostra que contenha aproximadamente 10 a 80 mg de água; introduza a amostra na cela e realize a titulação.

No caso de amostras não solúveis em metanol, escolha um solvente (ou uma mistura de solventes) adequado, que deverá ser previamente titulado com o reagente de Karl Fischer para eliminar a água.

Cálculos

$$\frac{m \times 0,1566}{V} = \text{fator do reagente de Karl Fischer usando tartarato de sódio}$$

m = massa do tartarato de sódio dihidratado
V = volume do reagente de Karl Fischer gasto na titulação

$$\frac{m}{V} = \text{fator do reagente de Karl Fischer usando água}$$

m = massa de água
V = volume do reagente de Karl Fischer gasto na titulação (em mL)

Cálculo do teor de umidade na amostra

$$\frac{100 \times F \times V}{m} = \text{umidade por cento m/m}$$

F = fator do reagente de Karl Fischer (em mg H_2O/mL do reagente de Karl Fischer)
V = volume do reagente de Karl Fischer gasto na titulação (mL)
m = massa da amostra (mg)

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 23-5.

MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, H.J.K. **VOGEL. Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S/A, 2002. p. 254-255.

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX. **Food Chemicals Codex**. 4th ed. Washington D.C.: National Academic Press, 1996. p 742-754.

015/IV Resíduo seco

Nos produtos líquidos ou de alto teor de umidade, costuma-se considerar o resíduo seco (sólidos totais) obtido para a avaliação dos sólidos existentes no produto.

Material

Pipeta de 10 mL, cápsula de platina ou de porcelana de 8,5 cm de diâmetro, estufa, dessecador com sílica gel, banho-maria, espátula e pinça de metal.

Procedimento – Transfira, com auxílio de uma pipeta, 10 mL de amostra, se a mesma for líquida, ou pese 10 g, se a amostra for sólida, para uma cápsula previamente aquecida a 105°C por 2 horas ou a 70ºC por 6 horas, sob pressão reduzida ≤ 100 mm de mercúrio (13,3 kPa), resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Evapore em banho-maria. Aqueça em estufa a 105°C por 2 horas ou a 70ºC por 6 horas, sob pressão reduzida ≤ 100 mm de mercúrio (13,3 kPa). Esfrie em dessecador até a temperatura ambiente e pese. Repita as operações de aquecimento por 30 minutos e resfriamento até peso constante.

Nota: podem ser utilizadas cápsulas de outros metais resistentes ao calor desde que as cinzas obtidas não sejam empregadas para posterior análise de metais.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{A} = \text{resíduo seco por cento m/v (ou m/m no caso de amostra sólida)}$$

N = nº de g de resíduo seco
A = nº de mL da amostra (ou nº de gramas da amostra)

Como alternativa, o resíduo seco pode ser calculado subtraindo-se de 100 g da amostra o número de g de "umidade por cento". Considere a diferença como o nº de g do "resíduo seco por cento".

Cálculo

100 - A = resíduo seco por cento m/m

A = nº de g de umidade por cento

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25.

016/IV Acidez

A determinação de acidez pode fornecer um dado valioso na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício. Um processo de decomposição,seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons de hidrogênio. Os métodos de determinação da acidez podem ser os que avaliam a acidez titulável ou fornecem a concentração de íons de hidrogênio livres, por meio do pH. Os métodos que avaliam a acidez titulável resumem-se em titular com soluções de álcali padrão a acidez do produto ou de soluções aquosas ou alcoólicas do produto e, em certos casos, os ácidos graxos obtidos dos lipídios. Pode ser expressa em mL de solução molar por cento ou em gramas do componente ácido principal.

Material

Proveta de 50 mL, frasco Erlenmeyer de 125 mL, bureta de 25 mL, balança analítica, espátula metálica e pipetas volumétricas de 1 e 10 mL.

Reagentes

Solução fenolftaleína
Solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou 0,01 M

Procedimento – Pese de 1 a 5 g ou pipete de 1 a 10 mL da amostra, transfira para um frasco Erlenmeyer de 125 mL com o auxílio de 50 mL de água. Adicione de 2 a 4 gotas da solução fenolftaleína e titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M, até coloração rósea.

Nota: no caso de amostras coloridas ou turvas, para a determinação do ponto de viragem, utilize método potenciométrico.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 100}{P \times c} = \text{acidez em solução molar por cento v/m}$$

V = nº de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M gasto na titulação
f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M
P = nº de g da amostra usado na titulação
c = correção para solução de NaOH 1 M, 10 para solução NaOH 0,1 M e 100 para solução NaOH 0,01 M.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25-26.

017/IV Determinação do pH

Os processos que avaliam o pH são colorimétricos ou eletrométricos. Os primeiros usam certos indicadores que produzem ou alteram sua coloração em determinadas concentrações de íons de hidrogênio. São processos de aplicação limitada, pois as medidas são aproximadas e não se aplicam às soluções intensamente coloridas ou turvas, bem como às soluções coloidais que podem absorver o indicador, falseando os resultados. Nos processos eletrométricos empregam-se aparelhos que são potenciômetros especialmente adaptados e permitem uma determinação direta, simples e precisa do pH.

Material

Béqueres de 50 e 150 mL, proveta de 100 mL, pHmetro, balança analítica, espátula de metal e agitador magnético.

Reagentes

Soluções-tampão de pH 4, 7 e 10

Procedimento – Pese 10 g da amostra em um béquer e dilua com auxílio de 100 mL de água. Agite o conteúdo até que as partículas, caso hajam, fiquem uniformemente suspensas.

Determine o pH, com o aparelho previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante.

Nota: no caso de amostras líquidas, determine o pH diretamente.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 27.

018/IV Resíduo por incineração -- Cinzas

Resíduo por incineração ou cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a (550-570)°C. Nem sempre este resíduo representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento. Geralmente, as cinzas são obtidas por ignição de quantidade conhecida da amostra. Algumas amostras contendo sais de metais alcalinos que retêm proporções variáveis de dióxido de carbono nas condições da incineração são tratadas, inicialmente, com solução diluída de ácido sulfúrico e, após secagem do excesso do reagente, aquecidas e pesadas. O resíduo é, então, denominado "cinzas sulfatizadas". Muitas vezes, é vantajoso combinar a determinação direta de umidade e a determinação de cinzas, incinerando o resíduo obtido na determinação de umidade.

A determinação de cinzas insolúveis em ácido, geralmente ácido clorídrico a 10% v/v, dá uma avaliação da sílica (areia) existente na amostra.

Alcalinidade das cinzas é outra determinação auxiliar no conhecimento da composição das cinzas.

Uma análise global da composição das cinzas nos diferentes alimentos, além de trabalhosa, não é de interesse igual ao da determinação de certos componentes, conforme a natureza do produto. Outros dados interessantes para a avaliação do produto podem ser obtidos no tratamento das cinzas com água ou ácidos e verificação de relações de solúveis e insolúveis. Um baixo conteúdo de cinzas solúveis em água é indício que o material sofreu extração prévia.

Material

Cápsula de porcelana ou platina de 50 mL, mufla, banho-maria, dessecador com cloreto de cálcio anidro ou sílica gel, chapa elétrica, balança analítica, espátula e pinça de metal.

Procedimento – Pese 5 a 10 g da amostra em uma cápsula, previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Caso a amostra seja

líquida, evapore em banho-maria. Seque em chapa elétrica, carbonize em temperatura baixa e incinere em mufla a 550ºC, até eliminação completa do carvão. Em caso de borbulhamento, adicione inicialmente algumas gotas de óleo vegetal para auxiliar o processo de carbonização. As cinzas devem ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas. Em caso contrário, esfrie, adicione 0,5 mL de água, seque e incinere novamente. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Nota: podem ser utilizadas cápsulas de outros metais resistentes ao calor desde que as cinzas obtidas não sejam empregadas para posterior análise de metais.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{cinzas por cento m/m}$$

N = nº de g de cinzas
P = nº de g da amostra

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 27-28.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 900.02)**.** Arlington: A.O.A.C., 1996 chapter 44. p. 3.

019/IV Cinzas sulfatizadas

A sulfatização das cinzas reduz perdas por volatilização, pois transforma substâncias voláteis em sulfatos mais fixos. Neste caso, a composição das cinzas não depende tanto da temperatura de calcinação.

Material

Cápsula de platina ou de porcelana de 50 mL, banho-maria, estufa e dessecador com cloreto de cálcio anidro ou sílica gel e mufla.

Reagente

Ácido sulfúrico a 10%, v/v

Procedimento – Pese 5 g da amostra em cápsula de platina ou de porcelana previamente aquecida em mufla a 550°C, resfrie em dessecador até a temperatura ambiente e pese. Adicione 5 mL de ácido sulfúrico a 10% v/v. Seque em banho-maria. Carbonize em temperatura baixa e incinere em mufla a 550°C. Resfrie. Adicione de 2 a 3 mL de ácido sulfúrico a 10% v/v. Seque em banho-maria e novamente incinere a 550°C. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Nota: podem ser utilizadas cápsulas de outros metais resistentes ao calor desde que as cinzas obtidas não sejam empregadas para posterior análise de metais.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{cinzas sulfatizadas por cento m/m}$$

N = nº de g de cinzas sulfatizadas
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 28.

020/IV Cinzas insolúveis em água

Material

Proveta de 50 mL, funil de vidro de 5 cm de diâmetro, estufa, mufla, bastão de vidro, dessecador com cloreto de cálcio anidro ou sílica gel e chapa elétrica.

Procedimento – Adicione 30 mL de água à cápsula contendo as cinzas obtidas segundo a técnica indicada em **018/IV**. Agite com um bastão de vidro. Aqueça por 15 minutos em banho-maria. Filtre em papel de filtro de cinzas conhecidas. Lave a cápsula, o filtro e o bastão de vidro com 100 mL de água quente. Receba o filtrado e as águas de lavagem em um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Reserve para a determinação **023/IV**. Transfira o resíduo com o papel de filtro para a mesma cápsula em que foi feita a incineração. Seque em estufa a 105°C. Carbonize em chapa elétrica. Incinere em mufla a 550°C. Esfrie em dessecador com cloreto de cálcio anidro ou sílica gel. Pese. Repita as operações de aquecimento (30 minutos na mufla) e resfriamento (1 hora no dessecador) até peso constante. Reserve o resíduo para a determinação de alcalinidade das cinzas insolúveis em água.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{cinzas insolúveis em água por cento m/m}$$

N = nº de g de cinzas insolúveis em água
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 29.

021/IV Cinzas solúveis em água

Procedimento – Subtraia do nº de g de cinzas por cento obtido em **018/IV** o nº de g de cinzas insolúveis por cento obtido em **020/IV**. Considere a diferença como cinzas solúveis em água por cento.

022/IV Alcalinidade das cinzas insolúveis em água

Material

Proveta de 50 mL, béquer de 250 mL, chapa elétrica e 2 buretas de 25 mL.

Reagentes

Ácido clorídrico 0,1 M
Indicador alaranjado de metila (metilorange)
Solução de hidróxido de sódio 0,1 M

Procedimento – Transfira o papel de filtro com o resíduo obtido em **020/IV** para um béquer de 250 mL. Adicione 20 mL de água e 15 mL de ácido clorídrico 0,1 M. Aqueça à ebulição em chapa elétrica. Esfrie e adicione duas gotas de indicador alaranjado de metila. Titule o excesso de ácido clorídrico com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até o desaparecimento da coloração alaranjada (a solução deverá ficar amarela).

Cálculo

$$\frac{V \times 10}{P} = \text{alcalinidade em solução molar por cento v/m}$$

V = diferença entre o nº de mL de ácido clorídrico 0,1 M adicionado e o nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 30.

023/IV Alcalinidade das cinzas solúveis em água

Procedimento – Adicione duas gotas do indicador alaranjado de metila à solução obtida em **020/IV**. Titule com ácido clorídrico 0,1 M até coloração alaranjada.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 10}{P} = \text{alcalinidade em solução molar por cento v/m}$$

V = nº de mL de ácido clorídrico 0,1 M gasto na titulação
f = fator do ácido clorídrico 0,1 M
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 30-31.

024/IV Cinzas insolúveis em ácido clorídrico a 10% v/v

Material

Proveta de 20 mL, papel de filtro de cinzas conhecidas, mufla, dessecador com sílica gel, balança analítica, chapa elétrica, papel indicador de pH e bastão de vidro.

Reagente

Acido clorídrico a 10% v/v

Procedimento – Adicione às cinzas obtidas em **018/IV**, 20 mL de ácido clorídrico a 10% v/v.

Agite com bastão de vidro. Filtre em papel de filtro. Lave a cápsula e o filtro com água quente até não dar mais reação ácida. Transfira o papel de filtro contendo o resíduo para a mesma cápsula em que foi feita a incineração. Seque em estufa a 105°C por uma hora. Carbonize o papel cuidadosamente, incinere em mufla a 550°C. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{cinzas insolúveis em ácido clorídrico a 10\%, por cento m/m}$$

N = nº de g de cinzas insolúveis em ácido clorídrico a 10%
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 31.

025/IV Cinzas solúveis em ácido clorídrico a 10% v/v

Procedimento – Subtraia do nº de g de cinzas por cento (**018/IV**) o nº de g de cinzas insolúveis em ácido clorídrico a 10% v/v (**024/IV**). Considere a diferença como cinzas solúveis em ácido clorídrico a 10% v/v, por cento m/m

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 31

026/IV Sulfatos pelo método gravimétrico

Material

Proveta de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, pipeta de 50 mL, béquer de 250 mL, cadinho de porcelana, mufla, dessecador com cloreto de cálcio anidro ou sílica gel, papel de filtro com cinzas conhecidas, bastão de vidro e bico Bünsen.

Reagentes

Ácido clorídrico (1+1)
Solução de cloreto de bário a 5% m/v

Procedimento – Dissolva as cinzas obtidas em **018/IV** com ácido clorídrico (1+1). Adicione 20 mL de água. Filtre. Lave a cápsula e o filtro com 50 mL de água. Receba o filtrado e as águas de lavagem em um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com água e transfira, com auxílio de uma pipeta, 50 mL do filtrado para um béquer de 250 mL. Aqueça à ebulição. Adicione às gotas, uma solução aquecida de cloreto de bário a 5% até completa precipitação. Aqueça em banho-maria por 1 hora. Deixe em repouso por 12 horas. Filtre em papel de filtro de cinzas conhecidas. Lave o filtro até que 2 mL de filtrado não dêem reação de íon cloreto. Transfira o papel de filtro com o precipitado para um cadinho de porcelana previamente aquecido em mufla a 550°C por 1 hora, resfriado em dessecador com cloreto de cálcio anidro até a temperatura ambiente e pesado. Carbonize em bico de Bünsen com chama baixa. Aqueça em mufla a 550°C. Resfrie e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{0{,}609 \times N \times 100}{P} = \text{sulfatos, em sulfato de sódio, por cento m/m}$$

N = nº de g de sulfato de bário
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 34-35.

027/IV Sulfatos por titulação com EDTA

Material

Pipetas de 5 e 25 mL, proveta e bureta de 25 mL.

Reagentes

Acido clorídrico
Álcool
Cloreto de bário 0,1 M
EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético) 0,1 M
Hidróxido de amônio
Metanol

Solução de púrpura de ftaleína – Pese 0,1 g púrpura de ftaleína, adicione água e hidróxido de amônio até dissolução do sal e complete o volume até 100 mL com água.

Procedimento – Acidule fracamente a solução contendo até 0,2 g de íon sulfato, com ácido clorídrico e aqueça até ebulição. Adicione 25 mL de cloreto de bário 0,1 M, aqueça novamente até ebulição e deixe em banho-maria cerca de 15 minutos. Esfrie a solução e adicione igual volume de metanol ou álcool e 5 mL de solução de hidróxido de amônio. Junte 2-3 gotas de solução de púrpura de ftaleína e titule o excesso de bário com solução de EDTA 0,1 M até viragem do violeta ao verde-amarelado.

Cálculo

$$\frac{0{,}9607 \times V}{P} = \text{sulfatos, em íon sulfato, por cento m/m}$$

V = nº de mL da solução de EDTA gasto na titulação
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 35-36.

028/IV Cloretos por volumetria

Os cloretos são precipitados na forma de cloreto de prata, em pH levemente alcalino em presença de cromato de potássio, como indicador. O ponto final da titulação é visualizado pela formação de um precipitado vermelho-tijolo de cromato de prata.

Material

Cápsulas de porcelana de 50 a 100 mL, mufla, proveta de 50 mL, bureta de 25 mL, balança analítica, espátula, bastão de vidro, dessecador com sílica gel, chapa elétrica, balões volumétricos de 100, 200 ou 500 mL, funil de vidro, frasco Erlenmeyer de 125 mL e pipeta volumétrica de 10 mL.

Reagentes

Bicarbonato de sódio
Carbonato de cálcio
Solução de cromato de potássio a 10% m/v

Solução de hidróxido de sódio a 10% m/v
Solução de nitrato de prata 0,1 M

Procedimento – Pese 5 g da amostra em uma cápsula de porcelana. Carbonize em chapa elétrica. Incinere em mufla a 550°C. Esfrie. Adicione 30 mL de água quente. Agite com bastão de vidro. Transfira a solução com auxílio de um funil para um balão volumétrico de 100 mL. Lave a cápsula, o bastão de vidro e o funil com mais duas porções de 30 mL de água quente. Transfira a solução e as águas de lavagem para o balão volumétrico. Esfrie, complete o volume do balão e agite. Filtre se necessário. Transfira, com auxilio de uma pipeta, uma alíquota de 10 mL para um frasco Erlenmeyer de 125 mL. Adicione 2 gotas da solução de cromato de potássio a 10%, como indicador. Titule com solução de nitrato de prata 0,1 M, até o aparecimento de uma coloração vermelho-tijolo.

Notas
Caso o pH da solução esteja ácido, neutralize com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, de bicarbonato de sódio ou carbonato de cálcio, até pH entre 6,5 e 9,0. Se for usado o bicarbonato de sódio ou carbonato de cálcio, aqueça a solução em banho-maria até não haver mais desprendimento de dióxido de carbono, antes de completar o volume do balão.
Nos produtos contendo quantidades maiores de cloretos, após a obtenção das cinzas e sua dissolução, conforme a técnica acima, transfira para um balão volumétrico de 200 ou 500 mL, lavando a cápsula e o funil com água e complete o volume. Transfira, com auxílio de uma pipeta, 10 mL da solução para um frasco Erlenmeyer de 125 mL e continue seguindo as indicações da técnica.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0{,}584}{P} = \text{cloretos, em cloreto de sódio, por cento m/m}$$

V = nº de mL da solução de nitrato de prata 0,1 M gasto na titulação
f = fator da solução de nitrato de prata 0,1 M
P = nº de g da amostra na alíquota utilizada para a titulação.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 36-37.

OHLWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. 3. ed., Rio de Janeiro, RJ: Livro Técnico e Científico Editora Ltda, v. 2, 1981. p. 121-122.

029/IV Cloretos por potenciometria

O cloreto pode ser determinado potenciometricamente, desde que se disponha de potenciômetro e eletrodo indicador de prata. O método baseia-se na precipitação do íon cloreto com nitrato de prata e dispensa o indicador cromato de potássio.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 37.

030/IV Fosfatos por titulação

Fósforo, na forma de íons fosfato, ou não, é dos mais importantes constituintes minerais presentes em cereais, carnes, leite e frutas. A determinação de fósforo é, geralmente, feita na forma de íon fosfato, pela precipitação de fosfomolibdato de amônio que é dissolvido em solução alcalina de concentração conhecida, cujo excesso é titulado. Os processos colorimétricos são empregados quando a quantidade de fósforo é pequena. O que distingue os métodos é o uso de diferentes agentes redutores.

Material

Cápsula de porcelana de 100 mL, proveta de 100 mL, bastão de vidro, mufla, béquer de 400 mL, 2 buretas de 50 mL e bico de Bünsen.

Reagentes

Ácido clorídrico (1+2)
Hidróxido de amônio (1+1)
Nitrato de amônio
Ácido nítrico (1+1)
Solução de hidróxido de sódio 0,2 M
Indicador fenolftaleína
Ácido clorídrico 0,2 M

Solução de acetato de magnésio (A) – Pese 2 g de acetato de magnésio $Mg(C_2H_3O_2).4H_2O$, adicione 25 mL de água e coloque álcool até completar 500 mL.

Solução de ácido molíbdico (B) – Pese 100 g de ácido molíbdico $H_2MoO_4.H_2O$, adicione 144 mL de hidróxido de amônio e complete com 1148 mL de água.

Solução de molibdato de amônio – Misture lentamente as soluções A e B e deixe em repouso por 48 horas. Filtre antes de usar.

Procedimento – Pese 5 g da amostra em uma cápsula de porcelana de 100 mL. Adicione 10 mL da solução de acetato de magnésio. Evapore até a secagem em banho-maria. Carbonize em bico de Bünsen. Incinere em mufla a 550°C. Esfrie. Dissolva as cinzas com ácido clorídrico (1+2). Transfira para um béquer de 400 mL, com auxílio de 80 mL de água. Alcalinize com hidróxido de amônio (1+1). Adicione 10 g de nitrato de amônio. Acidule com ácido nítrico (1+1). Adicione solução de molibdato de amônio até completa precipitação. Aqueça por uma hora em banho de água a (40-45)°C, agitando freqüentemente com um bastão de vidro. Esfrie, filtre e lave o béquer, o bastão de vidro e o filtro com água até que o filtrado não tenha reação ácida. Transfira o papel de filtro com o precipitado para o mesmo béquer em que foi feita a precipitação. Dissolva o precipitado em solução de hidróxido de sódio 0,2 M, medido em uma bureta. Adicione duas gotas do indicador fenolftaleína. Titule o excesso de hidróxido de sódio com ácido clorídrico 0,2 M.

Cálculo

$$\frac{V \times 0{,}473}{P} = \text{fosfatos, em anidrido fosfórico por cento m/m}$$

V = diferença entre o nº de mL de solução de hidróxido 0,2 M adicionado e o nº de mL de ácido clorídrico 0,2 M gasto na titulação.
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3 ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 32-3.

031/IV Fosfatos por espectrofotometria

Material

Balões volumétricos de 100, 250, 500 e 1000 mL, pipetas de 25 e 50 mL, proveta e espectrofotômetro ou fotocolorímetro.

Reagentes

Solução de vanado-molibdato de amônio – Dissolva 20 g molibdato de amônio - $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ e 1 g de vanadato de amônio - NH_4VO_3, separadamente, em

cerca de 300 mL de água quente e filtre, se necessário. Misture as duas soluções, adicione 140 mL de ácido nítrico e dilua para um litro. Este reativo é estável por três meses.

Solução-estoque de fosfato – Pese 0,9587 g de fosfato ácido de potássio, seco a 105°C e complete o volume a 500 mL com água.

Solução-padrão de fosfato – Pipete 50 mL da solução-estoque de fosfato e complete o volume a 250 mL com água. Um mL desta solução corresponde a 0,2 mg de P_2O_5.

Procedimento – Dissolva as cinzas obtidas de 5 g da amostra em ácido clorídrico (1+2), transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Pipete uma alíquota (que deve ser proporcional à quantidade de fosfato presente na amostra) em um balão volumétrico de 100 mL. Adicione 25 mL do reagente vanado-molibdato de amônio e complete o volume com água até 100 mL. Homogeneíze e espere 10 minutos para fazer a leitura a 420 nm. Determine a quantidade de fosfato correspondente, usando a curva-padrão previamente estabelecida ou o valor da absortividade.

Curva-padrão – Em uma série de balões volumétricos de 100 mL, meça volumes de solução-padrão contendo valores de 5 a 6,2 mg de P_2O_5. Quando for usado um espectrofotômetro, utilize volumes de solução-padrão de fosfato contendo de 0,2 a 2,0 mg de P_2O_5. Adicione 25 mL do reagente vanado-molibdato de amônio a cada balão. Complete o volume com água. A temperatura da água mais o reagente deve ser 20°C. Homogeneíze e espere 10 minutos. Faça leitura a 420 nm, usando como branco 25 mL de vanado-molibdato de amônio, completando com água até 100 mL.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 33-34.

Lipídios

Os lipídios são compostos orgânicos altamente energéticos, contêm ácidos graxos essenciais ao organismo e atuam como transportadores das vitaminas lipossolúveis. Os lipídios são substâncias insolúveis em água, solúveis em solventes orgânicos, tais como éter, clorofórmio e acetona, dentre outros. Estes são classificados em: simples (óleos e gorduras), compostos (fosfolipídios, ceras etc.) e derivados (ácidos graxos, esteróis). Os óleos e gorduras diferem entre si apenas na sua aparência física, sendo que à temperatura ambiente os óleos apresentam aspecto líquido e as gorduras, pastoso ou sólido.

A determinação de lipídios em alimentos é feita, na maioria dos casos, pela extração com solventes, por exemplo, éter. Quase sempre se torna mais simples fazer uma extração contínua em aparelho do tipo Soxhlet, seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente empregado. O resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídios, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente. Estes conjuntos incluem os ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, as lecitinas, as ceras, os carotenóides, a clorofila e outros pigmentos, além dos esteróis, fosfatídios, vitaminas A e D, óleos essenciais etc., mas em quantidades relativamente pequenas, que não chegam a representar uma diferença significativa na determinação. Nos produtos em que estas concentrações se tornam maiores, a determinação terá a denominação mais adequada de extrato etéreo. Uma extração completa se torna difícil em produtos contendo alta proporção de açúcares, de proteínas e umidade.

Em certos casos, podem ser aplicados outros métodos na determinação dos lipídios, tais como: a extração com solvente a frio (método de Bligh-Dyer ou Folch), hidrólise ácida (método de Gerber ou Stoldt- Weibull) ou alcalina (método Rose-Gotllieb-Mojonnier).

032/IV Lipídios ou extrato etéreo – Extração direta em Soxhlet

Material

Aparelho extrator de Soxhlet, bateria de aquecimento com refrigerador de bolas, balança analítica, estufa, cartucho de Soxhlet ou papel de filtro de 12 cm de diâmetro, balão de fundo chato de 250 a 300 mL com boca esmerilhada, lã desengordurada, algodão, espátula e dessecador com sílica gel.

Reagente

Éter

Procedimento – Pese 2 a 5 g da amostra em cartucho de Soxhlet ou em papel de filtro e amarre com fio de lã previamente desengordurado. No caso de amostras líquidas, pipete o volume desejado, esgote em uma porção de algodão sobre um papel de filtro duplo e coloque para secar em uma estufa a 105°C por uma hora. Transfira o cartucho ou o papel de filtro amarrado para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Acople o extrator ao balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Adicione éter em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Adapte a um refrigerador de bolas. Mantenha, sob aquecimento em chapa elétrica, à extração contínua por 8 (quatro a cinco gotas por segundo) ou 16 horas (duas a três gotas por segundo). Retire o cartucho ou o papel de filtro amarrado, destile o éter e transfira o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese e repita as operações de aquecimen-

to por 30 minutos na estufa e resfriamento até peso constante (no máximo 2 h).

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{lipídios ou extrato etéreo por cento m/m}$$

N = nº de gramas de lipídios
P = nº de gramas da amostra

Nota: no caso de produtos contendo alta proporção de carboidratos, pese a amostra sob papel de filtro e lave com cinco porções de 20 mL de água. Coloque em estufa a 105°C por uma hora para secagem e proceda a extração conforme acima descrito.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 42-43.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 920.39,C). Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 33. p. 10-12

033/IV Lipídios ou extrato etéreo com hidrólise ácida prévia – Método A

Material

Aparelho extrator de Soxhlet, bateria de aquecimento com refrigerador de bolas, espátula, pinça, balança analítica, estufa, cartucho de Soxhlet ou papel de filtro de 12 cm de diâmetro, balão de fundo chato de (250-300) mL com boca esmerilhada, frasco Erlenmeyer de 250 mL com boca esmerilhada, condensador longo, vidro de relógio e papel indicador de pH.

Reagentes

Éter de petróleo
Ácido clorídrico 3 M
Areia diatomácea

Procedimento – Pese 10 g da amostra homogeneizada. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 250 mL com boca esmerilhada. Adicione 100 mL de ácido clorídrico 3 M. Acople

o frasco Erlenmeyer em condensador longo, sob aquecimento. Mantenha por 1 hora em ebulição. Decorrido o tempo, deixe esfriar. Adicione uma pequena quantidade de auxiliar de filtração (areia diatomácea). Filtre utilizando duas folhas de papel de filtro. Lave o resíduo com água até neutralizar o filtrado, fazendo o teste com papel indicador de pH. Despreze o filtrado. Deposite o papel de filtro com o resíduo sobre um vidro de relógio e leve a estufa à 105°C para secagem. Após seco, faça um cartucho com os papéis, usando o externo para envolver o que contém a amostra. Transfira o cartucho para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Acople o extrator ao balão de fundo chato, previamente tarado a 105°C. Adicione éter de petróleo em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Acople em um refrigerador de bolas. Mantenha, sob aquecimento em chapa elétrica, a extração por 8 horas. Retire o cartucho e destile o éter. Transfira o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese. Repita as operações de aquecimento por 30 minutos na estufa e resfriamento até peso constante.

Nota: na expectativa de um alto teor de gordura na amostra a ser analisada, proceda a extração prévia com éter de petróleo, para a completa remoção da fração lipídica.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{lipídios ou extrato etéreo por cento m/m}$$

N = nº de gramas de lipídios
P = nº de gramas da amostra

Referência bibliográfica

U.K. FEEDING STUFFS (SAMPLING AND ANALYSIS) REGULATIONS. **The determination of oil in feeding stuffs nº 1119.** 1982, appendix I. p. 9-11.

034/IV Lipídios ou extrato etéreo com hidrólise ácida prévia – Método B

Material

Balança analítica, aparelho extrator de Soxhlet, bateria de aquecimento com refrigerador de bolas, chapa elétrica, estufa, espátula, béqueres de 100, 250 e 500 mL, proveta de 100 mL, pérolas de vidro ou cacos de porcelana, vidro de relógio, frasco Erlenmeyer de 500 mL, funil de vidro, papel de filtro, cartucho de Soxhlet, papel indicador de pH, balão de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL, pinça e dessecador com sílica gel.

Reagentes

Ácido clorídrico
Éter petróleo
Solução de nitrato de prata 0,1 M
Solução de HCl 4 M (1:2) – Dilua 100 mL do ácido clorídrico com 200 mL de água e misture.

Procedimento – Pese 5 a 10 g da amostra em um béquer de 100 mL. Transfira para um béquer de 500 mL, usando 100 mL de água quente. Adicione, com cuidado 60 mL de ácido clorídrico e algumas pérolas de vidro ou cacos de porcelana. Cubra o béquer com um vidro de relógio, coloque em uma chapa elétrica e aqueça até a ebulição, mantendo durante 30 minutos. Adicione 160 mL de água quente sobre a solução da amostra, lavando o vidro de relógio. Filtre a solução em papel de filtro previamente umedecido. Lave várias vezes o béquer e o resíduo do papel de filtro, cuidadosamente com água quente, até que o filtrado exiba reação neutra (teste com papel indicador de pH) ou ausência de cloreto (utilize solução de nitrato de prata 0,1 M). Coloque o papel de filtro contendo o resíduo sobre um outro papel de filtro seco em um vidro de relógio e leve à estufa a 105°C para a secagem. Após a secagem, faça um cartucho com os papéis, usando o externo para envolver o que contém a amostra. Transfira o cartucho para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Acople o extrator ao balão de fundo chato, previamente tarado a 105°C. Adicione éter de petróleo em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Acople em um refrigerador de bolas. Mantenha, sob aquecimento em chapa elétrica, a extração por 4 horas. Retire o cartucho e destile o éter. Transfira o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese. Repita as operações de aquecimento por 30 minutos na estufa e resfriamento até peso constante.

Nota: no caso da hidrólise ácida pode-se optar, alternativamente, pelo seguinte procedimento: pese diretamente a amostra em um béquer de 250 mL, adicione 50 mL de solução de ácido clorídrico 4 M e continue como descrito acima a partir de "algumas pérolas de vidro".

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{g de lipídios por cento, m/m}$$

N = n° de g de lipídios
P = n° de g da amostra

Referência bibliográfica

INTERNATIONAL STARDARD ORGANIZATION. **ISO 1443**: Meat and meat products - determination of total fat content. 1973.

035/IV Extrato alcoólico

É um tipo de extração em que o solvente empregado é o álcool. O resíduo obtido é chamado de extrato alcoólico o qual, nos produtos ricos em óleos voláteis, essências etc., representa um dado precioso na avaliação destes últimos. Como toda extração com solventes, ela poderá ser feita diretamente por simples percolação ou em aparelhos de extração contínua.

Material

Béqueres de 50 e 100 mL, balão volumétrico de 100 mL, proveta de 100 mL, funil de 5 cm de diâmetro, papel de filtro, frasco Erlenmeyer de 125 mL, pipeta de 50 mL, estufa, dessecador com sílica gel, balança analítica, banho-maria, espátula e pinça.

Reagente

Álcool

Procedimento – Pese 2 g da amostra em um béquer de 50 mL. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de 80 mL de álcool. Agite, com intervalos de 30 minutos, por 4 horas. Deixe em repouso por 16 horas. Complete o volume com álcool. Filtre em papel de filtro seco. Receba o filtrado em um frasco Erlenmeyer. Transfira, com auxílio de uma pipeta, 50 mL do filtrado para um béquer de 100 mL, previamente tarado. Coloque o béquer em banho-maria até completa evaporação do solvente. Aqueça em estufa a 105°C por 1 hora, resfrie em dessecador à temperatura ambiente e pese. Repita a operação até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{extrato alcoólico, por cento m/m}$$

P = nº de g da amostra contido na alíquota usada para a secagem
N = nº de g de extrato alcoólico fixo a 105°C

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 43-44.

Protídios

A determinação de protídios baseia-se na determinação de nitrogênio, geralmente feita pelo processo de digestão Kjeldahl. Este método, idealizado em 1883, tem sofrido numerosas modificações e adaptações, porém sempre se baseia em três etapas: digestão, destilação e titulação. A matéria orgânica é decomposta e o nitrogênio existente é finalmente transformado em amônia. Sendo o conteúdo de nitrogênio das diferentes proteínas aproximadamente 16%, introduz-se o fator empírico 6,25 para transformar o número de g de nitrogênio encontrado em número de g de protídios. Em alguns casos, emprega-se um fator diferenciado de 6,25, conforme descrito na **Tabela 6**. Amostras contendo nitratos podem perdê-los durante a digestão. Nestes casos, deve-se adicionar ácido salicílico ou fenol (cerca de 1 g), os quais retêm os nitratos, como nitro-derivados. Procede-se então à digestão.

Digestão – A matéria orgânica existente na amostra é decomposta com ácido sulfúrico e um catalisador, onde o nitrogênio é transformado em sal amoniacal.

Destilação – A amônia é liberada do sal amoniacal pela reação com hidróxido e recebida numa solução ácida de volume e concentração conhecidos.

Titulação – Determina-se a quantidade de nitrogênio presente na amostra titulando-se o excesso do ácido utilizado na destilação com hidróxido.

Tabela 6 – Fatores de conversão de nitrogênio total em proteína

Alimento	Fator	Alimento	Fator
Farinha de centeio	5,83	Castanha do Pará	5,46
Farinha de trigo	5,83	Avelã	5,30
Macarrão	5,70	Coco	5,30
Cevada	5,83	Outras nozes	5,30
Aveia	5,83	Leite e derivados	6,38
Amendoim	5,46	Margarina	6,38
Soja	6,25	Gelatina	5,55
Arroz	5,95	Outros alimentos	6,25
Amêndoas	5,18	-	-

036/IV Protídios – Método de Kjeldahl clássico

Material

Balança analítica, frascos de Kjeldahl de 500 a 800 mL, chapa elétrica ou manta aquecedora, balão de destilação, frasco Erlenmeyer de 500 mL, bureta de 25 mL, espátula, papel de seda, dedal e pipeta graduada de 25 mL ou pipetador automático.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Ácido sulfúrico 0,05 M
Sulfato de cobre
Sulfato de potássio
Dióxido de titânio
Solução fenolftaleína
Vermelho de metila a 1% m/v
Zinco em pó
Hidróxido de sódio a 30% m/v
Hidróxido de sódio 0,1 M

Mistura catalítica – Dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6.

Procedimento – Pese 1 g da amostra em papel de seda. Transfira para o balão de Kjeldahl (papel+amostra). Adicione 25 mL de ácido sulfúrico e cerca de 6 g da mistura catalítica. Leve ao aquecimento em chapa elétrica, na capela, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos). Aqueça por mais uma hora. Deixe esfriar. Caso o laboratório não disponha de sistema automático de destilação, transfira quantitativamente o material do balão para o frasco de destilação. Adicione 10 gotas do indicador fenolftaleína e 1 g de zinco em pó (para ajudar a clivagem das moléculas grandes de protídios). Ligue imediatamente o balão ao conjunto de destilação. Mergulhe a extremidade afilada do refrigerante em 25 mL de ácido sulfúrico 0,05 M, contido em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 3 gotas do indicador vermelho de metila. Adicione ao frasco que contém a amostra digerida, por meio de um funil com torneira, solução de hidróxido de sódio a 30% até garantir um ligeiro excesso de base. Aqueça à ebulição e destile até obter cerca de (250-300) mL do destilado. Titule o excesso de ácido sulfúrico 0,05 M com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, usando vermelho de metila.

Cálculo

$$\frac{V \times 0{,}14 \times f}{P} = \text{protídios por cento m/m}$$

V = diferença entre o nº de mL de ácido sulfúrico 0,05 M e o nº de mL de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação
P = nº de g da amostra
f = fator de conversão (conforme **Tabela 6**)

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 44-45.

FAO/WHO. FAO Nutrition Meetings Report Series, **52**. **Energy and protein requiriments**. Geneva, 1973. (Technical Report Series, n. 522).

SOUTHGATE, D.A.T. **The relationship between food composition and available energy**. Rome: Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements. 1981.

037/IV Protídios – Método de Kjeldahl modificado

Material

Balança analítica, frasco de Kjeldahl de 500 a 800 mL, chapa elétrica ou manta aquecedora, balão de destilação, frasco Erlenmeyer de 500 mL, buretas de 25 mL, espátula, papel de seda, pipeta graduada de 25 mL ou pipetador automático.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Ácido sulfúrico 0,05 M
Ácido bórico 0,033 M
Sulfato de cobre
Sulfato de potássio
Dióxido de titânio
Solução de fenolftaleína
Vermelho de metila a 1% m/v
Hidróxido de sódio a 30% m/v

Procedimento – Para a digestão da amostra, proceda conforme descrito em **036/IV**. Na destilação, proceda também como em **036/IV**, substituindo o ácido sulfúrico 0,05 M no frasco Erlenmeyer onde será recolhida a amônia formada, por ácido bórico 0,033 M, que não reage diretamente, servindo apenas como suporte para adsorsão da amônia. Titule diretamente a solução de hidróxido de amônio com a solução de ácido sulfúrico 0,05 M, utilizando o mesmo indicador do método **036/IV**.

Nota: alternativamente, poderá ser utilizada uma solução de ácido clorídrico 0,1 M em substituição ao ácido sulfúrico 0,05 M.

Cálculo

$$\frac{V \times 0{,}14 \times f}{P} = \text{protídios por cento m/m}$$

V = volume de ácido sulfúrico 0,05 M gasto na titulação
P = nº de g da amostra
f = fator de conversão (conforme **Tabela 6**)

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 991.20). Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 33. p. 10-12.

Glicídios

Neste grupo de compostos, que são hidratos de carbono, têm-se os mais variados tipos de substâncias, desde os monossacarídios, representados pela glicose, os dissacarídios, dos quais os mais freqüentes em alimentos são a sacarose e a lactose, até os polissacarídios, como amido e celulose. Qualquer que seja o produto a ser analisado, é inicialmente necessária a obtenção de uma solução dos glicídios presentes, livres de substâncias que possam interferir no processo escolhido para a sua determinação. Para isso, usam-se soluções de "clarificadores" (creme alumina, solução neutra de acetato de chumbo, solução básica de acetato de chumbo, ácido fosfotúngstico) as quais precipitam as substâncias interferentes.

Os métodos de determinação de glicídios estão baseados nas propriedades físicas das suas soluções ou no poder redutor dos glicídios mais simples (aos quais se pode chegar por hidrólise, no caso dos mais complexos). Os métodos de redução resumem-se em pesar ou titular a quantidade de óxido de Cu I precipitado de uma solução de íons de Cu II por um volume conhecido da solução de glicídios ou medir o volume da solução de glicídios necessário para reduzir completamente um volume conhecido da solução de cobre II. Os resul-

tados são calculados mediante fatores e, geralmente, as determinações de glicídios redutores são calculadas em glicose e as dos não-redutores em sacarose. A hidrólise dos não-redutores é feita, previamente, por meio de ácido ou enzimas.

038/IV Glicídios redutores em glicose

Material

Balança analítica, espátula de metal, béquer de 100 mL, proveta de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL, funil de vidro, balão de fundo chato de 250 mL, pipetas volumétricas de 5 e 10 mL ou bureta automática de 10 mL, buretas de 10 e 25 mL e chapa elétrica.

Reagentes

Hidróxido de sódio a 40% m/v
Carbonato de sódio anidro
Ferrocianeto de potássio a 6% m/v
Acetato de zinco a 12% m/v
Solução saturada de acetato neutro de chumbo
Sulfato de sódio anidro
Soluções de Fehling A e B tituladas (**Apêndice I**)

Procedimento – Pese 2 a 5 g da amostra em um béquer de 100 mL. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de água. Qualquer que seja a característica da amostra (a, b ou c), proceda como a seguir. Complete o volume e agite. Filtre se necessário em papel de filtro seco e receba filtrado em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Transfira o filtrado para a bureta. Coloque num balão de fundo chato de 250 mL, com auxílio de pipetas de 10 mL, cada uma das soluções de Fehling A e B, adicionando 40 mL de água. Aqueça até ebulição. Adicione, às gotas, a solução da bureta sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho de Cu_2O).

Notas

a) Em caso de amostras com alto teor de proteína: adicione 5 mL de ferrocianeto de potássio a 6% e 5 mL de acetato de zinco a 12%. Complete o volume com água, agite e deixe em repouso por 15 minutos. Filtre em papel de filtro seco e receba o filtrado em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Verifique o pH da solução. Caso esteja ácido, com pH abaixo de 6, coloque algumas gotas de hidróxido de sódio a 40% ou carbonato de sódio anidro até que a solução se torne alcalina, com pH próximo de 9,0 e filtre novamente. Transfira o filtrado para uma bureta.

b) Em caso de amostras com coloração intensa: clarifique a amostra adicionando solução saturada de acetato neutro de chumbo, até não haver mais precipitação (cerca de 1,5 mL). Complete o volume com água. Filtre em papel de filtro seco e receba o filtrado em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione sulfato de sódio anidro, até precipitar o excesso de chumbo. Filtre em papel de filtro seco e receba o filtrado em outro frasco Erlenmeyer de 250 mL. Transfira o filtrado para uma bureta.

c) Em caso de amostras com alto teor de lipídios: adicione à amostra pesada, 50 mL de água e aqueça em banho-maria por 5 minutos. Transfira a solução à quente para um balão volumétrico de 100 mL. Esfrie, complete o volume e agite. Filtre em papel de filtro seco e receba o filtrado em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Transfira o filtrado para uma bureta.

Cálculo

$$\frac{100 \times A \times a}{P \times V} = \text{glicídios redutores em glicose, por cento, m/m}$$

A = nº de mL da solução de P g da amostra
a = nº de g de glicose correspondente a 10 mL das soluções de Fehling
P = massa da amostra em g
V = nº de mL da solução da amostra gasto na titulação .

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 49-50.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 958.06). Arlington: A.O.A.C.. 1995, chapter 39. p. 21.

039/IV Glicídios não-redutores em sacarose

Material

Balança analítica, espátula de metal, banho-maria, béquer de 100 mL, proveta de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL, funil de vidro, balão de fundo chato de 250 mL, pipetas volumétricas de 10 e 20 mL, bureta automática de 10 mL, buretas de 10 e 25 mL e chapa elétrica.

Reagentes

Ácido clorídrico
Solução de hidróxido de sódio a 40% m/v
Carbonato de sódio anidro
Ferrocianeto de potássio a 6% m/v
Acetato de zinco a 12% m/v
Soluções de Fehling A e B tituladas (**Apêndice I**)

Procedimento – Transfira, com auxílio de uma pipeta, 20 mL de filtrado obtido em glicídios redutores em glicose (**038/IV),** para um balão volumétrico de 100 mL ou pese de 2 a 5 g da amostra e transfira para um balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Caso a amostra contenha alto teor de lipídios, proceda como em **038/IV**, no item c. Acidule fortemente com ácido clorídrico (cerca de 1 mL). Coloque em banho-maria a (100 ± 2)°C por 30 a 45 minutos. Esfrie e neutralize com carbonato de sódio anidro ou solução de hidróxido de sódio a 40%, com auxílio de papel indicador. Caso a amostra contenha alto teor de proteína, proceda como em **038/IV**, item a. Complete o volume com água e agite. Filtre se necessário em papel de filtro seco e receba o filtrado em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Transfira o filtrado para a bureta. Coloque num balão de fundo chato de 250 mL, com auxílio de pipetas de 10 mL, cada uma das soluções de Fehling A e B, adicionando 40 mL de água. Aqueça até ebulição. Adicione, às gotas, a solução da bureta sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho de Cu_2O).

Cálculo

$$\left[\frac{100 \times A \times a}{P \times V} - B\right] \times 0{,}95 = \text{glicídios não redutores em sacarose, por cento, m/m}$$

A = nº de mL da solução de P g da amostra
a = nº de g de glicose correspondente a 10 mL das soluções de Fehling
P = massa da amostra em g ou nº de g da amostra usado na inversão
V = nº de mL da solução da amostra gasto na titulação
B = nº de g de glicose por cento obtido em glicídios redutores, em glicose

Nota: na titulação, quando se tornar difícil observar o desaparecimento da cor azul, adicione ao balão, próximo ao ponto final, 1 mL da solução de azul de metileno a 0,02%, como indicador interno. Continue a titulação até completo descoramento da solução.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 50-51.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 958.06). Arlington: A.O.A.C.. 1995, chapter 39. p. 21.

040/IV Glicídios totais em glicose

Material

Balança analítica, chapa de aquecimento com refrigerador de refluxo, chapa elétrica, béquer de 100 mL, espátula de metal, frasco Erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada, frasco Erlenmeyer de 300 mL, balão volumétrico de 250 mL, balão de fundo chato de 250 mL, funil de vidro, bureta de 25 mL, pipeta graduada de 5 mL e pipeta volumétrica de 10 mL.

Reagentes

Ácido clorídrico
Hidróxido de sódio 40% m/v
Carbonato de sódio anidro
Ferrocianeto de potássio a 6% m/v
Acetato de zinco a 12% m/v
Soluções de Fehling A e B tituladas (**Apêndice I**)

Procedimento – Pese 2 a 5 g da amostra e desengordure conforme **032/IV**, no caso de produtos com teor de lipídios inferior a 5%, não há necessidade de extração prévia da gordura da amostra. Transfira, quantitativamente, a amostra para um frasco Erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada, com o auxílio de água. Adicione 5 mL de ácido clorídrico. Coloque em chapa de aquecimento e adapte o refrigerador de refluxo ao frasco. Deixe em ebulição por 3 horas a contar a partir do início da ebulição. Espere esfriar a solução e neutralize com hidróxido de sódio a 40%, com auxílio de papel indicador. Transfira, quantitativamente, para um balão volumétrico de 250 mL, com auxílio de água. Caso a amostra contenha alto teor de proteína, proceda como em **038/IV**, item a. Complete o volume com água e agite. Filtre, se necessário, em papel de filtro seco para um frasco Erlenmeyer de 300 mL. Transfira o filtrado para uma bureta de 25 mL. Coloque num balão de fundo chato de 250 mL, com pipetas de 10 mL, cada uma das soluções de Fehling A e B, adicionando 40 mL de água.

Aqueça até ebulição. Adicione, às gotas, a solução da bureta sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho de Cu_2O).

Cálculo

$$\frac{100 \times A \times a}{P \times V} = \text{glicídios totais em glicose, por cento m/m}$$

A= nº de mL da solução de P g da amostra
a= nº de g de glicose correspondente a 10 mL das soluções de Fehling
P= massa da amostra em g
V= nº de mL da solução da amostra gasto na titulação

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 49-50.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 958.06). Arlington: A.O.A.C.. 1995, chapter 39. p. 21.

041/IV Glicídios por cromatografia descendente em papel – Prova qualitativa

Os métodos cromatográficos, aplicáveis a pequenas quantidades de amostra, são os mais úteis para identificação de glicídios. A cromatografia em papel, usando solventes e reveladores apropriados, permite não só a identificação como a determinação quantitativa, eluindo-se as manchas do papel e determinando colorimetricamente a concentração dos glicídios correspondentes. Pode-se correr um cromatograma com solvente apropriado e, uma vez revelado, identificar os glicídios, comparando os valores de R_f com os dos padrões usados paralelamente à amostra.

Material

Balança analítica, estufa, papel para cromatografia Whatman nº 1, pipetas de 1 e 5 mL, capilares de vidro, cuba cromatográfica com cânula, atomizador, béquer de 250 mL, funil de vidro e frasco Erlenmeyer de 100 mL.

Reagentes

Soluções-padrão a 2% dos açúcares a serem identificados
n-Propanol
Acetato de etila
Solução de anilina a 4% em álcool
Solução de difenilamina a 4% em metanol
Ácido fosfórico

Fase móvel – n-propanol - acetato de etila - água (65:10:25).

Solução reveladora – Em um frasco Erlenmeyer, prepare a mistura de solução de anilina a 4% em álcool (5 mL), solução de difenilamina a 4% em metanol (5 mL) e ácido fosfórico (1 mL).

Procedimento – Pese cerca de 10 g da amostra em um béquer de 250 mL e dissolva com aproximadamente 100 mL de água, mantendo em contato por no mínimo duas horas. Filtre em papel de filtro, recolhendo o filtrado em béquer de 250 mL. Reserve o filtrado para aplicar no papel para cromatografia. Corte o papel Whatman nº 1 com largura de 15 cm e comprimento de 57 cm. Faça uma linha com grafite ao longo da largura do papel, a 6 cm da base. Marque seis pontos com a distância mínima de 3 cm uns dos outros. Aplique, utilizando capilar de vidro, duas gotas das soluções-padrão de açúcares e quatro gotas do filtrado da amostra nos pontos marcados do papel cromatográfico. Coloque a fase móvel numa cânula de vidro, tampe a cuba e mantenha no mínimo uma hora para saturação da mesma. Coloque o papel, adequadamente, com a extremidade em que foram aplicados os padrões e a amostra na cânula. Fixe o papel na cânula, usando um bastão de vidro como apoio. Corra o cromatograma descendentemente por cerca de 12 horas, retire o papel e deixe secar ao ar em uma capela. Aplique o revelador sobre toda a superfície do papel, com auxílio de atomizador. Seque o papel em estufa a (100 - 105)°C, até o aparecimento de manchas características quanto à cor e respectivos R_f. Compare os valores dos R_f dos padrões com os R_f dos componentes da amostra.

Cálculo

$$\frac{Dc}{Ds} = R_f$$

Dc = distância percorrida pelo componente da amostra ou padrão
Ds = distância percorrida pela fase móvel.

Referência bibliográfica

MORAES, R.M. **Carboidratos em alimentos** - Manual Técnico, Campinas, SP: Ed. ITAL. 1987.

042/IV Glicídios por cromatografia circular em papel – Prova qualitativa

Aplica-se na análise qualitativa dos açúcares presentes nos alimentos (glicose, frutose, maltose, sacarose, além de outros açúcares) utilizando-se a técnica de cromatografia circular em papel em comparação com soluções-padrão de açúcares. A cromatografia em papel é uma técnica de separação baseada no deslocamento diferencial de solutos, arrastados por uma fase móvel e retidos seletivamente por uma fase estacionária líquida (água), contida no papel.

Material

Balança analítica, estufa, capela para substâncias voláteis, papel para cromatografia Whatman nº 1, pipetas de 1 e 5 mL, capilares de vidro, cuba cromatográfica de (52 x 52) cm, atomizador, béquer de 250 mL, papel de filtro, funil de vidro, frasco Erlenmeyer de 100 mL, proveta com tampa de 100 mL e placas de Petri.

Reagentes

Soluções-padrão a 2% dos açúcares a serem identificados
n-Propanol
Acetato de etila
Solução de anilina a 4% em álcool
Solução de difenilamina a 4% em metanol
Ácido fosfórico
Fase móvel – Prepare em uma proveta de 100 mL uma mistura de n-propanol - acetato de etila - água (65:10:25).

Solução reveladora – Em um frasco Erlenmeyer de 20 mL prepare a mistura de 5 mL da solução de anilina, 5 mL de difenilamina e 1 mL de ácido fosfórico.

Procedimento – Pese (10 - 20) g da amostra em béquer de 250 mL, dissolva com cerca de 100 mL de água, mantendo em contato por no mínimo 2 horas. Filtre, recolhendo o filtrado em béquer de 250 mL e reserve, para aplicar no papel para cromatografia. Corte o papel para cromatografia Whatman nº 1, em quadrado de 50 cm de cada lado. Trace com grafite duas diagonais entre os vértices do quadrado e duas entre os lados (todas cruzando

pelo centro do papel). Marque com lápis um ponto em cada diagonal a 2 cm do centro do papel. Aplique, utilizando capilar de vidro, duas gotas das soluções-padrão e 4-6 gotas do filtrado da amostra. Coloque a fase móvel nas placas de Petri posicionadas no centro e nos quatro vértices da cuba cromatográfica, tampe com uma placa de vidro e deixe saturar por cerca de uma hora. Coloque o papel sobre as placas de Petri, conectando o centro do papel com o solvente da placa central por meio de uma "vassourinha de papel". Corra o cromatograma circular por cerca de 12 horas (até o solvente atingir as laterais do papel) e retire o papel, marque a frente do solvente e deixe secar ao ar numa capela. Aplique o revelador sobre toda a superfície do papel, com auxílio de atomizador, mantendo-o pendurado em um varal na capela e enrole em um grande cartucho (cerca de 10 cm de diâmetro). Leve a estufa a 105°C até o aparecimento de manchas características quanto a cor e respectivos R_f. Compare os valores dos R_f dos padrões com os R_f do componente da amostra que permite a sua identificação.

Cálculo

$$\frac{Dc}{Ds} = R_f$$

Dc = distância percorrida pelo componente da amostra, a partir do ponto de aplicação da amostra
Ds = distância percorrida pela fase móvel, do ponto de aplicação da amostra até a frente marcada.

Referências bibliográficas

MORAES, R.M. **Carboidratos em alimentos** - Manual Técnico, Campinas, SP: Ed. ITAL. 1987.

COLLINS, C.H.; BRAGA.G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**, Campinas, SP: Ed. UNICAMP, 1993, p. 29-43.

043/IV Amido

Material

Cápsulas de porcelana, provetas de 20 e de 100 mL, balões volumétricos de 100 e de 500 mL, béquer de 400 mL, balão de titulação, bureta de 25 mL, pipetas de 10 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL, autoclave, banho-maria e funil de vidro.

Reagentes

Éter
Álcool a 70% e a 95%
Carbonato de cálcio
Solução de acetato neutro de chumbo saturada
Soluções de Fehling tituladas (**Apêndice I**)
Acido clorídrico
Solução de hidróxido de sódio a 10%
Carvão ativo

Procedimento – Pese 5 g da amostra em uma cápsula de porcelana. Trate, sucessivamente, com três porções de 20 mL de éter. Agite e decante. Transfira o material desengordurado para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, com o auxílio de 100 mL de álcool a 70%. Agite e aqueça em banho-maria a (83-87)°C, por 1 hora, usando um pequeno funil no gargalo do frasco para condensar os vapores. Esfrie, adicione 50 mL de álcool e filtre em filtro seco ou centrifugue durante 15 minutos, a 1500 rpm. Lave o resíduo com 500 mL de álcool a 70%, reunindo as soluções de lavagem ao filtrado (o filtrado ou o sobrenadante pode ser usado para a determinação de glicídios redutores em glicose e em glicídios não redutores em sacarose, evaporando o álcool, dissolvendo o resíduo com água, transferindo para um balão volumétrico de 100 mL e titulando com soluções de Fehling conforme **038/IV** e **039/IV**). Transfira o resíduo juntamente com o papel de filtro para um frasco Erlenmeyer de 500 mL com auxílio de 150 mL de água. Adicione 5 gotas de solução de hidróxido de sódio a 10%. Aqueça em autoclave a uma atmosfera por 1 hora. Esfrie e adicione 5 mL de ácido clorídrico (a solução deverá ficar fortemente ácida). Aqueça em autoclave por mais 30 minutos e neutralize com solução de hidróxido de sódio a 10%. Transfira para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume com água. Adicione, se necessário, 0,5 g de carvão ativo. Agite e filtre em filtro seco. Nesta solução determine glicídios redutores por titulação pelo método **038/IV**.

Cálculo

$$\frac{100 \times A \times a \times 0{,}9}{P \times V} = \text{glicídios não redutores, em amido, por cento m/m}$$

A = nº de mL da solução de P g da amostra
P = nº de g da amostra
V = nº de mL da solução gasto na titulação
a = nº de g de glicose correspondente a 10 mL das soluções de Fehling

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 53-54.

Fibras

Ao resíduo orgânico obtido em certas condições de extração, dá-se o nome de fibra. Os métodos de tratamento de extração da amostra variam e é de grande importância, para a comparação de resultados, seguir exatamente as condições específicas em cada um. O termo fibra alimentar foi proposto por Hipsely e definido por Trowell como sendo os componentes das paredes celulares vegetais incluídas na dieta humana que resistem à ação das secreções do trato gastrointestinal. Para a análise de alimentos de consumo humano, o conhecimento do teor fibra alimentar é mais adequado do que o de fibra bruta. Hoje a definição mais aceita, para fins analíticos, é a de Asp que define as fibras, considerando os aspectos fisiológicos, como polissacarídios (exceto amido) e lignina que não são digeridos pelo intestino delgado humano. As fibras podem ser classificadas de acordo com a sua solubilidade. As fibras solúveis são responsáveis pelo aumento da viscosidade do conteúdo gastrointestinal, retardando o esvaziamento e a difusão de nutrientes; incluem as gomas, mucilagens, a maioria das pectinas e algumas hemiceluloses. As fibras insolúveis diminuem o tempo de trânsito intestinal, aumentam o peso das fezes, tornam mais lenta a absorção da glicose e retardam a digestão do amido; incluem a celulose, lignina, hemicelulose e algumas pectinas. Embora em concentrações diferentes, a maioria dos alimentos contém uma combinação dos dois tipos de fibras: as solúveis, tendo como principais fontes alimentares as leguminosas e as frutas e as insolúveis que estão presentes nos grãos de cereais, no farelo de trigo, nas hortaliças e nas cascas de frutas. Durante muitos anos foi utilizada a determinação do teor de fibra ou o resíduo vegetal resultante de um tratamento não fisiológico, obtido pelo método de Henneberg, que consiste numa digestão ácida e outra alcalina num material previamente dessecado e desengordurado. Posteriormente, o procedimento foi simplificado utilizando-se apenas uma etapa de digestão. Estes métodos fornecem valores baixos devido à utilização de digestão muito drástica, levando à perda de alguns componentes, não sendo mais adequados para a análise de alimentos, podendo ser aplicados apenas para de rações animais. Hellenboon *et al.* (1975) desenvolveram o método enzimático-gravimétrico, que consiste em tratar o alimento com diversas enzimas fisiológicas, simulando as condições do intestino humano, permitindo separar e quantificar gravimetricamente o conteúdo total da fração fibra e/ou as frações solúveis e insolúveis. Este método foi posteriormente modificado por Asp *et al* (1983) e Prosky *et al.* (1984).

044/IV Fibra bruta

Material

Estufa, mufla, dessecador com sílica indicadora de umidade, frasco Erlenmeyer de 750 mL com boca esmerilhada, refrigerador de refluxo longo com boca inferior esmerilhada, papel tornassol, proveta de 100 mL, pipetas de 20 mL e cadinho de Gooch com camada de filtração.

Reagentes

Éter
Álcool
Areia diatomácea (agente filtrante) para preparação do cadinho

Solução ácida – Em um béquer de 1000 mL misture 500 mL de ácido acético glacial, 450 mL de água, 50 mL de ácido nítrico e 20 g de ácido tricloracético.

Procedimento – Pese 2 g da amostra, envolva em papel de filtro e amarre com lã. Faça extração contínua em aparelho de Soxhlet, usando éter como solvente. Aqueça em estufa para eliminar o resto de solvente. Transfira o resíduo para um frasco Erlenmeyer de 750 mL, com boca esmerilhada. Adicione 100 mL de solução ácida e 0,5 g de agente de filtração. Adapte o frasco Erlenmeyer a um refrigerante de refluxo por 40 minutos a partir do tempo em que a solução ácida foi adicionada, mantendo sob aquecimento. Agite, freqüentemente, a fim de evitar que gotas sequem na parede do frasco. Filtre em cadinho de Gooch previamente preparado com areia diatomácea e com auxílio de vácuo. Lave com água fervente até que a água de lavagem não tenha reação ácida. Lave com 20 mL de álcool e 20 mL de éter. Aqueça em estufa a 105°C, por 2 horas. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese e repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. Incinere em mufla a 550°C. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese e repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. A perda de peso será igual à quantidade de fibra bruta.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{fibra bruta por cento, m/m}$$

N = nº de g de fibra
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 56.

045/IV Fibra alimentar total – Método enzimático-gravimétrico

Material

Estufa, mufla, banho-maria, banho-maria com bandeja agitadora, dessecador com sílica indicadora de umidade, cadinho de vidro com placa de vidro sinterizado (ASTM 40-60 µm), lã de vidro de fibra média, béquer de 250 mL, proveta de 250 mL, kitassato de 500 ou 1000 mL, trompa d'água e tamis de 32 *mesh.*

Reagentes

Extran a 2%
Ácido clorídrico 0,561 M
Ácido clorídrico 1 M
Hidróxido de sódio 1 M
Álcool a 95%
Álcool a 78%
Acetona
α-amilase termorresistente
Protease
Amiloglicosidase
MES – Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano
Solução-tampão MES-TRIS 0,05 M – Pese 19,52 g de MES e 12,2 g de TRIS. Dissolva em 1,7 L de água. Ajuste o pH para 8,2, a 24°C, com NaOH 6 M e dilua para 2 L com água.

Procedimentos

Preparação da amostra – Dependendo das características da amostra com relação ao teor de umidade, gordura e açúcar, adota-se um procedimento diferente, visando facilitar a eficiência do tratamento enzimático. Alimentos com alto teor de umidade devem ser inicialmente secos em estufa a vácuo a 70°C, durante a noite, quantificando-se o teor de umidade para efeito do cálculo final da fibra alimentar. Alimentos com alto teor de açúcar devem ser tratados previamente com 100 mL de álcool a 85% por 30 min em banho-maria a 70°C com posterior filtração. O resíduo é lavado com álcool a 70% até atingir o volume de 500 mL.

Após a evaporação do solvente, o teor de açúcar é quantificado conforme **038/IV** e **039/IV**. Alimentos com teores de lipídios acima de 5%, quando secos, devem ser desengordurados com éter, em aparelho de Soxhlet, quantificando-se o teor de gordura pelo mesmo motivo da determinação de umidade. Após o tratamento adequado, a amostra deve se moída ou triturada e passada por tamis de 32 *mesh*. Conserve-a em recipiente fechado até ser analisada. No momento da tomada da amostra para a análise da fibra, determine novamente o teor de umidade.

Preparação dos cadinhos – Lave os cadinhos de vidro com placa de vidro sinterizado com porosidade nº 2 (Pyrex nº 32940, ASTM 40-60 µm) com extran a 2%, mantendo em banho por 24 horas, enxágüe com 6 porções de água utilizando vácuo, passe mais 3 porções de água no sentindo oposto ao da filtração, com a finalidade de remover qualquer resíduo retido na placa de vidro. Seque em estufa a 105°C. Transfira os cadinhos para dessecador mantendo-os à temperatura ambiente. Pese. Revista internamente os cadinhos com uma camada de cerca de 1 g de lã de vidro, tendo o cuidado de distribuir uniformemente no fundo e nas paredes (forma de concha). Lave a lã com uma porção de 50 mL de ácido clorídrico 0,5 M com auxílio de vácuo, lave com água até a neutralização. Seque em estufa a 105°C. Incinere em mufla a 525°C, no mínimo por cinco horas. Resfrie em dessecador e pese (P_1 para a amostra e B_1 para branco).

Tratamento enzimático – Pese em béquer de 250 mL, em triplicata, cerca de 1 g da amostra tratada e que tenha passado por tamis de 32 mesh. O peso entre as triplicatas não deve diferir de 20 mg. Adicione 40 mL de solução-tampão MES-TRIS, pH 8,2, dispersando completamente a amostra. Adicione 50 µg de α-amilase termorresistente, agitando levemente. Tampe com papel alumínio e leve ao banho-maria a (95 - 100)°C, por 35 min com agitação contínua. Remova os béqueres do banho e resfrie até (60 ± 1)°C. Adicione 100 µL de solução de protease preparada no momento do uso (50 mg/mL em tampão MES-TRIS), cubra com papel alumínio e leve ao banho-maria a (60 ± 1)°C com agitação por 30 minutos. Remova o papel alumínio dos béqueres e adicione 5 mL de ácido clorídrico 0,561 M, com agitação. Mantenha a temperatura a (60 ± 1)°C e ajuste o pH entre 4,0 - 4,7, com adição de solução de hidróxido de sódio 1 M e/ou ácido clorídrico 1 M. Adicione 300 µL de solução de amiloglicosidase. Cubra com papel alumínio e leve ao banho-maria a (60 ± 1)°C, por 30 minutos, com agitação contínua.

Notas
Paralelo ao procedimento da amostra, processe pelo menos dois cadinhos em branco (sem amostra).
É fundamental, para fins de cálculo, conhecer a massa de lã de vidro utilizada no revestimento do cadinho.

O vácuo utilizado nas filtrações deve ser moderado, sendo suficiente o produzido pela trompa d'água.

Utilize luvas e máscara de proteção durante a manipulação da lã de vidro.

Fibra alimentar total – Meça o volume do hidrolisado obtido no tratamento enzimático. Adicione álcool 95% a 60°C, medido após aquecimento, na proporção de 4:1 do volume do hidrolisado. Cubra os béqueres com papel alumínio e deixe a mistura em repouso, à temperatura ambiente, por 1 hora, para a precipitação da fração fibra solúvel. Posicione o cadinho, previamente preparado e pesado, num kitassato acoplado a uma trompa de vácuo. Passe pelos cadinhos uma porção de 15 mL de álcool a 78%, para redistribuir a lã de vidro. Filtre quantitativamente a solução alcoólica contendo o resíduo da hidrólise, cuidando para que a solução não ultrapasse o nível da lã de vidro durante a filtração. Lave o resíduo com duas porções de 15 mL de álcool a 95% e duas porções de 15 mL de acetona. Seque os cadinhos contendo o resíduo em estufa a 105°C, durante uma noite. Resfrie em dessecador e pese (P_2 para a amostra e B_2 para o branco). Após a pesagem, determine o teor de proteína em um dos cadinhos da amostra e em um do branco. Determine o teor de cinzas nos outros dois cadinhos da amostra e em um do branco.

Cálculo

$$\frac{RT - P - C - BT \times 100}{m} = \text{fibra alimentar total por cento m/m}$$

RT = resíduo total da amostra = $(P_2 - P_1)$
BT = resíduo total do branco = $(B_2 - B_1) - P_b - C_b$
C = cinzas da amostra
m = massa da tomada da amostra
P = teor de proteína

046/IV Fibra alimentar solúvel e insolúvel – Método enzimático-gravimétrico

Procedimento – Execute como a análise da fibra alimentar total, com relação a preparação da amostra, dos cadinhos e a hidrólise enzimática. Concluída a etapa da hidrólise, filtre quantitativamente a solução contendo o resíduo, cuidando para que não ultrapasse a lã de vidro. Lave o béquer e o resíduo com duas porções de 10 mL de água a 70°C, recolhendo a água de lavagem junto com o filtrado da hidrólise. Reserve o filtrado em béquer de 250 mL. A fração fibra insolúvel fica retida no cadinho e a solúvel no filtrado. Lave o resíduo do cadinho contendo a fibra insolúvel com duas porções de 15 mL de álcool a 78%, duas porções de 15 mL de álcool a 95% e duas porções de 15 mL de acetona. Seque os cadinhos em estufa a 105°C, durante uma noite. Resfrie os cadinhos em dessecador e pese (P_2 para a amostra e B_2 para o branco). Utilize um dos cadinhos da amostra e um do branco para determinar o teor de proteína do resíduo insolúvel e dois cadinhos da amostra e um do branco para determinar o teor de cinzas do resíduo insolúvel. Calcule a fração fibra insolúvel procedendo da mesma forma que para fibra total. Retome o béquer com

o filtrado após a hidrólise. Meça o volume. Adicione álcool 95% a 60°C (medido após aquecimento) na proporção de 4:1 do volume do filtrado. Cubra o béquer com papel alumínio e mantenha a mistura em repouso por 1 hora à temperatura ambiente, para a precipitação da fração fibra solúvel. Filtre a solução alcoólica em cadinhos previamente tarados. Proceda à lavagem, secagem e pesagem, como na fração fibra insolúvel. Determine os teores de proteína e cinza da mesma forma que na fração fibra solúvel. Calcule a fração fibra solúvel procedendo da mesma forma que para fibra total.

Referência bibliográfica

LEE, S.C.; PROSKY, L.; DEVRIES, J.W. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **J. Assoc. Off. Chem. Int.**, v. 75, p. 395-416, 1992.

047/IV Pectinas – Prova qualitativa

Um certo número de substâncias relacionadas ao ácido péctico ($C_{17}H_{24}O_{16}$) recebe esta designação. Pectinas são componentes de muitas frutas; na presença de açúcares e ácidos, apresentam tendência a formar um gel, de onde a sua grande importância nos produtos feitos de frutas. Os métodos de determinação de pectinas se baseiam na sua extração por água quente seguida por precipitação com álcool e, após purificação, pesagem na forma de pectato de cálcio ou ácido livre.

Procedimento – Adicione a 30 g da amostra, em um béquer, 200 mL de água e misture bem. Aqueça, ligeiramente, em banho-maria. Filtre se necessário. Adicione a uma alíquota do filtrado uma solução de permanganato de potássio a 0,25%. Aqueça até ebulição. Uma cor intensa com fluorescência esverdeada é indicação da presença de pectinas.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 59.

048/IV Pectinas – Determinação por gravimetria

Material

Balão volumétrico de 200 mL, béquer de 400 mL, pipeta graduada de 5 mL, proveta de 200 mL e cadinho de Gooch.

Reagentes

Sacarose
Ácido sulfúrico 0,5 M
Álcool a 95%
Solução de hidróxido de sódio a 10%
Ácido clorídrico (1+9)

Preparo da solução da amostra

a) Geléias e xaropes – Pese 30 g da amostra em um béquer de 200 mL. Adicione 100 mL de água e aqueça ligeiramente. Esfrie. Transfira para um balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com água. Se necessário, filtre em filtro seco.

b) Frutas frescas, doces de massa e conservas – Homogeneíze a amostra em um liqüidificador, se necessário, o mais rapidamente possível. Pese 30 g da amostra em um béquer de 200 mL. Adicione 80 mL de água e aqueça até ebulição por 1 hora, recolocando, de tempo em tempo, o volume de água evaporado. Esfrie e transfira para um balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com água.

Procedimento – Transfira 200 mL da solução da amostra, preparada segundo (a ou b), para um béquer de 400 mL. Adicione de 8 a 12 g de sacarose, se a amostra não contiver açúcar. Evapore em banho-maria até cerca de 25 mL. Esfrie. Adicione 3 mL de ácido sulfúrico 0,5 M e adicione, lentamente, agitando sempre, 200 mL de álcool. Deixe em repouso por 10 horas e filtre. Lave o filtro com 50 mL de álcool a 95%. Transfira o precipitado para o mesmo béquer em que foi feita a evaporação, com o auxílio de um jato de água quente. Evapore até reduzir a 40 mL. Esfrie. Adicione 5 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% e 5 mL de água. (Se depois da adição da solução de hidróxido de sódio a solução contiver substâncias insolúveis, repita a análise, usando uma quantidade menor da solução da amostra). Deixe em repouso por 15 minutos. Adicione 40 mL de ácido clorídrico (1+9). Ferva por 15 minutos. Filtre rapidamente. Lave o béquer e o filtro com água quente. Transfira o precipitado para um béquer de 200 mL, com auxílio de um jato de água quente. Lave bem o papel de filtro com água quente. Complete com água o volume de 40 mL. Esfrie. Adicione 5 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% e 5 mL de água. Deixe em repouso por 15 minutos. Adicione 49 mL de água e 10 mL de ácido clorídrico (1+9). Ferva por 5 minutos. Filtre em cadinho de Gooch que foi previamente aquecido por 30 minutos em mufla a 550°C e resfriado até a temperatura ambiente em dessecador com cloreto de cálcio anidro, pesado. Lave o cadinho de Gooch com água quente e depois com álcool a 95%. Aqueça por 1 hora em estufa a 100°C. Resfrie até temperatura ambiente em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento I (30 minutos na estufa) e resfriamento até peso constante.

Aqueça por 30 minutos em mufla a 550°C. Resfrie e pese. Repita as operações de aquecimento (30 minutos na mufla) e resfriamento até peso constante. A perda de peso dará a quantidade de ácido péctico.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{ácido péctico por cento m/m}$$

N = nº de g de ácido péctico
P = nº de g da amostra usado na precipitação

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 59-61.

049/IV Dióxido de enxofre – Prova qualitativa

O dióxido de enxofre pode ser usado nos alimentos como conservador isolado ou na forma de seus sais de sódio, potássio ou cálcio, mas nas análises sempre é calculado na forma de SO_2 livre. Tem ação inibidora no crescimento de fungos, fermentos e bactérias aeróbias e previne o escurecimento enzimático de frutas e vegetais. Mantém a vitamina C, mas inativa a vitamina B_1.

Material

Frasco Erlenmeyer de 125 mL, tubo em U, tubo de ensaio, proveta de 10 mL e pipeta graduada de 1 mL.

Reagentes

Acetato de cobre
Ácido clorídrico
Pedra de mármore

Solução de iodo com cloreto de bário – Dissolva 3 g de iodo em uma solução de 3 g de iodeto de potássio em 50 mL de água. Adicione 2 g de cloreto de bário e complete com água o volume até 100 mL.

Procedimento – Pese 5 g da amostra em um frasco Erlenmeyer de 125 mL. Adicione 0,1 g de acetato de cobre, um pequeno pedaço de mármore e 10 mL de ácido clorídrico. Feche imediatamente com uma rolha contendo um tubo recurvado cuja extremidade mergulhe em 0,5 mL de solução iódica de cloreto de bário. Deixe o ácido agir sobre o mármore por 10 minutos. Aqueça até ebulição. Observe a solução na extremidade do tubo. Em presença do dióxido de enxofre ela descora e se forma um precipitado branco de sulfato de bário.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 86-87.

050/IV Dióxido de enxofre – Método quantitativo de Monier- Williams

Material

Manta aquecedora, cilindro de nitrogênio e aparelho segundo a **Figura 1.**

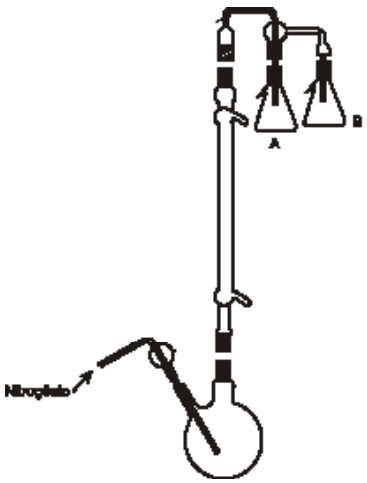


Figura 1 – Aparelho para determinação de SO_2

Reagentes

Água oxigenada a 3%, recém-preparada com água destilada e deionizada
Ácido clorídrico
Hidróxido de sódio 0,05 M
Vermelho de metila a 0,2% m/v ou azul de bromofenol a 0,4% m/v

Procedimento – Pese 50 g da amostra e transfira para o balão de reação do aparelho. Adicione 350 mL de água e 20 mL de ácido clorídrico. Transfira 15 mL e 5 mL de água oxigenada a 3%, respectivamente, para os frascos A e B, que devem estar mergulhados em banho de água gelada. Abra o torpedo de nitrogênio e faça passar corrente de nitrogênio a razão de 10 bolhas por minuto no balão de reação e aqueça-o de modo a manter a ebulição durante 120 minutos e não aumentar o número de bolhas por minuto. Desligue. Transfira a solução do frasco B para o frasco A, lavando com 10 mL de água bidestilada e deionizada. Adicione três gotas do indicador e titule com a solução de hidróxido de sódio 0,05 M. Titule um branco de 20 mL de água oxigenada nas mesmas condições.

Notas

Alternativamente, pode-se usar, em substituição ao ácido clorídrico, uma solução aquosa de ácido fosfórico 1:1, v/v.

Para amostras com baixa concentração de sulfito, recomenda-se a titulação por via potenciométrica.

Cálculo

$$\frac{(A-B) \times M \times f \times 3{,}2}{P} = \text{dióxido de enxofre por cento m/m}$$

B = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,05 M gasto na prova em branco
A = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,05 M gasto na titulação da amostra
M = molaridade da solução de hidróxido de sódio
P = nº de g da amostra
f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,05 M

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 88-89.

FAZIO, T.; WARNER, C. A. Review of sulphites in foods: analytical Methodology and reported findings. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v. 7, n. 4, p. 433-454, 1990.

051/IV Corantes artificiais orgânicos – Prova qualitativa

O método é aplicável a amostras de alimentos coloridos artificialmente e baseia-se na separação dos corantes por cromatografia ascendente em papel.

Material

Banho-maria, capela para solventes, lã natural branca de 20 cm, régua de 20 cm, papel Whatman nº 1 (20 x 20 cm), béquer de 25 e 200 mL, bastão de vidro, capilar de vidro e cuba de vidro (21 x 21 x 10) cm.

Reagentes

Ácido clorídrico
Hidróxido de amônio
Padrões de corantes orgânicos artificiais a 0,1% m/v

Procedimento – Para a extração dos corantes, coloque em um béquer de 200 mL aproximadamente 30 a 50 g da amostra, 100 mL de água e cerca de 20 cm de um fio de lã natural branca e misture bem. Acrescente algumas gotas de HCl (± 0,5 mL) e coloque em banho-maria fervente até que o corante fique impregnado na lã. Lave a lã com água corrente. Coloque em um béquer de 25 mL e adicione algumas gotas de hidróxido de amônio (± 0,5 mL). Em seguida, adicione 10 mL de água e coloque em banho-maria até que a solução adquira uma coloração igual à da lã. Retire a lã e reduza o volume do líquido à metade, por evaporação. Para a identificação dos corantes extraídos, aplique a amostra e as soluções dos padrões de corantes, com auxilio de capilar, no papel de cromatografia Whatman n. 1 e escolha o solvente mais adequado seguindo o procedimento descrito no método **086/IV**. Compare o aparecimento das manchas da amostra quanto à cor e aos fatores de resolução (R_f), com os respectivos padrões de corantes orgânicos artificiais.

Notas
Para se obter um produto mais puro, caso seja necessário, faça dupla extração dos corantes com o fio de lã.
Corantes naturais poderão tingir o fio no primeiro tratamento, mas a coloração não é removida pela solução de hidróxido de amônio.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 106-108.

052/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa

Material

Extrator de Soxhlet, espectrofotômetro UV/VIS, balança analítica, balões volumétricos de 100 mL, béqueres de 150 e 200 mL e funil de Büchner.

Reagentes

Metanol com 5% de hidróxido de amônio
Álcool com 5% de hidróxido de amônio
Solução de acetato de amônio 0,02 M e pH = 5,6

Balas de goma, balas duras, gomas de mascar, pós para sobremesa e pós para refresco

Procedimento – Pese com precisão cerca de 7 g de balas ou gomas de mascar devidamente trituradas ou picadas, 5 g de pós para sobremesas ou 3 g de pós para refresco em um béquer de 150 mL, adicione 30 mL de metanol amoniacal e agite com auxílio de bastão de vidro. Deixe decantar e transfira o líquido colorido para um balão volumétrico de 100 mL, filtrando em papel de filtro. Repita a extração com mais duas porções de 30 mL de metanol amoniacal ou até que a amostra fique incolor. Caso as bordas do papel de filtro adquirem a coloração da amostra, recorte e junte ao resíduo da amostra no béquer. Repita a extração com metanol amoniacal. Complete o volume com a mesma solução. Centrifugue, se necessário. Leia a absorbância em espectrofotômetro no(s) comprimento(s) de onda do(s) corante(s) identificado(s) como em **051/IV**, usando como branco a solução de metanol amoniacal.

Sorvetes e iogurtes

Procedimento – Pese com precisão cerca de 10 g de amostra em um béquer de 150 mL, adicione 30 mL de álcool contendo 5% de hidróxido de amônio. Agite e deixe em repouso em geladeira por quatro horas aproximadamente. Após a decantação do líquido colorido, filtre em funil de Büchner, recolhendo o filtrado em um balão volumétrico de 50 mL. Transfira o resíduo para o mesmo béquer e repita a extração com mais 15 mL de álcool amoniacal, até que a amostra fique incolor. Complete o volume. Se a solução ficar turva, coloque o balão em geladeira por três horas aproximadamente. Retire, espere estabilizar à temperatura ambiente e filtre em papel de filtro. Leia a absorbância em espectrofotômetro no(s) comprimento(s) de onda do(s) corante(s) identificado(s) como em **051/IV** usando como branco a solução de álcool amoniacal.

Xarope de groselha

Procedimento – Pese com precisão cerca de 5 g de amostra e dilua a 100 mL em balão volumétrico com solução de acetato de amônio 0,02 M. Leia a absorbância em espectrofotômetro no(s) comprimentos de onda do(s) corante(s) identificado(s) usando como branco a solução de acetato de amônio.

Cálculos

a) Amostra com um só corante: calcule o teor usando o valor de $E^{1\%}_{1cm}$ do respectivo corante, segundo a **Tabela 7**.

Tabela 7 – Características espectrofotométricas dos corantes artificiais

Corante	(nm)	$E^{1\%}_{1cm}$
Amarelo crepúsculo	481	564,1
Azul brilhante	630	1840,0
Azul indigotina	610	449,3
Bordeaux S	519	436,0
Eritrosina	524	1130,0
Tartrazina	426	536,0
Vermelho sólido E	505	447,9
Vermelho 40	505	536,0
Ponceau 4R	507	442,5

b) Amostra com dois corantes cujas absorções máximas são bem distantes entre si: faça as leituras das absorbâncias nos dois comprimentos de onda respectivos na mesma solução. Como os corantes absorvem em regiões distintas, a absorção de um não interfere na absorção do outro. Calcule o teor de corante usando o valor de $E^{1\%}_{1cm}$ de cada corante.

c) Amostra com dois corantes cujas absorções máximas são bem próximas uma da outra: faça as leituras das absorbâncias nos comprimentos de onda de cada corante na mesma solução. Como as regiões de absorções máximas são bem próximas, a absorção de um dos corantes interfere na absorção do outro. Em amostras contendo tartrazina e amarelo crepúsculo, como por exemplo ao fazer a leitura a 426 nm, na realidade, estamos considerando a absorção da tartrazina mais a do amarelo-crepúsculo; a 481 nm, estamos considerando a absorção do amarelo-crepúsculo mais a da tartrazina. O que ocorre é a aditividade das absorbâncias. Para a devida correção, estabelecemos valores de $E^{1\%}_{1cm}$ a 426 nm e $E^{1\%}_{1cm}$ a 481 nm com o padrão do corante tartrazina com 96,36% de pureza

(no mínimo) e com o padrão do corante amarelo-crepúsculo com 90,29 % de pureza (no mínimo), conforme **Tabela 8**.

Tabela 8 – Características espectrofotométricas dos corantes artificiais

Corante	(nm)	$E^{1\%}_{1cm}$
Tartrazina	426	535
Tartrazina	481	170
Amarelo-crepúsculo	426	221
Amarelo-crepúsculo	481	592

Substituindo esses valores de $E^{1\%}_{1cm}$ na equação de Lambert-Beer, (A=abc), a concentração do corante é obtida com a resolução do sistema de equação com duas incógnitas.

$$\begin{cases} A_{426nm} = 535x + 221y \\ A_{481nm} = 170x + 592y \end{cases}$$

x = concentração do corante tartrazina
y = concentração do corante amarelo-crepúsculo
A_{426}= absorbância da solução a 426 nm
A_{481} = absorbância da solução a 481 nm

Referência bibliográfica

TAKAHASHI, M.Y.; YABIKU, H.Y.; MARSIGLIA, D.A.P. Determinação quantitativa de corantes artificiais em alimentos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 48, (1/2) p. 7-15, 1988.

053/IV Determinação da composição de ácidos graxos saturados e insaturados por cromatografia em fase gasosa

Os lipídios da amostra a ser analisada são submetidos à reações de transesterificação ou hidrólise e esterificação; os ésteres metílicos de ácidos graxos formados são determinados por cromatografia em fase gasosa utilizando como padrão interno metiltridecanoato. O método permite uma separação quantitativa de misturas de ésteres metílicos de ácidos graxos saturados e insaturados, inclusive dos ácidos graxos *trans*, dependendo da coluna, condições cromatográficas e dos padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos empregados. A quantificação é feita baseada nas relações de área de cada ácido graxo com a área do padrão interno, utilizando os fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama (DIC) e de conversão de ésteres metílicos de ácidos graxos para ácido graxo.

Como uma alternativa, o cálculo da concentração dos ácidos graxos saturados e insaturados, pode ser feito por normalização de área, calculando os fatores de correção de resposta para cada ácido graxo no detector de ionização de chama. As porcentagens em massa obtidas para cada éster metílico de ácido graxo são multiplicadas pelo teor de lipídios da amostra e por fatores de conversão de gordura para ácidos graxos, variáveis conforme o tipo de alimento. Este procedimento de cálculo aplica-se principalmente aos alimentos cujos lipídios extraídos sejam predominantemente de um dos tipos de alimentos cujos fatores de conversão foram estabelecidos. Os lipídios dos alimentos (gordurosos) são essencialmente ésteres de ácidos graxos e glicerol com pequenas quantidades de outros componentes como: fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e outros compostos extraídos com solventes orgânicos. Deve-se adotar, preferencialmente, o método de cálculo com padrão interno.

Material

Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama, integrador ou computador, coluna cromatográfica capilar de sílica fundida com fases estacionárias de ciano propil siloxano, exemplo: SP2340 de 60 m, SP2560 de 100 m, CP-Sil 88, 50 ou 100 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme 0,25 µm, sistema de injeção com divisão de amostra; balança analítica; agitador do tipo vortex; seringa de capacidade máxima 10 µL, graduada em 0,1 µL; balão volumétrico de 25 e 100 mL; flaconete (*vial*) de 1,5 mL; pipeta volumétrica de 5 mL e pipeta graduada de 1 mL.

Reagentes

Mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos variando de C_4 a C_{24}.
Padrão interno C_{13} (metiltridecanoato)
n- Hexano grau CLAE
Gás de arraste para DIC: hidrogênio
Gases auxiliares para DIC: nitrogênio/ar super seco (livre de hidrocarbonetos).
Solução-padrão de mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos – Dilua com n-hexano o conteúdo da ampola (contendo 100 mg da mistura de padrões de FAMEs) em balão volumétrico de 25 mL. Distribua em *vials* de 1,5 mL e armazene em *freezer*. Esta solução será utilizada para identificar os ésteres metílicos de ácidos graxos e determinar os fatores de correção de cada componente.

Solução-padrão interno (C13:0) – Pese, com precisão, cerca de 250 mg de metiltridecanoato em balão volumétrico de 100 mL, dissolva e complete o volume com n-hexano. Transfira para um frasco âmbar e armazene em geladeira (validade 1 semana) ou em *freezer* (validade 1 ano).

Procedimento – Extraia os lipídios da amostra pelo método mais apropriado para a análise de ácidos graxos. Verifique, nos capítulos deste livro, dependendo do tipo de amostra, qual é o melhor método de extração. Prepare os ésteres metílicos de ácidos graxos como descritos

nos procedimentos **054/IV**, **055/IV** e **056/IV.** Condições de operação do cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama e condições otimizadas para colunas com fases estacionárias de ciano propil siloxano (exemplo: SP2560, 100 m); programação da temperatura da coluna: 45°C por 4 min, primeira rampa de 13°C/min até 175°C (27 min), segunda rampa de 4°C/min até 215°C (35 min), temperatura do injetor 220°C, temperatura do detector 220°C, razão de divisão da amostra 1:50.

Cálculo dos fatores de correção de reposta no DIC:

Cálculo experimental: Injete, em triplicata, 1 µL da solução-padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos. Identifique cada pico e determine os fatores de correção (K') individuais com relação ao éster metílico do ácido tridecanóico (C13:0), utilizando a equação abaixo:

$$\frac{M_{AGi} \times A_{C13:0}}{M_{C13:0} \times A_{AGi}} = K'$$

M_{AGi} = porcentagem do ácido graxo na mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos
$A_{C13:0}$ = média das áreas do pico do éster metílico do C13:0
$M_{C13:0}$ = porcentagem do éster metílico do C13:0 na mistura de padrões
A_{AGi} = média das áreas do ácido graxo na mistura de padrões

Cálculo teórico:

$$\frac{M_{Agi}}{(n_{Agi} - 1) \times A_c} = K_{Agi}$$

K_{Agi} = fator de resposta para o ácido graxo "i"
M_{Agi} = massa molecular do éster metílico de ácido graxo "i"
n_{Agi} = número de átomos de carbono do éster metílico do ácidos graxo "i"
A_c = massa atômica do carbono (12,01)

Pesos atômicos utilizados no cálculo:

Carbono =12,01; Hidrogênio = 1,0079; Oxigênio =15,994.

Fator relativo de resposta do DIC para cada componente com relação ao C13:0:

$$\frac{K_{AGi}}{K_{C13}} = K'_{AGi\,t}$$

K'_{AGi} = fator relativo de correção, para o ácido graxo "i"
K_{C13} = fator de resposta do DIC para o C13:0
K_{AGi} = fator de resposta do DIC para o ácido graxo "i"

Nota: recomenda-se, nos cálculos, a utilização dos fatores teóricos de resposta do DIC.

Determinação da concentração de ácidos graxos na amostra – Injete 1 µL da amostra no cromatógrafo a gás, utilizando microsseringa de 10 µL. Identifique os picos por comparação com os tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos com os componentes separados da amostra. Determine a concentração de cada ácido graxo, utilizando a equação abaixo.

Cálculo com padrão interno

$$\frac{M_{PI} \times A_{AGI} \times K'_{AGI} \times FC_{AG} \times L \times 100}{M \times A_{PI}} = C_{AGI}\ (g/100\ g\ da\ amostra)$$

M_{PI} = massa do padrão interno (C13:0) adicionada na amostra
A_{AGi} = área do ácido graxo no cromatograma da amostra
K'_{AGi} = fator de correção de cada ácido graxo com relação ao C13:0 (teórico ou experimental)
FC_{AG} = fator de conversão de éster metílico de ácido graxo (**Tabela 9**)
L = teor de lipídios em gramas por 100 g de amostra
M = massa da amostra
A_{PI} = área do padrão interno (C13:0) no cromatograma da amostra

Tabela 9 - Fatores de conversão de éster metílico de ácido graxo para ácido graxo

Ácido graxo	Fator de conversão FC_{AG}
C 4:0 (ácido butírico)	0,863
C 6:0 (ácido capróico)	0,892
C 8:0 (ácido caprílico)	0,911
C10:0 (ácido cáprico)	0,925
C11:0 (ácido undecanóico)	0,930
C12:0 (ácido láurico)	0,935
C13:0 (ácido tridecanóico)	0,939
C14:0 (ácido mirístico)	0,942
C14:1 (ácido miristoleico)	0,942
C15:0 (ácido pentadecanóico)	0,945
C15:1 (ácido pentadecenóico)	0,945

Ácido graxo	Fator de conversão FC_{AG}
C16:1 (ácido palmitoleico)	0,948
C17:0 (ácido margárico)	0,951
C17:1 (ácido heptadecenóico)	0,950
C18:0 (ácido esteárico)	0,953
C18:1 *cis* (ácido oléico)	0,953
C18:1 *trans* (ácido elaídico)	0,953
C18:2 *cis* (ácido linoleico)	0,952
C18:2 *trans* (ácido linolelaídico)	0,952
C18:3 *cis* (ácido linolênico)	0,952
C18:3 *trans* (ácido linolênico *trans*)	0,952
C20:0 (ácido araquídico)	0,957
C20:1 (ácido gadoleico)	0,957
C20:2 *cis* (ácido eicosadienóico)	0,957
C20:3 n3 (ácido eicosatrienóico n3)	0,956
C20:3 n6 (ácido eicosatrienóico n6)	0,956
C20:4 (ácido araquidônico)	0,956
C20:5 (ácido eicosapentaenóico)	0,956
C21:0 (ácido heneicosanóico)	0,959
C22:0 (ácido behênico)	0,960
C22:1 (ácido erúcico)	0,960
C22:2 (ácido docosadienóico)	0,960
C22:6 (ácido docosahexaenóico)	0,959
C23:0 (ácido tricosanóico)	0,962
C24:0 (ácido lignocérico)	0,963
C24:1 (ácido nervônico)	0,963

Cálculo com fatores de conversão:

$$\frac{(K'_{AGi} \times \%A_{AGi})}{\sum(K'_{AGi} \times \%A_{AGi})} \times L \times FC_v\ (g/100\ g\ da\ amostra) = Conc_{AGi}$$

$Conc_{AGi}$= concentração do ácido graxo em gramas por 100 g da amostra
$\%A_{AGi}$ = porcentagem de área do ácido graxo no cromatograma da amostra
K'_{AGi} = fator de correção de resposta de cada ácido graxo com relação ao C13:0 (teórico ou experimental)
FC_v = fator de conversão de gordura para os ácidos graxos
L = teor de lipídios na amostra em gramas por 100 g da amostra

Fatores (FC_v) para alguns alimentos:

FC_v = 0,956 – óleos, gorduras e sementes oleaginosas
FC_v = 0,945 – produtos lácteos
FC_v = 0,830 – ovos
FC_v = 0,800 – frutas e vegetais
FC_v = 0,953 – carne gorda bovina, suína e ovina
FC_v = 0,916 – carne magra bovina e ovina
FC_v = 0,910 – carne magra suína
FC_v = 0,945 – carne de frango
FC_v = 0,900 – carne gorda de peixe
FC_v = 0,700 – carne magra de peixe

Cálculo

Expresse a concentração dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, em gramas por 100 g de amostra, utilizando o cálculo abaixo:

$\sum AGS$ = somatória da $Conc_{AG\ saturados}$ (ácidos graxos sem duplas ligações)

$\sum AGM$ = somatória da $Conc_{AG\ monoinsaturados}$ (ácidos graxos com uma dupla ligação)

$\sum AGP$ = somatória da $Conc_{AG\ polinsaturados}$ (ácidos graxos com mais de um dupla ligação)

Nota: Caso os ácidos graxos *trans* estejam presentes, expressar como:

$\sum AGT$ = somatória da $Conc_{AG\ trans}$

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 996.06). Arlington: A.O.A.C. 16th ed. Chapter 41, p. 18 -18 B. (Supplement March, 1997).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 996.01). Arlington: A.O.A.C. 17th ed., 2000.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemits' Society*. 4th. ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 2-66).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 4th. ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography).

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **IS0 5508**: animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. ISO 5508-1990E - 09-15.

HOLLAND, B. et al. in: **The composition of foods**. Mc cance and Widdowson's 16th ed., Cambridge, UK, 2002. p. 7-10.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemits' Society. 5th. ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1999 (A.O.C.S. Official Method Ce-1f 96).

054/IV Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos – Método 1

Este método refere-se à preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos ésteres de ácidos graxos e glicerol de óleos e gorduras por reação de transesterificação. Os ésteres metílicos obtidos serão posteriormente analisados por cromatografia em fase gasosa. Aplica-se à preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos com 8 ou mais átomos de carbono a partir de óleos e gorduras de origem animal ou vegetal (inclusive os lipídios extraídos dos alimentos). O material insaponificável não é extraído e, se presente em grandes quantidades, poderá interferir na análise. Amostras que apresentem ácidos contendo os seguintes grupos na molécula: epoxi, hidroperóxidos, ciclopropenil e ciclopropil, não poderão ser preparadas por este método, pois poderá ocorrer destruição parcial ou completa de tais grupos.

Material

Bateria de Sebelin, balança analítica, frasco de transesterificação de 200 mL com junta esmerilhada 24/40, pérolas de vidro e pipetas volumétricas de 2 a 5 mL.

Reagentes

Solução saturada de cloreto de sódio
n-Hexano grau cromatográfico

Solução de ácido sulfúrico a 2% (v/v) em metanol grau cromatográfico)

Nota: todos os padrões devem ter pureza superior a 99% e devem ser substituídos a cada seis meses.

Procedimento – Pese cerca de 25 mg da amostra (óleo ou gordura vegetal ou animal) e transfira para o frasco de transesterificação (**Figura 2**). Adicione 3 mL de n-hexano (ou de 2 a 5 mL da solução do padrão interno), 15 mL de solução de ácido sulfúrico a 2% (v/v) em metanol e algumas pérolas de vidro. Aqueça em refluxo durante uma hora. Resfrie e adicione 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Agite por um minuto. Adicione mais solução saturada de cloreto de sódio saturada até que a fase orgânica, onde estão dissolvidos os ésteres metílicos, atinja a parte afunilada do frasco. Espere até que as fases (aquosa e orgânica) se separem nitidamente. Utilize a fase superior para a análise por cromatografia em fase gasosa. Analise os ésteres metílicos o mais rápido possível para evitar a perda dos mais voláteis.

Nota: caso não seja possível a análise imediata daqueles compostos, guarde em geladeira, sob atmosfera de nitrogênio, por no máximo 24 horas. Para estocagem por tempo prolongado, guarde em congelador sob atmosfera de nitrogênio em ampola de vidro selada.

Figura 2 – Frasco de transesterificação

Referências bibliográficas

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and ecommended Practices of the American Oil Chemits' Society. 4th. ed.Champaign, USA, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 2-66).

THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO

15304:2002 (E): animal and vegetables fats and oils – Determination of the content of *trans* fatty acid isomers of vegetables fats and oils – Gas chromatographic method. 2nd. ed. Switzerland, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 266.

BADOLATO, E.S.G.; ALMEIDA, M.E.W. Pesquisa por cromatografia em fase gasosa da adulteração do chocolate. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 37, p. 47-56, 1977.

055/IV Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos – Método 2

Este método refere-se a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos ésteres de ácidos graxos e glicerol de óleos e gorduras, por reação de transesterificação, em meio básico e a frio. Os ésteres metílicos obtidos serão posteriormente analisados por cromatografia em fase gasosa. Este é um método apropriado para a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos com 4 ou mais átomos de carbono, a partir de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal (inclusive os lipídios extraídos dos alimentos), que apresentem índice de acidez em ácido oléico inferior a 4,0. A metodologia é rápida e adequada à preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos mais voláteis, pois a reação ocorre a frio.

Material

Centrífuga ou agitador de tubos tipo vortex, pipeta automática de 20 a 200 µL, balança analítica, tubos de centrífuga de 20 mL com tampa, balão volumétrico de 100 mL e pipetas volumétricas de 2 a 5 mL.

Reagentes

Solução de hidróxido de potássio 2 M em metanol (grau cromatográfico).
Solução saturada de cloreto de sódio.
n-Hexano grau cromatográfico.

Procedimento – Pese cerca de 100 mg da amostra em tubo de centrífuga de 20 mL com tampa. Adicione 2 mL de n-hexano (ou de 2 a 5 mL da solução do padrão interno) e em seguida 0,2 mL de solução metanólica de KOH 2 M. Feche o tubo e agite no vortex (ou centrífuga) por 30 segundos. Adicione 3 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Deixe separar as fases e utilize a fase superior para a análise por cromatografia em fase gasosa. Analise os ésteres metílicos o mais rápido possível, para evitar a perda dos ésteres mais voláteis.

Nota: veja a nota do procedimento **054/IV**

Referências bibliográficas

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemits' Society. 4th. ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ch 1-91).

THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 15304:2002(E): animal and vegetables fats and oils – Determination of the content of *trans* fatty acid isomers of vegetables fats and oils – Gas chromatographic method. 2. ed. Switzerland, 2002.

IUPAC Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivates. Blackwell Scientific Publications 7th Edition (1987); IUPAC Methodot 2:301; Report of IUPAC Working Group WG 2/87.

056/IV Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos – Método 3

Este método refere-se a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos ésteres de ácidos graxos e glicerol de óleos e gorduras, por reação de hidrólise e esterificação. Os ésteres metílicos obtidos serão posteriormente analisados por cromatografia em fase gasosa. Aplica-se à preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos com 8 ou mais átomos de carbono, a partir de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal, inclusive os de origem marinha.

Material

Agitador de tubo tipo vortex, banho-maria, balança analítica, tubos de centrifuga de 30 mL com tampa, balão volumétrico de 100 mL, pipeta automática de 20 a 200 µL e pipetas volumétricas de 2 a 5 mL.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,5 M em metanol (grau cromatográfico)
Solução saturada de cloreto de sódio
n-Hexano grau cromatográfico

Solução esterificante – Pese 10 g de NH_4Cl e adicione 300 mL de metanol seguido de 15 mL de H_2SO_4, adicionado em pequenas porções com agitação.

Procedimento – Pese entre 30 e 100 mg do óleo ou gordura em tubo de centrí-

fuga de 30 mL com tampa. Adicione 3 mL de n-hexano para solubilizar a amostra (ou de 2 a 5 mL da solução de padrão-interno). Adicione 4 mL de solução 0,5 M de NaOH. Feche bem o tubo e aqueça em banho de água com temperatura entre (65 - 70)°C até dissolver os glóbulos de gordura e a solução ficar transparente (3 - 5) min. Esfrie o tubo sob água corrente. Adicione 5 mL da solução esterificante, feche e agite o tubo por 30 segundos. Aqueça em banho de água com temperatura entre 65 e 70°C por 5 min. Esfrie o tubo sob água corrente o mais rápido possível. Adicione 4 mL de solução saturada de NaCl. Agite vigorosamente por 30 segundos em agitador tipo vortex. Adicione 3 mL de n-hexano. Agite vigorosamente por 30 segundos no vortex. Deixe separar as fases e utilize a fase superior para a análise por cromatografia em fase gasosa. Analise os ésteres metílicos o mais rápido possível, para evitar a perda dos mais voláteis.

Nota: veja a nota do procedimento **054/IV**

Referências bibliográficas

THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 15304:2002(E)**: animal and vegetables fats and oils – Determination of the content of trans fatty acid isomers of vegetables fats and oils – Gas chromatographic method. 2. ed., Switzerland, 2002.

HARTMAN. L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Prac**., v. 22, p. 475-476, 1973.

MAIA, E.L.; RODRIGUES-AMAYA, D.B.R. Avaliação de um método simples e econômico para metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 53(1/2), p. 27-35, 1993.

057/IV Pesquisa de compostos voláteis por cromatografia em fase gasosa com detector de massas e técnica de *headspace*

Este método aplica-se a amostras de alimentos, bebidas e águas, que apresentem características sensoriais alteradas (odor). Os compostos voláteis das amostras, extraídos pela técnica de *headspace,* são injetados no cromatógrafo gasoso e seus componentes são separados de acordo com a afinidade destes com a fase estacionária da coluna cromatográfica; posteriormente, os compostos separados são fragmentados por impacto de elétrons, no detector de massas, e os respectivos espectros de massas gerados são comparados com aqueles presentes nas bibliotecas de espectros de massas dos aparelhos ou disponíveis na literatura. As identificações são feitas por similaridade, e, quando disponíveis, padrões de substâncias puras são analisados em paralelo para confirmação dos resultados.

Material

Cromatógrafo gasoso com detector de massas e auto-amostrador de *headspace* acoplado, recravador de tubos, estufa com temperatura controlada (até 150°C) e flaconetes ou *vials* de 20 mL com septo de material inerte (*teflon*).

Procedimento

Preparação da amostra – Transfira uma quantidade da amostra, previamente homogeneizada, para um *vial* de 20 mL, de modo a ocupar aproximadamente 1/3 do seu volume. Lacre o *vial* e adapte ao auto-injetor.

Programação das condições do auto-amostrador – Auto-injetor de *headspace*, temperatura do *vial:* (90-110)°C, temperatura da seringa: (90-10)°C, tempo de aquecimento do *via*l: 15 min, volume injetado: 0,8 mL.

Nota: o volume injetado pode ser diminuído ou aumentado, dependendo da concentração da amostra.

Programação das condições do cromatógrafo – Temperatura da coluna 30°C por 5 min, rampa de aquecimento 5°C até 160°C por 5 min, tempo de equilíbrio para estabilização das condições do aparelho 1 min, temperatura do injetor 230°C, temperatura do detector 240ºC, coluna Carbowax 20 M (ou outra fase própria para análise dos componentes da amostra problema), comprimento da coluna: 30, 50 ou 60 m, diâmetro interno 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm, pressão da coluna 40 kPa, fluxo 0,8 mL/min, velocidade linear: 33,2 m/s, razão de divisão da amostra variável de acordo com a concentração da amostra.

Nota: pode-se utilizar outros tipos de coluna, com diferentes fases estacionárias; porém, as condições analíticas devem ser alteradas de acordo com as especificações das mesmas.

Programação das condições do detector de massas – Intervalo de massa: Razão massa/carga 35 a 350, corte do solvente 0,50 min, início da aquisição 0,60 min, ganho do detector (1,3 - 1,5) kV, energia do filamento 70 eV, forma de aquisição varredura (SCAN) ou monitoramento de um íon (SIM). Este último modo aumenta a sensibilidade da análise.

Análise da Amostra – Injete a amostra de acordo com as condições programadas. O monitor exibirá o cromatograma e os respectivos espectros de massas de cada pico eluído. Após o término da corrida, analise cada pico separadamente e correlacione com o seu espectro de massas. A partir da obtenção de cada espectro de massas, realize a pesquisa individual nas bibliotecas NIST 62 e NIST 12

(ou outras disponíveis). As identificações são feitas por similaridade, baseadas na comparação com os espectros de massas presentes nas bibliotecas citadas.

Notas

Ao invés de se trabalhar com auto-amostrador, é possível, também, fazer a injeção manual. Aqueça a amostra previamente em estufa a 90°C por 15 min, em *vial* lacrado, ou outro frasco de vidro. Injete a fração volátil da amostra, utilizando uma seringa de vidro com capacidade de 2 mL, própria para gases.

É necessário fazer a análise de brancos precedente à da amostra, a fim de se descartar possíveis interferentes.

Em paralelo à analise da amostra, submeta uma amostra-padrão do material em análise às mesmas condições analíticas da amostra, com a finalidade de efetuar a comparação dos resultados de ambas.

Quando disponíveis, injete padrões das substâncias puras encontradas na amostra para confirmação dos resultados.

Referências bibliográficas

AMSTALDEN, L. C.; LEITE, F.; MENEZES, H.C. Identificação de voláteis de café através de cromatografia gasosa de alta resolução/espectrometria de massas empregando um amostrador automático de "headspace". **Ciênc. e Tecn. Aliment.**, Campinas, v. 21(1), p.123-128, 2001.

GOBATO, E.A.A.F.; LANÇAS, F.M. Comparação entre injeção na coluna ("on-column") e "headspace" dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24(2), p. 176-179, 2001.

KOLB. B.; ETTRE, L. S. **Static headspace - gas chromatography theory and practice**. N.Y.: Ed. Wiley-VCH, 1997. 298 p.

WARNER, K.; ELSON, T. AOCS collaborative study on sensory and volatile compound analyses of vegetable oils. **J. Am. Oil Chem. Soc**., v. 73 (2), p. 157-166, 1996.

Colaboradores

Alice Momoyo Sakuma; Carmen Sílvia Kira; Cláudio de Flora; Cristiane Bonaldi Cano; Deise Aparecida Pinatti Marsiglia; Maria de Fátima Henriques Carvalho; Márcia Regina Pennacino do Amaral Mello; Maria Lima Garbelotti; Miriam Solange Fernandes Caruso; Neus Sadocco Pascuet; Odair Zenebon; Regina Sorrentino Minazzi Rodrigues e Sabria Aued Pimentel

CAPÍTULO V

ADITIVOS

V

ADITIVOS

Com o desenvolvimento tecnológico, é grande e variado o número de substâncias químicas empregadas no decorrer de todo o processo de produção de alimentos. Dentre estas substâncias, destacam-se os aditivos, que podem apresentar grandes vantagens para melhorar os alimentos do ponto de vista tecnológico, desde que seu uso seja seguro. Para isto, é necessário verificar se obedecem às normas de identidade e pureza estabelecidas pela *FAO/OMS* ou pelo *Food Chemicals Codex,* exigidos pela legislação brasileira, sendo portanto este controle feito antes da adição ao alimento.

Toda a legislação a respeito de aditivos é positiva e dinâmica, isto é, são agrupadas em listas as substâncias cujo uso é permitido, os alimentos em que podem ser usadas e os limites máximos no produto final, sendo estas listas revisadas e acrescidas com novas substâncias sempre que necessário.

A partir de 1997, houve muitas alterações na legislação de aditivos alimentares, a fim de compatibilizar a legislação nacional com o estabelecido nas resoluções harmonizadas no Mercosul, a começar com a Portaria nº 540 da SVS/MS de 27/10/1997, que aprova o regulamento técnico de aditivos alimentares e os define como "qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se, poderá resultar que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais." Esta Portaria também altera a classificação dos aditivos alimentares, aumentando de 11 para 23 classes funcionais.

A seguir, são comentadas algumas classes de aditivos, cujas definições foram extraídas da Portaria n° 540/97.

Acidulantes/Reguladores de acidez

Substâncias que aumentam a acidez ou conferem um sabor ácido aos alimentos, dentre estas são de maior emprego os ácidos orgânicos, tais como: o ácido cítrico, tartárico, láctico, fumárico e málico; além do ácido fosfórico, que é inorgânico. Estes ácidos também podem ser utilizados como reguladores de acidez, substâncias que alteram ou controlam a acidez ou a alcalinidade dos alimentos.

Antioxidantes

Substâncias que retardam o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos. Geralmente são utilizados os galatos (propila, octila ou duodecila), ácido ascórbico e seus isômeros, butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT), isoladamente ou em mistura, pois apresentam melhores resultados quando juntos (efeito sinérgico).

Aromatizantes

Substâncias o u mistura de substâncias com propriedades aromáticas e/ou sápidas, capazes de conferir ou reforçar o aroma e/ou sabor dos alimentos. Segundo a Resolução RDC n° 2 da ANVISA, de 15 de janeiro de 2007, os aromatizantes apresentam duas classificações: aromas naturais e sintéticos. As misturas de aromas, os aromas de reação ou de transformação e os de fumaça poderão ser considerados naturais ou sintéticos, de acordo com a natureza de suas matérias-primas ou processos de elaboração. Eles podem ser comercializados na forma sólida (pós, granulados ou tabletes), líquida (soluções ou emulsões) ou pastosa. No caso dos aromas em pó, além dos ensaios descritos neste capítulo, determinam-se os resíduos mineral fixo e o insolúvel em HCl (1+9), para se verificar a presença do dióxido de silício (anti-umectante).

Conservadores

Antigamente, os alimentos eram conservados com ácidos, sal, açúcar e fumaça de madeira. Nos dias de hoje, é grande o número de conservadores químicos empregados em alimentos. Tais aditivos impedem ou retardam as alterações dos alimentos provocadas por microorganismos ou enzimas. Entre os de maior emprego estão: dióxido de enxofre, ácido benzóico, ácido sórbico, ácido propiônico, na forma livre, ou de sais de sódio ou potássio e nitritos e nitratos de sódio e de potássio.

Corantes

Substâncias que conferem, intensificam ou restauram a cor de um alimento. Os corantes artificiais são substâncias orgânicas de síntese cuja estrutura molecular difere dos corantes encontrados na natureza. São produtos cuja capacidade de conferir grande intensidade de cor e estabilidade supera a dos corantes naturais. Em 1999, foram introduzidos na legislação brasileira os seguintes corantes artificiais: azul patente, verde sólido e azorrubina, que passam a fazer parte deste capítulo. Apesar das dificuldades encontradas na aplicação dos corantes naturais nos alimentos, devido ao seu baixo poder tintorial, alto custo e instabilidade, atualmente seu emprego vem crescendo de forma significativa no ramo alimentício, pela preocupação dos consumidores com o uso de substâncias artificiais em alimentos.

Edulcorantes

Substâncias diferentes dos açúcares que conferem sabor doce aos alimentos. Seu emprego justifica-se nos produtos destinados a consumidores que necessitam de restrição calórica em suas dietas, bem como para aqueles portadores de diabetes. Atualmente, a técnica mais utilizada para separação, identificação e quantificação dos edulcorantes é a cromatografia líquida de alta eficiência. Os edulcorantes mais empregados hoje em dia são: sacarina, ciclamato, aspartame, acesulfame-K e esteviosídio.

Gomas: são polissacarídios de alto peso molecular e, desde que atendam aos padrões de identidade e pureza exigidos para uso em alimentos, são consideradas GRAS pelo FDA. Devido à sua afinidade pela água, desempenham papel importante na maioria dos alimentos, sendo de amplo uso na indústria, como espessantes, geleificantes, estabilizantes e emulsificantes.

Espessantes

Substâncias que aumentam a viscosidade dos alimentos. Eles são usados para controlar a consistência de alimentos líquidos e semilíquidos.

Geleificantes

Substâncias que conferem textura pela formação de um gel.

Estabilizantes

Substâncias que tornam possível a manutenção de uma dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento.

Emulsificantes

Substâncias que propiciam a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento. Estes podem ser naturais ou sintéticos.

Neste capítulo, são destacados alguns acidulantes, reguladores de acidez, antioxidantes, aromatizantes, conservadores, corantes naturais e artificiais, edulcorantes, espessantes, geleificantes, estabilizantes, emulsionantes; além dos bromatos, cujo uso não é permitido na legislação brasileira, da determinação de teobromina e cafeína em produtos a base de cacau e dos contaminantes arsênio, fluoreto e benzo(a)pireno, um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), formado principalmente em processos de combustão incompleta de matérias orgânicas, que se encontra na natureza como contaminante de solo, ar, água e alimentos.

Como atualmente são permitidos, no Brasil, mais de 300 aditivos, é descrita, a seguir, a análise apenas dos aditivos, puros ou presentes em uma formulação, mais utilizados nos alimentos. Os métodos podem sofrer algumas alterações em função da formulação do produto.

A determinação dos aditivos nos alimentos é tratada nos respectivos capítulos deste livro.

058/IV Acidulantes – Identificação de ácido cítrico, láctico e tartárico por cromatografia em papel.

Os ácidos orgânicos podem ser identificados por cromatografia em papel. Na análise dos ácidos orgânicos, este método permite identificar, simultaneamente, a presença dos ácidos cítrico, tartárico e láctico em amostras de aditivos alimentares.

Material

Balança analítica, papel Whatman nº 1 (20 x 20) cm, balão volumétrico de 100 mL, béquer de 100 mL, cuba cromatográfica com tampa, frasco Erlenmeyer de 300 mL, provetas de 50 e 100 mL e seringas de 5 µL.

Reagentes

Hidróxido de amônio
Álcool
Azul de timol
Ácido clorídrico

Soluções-padrão – Pese 1 g de ácido cítrico, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Repita o mesmo procedimento para os ácidos tartárico e láctico.

Solvente para a fase móvel com revelador – Misture 35 mL de álcool, 13 mL de água e 2 mL de hidróxido de amônio e adicione 50 mg de azul de timol. Se necessário, prepare um volume maior mantendo as mesmas proporções. Guarde em frasco de vidro com tampa.

Procedimento – Em um béquer de 100 mL, dissolva a amostra com pouca água. Aplique, em pontos eqüidistantes e a 2 cm da borda inferior no papel de cromatografia, 5 µL da solução-teste e 5 µL de cada uma das soluções-padrão. Desenvolva o cromatograma, em cuba saturada com a fase móvel contendo revelador, até a frente do solvente atingir dois centímetros antes da borda superior do papel. As manchas amarelas sob o fundo azul do papel indicam a presença dos ácidos. Colocando o papel em atmosfera de vapores de ácido clorídrico, o fundo azul do papel torna-se vermelho. Marque, imediatamente, o contorno das manchas com lápis. A identificação deve ser feita por comparação dos R_f das manchas obtidas com os das soluções-padrão.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 78-79.

059/IV Acidulantes – Identificação de ácido cítrico

Este ensaio permite a identificação do ácido cítrico puro e baseia-se numa reação colorida com piridina e anidrido acético.

Material

Béqueres de 5 e 25 mL, pipetas graduadas de 1, 5 e 20 mL e bastão de vidro.

Reagentes

Piridina
Anidrido acético

Procedimento – Dissolva alguns mg de ácido cítrico em 1 mL de água, transfira para um béquer contendo 15 mL de piridina e agite. Acrescente 5 mL de anidrido acético e agite novamente. A solução deve ficar avermelhada.

Referência bibliográfica

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX.**Food Chemicals Codex.** 4. ed. Washington D. C.: National Academic Press, 1996. p. 753.

060/IV Acidulantes – Quantificação de ácido cítrico

Material

Balança analítica, frascos Erlenmeyer de 125 mL, proveta graduada de 50 mL e bureta de 50 mL.

Reagentes

Solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M

Solução de fenolftaleína 1% m/v – Pese 1 g de fenolftaleína, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com álcool.

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 3 g da amostra e dissolva em 40 mL de água. Adicione algumas gotas de solução de fenolftaleína e titule com NaOH 1 M.

Cálculo

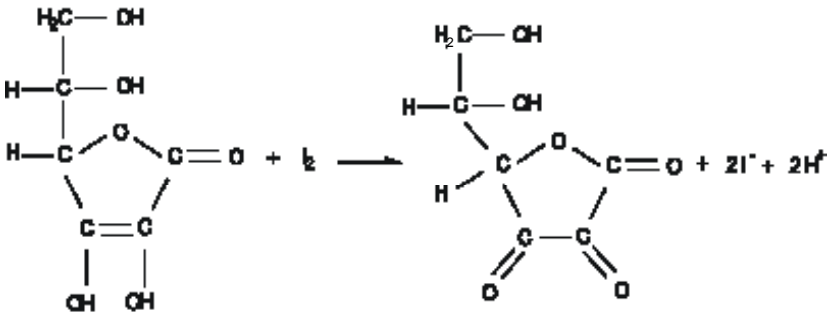
Cada mL de NaOH 1M é equivalente a 64,04 mg de $C_6H_8O_7$.

Referência bibliográfica

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX. **Food Chemicals Codex.** 4. ed. Washington D. C.: National Academic Press, 1996. p. 102 e 753.

061/IV Antioxidantes – Titulação de ácido ascórbico e isômeros com solução de iodo

O ácido ascórbico pode ser adicionado aos alimentos com a função de antioxidante ou melhorador de farinha. Também é empregado nos sais de cura para reduzir a possibilidade de formação de N-nitrosaminas, pela ação bloqueadora na reação de nitrosação de nitrito. Este método é aplicado para misturas de aditivos, desde que não contenham nitrito ou outras substâncias redutoras, pois reagem com o iodo.



Ácido ascórbico Ácido dehidroascórbico

Material

Balança analítica, béquer de 100 mL, balão volumétrico de 100 mL, proveta de 25 mL, bureta de 25 mL e frasco Erlenmeyer de 250 mL.

Reagentes

Solução de ácido sulfúrico M
Solução de iodo 0,05 M
Solução de amido a 1% m/v

Procedimento – Pese uma quantidade de amostra que contenha aproximadamente 0,2 g de ácido ascórbico e dissolva em uma solução de 100 mL de água, recentemente fervida e resfriada, e adicione 25 mL de ácido sulfúrico M. Titule a solução imediatamente com iodo 0,05 M, adicionando amido a 1% próximo ao ponto final da titulação.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 8,806 \times 0,1}{P} = \text{ácido ascórbico ou ácido eritórbico por cento m/m}$$

$$\frac{V \times f \times 9,905 \times 0,1}{P} = \text{ascorbato de sódio por cento m/m}$$

$$\frac{V \times f \times 10,81 \times 0,1}{P} = \text{eritorbato de sódio por cento m/m}$$

V = volume de I_2 0,1 M gasto na titulação
f = fator da solução de I_2 0,1 M
P = massa da amostra em g

Nota: cada mL de iodo 0,1 M é equivalente a 8,806 mg de ácido ascórbico ou ácido eritórbico ($C_6H_8O_6$), 9,905 mg de ascorbato de sódio ($C_6H_7NaO_6$) e 10,81 mg de eritorbato de sódio monohidratado ($C_6H_7NaO_6.H_2O$).

Referência bibliográfica

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX. **Food Chemicals Codex.** 4. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. p. 33,34,134,354 e 362.

062/IV Antioxidantes – Determinação de ácido ascórbico e isômeros pelo método de Tillman's

Este método, aplicado para misturas de aditivos que apresentem baixa concentração de ácido ascórbico e não contenham nitrito em sua formulação, fundamenta-se na redução de 2,6-diclorofenol indofenol por uma solução de ácido ascórbico.

Procedimento – Siga a determinação conforme método **365/IV.**

063/IV Antioxidantes – Titulação de ácido ascórbico e isômeros com solução de iodo na presença de polisorbato 80

O polisorbato 80, componente comum nos produtos para panificação, interfere na determinação do teor de ácido ascórbico pelo método de iodimetria. Assim, quando ambos estiverem presentes, é necessário fazer a extração do polisorbato antes da determinação do ácido ascórbico. Pode-se também dosá-lo diretamente por técnica polarográfica, sem necessidade de extração.

Material

Balança analítica, balança semi-analítica, béquer de 100 mL, provetas de 25 e 50 mL, funil de separação tipo pêra de 250 mL, funil e papel de filtro, bureta de 10 mL e frasco Erlenmeyer de 250 mL.

Reagentes

Solução aquosa de iodo 0,05 M
Cloreto de sódio
Butanol

Solução aquosa de HCl 3 M saturada com NaCl – Adicione NaCl sólido à solução HCl 3 M até haver precipitação, ou, alternativamente, dilua 1:1 uma solução de HCl 6 M com solução aquosa saturada de NaCl.

Procedimento – Pese, com precisão, uma quantidade de amostra que contenha aproximadamente 50 mg de ácido ascórbico. Adicione 2 g de cloreto de sódio e dissolva a mistura em 50 mL de água com agitação. Filtre, se necessário. Transfira o filtrado para um funil de separação. Adicione ao funil 25 mL de HCl 3 M, saturado com NaCl, e 25 mL de butanol. Agite a mistura por 2 minutos, deixe separar as fases, e recolha a camada aquosa inferior, filtrando-a para o frasco Erlenmeyer. Titule com iodo usando amido a 1% como indicador. Cada mL de iodo 0,05 M equivale a 8,806 mg de ácido ascórbico ou de ácido eritórbico, 9,905 mg de ascorbato de sódio e 10,81 mg de eritorbato de sódio monohidratado.

Cálculos

$$\frac{V \times f \times 8,806 \times 0,1}{P} = \text{ácido ascórbico ou ácido eritórbico por cento m/m}$$

$$\frac{V \times f \times 9,905 \times 0,1}{P} = \text{ascorbato de sódio por cento m/m}$$

$$\frac{V \times f \times 10,81 \times 0,1}{P} = \text{eritorbato de sódio por cento m/m}$$

V = mL de iodo 0,2 M gasto na titulação
f = fator da solução de iodo 0,2 M
P = massa da amostra em g

Referência bibliográfica

DESSOUKY, Y. M.; HUSSEIN, F. T.; ISMAEL S. A. Determination of ascorbic acid in the presence of polysorbate 80 **Pharmazie**, v.28 (11-12), p. 791-792. 1973.

064/IV Antioxidantes – Identificação de ácido ascórbico por redução da solução de Fehling

Este método é aplicado para a identificação de ácido ascórbico, ácido eritórbico, ascorbato de sódio e eritorbato de sódio em amostras puras ou em misturas de aditivos que não apresentem outras substâncias redutoras.

Material

Balança analítica, banho-maria, tubo de ensaio, béquer de 10 mL e balão volumétrico de 50 mL.

Reagente

Soluções tituladas A e B de Fehling (**Apêndice I**)

Procedimento – Pese uma quantidade de amostra de maneira que a concentração final de ácido ascórbico esteja em torno de 2%. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Filtre se necessário. Adicione a solução de Fehling.

Na presença de ácido ascórbico, o tartarato cúprico alcalino é reduzido lentamente a 25°C, porém mais rapidamente sob aquecimento.

Referências bibliográficas

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX **Food Chemicals Codex.** 4. ed. Washington D. C.: National Academic Press. 1996. p. 34.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 3. ed. São Paulo: Organização Andrei Editora S.A., 1977. p. 83.

065/IV Antioxidantes – Identificação de ácido ascórbico por redução da solução de Tillmans

Material

Balança analítica, balão volumétrico de 100 mL, tubo de ensaio, béquer de 10 mL e pipetas de 1 e 2 mL.

Reagente

Solução de Tillmans descrita no método **365/IV**.

Procedimento – Pese uma quantidade de amostra de maneira que a concentração final de ácido ascórbico esteja em torno de 1%. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Filtre se necessário. Pipete 2 mL desta solução no tubo de ensaio e adicione 1 mL da solução de Tillmans, que deverá descorar-se imediatamente.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 394-395.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15th, Arlington: A.O.A.C., 1990, chapter 45, p. 1058-1059.

066/IV Antioxidantes – Identificação de ácido ascórbico pela reação com bicarbonato de sódio e sulfato ferroso

Material

Balança analítica, balões volumétricos de 100 e 1000 mL, proveta de 100 mL, tubo de ensaio, béqueres de 10 mL e pipetas graduadas de 5 mL.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Bicarbonato de sódio
Sulfato ferroso
Solução aquosa de ácido sulfúrico a 10% v/v

Procedimento – Pese uma quantidade de amostra de maneira que a concentração final de ácido ascórbico esteja em torno de 1%. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Filtre se necessário. Pipete 4 mL desta solução em um tubo de ensaio. Adicione 0,1 g de bicarbonato de sódio e cerca de 0,02 g de sulfato ferroso. Agite e deixe repousar. A solução deverá produzir coloração violeta-escura que desaparece após a adição de 5 mL de ácido sulfúrico a 10%.

Referências bibliográficas

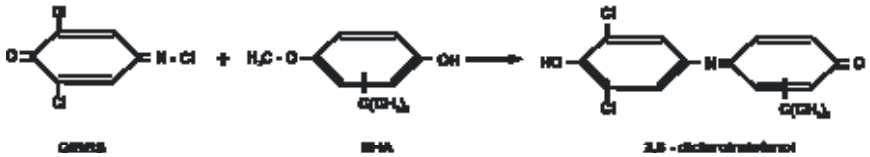
FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2. ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira S.A., 1959. p. 45-46.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei Editora S.A., 1977. p. 82-83.

067/IV Antioxidantes – Determinação de butil-hidroxianisol (BHA)

A solubilidade em álcool a 72% de quase todos os antioxidantes mais comumente utilizados, favorece a análise dos mesmos. Após a extração dos antioxidantes, podem ser feitas provas qualitativas envolvendo reações para a identificação ou cromatografia em camada delgada. O butil-hidroxianisol pode ser identificado em amostras de gorduras ou aditivos formulados contendo este antioxidante após a extração com álcool a 72% e posterior confirmação por meio de reação colorimétrica com 2,6-dicloroquinona cloroimida (reagente de Gibbs) e bórax. A reação do BHA,

após extração com álcool a 72%, com 2,6-dicloroquinonacloroimida em presença de bórax, forma um composto azul cuja concentração é medida porespectrofotometria 620 nm, usando curva-padrão.



Material

Balança analítica, balança semi-analítica, espectrofotômetro UV/VIS, béqueres de (25 e 100) mL, bastão de vidro, funil de separação tipo pêra de 250 mL, provetas graduadas de 25, 50, 100 e 500 mL, balões volumétricos de 100, 200 e 500 mL, pipeta graduada de 2 mL e pipetas volumétricas de (1 a 12) mL.

Reagentes

Éter de petróleo (60-100)°C
Álcool absoluto
Bórax
2,6-Dicloroquinonacloroimida
Padrão analítico de 3-BHA ou uma mistura conhecida dos dois isômeros 3-BHA e 2-BHA

Solução de álcool a 72% v/v – Adicione 360 mL de álcool em um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume com água.

Solução de bórax a 2% m/v – Pese 2 g de bórax – $Na_2B_4O_7.10H_2O$, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução de 2,6-dicloroquinonacloroimida (reagente de Gibbs) – Pese 0,01 g de 2,6-dicloro-quinonacloroimida ($C_6H_2ONCl_3$), transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com álcool absoluto. Prepare a solução no dia do uso.

Procedimento – Dissolva 10 g da amostra em 50 mL de éter de petróleo e transfira quantitativamente para um funil de separação. Adicione 25 mL de álcool a 72% e agite. Separe a camada alcoólica e extraia mais duas vezes com 60 mL de álcool. Reúna os extratos alcoólicos e complete o volume até 200 mL com álcool a 72%. Adicione a uma

alíquota de 12 mL desta solução, 2 mL de uma solução de 2,6-dicloroquinonacloroimida a 0,01% e 2 mL de uma solução de bórax a 2% e agite. Meça a coloração desenvolvida em espectrofotômetro a 620 nm e determine a quantidade de BHA correspondente usando a curva-padrão previamente estabelecida.

Curva-padrão – Pese, com precisão, 0,1 g de BHA e dissolva em álcool a 72%. Transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume. Retire 1 mL desta solução, transfira para outro balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com o mesmo solvente. Tome alíquotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mL desta última solução em béqueres de 25 mL e adicione, respectivamente, 11, 10, 9, 8, 7, 6 e 5 mL de álcool a 72%, totalizando 12 mL em todos eles. Adicione 2 mL de solução de 2,6-dicloroquinonacloroimida a 0,01% em álcool absoluto e 2 mL de solução de bórax a 2%. Homogeneíze. Meça a coloração desenvolvida em espectrofotômetro a 620 nm usando como branco uma mistura constituída de 12 mL de álcool a 72% e os dois reagentes acima mencionados. Construa a curva-padrão.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 85.

JOSEPHY, P.D.; VAN DAMME, A. Reaction of Gibbs reagent with para-substituted phenols. **Anal. Chem**. v. 56, p. 813-814.,1984.

MAHON, J.H.; CHAPMAN, R.Q. Butylated Hydroxianisole in lard and shortening. **Anal. Chem.** v. 23, n.8, p. 1120-1123, 1951.

068/IV Antioxidantes – Identificação de butil-hidroxianisol (BHA)

Basea-se na reação do BHA com 2,6-dicloroquinonacloroimida em presença de bórax, após extração com álcool a 72%, para formar um composto azul.

Material

Balança semi-analítica, béqueres de 25 e 100 mL, balão volumétrico de 100 mL, provetas graduadas de 50 e 100 mL, funil de separação tipo pêra de 250 mL e pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Éter de petróleo (60-100)°C
Álcool
Bórax

2,6-Dicloroquinonacloroimida
Álcool a 72% v/v
Solução de bórax a 2% m/v

Procedimento – Dissolva 20 g da amostra em 50 mL de éter de petróleo. Extraia em funil de separação com três porções de 30 mL de álcool a 72%. Reúna os extratos alcoólicos em balão volumétrico de 100 mL e complete com álcool a 72%. Adicione 1 mL de solução de bórax a 2% e alguns cristais de 2,6-dicloroquinonacloroimida a 5 mL de extrato alcoólico obtido no item anterior. Uma coloração azul indicará a presença de BHA.

Referência bibliográfica

JOSEPHY, P.D.; VAN DAMME, A. Reaction of Gibbs reagent with para-substituted phenols. **Anal. Chem**. v. 56, p. 813-814, 1984.

069/IV Antioxidantes – Determinação de butil hidroxitolueno (BHT)

O princípio deste método baseia-se na reação do BHT, após extração da amostra, com o-dianisidina e nitrito de sódio e na medida espectrofotométrica do composto vermelho-alaranjado formado. O BHT é melhor extraído por destilação com arraste de vapor e o destilado é utilizado na reação colorimétrica.

Material

Balança analítica, balança semi-analítica, espectrofotômetro UV/VIS, manta aquecedora elétrica, regulador de temperatura, suporte, garra, mufa, tubo de látex para condensador, bastão de vidro, funil de separação tipo pêra de 250 mL, provetas graduadas de 50 e 100 mL, condensador tipo reto, com junta esmerilhada 24/40, balões volumétricos de 100 e 250 mL, béqueres de 50, 100 e 250 mL, pipetas graduadas de 2 e 5 mL e pipeta volumétrica de 25 mL.

Reagentes

Clorofórmio
Nitrito de sódio
o-Dianisidina ($C_{14}H_{16}N_2O_2$)
Metanol
Carvão
Ácido clorídrico 1 M
Cloreto de magnésio ($MgCl_2.6H_2O$)
Padrão analítico de BHT

Solução-padrão de BHT a 0,05% m/v – Pese 0,05 g de BHT, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com metanol.

Solução de nitrito de sódio a 0,3% m/v – Pese 0,3 g de nitrito de sódio, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Esta solução é estável, pelo menos, por duas semanas a 4ºC

Solução de o-dianisidina – Pese 250 mg de o-dianisidina ($C_{14}H_{16}N_2O_2$) e dissolva com 50 mL de metanol. Adicione 100 mg de carvão. Agite por cinco minutos e filtre. Adicione a 40 mL do filtrado, 60 mL de ácido clorídrico 1 M. Prepare diariamente, e guarde ao abrigo da luz.

Solução de cloreto de magnésio – Pese 100 g de cloreto de magnésio e dissolva em 50 mL de água.

Procedimento – Monte o aparelho para destilação por arraste de vapor. Pese exatamente 5 g da amostra e transfira para o frasco Erlenmeyer junto com 15 mL da solução de cloreto de magnésio. Adapte as juntas conectoras e destile com arraste de vapor à razão de 4 mL por minuto. Recolha de 100 a 125 mL do destilado em um balão volumétrico de 250 mL, completando o volume com metanol. A uma alíquota de 25 mL, adicione 2 mL da solução de nitrito de sódio e 5 mL da solução de o-dianisidina Após 10 minutos, extraia a fração colorida com 10 mL de clorofórmio. Meça espectrofotometricamente a 520 nm e determine a concentração de BHT, utilizando uma curva de calibração previamente construída.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP 1985. p. 85-86.

070/IV Antioxidantes – Identificação de butil hidroxitolueno (BHT)

Material

Balança semi-analítica, manta aquecedora, regulador de temperatura, suporte, garra e mufa, tubo de látex para condensador, balão de fundo redondo com junta esmerilhada 45/50 e capacidade para 5 L, tubo de vidro de 1,4 m de comprimento e 1,2 cm de diâmetro, juntas conectoras para frasco Erlenmeyer com presilha, frasco Erlenmeyer com junta esmerilhada 29/32 e capacidade 500 mL, condensador tipo reto, com junta esmerilhada 24/40, balão volumétrico de 100 mL, provetas graduadas de (50 e 100) mL, béqueres de (50, 100 e 250) mL e pipetas graduadas de (2 e 5) mL.

Reagentes

Clorofórmio
Nitrito de sódio
o-Dianisidina ($C_{14}H_{16}N_2O_2$)
Metanol
Carvão
Ácido clorídrico
Cloreto de magnésio ($MgCl_2.6H_2O$)
Padrão analítico de BHT
Solução de nitrito de sódio a 0,3% m/v, conforme 069/IV
Solução de o-dianisidina, conforme 069/IV
Solução de cloreto de magnésio, conforme 069/IV

Procedimento – Monte o aparelho para destilação por arraste de vapor. Pese 5 g da amostra, transfira para o frasco Erlenmeyer junto com 15 mL da solução de cloreto de magnésio. Adapte as juntas conectoras e destile com arraste de vapor à razão de 4 mL por minuto. Recolha de 100 a 125 mL do destilado em um béquer de 250 mL. Concentre, em banho-maria, o destilado até 50 mL. A uma alíquota de 25 mL, adicione 5 mL de solução de o-dianisidina e 2 mL de solução de nitrito de sódio. Na presença de BHT, deverá formar uma coloração vermelho-alaranjada em até 10 minutos.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 85-86.

071/IV Antioxidantes – Identificação de galatos

Este ensaio permite a identificação dos galatos em misturas de aditivos e baseia-se na extração dos galatos (propila, octila ou duodecila) com álcool a 72% e reação com hidróxido de amônio .

Material

Balança semi-analítica, béqueres de 10 e 100 mL, proveta graduada de 50 mL, funil de separação de 125 mL, balões volumétricos de 100 e 500 mL e pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Éter de petróleo

Álcool
Hidróxido de amônio

Solução de álcool a 72% v/v – Misture 360 mL de álcool e 140 mL de água.

Procedimento – Dissolva 20 g de amostra em 50 mL de éter de petróleo. Extraia em funil de separação com álcool a 72% (30 mL por três vezes). Reúna os extratos em balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com álcool a 72%. Adicione 0,5 mL de hidróxido de amônio a 5 mL do extrato alcoólico. Uma coloração rósea indicará a presença de galatos.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 82.

072/IV Aromatizantes – Identificação e quantificação

A identificação e a quantificação dos componentes do aroma (aldeídos, ésteres, cetonas, etc.) são efetuadas por cromatografia em fase gasosa, usando detector de ionização de chama (FID).

Material

Balança analítica, cromatógrafo a gás, coluna Carbowax 20 M ou equivalente, detector de ionização de chama (FID), balões volumétricos de 10 mL, pipetas graduadas de 2 mL e microsseringa de 10 μL.

Reagentes

Álcool
Padrões analíticos de aldeídos, ésteres, cetonas, etc.

Solução-padrão – Com auxílio de uma pipeta, pese cerca de 100 mg dos padrões diretamente em balões volumétricos de 10 mL e complete o volume com álcool.

Condições cromatográficas – Temperatura do injetor: 230°C, temperatura do detector: 250°C, programação de aquecimento da coluna: de (70 - 210)°C, 8°C/min, razão de *splitter* 1:100.

Procedimento – Para aromas líquidos, pese diretamente em balão volumétrico de 10 mL, com auxílio de uma pipeta, uma quantidade da amostra de modo que a concentração do

analito estudado seja próxima a do padrão e em torno de 1%. Complete o volume com álcool. Para aromas em pó, pese uma quantidade da amostra cuja concentração do analito estudado seja próxima a do padrão. Transfira, com álcool, para um balão volumétrico de 10 mL e complete o volume. Filtre, se necessário. Injete 1 µL da amostra e dos padrões no cromatógrafo e calcule a porcentagem dos analitos estudados por meio das áreas obtidas nos cromatogramas.

Cálculo

$$\frac{100 \times Cp \times Aa}{Ca \times Ap} = \text{por cento m/m}$$

Cp = concentração do padrão
Ca = concentração da amostra
Ap = área do padrão
Aa = área da amostra

Referências bibliográficas

ARCTANDER, S. **Perfum and flavor chemicals (aroma chemicals)** v. 1-2. New Jersey, U.S.A.: publicado pelo autor, 1969.

Flavor and Fragrance Materials. Wheaton, USA: Allured Publishing Corporation, 1993.

073/IV Aromatizantes – Teor alcoólico a 20°C

A quantificação do teor alcoólico, quando presente, em aromas líquidos é determinado conforme o método **0217/IV**.

074/IV Aromatizantes – Identificação de óleos essenciais

Os óleos essenciais, quando presentes nos aromas, podem ser identificados por cromatografia em camada delgada ou quantificados com o uso do balão volumétrico tipo Cássia. Quando puros, devem ser feitas as seguintes determinações físico-químicas: índice de refração a 20°C, densidade relativa a (20/20)°C e rotação óptica a 20°C. Os valores obtidos são comparados com os da literatura. Os aromas líquidos podem ser analisados diretamente ou após a separação dos óleos essenciais com solução saturada de cloreto de sódio, enquanto que os em pó devem ser previamente extraídos. Para amostras em pó, extraia com uma pequena quantidade de álcool ou éter.

Material

Placas de sílica gel 60 G (20 x 20)cm, estufa, câmara ultravioleta, cuba cromatográfica com tampa, frasco Erlenmeyer de 250 mL e provetas de 10 e 100 mL.

Reagentes

Ciclohexano
Acetato de etila
Ácido acético
Ácido sulfúrico
Padrões analíticos de óleos essenciais

Fase móvel – Ciclohexano-acetato de etila-ácido acético (90:10:1).

Revelador – Solução aquosa de ácido sulfúrico a 10% (v/v).

Procedimento – Sature a cuba de vidro com a mistura de solventes da fase móvel. Coloque, com auxílio de um capilar, a amostra e os padrões em pontos diferentes da placa de sílica gel, preparada para cromatografia ascendente. Deixe secar. Coloque na cuba cromatográfica com o solvente e deixe correr até uns 2 cm da extremidade superior da placa. Retire e deixe secar ao ar. Vaporize com o revelador. Seque em estufa a 105°C por alguns minutos tomando o cuidado de não deixar carbonizar a placa. Compare o cromatograma da amostra com o dos padrões. Antes de revelar a placa, observe o cromatograma sob luz ultravioleta.

075/IV Aromatizantes – Quantificação dos óleos essenciais

Material

Pipeta volumétrica de 10 mLe balão volumétrico tipo Cássia (110 mL de capacidade e gargalo graduado de 10 mL, subdividido em 0,1 mL).

Reagentes

Cloreto de sódio

Solução saturada de cloreto de sódio – Adicione cloreto de sódio em 1000 mL de água até saturar a solução.

Procedimento – Pipete 10 mL da amostra, transfira para um balão volumétrico tipo Cássia e complete o volume com solução saturada de cloreto de sódio.

O volume do óleo essencial separado (obtido na escala graduada do gargalo do balão) corresponde ao teor em porcentagem do óleo na amostra.

076/IV Aromatizantes – Rotação óptica a 20°C

Material

Polarímetro

Procedimento – Transfira a amostra para um tubo de 1 dm de um polarímetro. Ajuste a temperatura da amostra a 20°C. Faça a determinação da rotação óptica com luz monocromática (lâmpada de sódio). Efetue no mínimo 5 leituras e calcule a média aritmética.

Cálculo

$$\frac{100 \times L}{C \times D} = \text{rotação óptica da amostra}$$

L = leitura no polarímetro
C = comprimento do tubo em dm
D = densidade da amostra

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP. 1985. p. 419.

FENAROLI, G. **Sostanze Aromatiche Naturali.** Milano, Italy: Editore Ulrico Hopepli, v. 1:, 1963. 1004 p.

077/IV Aromatizantes – Índice de refração a 20°C

Material

Refratômetro

Procedimento – Faça circular uma corrente de água através do refratômetro de modo a manter a temperatura constante. Esta temperatura não deverá diferir da referência de ± 2°C.

Antes de colocar o óleo essencial no instrumento, o mesmo deve estar à temperatura na qual a medida será efetuada. Coloque 2 gotas da amostra entre os prismas. Feche os prismas, focalize e corrija o índice de refração obtido pela leitura da escala, conforme o cálculo a seguir.

Cálculo

$$N_D^{t'} + 0{,}0004(t' - t) = \text{índice de refração a } 20°C$$

$N_D^{t'}$ = índice de refração à temperatura de trabalho
t' = temperatura de trabalho
t = 20°C

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* São Paulo: IMESP. 3. ed., 1985. p. 420.

FENAROLI, G. **Sostanze Aromatiche Naturali.** Milano, Italy: Editore Ulrico Hopepli, v. 1, 1963. 1004 p.

078/IV Aromatizantes – Densidade relativa a (20/20)°C

Material

Termômetro, picnômetro (ou densímetro digital) e dessecador.

Procedimento – Tare um picnômetro, previamente seco em estufa a 100°C. Encha-o com água, a 20°C e pese. Seque o picnômetro em estufa e coloque nele a amostra, a 20°C e pese.

Cálculo

$$\frac{A}{B} = \text{densidade relativa a } (20/20)°C$$

A = massa do conjunto picnômetro e amostra menos a tara do picnômetro
B = massa do conjunto picnômetro e água menos a tara do picnômetro

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* São Paulo: IMESP. 3. ed., 1985. p. 421.

FENAROLI, G. **Sostanze Aromatiche Naturali.** Milano, Italy: Editore Ulrico Hopepli, v. 1, 1963. 1004 p.

079/IV Aromatizantes – Vanilina e correlatos

Pesquisa em aromas contendo: vanilina, etil vanilina, maltol, etil maltol, heliotropina, cumarina, dihidrocumarina, etc.

Material

Papel Whatman nº 1, (20x20) cm, câmara ultravioleta, cuba cromatográfica com tampa, funil de separação de 250 mL, béqueres de 50 mL, balões volumétricos de 100 mL e microsseringa.

Reagentes

Isobutanol
Hidróxido de amônio
Padrões analíticos de vanilina, etil vanilina, maltol, etil maltol, heliotropina, cumarina, dihidrocumarina

Solução-padrão – Prepare soluções a 1% de vanilina, etil vanilina, maltol, etil maltol, heliotropina, cumarina, dihidrocumarina, em álcool.

Fase móvel – Isobutanol (100 mL) e hidróxido de amônio a 2% (60 mL). Agite em funil de separação. Decante. A camada alcoólica (superior) é utilizada para correr o cromatograma. A camada aquosa (inferior) é utilizada para saturar a câmara.

Procedimento – Coloque a camada alcoólica da fase móvel na cuba cromatográfica. Distribua a camada aquosa da fase móvel em dois béqueres pequenos e coloque-os dentro da cuba, um em cada extremidade. Para amostras em pó, extraia com uma pequena quantidade de álcool ou éter e filtre. As amostras líquidas não necessitam de preparação. Aplique, com auxílio de um capilar, a amostra e os padrões em pontos diferentes do papel Whatman nº 1, preparado para cromatografia ascendente. Deixe secar. Coloque-o na cuba cromatográfica contendo a fase móvel e deixe correr até 2 cm da extremidade superior do papel. Retire e deixe secar ao ar. Observe sob luz ultravioleta e marque as manchas obtidas. Compare com as dos padrões.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* São Paulo: IMESP. 3. ed., 1985. p. 427-428.

080/IV Conservadores – Determinação espectrofotométrica simultânea de nitrito e nitrato

Esse método aplica-se às formulações simples de aditivos contendo nitritos, nitratos e cloreto de sódio. A razão das absorbâncias de uma solução aquosa de nitrito a 355 nm e a 302 nm é 2,5. O nitrato não absorve a 355 nm mas tem uma banda característica a 302 nm. A absorbância do nitrato pode ser calculada dividindo-se a absorbância do nitrito a 355 nm por 2,5 e subtraindo-se o quociente do total da absorbância a 302 nm. Em cubeta de 1 cm, o limite de detecção para nitrito é 0,02 mg/mL e 0,09 mg/mL para nitrato. O pH da solução não deve estar abaixo de 5 (o nitrito forma ácido nitroso, com uma absorbância máxima a 357 nm).

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, béqueres de 25 mL e balões volumétricos de 100 mL.

Reagente

Padrões analíticos de nitrato de sódio e nitrito de sódio

Procedimento – Pese 20 g da amostra, com precisão até mg. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância a 302 ou 355 nm, utilizando água como branco e cubetas de 1 cm. Meça a absorbância da amostra a 302 e 355 nm e calcule como descrito a seguir. Determine o teor de nitrito na amostra utilizando o valor da absorbância a 355 nm e a curva-padrão do nitrito. Para o nitrato, divida o valor desta absorbância por 2,5 e subtraia do valor da absorbância a 302 nm. Calcule a concentração de nitrato na amostra utilizando o valor de absorbância resultante desta subtração e a curva-padrão do nitrato.

Curva-padrão do nitrito – Prepare, em uma série de balões volumétricos de 100 mL, diferentes concentrações de nitrito (0,025 - 0,2)g/100 mL e meça a absorbância destas soluções a 355 nm.

Curva-padrão do nitrato – Prepare, em uma série de balões volumétricos de 100 mL, diferentes concentrações de nitrato (0,1 - 1)g/100 mL e meça a absorbância destas soluções a 302 nm.

Cálculos

1. Em nitrito:

$$\frac{100 \times C}{P} = \text{nitrito, em nitrito de sódio por cento, m/m}$$

C = concentração de nitrito de sódio encontrada na curva-padrão a 355 nm
P = massa da amostra

2. Em nitrato:

$$\frac{100 \times C}{P} = \text{nitrato, em nitrato de sódio por cento, m/m}$$

$$A_{302} - \frac{A_{355}}{2,5} = A_c$$

C = concentração de nitrato de sódio obtido na leitura de A_c na curva-padrão
P = massa da amostra
A_c = absorbância corrigida

Referências bibliográficas

LARA, W.H.; TAKAHASHI, M. Determinação espectofotométrica de nitritos e nitratos em sais de cura. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 52, p. 35-39, 1974.

WETTERS, J.M.; UGLUM, K.L. Direct spectrophotometric simultaneous determination of nitritre and nitrate in the ultraviolet. **Anal. Chem.**, v. 42. p. 355-340, 1970.

081/IV Conservadores – Determinação de nitrato após redução em coluna de cádmio e de nitrito

Este método aplica-se à amostras de aditivos que possuem na sua formulação compostos que interferem na análise direta dos nitritos e nitratos por espectrofotometria no ultravioleta conforme **080/IV**. A análise dos nitritos e nitratos é feita por espectrofotometria no visível, após redução dos nitratos em coluna de cádmio, conforme os métodos **283/IV e 284/IV**.

082/IV Conservadores – Determinação de propionatos

Os sais de cálcio e sódio do ácido propiônico têm ação antimicrobiana, sendo efetivos no controle de bolores em farinhas e certos produtos de confeitaria. Os métodos para a sua determinação envolvem primeiro a extração, que geralmente é feita por destilação por arraste a vapor, seguida da separação e identificação do ácido propiônico junto aos demais ácidos que podem ser co-extraídos. Nesta etapa, pode-se utilizar as técnicas de cromatografia em fase gasosa, em camada delgada ou em papel.

Material

Banho-maria, aparelho completo para destilação por arraste a vapor, pipetas de 1, 2 e 5 mL, frasco Erlenmeyer de 200 mL, papel Whatman nº 1 (20 x 20) cm, microsseringa, vaporizador, pHmetro, béqueres de 100, 200, 400 e 600 mL, provetas de 10, 50, 100 e 500 mL e cuba cromatográfica com tampa.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Ácido fosfotúngstico
Sulfato de magnésio
Hidróxido de sódio
Papel indicador vermelho congo
Hidróxido de amônio
terc-Butanol
n-Butanol
Indicadores vermelho de metila e azul de bromotimol
Formol
Álcool
Ácido propiônico

Solução aquosa de ácido fosfotúngstico a 20% – Em um frasco Erlenmeyer de 200 mL, pese 20 g de ácido fosfotúngstico e dilua com 80 mL de água. Misture bem. Guarde em frasco de vidro com tampa.

Solução-padrão – Neutralize, com hidróxido de sódio 1 M, 1 mL de ácido propiônico e dilua até 100 mL. Use 4 mL desta solução para uma destilação igual à da amostra, recolhendo 200 mL do destilado, neutralizando e secando nas mesmas condições descritas.

Fase móvel – terc-butanol-n-butanol-hidróxido de amônio (1:1:1).

Revelador – Misture 200 mg de vermelho de metila, 200 mg de azul de bromoti-

mol, 100 mL de formol e 400 mL de álcool e ajuste o pH a 5,2 com hidróxido de sódio 0,1 M.

Procedimento – Transfira 20 g da amostra para um frasco de destilação, com auxílio de 50 mL de água. Adicione 10 mL de ácido sulfúrico 0,5 M, agite e adicione 10 mL de ácido fosfotúngstico a 20% e agite novamente, por rotação, o frasco e adicione 40 g de sulfato de magnésio. Agite. A mistura deve ser ácida quando se usa papel vermelho-congo; caso não seja, adicione ácido sulfúrico (1+1). Aqueça o frasco contendo a amostra antes de conectar no aparelho de destilação por arraste a vapor. Destile 200 mL em 35-40 minutos, recolha o destilado em béquer de 400 mL, contendo 2 mL de solução de hidróxido de sódio 1 M. Evapore em banho-maria até secagem. Dissolva o resíduo em 2 mL de água. Deixe saturando na cuba de vidro o solvente: terc-butanol-n-butanol-hidróxido de amônio na proporção (1:1:1). Coloque 2 µL da solução da amostra e do padrão em pontos diferentes do papel Whatman nº 1, preparado para cromatografia ascendente. Deixe secar. Coloque-o na cuba cromatográfica contendo o solvente e deixe correr até aproximadamente 2 cm da extremidade superior do papel (5 horas). Retire e deixe secar ao ar. Vaporize com o revelador. Coloque o papel em atmosfera de amoníaco por alguns instantes. As manchas vermelhas correspondem aos ácidos voláteis. Como não são estáveis, marque logo que apareçam com lápis. Compare as manchas correspondentes à amostra e ao padrão. O mesmo R_f mostrará a presença do propionato na amostra e, se a intensidade da mancha for mais fraca que a do padrão, estará abaixo de 0,2% m/m.

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** 16th, Arlington: A.O.A.C., 1996. chapter 47, p. 19 (method 970.36).

083/IV Conservadores – Identificação de ácido sórbico e sorbatos

O ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio têm ação mais efetiva sobre fermentos e fungos do que em bactérias e agem melhor em meio ácido. Podem ser identificados em formulações de aditivos ou em alimentos após adequada extração. Eles são convertidos em ácido sórbico após acidulação e são extraídos das amostras por destilação com arraste de vapor d'água e posteriormente identificados por cromatografia em papel ou com ácido tiobarbitúrico.

Material

Balança analítica, balança semi-analítica, banho-maria, espectrofotômetro UV/VIS, estufa, manta aquecedora, regulador de temperatura, suporte, garra, mufa, tubo de látex para condensador, béqueres de 100 e 400 mL, balão de fundo redondo com junta esmerilhada 45/50 e com capacidade para 5 L, tubo de vidro de 1,40 m de comprimento e 1,2 cm de diâmetro, juntas conectoras para frasco Erlenmeyer com presilha, frasco Erlenmeyer com junta esmerilhada 29/32 com capacidade para 500 mL, condensador tipo reto com junta esmerilhada 24/40, funil de separação tipo pêra de 250 mL, pipeta graduada de 2 mL, provetas graduadas de 25 e 200 mL, balões volumétricos de 1000, 500 e 100 mL e tubo capilar de vidro.

Reagentes

Cloreto de sódio
Ácido fosfórico
Sulfato de magnésio
Hidróxido de sódio
Éter
Ácido sulfúrico
Ácido sórbico
Propanol
Acetato de etila
Hidróxido de amônio

Solução de ácido sórbico 0,001% m/v – Pese 0,001 g de ácido sórbico ($C_6H_8O_2$) e dissolva em água suficiente para 100 mL em balão volumétrico.

Solução de hidróxido de sódio 1 M – Dissolva 4 g de hidróxido de sódio com água em um béquer de 100 mL, esfrie, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume.

Solução de ácido sulfúrico 0,005 M – Dissolva 0,3 mL de ácido sulfúrico em água, esfrie, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume.
Solução saturada de cloreto de sódio – Adicione cloreto de sódio em 1000 mL de água até saturar a solução.

Procedimento – Monte o aparelho para destilação por arraste de vapor. Pese 5 g da amostra ou meça 5 mL, se a amostra for líquida. Transfira para o frasco Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Acidule com 2 mL de ácido fosfórico. Adicione 7,5 g de sulfato de magnésio. Destile cerca de 350 mL, com arraste de vapor d'água para um béquer de 400 mL contendo 10 mL de hidróxido de sódio 1 M, inclinando o béquer de modo a manter a extremidade do condensador imersa na solução alcalina. Evapore o destilado em banho-maria até reduzir o volume a 100 mL. Esfrie. Transfira para um funil de separação, acidule e extraia com 4 porções de éter. Reúna os extratos e evapore

o éter sem levar à secura. Dissolva o resíduo em 0,5 mL de água. Acidule a solução aquosa com ácido sulfúrico 0,005 M e aplique com capilar em papel cromatográfico Whatman nº 4 ou equivalente, paralelamente com o padrão de ácido sórbico a 0,001%. Coloque em cuba cromatográfica previamente saturada com o solvente propanol-acetato de etila-hidróxido de amônio-água (3:1:1:1) e deixe correr até ± 2 cm da extremidade superior do papel. Retire e seque a 60°C. Observe o cromatograma em câmara com luz ultravioleta (± 255 nm). Compare as manchas da amostra e do padrão.

A identificação do ácido sórbico, após a extração por arraste de vapor, também pode ser realizada como descrito no método colorimétrico **085/IV**, utilizando o ácido tiobarbitúrico.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* São Paulo: IMESP. 3. ed., 1985. p. 103.

084/IV Conservadores – Determinação de ácido sórbico e sorbatos por espectrofotometria no UV

O ácido sórbico e seus sais podem ser quantificados em alimentos ou formulações de aditivos após sua extração. Este método baseia-se na extração do ácido sórbico ou de seus sais, convertidos em ácido sórbico após acidificação, por destilação com arraste de vapor e posterior leitura espectrofotométrica a 254 nm.

Material

Balança analítica, balança semi-analítica, banho-maria, espectrofotômetro UV/VIS, estufa, manta aquecedora, regulador de temperatura, suporte, garra, mufa, tubo de látex para condensador, pHmetro, pipetador automático de 100 a 1000 µL e de 1 a 5 mL com as respectivas ponteiras, papel de filtro qualitativo, béqueres de 25, 100 e 400 mL, balão de fundo redondo com junta esmerilhada 45/50 e com capacidade para 5 L, tubo de vidro de 1,4 m de comprimento e 1,2 cm de diâmetro, juntas conectoras para frasco Erlenmeyer com presilha, frasco Erlenmeyer com junta esmerilhada 29/32 e com capacidade para 500 mL, condensador tipo reto com junta esmerilhada 24/40, pipeta graduada de 2 mL e balões volumétricos de 500 e 1000 mL.

Reagentes

Cloreto de sódio
Ácido fosfórico

Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)
Hidróxido de sódio
Ácido sulfúrico
Ácido sórbico ($C_6H_8O_2$)

Solução de ácido sulfúrico 0,005 M – Dissolva 0,3 mL de ácido sulfúrico em água, esfrie, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume.

Procedimento – Proceda como no método **083/IV**, até: "*inclinando o béquer de modo a manter a extremidade do condensador imersa na solução alcalina*". Dissolva o resíduo da destilação, obtido no item anterior, com água até 500 mL, acidulando com ácido sulfúrico 0,005 M, a fim de obter pH 5,9. Ajuste o zero do espectrofotômetro a 254 nm, utilizando como branco água acidulada com ácido sulfúrico 0,005 M até pH igual a 5,9, em cubeta de 1 cm de caminho óptico. Meça a absorbância da amostra a 254 nm.

Cálculo

Calcule a concentração usando o valor $E^{1\%}_{1cm}$ = 2200, ou uma curva-padrão construída com soluções-padrão de ácido sórbico (ou sorbato de potássio).

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 103.

085/IV Conservadores – Determinação de ácido sórbico por espectrofotometria no visível

Este método baseia-se na extração do ácido sórbico ou de seus sais, convertidos em ácido sórbico, com clorofórmio na reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico e posterior leitura espectrofotométrica a 530 nm.

Material

Balança analítica, banho-maria, espectrofotômetro UV/VIS, suporte, garra, mufa, parafilme, papel de filtro qualitativo, funil de separação, tipo pêra, de 250 mL, balões volumétricos de 25, 50, 100, 200, 250, 500 e 1000 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10, 25 mL, funil para filtração, tubo de ensaio, pipetador automático de 100 a 200 µL e de 1 a 5 mL com as respectivas ponteiras, béqueres de 25, 100 e 400 mL e provetas graduadas de 25, 50 e 200 mL.

Reagentes

Clorofórmio
Sulfato de sódio anidro
Ácido sórbico
Ácido clorídrico
Dicromato de potássio
Bicarbonato de sódio
Ácido sulfúrico

Solução-padrão – Pese, com precisão, cerca de 100 mg de ácido sórbico, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL completando o volume com água . Esta solução tem concentração de 100 µg/mL. Retire 1 mL desta solução e leve para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume. Esta solução tem concentração de 2 µg/mL. Retire 5 mL da solução a 100 µg/mL e leve para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume. Esta solução tem concentração de 5 µg/mL.

Solução de ácido clorídrico (1:1) – Dissolva 25 mL de ácido clorídrico em 25 mL de água.

Solução de bicarbonato de sódio 0,5 M – Dissolva 4,2 g de bicarbonato de sódio em água, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução de dicromato de potássio – Pese 0,49 g de dicromato de potássio e dissolva em balão volumétrico de 1000 mL, com aproximadamente 500 mL de água. Adicione 8 mL de ácido sulfúrico e complete o volume com água.

Solução de ácido tiobarbitúrico a 0,5% m/v – Dissolva 0,5 g de ácido tiobarbitúrico em água, aquecendo em banho-maria para dissolver, esfrie, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume. Prepare na hora de usar.

Procedimento – Pese , com precisão, 5 g da amostra (triture no liqüidificador, se necessário), transfira para um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com água. Filtre se necessário, e pipete 10 mL do filtrado para um funil de separação de 250 mL e extraia, por agitação durante 1 minuto, com duas porções de 40 mL de clorofórmio (pode-se aumentar para 4 extrações de 25 mL, se necessário). Recolha a fase clorofórmica em balão volumétrico de 100 mL ou outro de volume adequado, passando por um funil com sulfato de sódio anidro. Complete o volume com clorofórmio. Pipete 25 mL desta solução para um funil de separação de 250 mL e extraia com 15 mL de solução de bicarbonato de sódio 0,5 M, agitando durante 1 minuto, despreze a fase clorofórmica e transfira quantitativamente a fase aquosa para um balão volumétrico de 25 mL (pode-se aumentar para 4 extrações de 20 mL, se necessário;

nesse caso, receba o extratos em um balão volumétrico de 100 mL). Adicione ácido clorídrico 1:1 cuidadosamente até que a solução fique ácida e complete o volume com água. Pipete 2 mL para um tubo de ensaio contendo 2 mL de solução sulfúrica de dicromato de potássio. Cubra os tubos com parafilme e coloque-os em um banho de água fervente, por 5 minutos. Retire-os e, imediatamente, adicione 2 mL de solução de ácido tiobarbitúrico, cobrindo-os novamente com parafilme. Coloque os tubos de ensaio novamente em um banho de água fervente, durante 10 minutos. Retire os tubos e deixe esfriar. Faça um branco usando 2 mL de água em lugar da amostra. Leia a absorbância a 530 nm e compare com uma curva-padrão obtida nas mesmas condições da análise.

Curva-padrão – Retire com pipetador automático, porções de 0,5; 1; 1,5 e 2 mL da solução-padrão a 2 µg/mL para 4 tubos de ensaio e adicione 1,5; 1; 0,5 e 0 mL de água, respectivamente. Estas soluções contêm 1, 2, 3 e 4 µg de ácido sórbico, pela ordem. Retire, com pipetador automático, porções de 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2 mL da solução a 5 µg/mL para 6 tubos de ensaio e adicione 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0 mL de água respectivamente. Estas soluções contêm 5, 6, 7, 8, 9 e 10 µg de ácido sórbico, pela ordem. Proceda a determinação como descrito acima. Construa o gráfico absorbância x µg ácido sórbico/6 mL solução.

Nota: após a extração do analito, pode-se também fazer a quantificação por meio de leitura direta a 254 nm da solução aquosa final, utilizando como branco uma solução de bicarbonato de sódio. Outro modo de determinar o ácido sórbico seria a extração deste por arraste de vapor (como descrito no método **083/IV**), recolhendo o destilado e levando este a um volume definido, se necessário e proceda a determinação como descrito acima.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 103.

086/IV Corantes artificiais – Identificação por cromatografia em papel

Material

Balança analítica, papel Whatman nº 1, cuba cromatográfica, balão volumétrico de 100 mL e capilares de vidro.

Reagentes

Citrato de sódio
Hidróxido de amônio

n-Butanol
Álcool

Soluções-padrão – Prepare as soluções aquosas de padrões dos corantes a 1% m/v.

Fase móvel (Solvente A) – Pese 2 g de citrato de sódio, transfira para um balão volumétrico de 100 mL, adicione 20 mL de hidróxido de amônio e complete o volume com água.

Fase móvel (Solvente B) – n-butanol-álcool-água-hidróxido de amônio (50:25:25:10).

Procedimento – Prepare soluções aquosas das amostras a 1%. Sobre uma folha de papel Whatman nº 1, a 2 cm da extremidade, em pontos distantes 2 cm uns dos outros, aplique com um tubo capilar as soluções das amostras e dos respectivos padrões dos corantes. Desenvolva o cromatograma com o solvente A ou B. O valor de R_f e a coloração da mancha devem ser idênticos aos do padrão. A visualização da mancha também pode ser feita à luz ultravioleta, onde tem-se melhor nitidez dos contornos e, em certos casos, de algumas manchas que não foram vistas no exame direto.

Nota: os cromatogramas feitos com os solventes A e B não levam sempre ao mesmo resultado. Alguns corantes mudam inteiramente os valores de R_f de um para outro solvente e outros se mostram mais puros em solvente A que em solvente B. O cromatograma com solvente A é o mais usado por ser mais rápido, apesar dos contornos das manchas não serem muito precisos. Outros solventes também podem ser usados como mostra a **Tabela 1**.

Tabela 1 – R_f e absorbância máxima de alguns corantes artificiais permitidos em alimentos

Corante	Classe	R_f no solvente						Abs. Máx.(nm)
		A	B	C	D	E	F	
Bordeaux S ou Amaranto	Azo	0,62	0,27	0,29	0,14	0,19	0,11	520 (em meio ácido)
Eritrosina	Xanteno	0,21	0,52	0,61	1,00	0,58	0,47	525 (em meio ácido)
Amarelo crepúsculo	Azo	0,73	0,72	0,46	0,28	0,45	0,40	480 (em meio ácido)
Tartrazina	Pirazolona	0,91	0,41	0,28	0,12	0,17	0,09	430 (em meio ácido)
Indigotina	Indigóide	0,52	0,27	0,25	0,14	0,20	0,30	285 e 615 (em meio ácido)

A = Hidróxido de amônio-água (1: 99)
B = Cloreto de sódio a 2% em álcool a 50%

C = Isobutanol-álcool-água (1:2:1)
D = n-Butanol-água-ácido acético glacial (20:12:5)
E = Isobutanol-álcool-água (3:2:2) e 1 mL de hidróxido de amônio para 99 mL da mistura anterior
F = Solução de 80 g de fenol em 20 mL de água

Referência bibliográfica

GAUTIER, J.A.; MALANGEAU, P. **Mises au Point de Chimie Analytique Organique – Pharmaceutique et Bromatologique**. 13. ed., Paris: Masson & Cie., 1964. p. 70, 71, 91.

087/IV Corantes artificiais – Identificação por espectrofotometria

Material

Balança analítica, pHmetro, espectrofotômetro UV/VIS, balão volumétrico de 100 mL , pipeta de 1 mL e balão de 2 L.

Reagentes

Ácido acético

Acetato de amônio 0,02 M (pH 5,6) – Pese 3,08 g de acetato de amônio e transfira para balão volumétrico de 2 L, dilua com água, acerte o pH da solução para 5,6 com ácido acético e complete o volume com água.

Procedimento – Pese 0,1 g da amostra e dilua a 100 mL com uma solução de acetato de amônio 0,02 M (pH 5,6). Pipete 1 mL desta solução e dilua a 100 mL com a solução de acetato de amônio 0,02 M. Controle o pH da solução para 5,6. Trace o espectro do corante no intervalo de 200 a 600 nm. Os máximos e mínimos de absorção são bem definidos, podendo variar de 2 a 3 nm. Compare com os espectros obtidos nas mesmas condições para os corantes-padrão.

Referência bibliográfica

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES. **Guide to specifications for general notices, general analytical techniques, identification tests, test solutions and other reference materials.** Rome, 1991. p. 114 (FNP5/rev.2).

088/IV Corantes artificiais – Quantificação por espectrofotometria

Material

Balança analítica, pHmetro, espectrofotômetro UV/VIS, balões volumétricos de 100, 200

e 1000 mL, pipetas volumétricas de 1 e 10 mL e frasco Erlenmeyer de 250 mL.

Reagentes

Ácido acético
Acetato de amônio 0,02 M

Acetato de amônio 0,02M (pH 5,6) – Pese 3,08 g de acetato de amônio e transfira para balão volumétrico de 2 L, dilua com água, acerte o pH da solução para 5,6 com ácido acético e complete o volume com água.

Procedimento – Para os corantes amarelo-crepúsculo, tartrazina, indigotina, bordeaux S, eritrosina, ponceau 4R, vermelho 40 e azorrubina, prepare soluções a 0,001% em acetato de amônio 0,02 M (pH 5,6). Para os corantes azul-brilhante e azul-patente, prepare uma solução a 0,0005% em acetato de amônio 0,02 M (pH 5,6). Para o corante verde-sólido FCF, pese com precisão, de 50 a 75 mg do corante, transfira para um balão volumétrico de 1 L, dissolva e complete o volume com água. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância no comprimento de máxima absorção do corante a ser medido, utilizando a solução de acetato de amônio como branco e cubetas de 1 cm. Meça no comprimento de onda de absorção máxima no visível, indicado na **Tabela 2**, a absorbância das soluções de corantes. Para o corante verde sólido FCF, pipete 10 mL da solução anterior para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de acetato de amônio 0,04 M, misture bem e faça a leitura a 625 nm. Calcule a concentração de cada corante utilizando o valor da absortividade ($E^{1\%}_{1cm}$).

Cálculos

$$\frac{A \times 100}{E^{1\%}_{1cm} \times C} = \text{corante puro \% m/m}$$

A = absorbância da solução da amostra
C = concentração da solução da amostra (g/100 mL)

Para o verde-sólido FCF:

$$\frac{A \times 100}{a \times P} = \text{corante puro \% m/m}$$

A = absorbância da solução da amostra
a = absortividade
P = peso da amostra em g

Tabela 2 - Características espectrofotométricas de alguns corantes

Corantes	INS *	Colour Index	$E^{1\%}_{1cm}$ no máximo do visível	Absorção máxima no visível (nm)
Amarelo-crepúsculo	110	15985	564,1	481
Tartrazina	102	19140	536,6	426
Azul-brilhante	133	42900	1640,0	630
Indigotina	132	73015	449,3	610
Azul-patente V	131	42051	2089	640
Verde-sólido FCF	143	42053	**	625
Bordeaux S ou amaranto	123	16185	436,0	519
Eritrosina	127	45430	1130,0	524
Ponceau 4R ou N cocina	124	16255	442,5	507
Vermelho 40	129	16035	536,0	505
Azorrubina ou carmoisina	122	14720	518,6	515

*Sistema Internacional de Numeração
**Para o verde-sólido FCF, a absortividade é de 0,156 mg/L/cm.

Referências bibliográficas

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX **Food Chemicals Codex.** 4. ed., Washington D. C.: National Academic Press, 1996. p. 142, 773.

GAUTIER, J.A.; MALANGEAU, P. **Mises au Point de Chimie Analytique Organique – Pharmaceutique et Bromatologique**. 13. ed., Paris: Masson & Cie., 1964. p. 70, 71, 91.

089/IV Corantes artificiais – Quantificação por titulação com cloreto de titânio

A porcentagem de corante puro pode muitas vezes ser determinada pela titulação com cloreto de titânio, usando-se uma solução-tampão adequada. Na maioria dos casos, a própria amostra serve como indicador, visto que no ponto final ocorre a descoloração da solução. Se a amostra contiver uma mistura de dois ou três corantes, é necessária uma separação por cromatografia antes de se efetuar a titulação.

Material

Balança analítica, aparelho de Kipp para gerar de CO_2 e H_2, agitador, balão de 2000 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL, provetas de 25 e 50 mL e bureta de 50 mL.

Reagentes

Solução de tricloreto de titânio 0,1 M – Misture 200 mL de solução de tricloreto de titânio comercial a 15% com 150 mL de ácido clorídrico. Ferva a mistura durante 2 minutos e resfrie em água fria. Adicione água até completar 2000 mL. Misture bem e borbulhe CO_2 ou N_2 na solução por uma hora. Antes de padronizar, mantenha a solução sob atmosfera de hidrogênio por pelo menos 16 horas usando um aparelho gerador Kipp.

Padronização da solução de tricloreto de titânio – Transfira 3 g de sulfato duplo de ferro e amônio para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Introduza uma corrente de gás carbônico. Adicione 50 mL de água recentemente fervida e 25 mL de ácido sulfúrico 5 M. Adicione, rapidamente, com auxílio de uma bureta, 30 mL de solução de dicromato de potássio 0,0167 M (não interrompa a corrente de CO_2). Transfira a solução de tricloreto de titânio para uma bureta e coloque rapidamente no frasco Erlenmeyer até pouco acima do ponto de viragem. Adicione rapidamente 5 mL de tiocianato de amônio a 20% e complete a titulação até que desapareça a coloração vermelha e a solução permaneça verde. Efetue uma determinação em branco com 3 g de sulfato duplo de ferro e amônio, utilizando as mesmas quantidades de água, ácido e solução de tiocianato de amônio e passe uma corrente contínua de gás carbônico na solução.

Cálculo

$$\frac{A \times f}{V} = \text{fator da solução de tricloreto de titânio 0,1 M}$$

A = mL da solução de dicromato de potássio 0,0167 M adicionado
f = fator da solução de dicromato de potássio 0,0167 M adicionado
V = mL (corrigido) da solução de tricloreto de titânio gasto na titulação

Procedimento – O aparelho para determinação do teor de corante por titulação com $TiCl_3$ (**Figura 1**) consiste de um frasco de estocagem (A) do titulante $TiCl_3$ mantido sob atmosfera de hidrogênio, produzido por uma aparelho gerador de Kipp, um frasco Erlenmeyer (B), equipado com uma fonte de CO_2 ou N_2, para manter a atmosfera inerte, onde a reação se realizará; um agitador e uma bureta (C). Pese a quantidade da amostra de acordo com a **Tabela 3**. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, com auxílio de 150 mL de água. Adicione 10 g de citrato de sódio ou 15 g de bitartarato de sódio (**Tabela 3**). Titule com a solução-padrão de cloreto de titânio sem interromper a corrente de CO_2 e o aquecimento.

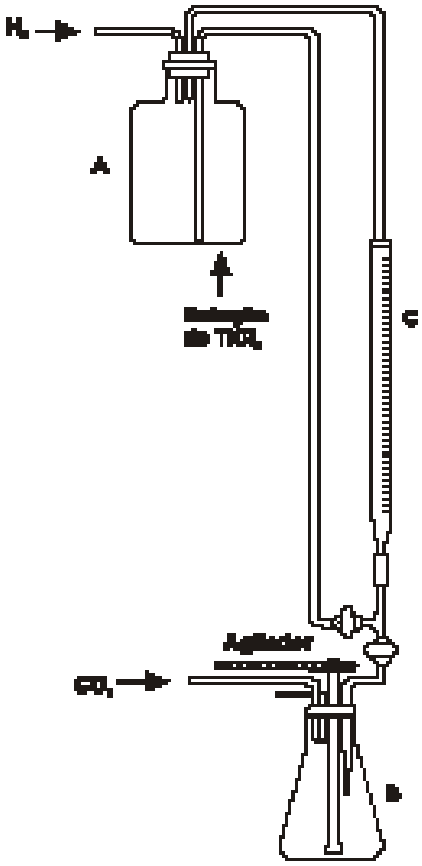


Figura 1 – Aparelho para determinação do teor de corante por titulação com $TiCl_3$

Cálculo

$$\frac{A \times D \times 100 \times f}{P} = \text{corante puro, por cento, m/m}$$

A = mL (corrigido) de solução-padrão de cloreto de titânio gasto na titulação
D = peso (em g) do corante equivalente a 1 mL da solução-padrão de cloreto de titânio 0,1 M (**Tabela 3**)
f = fator da solução-padrão de cloreto de titânio 0,1 M
P = peso da amostra

Tabela 3 - Titulação com cloreto de titânio

Corante	Massa em g da amostra a ser usada na titulação	Adicionar 15 - 10 g *	nº de g do corante equivalente a 1 mL da solução-padrão de $TiCl_3$ 0,1 M
Amarelo-crepúsculo	0,5 – 0,6	Citrato	0,01131
Tartrazina	0,6 – 0,7	Bitartarato	0,01356
Bordeaux S ou amaranto	0,7 – 0,8	Citrato	0,01511
Ponceau 4R	0,7 – 0,8	Citrato	0,01578
Vermelho 40	0,5 – 0,6	Bitartarato	0,01241
Azorrubina	0,5 – 0,6	Bitartarato	0,01256
Azul-brilhante	1,8 – 1,9	Bitartarato	0,03965
Indigotina	1,0 – 1,1	Bitartarato	0,02332
Azul-patente V	1,3 – 1,4	Bitartarato	0,02898
Verde-sólido FCF	1,9 – 2,0	Bitartarato	0,04045

*15 g, se for bitartarato ou 10 g, se for citrato.

Referências bibliográficas

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX **Food Chemicals Codex**. 4th ed., Washington D. C.: National Academic Press, 1996. p. 142, 773-774.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES. **Guide to specifications for general notices, general analytical techniques, identification tests, test solutions and other reference materials.** Rome, 1991. p. 116-118.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Associatio of Official Analytical Chemists**. 16th, Arlington: A.O.A.C., 1996, chapter 46. p. 10, 11 (method 950.61).

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES. Compendium of food addittive specifications. Rome, 1992, p. 37, 71, 176, 219, 639, 783, 1051, 1141, 1463, 1483.

090/IV Corantes artificiais – Determinação de eritrosina por gravimetria

O procedimento gravimétrico simples permite somente a determinação da eritrosina na matéria-prima do corante puro.

Material

Balança analítica, estufa, béquer de 400 mL, pipeta de 5 mL, placa filtrante. provetas de 10 e 50 mL, dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro e bastão de vidro.

Reagentes

Ácido nítrico (1+19)
Ácido nítrico (1+179)

Procedimento – Estabilize a temperatura da estufa para 135°C. Pese 0,25 g da amostra e transfira com auxílio de 100 mL de água para um béquer de 400 mL. Adicione 5 mL de ácido nítrico (1 + 19), agite com um bastão de vidro, filtre em placa filtrante previamente aquecida em estufa a 135°C, resfriada em dessecador e pesada. Lave o béquer e a placa com 50 mL de ácido nítrico (1 + 179) e depois com 10 mL de água, evitando que o precipitado seque. Seque, aqueça em estufa a 135°C, resfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N \times 1{,}074}{P} = \text{corante puro por cento, m/m}$$

N = g da substância precipitada
P = g da amostra

Referência Bibliográfica

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES. **Compendium of Food Additive Specifications**. Rome , 1992. p. 573.

091/IV Corantes artificiais – Determinação de substâncias insolúveis em água

Material

Estufa, balança analítica, béquer de 250 mL, proveta de 200 mL, placa filtrante e dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro.

Procedimento – Estabilize a temperatura da estufa para 135°C. Pese 5 g da amostra, transfira para um béquer de 250 mL, com auxílio de 200 mL de água quente (80-90)°C. Agite para dissolver o corante e deixe esfriar a solução à temperatura ambiente. Filtre a solução através

de uma placa filtrante (porosidade 4), previamente aquecida a 135°C, por 1 hora, resfriada em dessecador e pesada. Lave com água fria até as águas de lavagem se tornarem incolores. Seque o filtro com o resíduo, aqueça em estufa a 135°C, resfrie em dessecador e pese.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{substâncias insolúveis em água por cento m/m}$$

N = nº de g de substâncias insolúveis em água
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES. **Guide to specifications for general notices, general analytical techniques, identifications tests, test solutions and other reference materials.** Rome, 1991. p. 132.

092/IV Corantes artificiais – Determinação de substâncias voláteis a 135°C

Material

Estufa, balança analítica, pesa-filtro com tampa e dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro
Procedimento – Estabilize a temperatura da estufa para 135°C. Pese 5 g da amostra em um pesa-filtro com tampa esmerilhada, previamente aquecido em estufa a 135°C, por 1 hora, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. Aqueça a 135°C, por 12 horas. Resfrie em dessecador até à temperatura ambiente e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{substâncias voláteis a 135° C por cento m/m}$$

N = perda de peso em g
P = nº g da amostra

Referência bibliográfica

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES. **Guide to specifications for general notices, general analytical techniques, identifications tests,**

test solutions and other reference materials. Rome, 1991. p. 131-132.

093/IV Corantes artificiais – Determinação de sulfatos

Material

Mufla, balança analítica, papel de filtro, frasco Erlenmeyer de 250 mL, proveta de 100 mL, balão volumétrico de 200 mL, pipeta de 100 mL, béquer de 600 mL, proveta de 300 mL, pipeta graduada de 20 mL, pipeta graduada de 2 mL e cadinho de porcelana.

Reagentes

Cloreto de sódio isento de sulfatos
Solução saturada de cloreto de sódio
Ácido clorídrico
Solução de cloreto de bário 0,125 M

Procedimento – Estabilize a temperatura da mufla para 500°C. Pese 5 g da amostra e transfira para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, com auxílio de 100 mL de água. Aqueça em banho-maria, adicione 35 g de cloreto de sódio, isento de sulfatos, tampe o frasco Erlenmeyer e agite em intervalos freqüentes, durante 1 hora. Esfrie, transfira com auxílio de solução saturada de cloreto de sódio para um balão volumétrico de 200 mL e complete o volume. Agite, deixe em repouso por algumas horas. Filtre a solução através de papel de filtro seco e transfira 100 mL do filtrado, com auxílio de uma pipeta, para um béquer de 600 mL, dilua até 300 mL com água e acidule com ácido clorídrico, adicionando 1 mL em excesso. Aqueça a solução até ebulição e adicione um excesso de solução de cloreto de bário 0,125 M, gota a gota, com agitação. Deixe repousar a mistura sobre uma placa quente durante 4 horas ou deixe por uma noite à temperatura ambiente. Separe por filtração o sulfato de bário, lave com água quente e calcine o papel de filtro com o resíduo em um cadinho previamente aquecido em mufla a 500°C, resfriado em um dessecador até a temperatura ambiente e pesado. Leve o cadinho com a substância à mufla a 500°C, por uma hora. Resfrie em dessecador e pese.

Cálculo

$$\frac{100 \times N \times 0{,}5069}{g} = \text{sulfatos, em sulfato de sódio, por cento, m/m}$$

N = nº de g de sulfato de bário
S = nº de g da amostra usado na precipitação

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 410.

094/IV Corantes artificiais – Determinação de cloretos

Material

Potenciômetro, eletrodo $Ag^+/AgCl$, balança analítica, béquer de 400 mL, proveta de 200 mL, pipeta graduada de 1 mL e bureta de 25 mL.

Reagentes

Nitrato de prata 0,1 M
Ácido nítrico

Procedimento – Pese 0,5 g da amostra. Transfira para um béquer de 400 mL, com auxílio de 200 mL de água. Adicione 1 mL de ácido nítrico. Titule com solução de nitrato de prata 0,1 M.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0{,}585}{P} = \text{cloretos, em cloreto de sódio, por cento m/m}$$

V = nº de mL de solução de nitrato de prata 0,1 M gasto na titulação
f = fator da solução de nitrato de prata 0,1 M
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES. **Guide to specifications for general notices, general analytical techniques, identifications tests, test solutions and other reference materials.** Rome, 1991. p. 129.

095/IV Corantes artificiais – Determinação de corantes subsidiários

Corantes subsidiários são definidos como aqueles corantes que são os subprodutos do processo de fabricação do corante principal. Qualquer outro corante, que não o principal e seus subsidiários, são considerados adulterantes cuja presença é usualmente detectada em cromatogramas usados para determinar corantes subsidiários. Os corantes subsidiários são separados do corante principal por cromatografia ascendente em papel.

Material

Balança analítica, papel Whatman nº 1, sílica gel, balão volumétrico de 100 mL, cuba cromatográfica e microsseringas de 5 ou 10 µL.

Reagentes

Hidróxido de amônio
Citrato trissódico
n-Butanol
Álcool
2-Butanona
Acetona
Ácido acético glacial
Acetonitrila
Álcool isoamílico
Metil etil cetona

Fases móveis:
1. água-amônia-citrato trissódico (95:5:2)
2. n-butanol-água-álcool-hidróxido de amônio (600:264:135:6)
3. 2-butanona-acetona-água (7:3:3)
4. 2-butanona-acetona-água-hidróxido de amônio (700:300:300:2)
5. 2-butanona-acetona-água-hidróxido de amônio (700:160:300:2)
6. n-butanol-ácido acético glacial-água (4:1:5). Agite por 2 minutos, deixe separar as camadas e use a camada superior como fase móvel
7. acetonitrila-álcool isoamílico-metil etil cetona-água-hidróxido de amônio (50:50:15:10:5)

Procedimento – Prepare soluções aquosas das amostras a 1% m/v. Dilua em água de acordo com o limite legal permitido para cada corante. Sobre uma folha de papel Whatman nº 1 ou sobre a placa de sílica gel no caso do corante verde sólido, aplique, com uma microsseringa, 2 µL das soluções de corantes a 1% e as respectivas soluções diluídas, conforme o limite

legal estabelecido para corantes subsidiários. Desenvolva o cromatograma com o solvente apropriado para cada corante, conforme **Tabela 4**.

Tabela 4 – Altura ou tempo necessário para o desenvolvimento de corantes em respectivas fases móveis

Corante	Fase móvel	Altura ou tempo
Vermelho 40	4	17 cm
Bordeaux S (Amaranto)	3	17 cm
Azul-brilhante	4	20 h
Eritrosina	5	17 cm
Verde-sólido	7	CCD - sílica gel até o topo da placa
Azul-indigotina	3	17 cm
Amarelo-tartrazina	4	12 cm
Amarelo-crepúsculo	4	17 cm
Azorrubina (carmoisina)	4	17 cm
Azul-patente	2	17 cm
Ponceau 4R	3	17 cm

A mancha do corante subsidiário da solução a 1% deve ser menor do que a mancha principal da solução diluída.

Referências bibliográficas

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES. **Guide to specifications for general notices, general analytical techniques, identification tests, test solutions and other reference materials**. Rome, 1991. p.122.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES. **Guide to specifications for general notices, general analytical techniques, identification tests, test solutions and other reference materials** . Rome , 1992. p. 37, 71, 176, 219, 641, 785, 1051, 1141, 1463, 1482.

096/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de amarelo-crepúsculo e bordeaux S

Este método espectrofotométrico é aplicado para determinação das misturas dos corantes artificiais: amarelo-crepúsculo e bordeaux S e baseia-se na aditividade das absorbâncias dos corantes.

Material

Balança analítica, pHmetro, espectrofotômetro UV/VIS, balão volumétrico de 100 mL, balão volumétrico de 2000 mL e pipetas volumétricas.

Reagentes

Ácido acético

Acetato de amônio 0,02 M – Pese 3,08 g de acetato de amônio e transfira para balão volumétrico de 2000 mL, dilua com água, acerte o pH da solução para 5,6 com ácido acético e complete o volume com água.

Procedimento – Pese uma quantidade adequada da amostra e faça as diluições necessárias em acetato de amônio 0,02 M, de forma a obter leitura nos comprimentos de onda desejados. A solução final deverá estar em balão volumétrico de 100 mL. Para amostras contendo amarelo crepúsculo e bordeaux S, faça a leitura em 481 nm e 519 nm (As leituras nestes comprimentos de onda correspondem à absorção do amarelo crepúsculo mais a absorção do bordeaux S).

Tabela 5 – Valores de $E^{1\%}_{1cm}$ dos corantes amarelo-crepúsculo e bordeaux S, nos comprimentos de onda 481 e 519 nm

Corante	λ (nm)	$E^{1\%}_{1cm}$
Amarelo-crepúsculo	481	533,3
Amarelo-crepúsculo	519	325,0
Bordeaux S	481	291,3
Bordeaux S	519	438,2

Cálculo

Utilize o valor de $E^{1\%}_{1cm}$ obtidos para estes corantes nos comprimentos de onda de 481 nm e 519 nm na equação de Lambert-Beer (**Tabela 5**).

$$E^{1\%}_{1cm\ (amar.)} \times C_{amar.} + E^{1\%}_{1cm\ (bord.)} \times C_{bord.} = A_{481}$$
$$533{,}3 \times C_{amar.} + 291{,}3 \times C_{bord.} = A_{481}$$
$$E^{1\%}_{1cm\ (amar.)} \times C_{amar.} + E^{1\%}_{1cm\ (bord.)} \times C_{bord} = A_{519}$$
$$325{,}0 \times C_{amar.} + 438{,}2 \times C_{bord} = A_{519}$$

$$\frac{A_{481} - 533,3 \times C_{ind}}{291,3} = C_{bord}$$

$$\frac{1,50 \times A_{481} - A_{519}}{477,2} = C_{ind}$$

Referência bibliográfica

YABIKU, H. Y.; MARTINS, M. S.; BRUM, A. M. S. Determinação quantitativa de misturas de corantes artificiais. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, ano 6, n. 1, p. 14-19, 1996.

097/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de indigotina e bordeaux S

Procedimento – Para amostras contendo indigotina e bordeaux S, faça as leituras das absorbâncias em 519 nm e 610 nm. (A leitura a 519 nm, corresponderá à absorção do corante indigotina mais a do bordeaux S e a 610 nm somente a do corante indigotina).

Tabela 6 – Valores de $E^{1\%}_{1cm}$ dos corantes bordeaux S e indigotina, nos comprimentos de onda 519 e 610 nm

Corante	λ (nm)	$E^{1\%}_{1cm}$
Bordeaux S	519	438,2
Bordeaux S	610	------
Indigotina	519	060,0
Indigotina	610	447,4

Cálculo

Utilize os valores de $E^{1\%}_{1cm}$ obtidos para estes corantes nos comprimentos de onda de 519 nm e 610 nm na equação de Lambert Beer.

$$\frac{A_{610}}{447,4} = C_{ind}$$

$$\frac{A_{519} - 0,13 \times A_{610}}{438,2} = C_{bord}$$

Referência bibliográfica

YABIKU, H. Y.; MARTINS, M. S.; BRUM, A .M. S. Determinação quantitativa de misturas de corantes artificiais. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, ano 6, n. 1, p. 14-19, 1996.

098/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de tartrazina, bordeaux S e indigotina

Procedimento – Para amostras contendo tartrazina, bordeaux S e indigotina, faça a leitura em 426, 519 e 610 nm. Em 426 nm, ocorre a absorção da tartrazina mais bordeaux S, em 519 nm a absorção do bordeaux mais indigotina e em 610 nm somente a absorção da indigotina.

Tabela 7 – Valores de $E^{1\%}_{1cm}$ dos corantes tartrazina, bordeaux S e indigotina, nos comprimentos de onda 426, 510 e 519 nm

Corante	λ (nm)	$E^{1\%}_{1cm}$
Tartrazina	426	534,1
Tartrazina	519	----
Tartrazina	610	----
Bordeaux S	426	100,0
Bordeaux S	519	438,2
Bordeaux S	610	----
Indigotina	426	----
Indigotina	519	060,0
Indigotina	610	447,4

Cálculo

Utilize os valores de $E^{1\%}_{1cm}$ obtidos para estes corantes nos comprimentos de onda de 426, 519 e 610 nm na equação de Lambert Beer (**Tabela 7**).

$$\frac{A_{426} - 0{,}23 \times A_{519} + 0{,}03 \times A_{610}}{534{,}1} = C_{tar}$$

$$\frac{A_{519} - 0{,}13 \times A_{610}}{438{,}2} = C_{bor}$$

$$\frac{A_{610}}{447{,}4} = C_{ind}$$

Referência bibliográfica

YABIKU, H. Y.; MARTINS, M. S.; BRUM, A. M. S. Determinação quantitativa de misturas de corantes artificiais. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, ano 6, n. 1, p. 14-19, 1996.

099/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de tartrazina, indigotina e azul brilhante

Procedimento – Para misturas contendo tartrazina, indigotina e azul-brilhante, faça as leituras da absorbância em 426, 610 e 630 nm. No comprimento de onda 426 nm, ocorre a absorção dos corantes tartrazina e azul-brilhante, em 610 nm a absorção da indigotina e azul-brilhante e em 630, a da indigotina e do azul-brilhante.

Tabela 8 – Valores de $E^{1\%}_{1cm}$ dos corantes tartrazina, indigotina e azul brilhante, nos comprimentos de onda 426, 610 e 630 nm.

Corante	λ (nm)	$E^{1\%}_{1cm}$
Tartrazina	426	534,1
Tartrazina	610	----
Tartrazina	630	----
Indigotina	426	------
Indigotina	610	447,4
Indigotina	630	357,3
Azul-brilhante	426	062,9
Azul-brilhante	610	1016,8
Azul-brilhante	630	1652,0

Cálculo

Utilize o valor de $E^{1\%}_{1cm}$ obtido para estes corantes nos comprimentos de onda de 426, 610 e 630 nm na equação de Lambert-Beer.

$$\frac{A_{426} - 62,9 \times C_{ind.}}{534,1} = C_{tar}$$

$$\frac{1,62 - A_{610} - A_{630}}{357,3} = C_{ind}$$

$$\frac{A_{610} - 447,4 \times C_{ind.}}{1016,8} = C_{azul}$$

Referência bibliográfica

YABIKU, H. Y.; MARTINS, M. S.; BRUM, A .M. S. Determinação quantitativa de misturas de corantes artificiais. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, ano 6, n. 1, p. 14-19, 1996.

100/IV Corantes artificiais – Determinação quantitativa de misturas de tartrazina e amarelo crepúsculo

Procedimento – Para amostras contendo tatrazina e amarelo-crepúsculo, faça a leitura em 426 e 481 nm, pois nestes comprimentos de onda ocorre a absorção dos dois corantes.

Tabela 9 – Valores de $E^{1\%}_{1cm}$ dos corantes tartrazina e amarelo-crepúsculo, nos comprimentos de onda 426 e 481 nm.

Corante	λ (nm)	$E^{1\%}_{1cm}$
Tartrazina	426	535
Tartrazina	481	170
Amarelo-crepúsculo	426	221
Amarelo-crepúsculo	481	592

Cálculo

Utilize os valores de $E^{1\%}_{1cm}$ obtidos para estes corantes nos comprimentos de onda de 426 e 481 nm na equação de Lambert-Beer.

$$\frac{2,67 \times (A_{426}) \quad A_{481}}{1258} = C_{tar}$$

$$\frac{A_{426} - 535 \times C_{tar}}{221} = C_{am.crep}$$

Referência bibliográfica

TAKAHASHI, M. Y.; YABIKU, H.Y.; MARSIGLIA, D.A.P. Determinação quantitativa de corantes artificiais em alimentos. São Paulo, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 48, p. 7-15, 1988.

101/IV Teobromina e cafeína – Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência

Este método é aplicado para a determinação de teobromina e cafeína em cacau, produtos de chocolate e aromas à base de cacau. A técnica utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência, que separa e quantifica a teobromina e a cafeína. Estes dois alcalóides são separados em uma coluna de fase reversa (C_{18}), eluídos com a fase móvel metanol-ácido acético-água e detectados por absorção na região do ultravioleta a 280 nm.

Material

Balança analítica, centrífuga, tubos de c entrífuga de 50 mL, banho-maria, cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector DAD ou ultravioleta, coluna analítica de octadecilsilano, 8 mm x 10 cm, 5 µm (Lichrospher 100 RP-18 ou equivalente), integrador, papel de filtro, nitrogênio para evaporação do solvente, balões volumétricos de 100, 200 e 1000 mL, funil de vidro, provetas de 50 mL, béqueres de 50 e 250 mL, bastões de vidro, frascos Erlenmeyer de 250 mL, pipetas volumétricas de 5 mL, pedras de ebulição e sistema de filtração de fase móvel (Millipore ou equivalente).

Reagentes

Ácido acético grau CLAE
Metanol grau CLAE
Água ultra-pura
Padrões analíticos de teobromina e cafeína
Éter de petróleo (40-60)°C
Acetato de zinco
Ácido acético 0,1 M
Ferrocianeto de potássio

Solução de Carrez I – Dissolva 219 g de acetato de zinco em aproximadamente 500 mL de água ultra-pura e 30 mL de ácido acético 0,1 M. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Solução de Carrez II – Dissolva 106 g de ferrocianeto de potássio em aproximadamente 500 mL de água ultra-pura, transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Fase móvel – Misture 200 mL de metanol, 790 mL de água e 10 mL de ácido acético. Homogeneíze, filtre através de membranas de 0,45 µm e degaseifique.

Solução-padrão de teobromina (250 µg/mL) – Pese, com precisão, 50 mg de teobromina, dissolva em água e aqueça, se necessário. Transfira a solução para um balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão de trabalho de teobromina – Transfira 5 mL da solução-padrão de teobromina em um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Filtre com filtros de 0,45 µm.

Solução-padrão de cafeína (500 µg/mL) – Pese com precisão, aproximadamente 100 mg de cafeína, dissolva em água. Transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão de trabalho de cafeína – Transfira 5 mL da solução-padrão de cafeína para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Filtre com filtros de 0,45 µm.

Procedimento – Pese, com precisão, em um tubo de centrífuga de 50 mL, cerca de 0,5 g de amostra de cacau ou 1 g, se for aroma à base de cacau, ou 3 g, se forem produtos de chocolate (biscoitos, bolos, sorvetes, bebidas lácteas, alimentos achocolatados, etc). Extraia a gordura adicionando 30 mL de éter de petróleo. Agite por 2 minutos. Centrifugue a 2000 rpm por 10 minutos e decante o solvente. Repita esta extração com mais 30 mL de éter de petróleo. Evapore o solvente residual (pode-se usar uma corrente de nitrogênio ou um banho de água quente dentro de uma capela).Transfira quantitativamente, o resíduo com auxílio de água quente para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo várias pedras de ebulição. Adicione água até um volume aproximado de 50 mL. Aqueça 20 minutos a 100°C. Transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Esfrie e adicione 5 mL de cada uma das soluções de Carrez I e Carrez II, complete o volume com água e homogeneíze. Filtre descartando os primeiros 20 mL. Use o filtrado para a análise cromatográfica, filtrando-o previamente com filtros de 0,45 µm. Ajuste o comprimento de onda do detector para 280 nm , o fluxo da fase móvel para 1 mL/min e a temperatura do forno a 35°C. Injete 20 µL das soluções-padrão de trabalho de teobromina e cafeína no cromatógrafo ajustado às condições experimentais estabelecidas. Efetue a operação em triplicada de cada padrão para verificar a repetitividade. A diferença não deve ser maior que 2%. Injete 20 µL da amostra em triplicata.

Cálculo

Calcule o teor de teobromina e cafeína na amostra analisada por meio das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas.

$$\frac{100 \times C_p \times A_a}{C_a \times A_p} = \text{porcentagem de teobromina, m/m}$$

Cp = concentração do padrão de teobromina
Ca = concentração da amostra
Aa = área do pico da amostra
Ap = área do pico do padrão

$$\frac{100 \times C_p \times A_a}{C_a \times A_p} = \text{porcentagem de cafeína, m/m}$$

Cp = concentração do padrão de cafeína
Ca = concentração da amostra
Aa = área do pico da amostra
Ap = área do pico do padrão

Referência bibliográfica

YABIKU, H. Y.; KIMURA, I. A. Determinação de teobromina e cafeína em cacau e produtos de chocolate por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** 56(1), p. 59-64, 1996.

102/IV Corantes naturais – Identificação de antocianinas de cascas de uva

Dentre os corantes naturais, as antocianinas (ou enocianinas) são obtidas a partir dos extratos de cascas de uva. São solúveis em água e pertencem à classe de compostos contendo uma estrutura básica de 15 átomos de carbono, conhecidos coletivamente como flavonóides. Apresentam-se na forma de líquido, pó ou pasta de cor vermelho-púrpura com odor característico.

Material

Balança analítica, béqueres de 25 mL, proveta graduada de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL.

Reagentes

Hidróxido de sódio

Solução de hidróxido de sódio – Pese 4,3 g de NaOH, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Procedimento – Pese 0,1 g de amostra, adicione 50 mL de água e agite. Filtre, se necessário e adicione solução de hidróxido de sódio. A cor vermelha-púrpura torna-se azul ou verde-escura.

Nota: outra maneira para identificar antocianinas em cascas de uva é o aparecimento de um máximo de absorção a 525 nm, na varredura espectrofotométrica na região do visível de uma solução preparada de acordo com o procedimento **0103/IV.**

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade, 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.612**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

103/IV Corantes naturais – Determinação da intensidade de cor em enocianinas por espectrofotometria

Material

Balança analítica, pHmetro, espectrofotômetro UV/VIS, béqueres de 100 mL, provetas graduadas de 50 e 100 mL, balões volumétricos de 100 e 1000 mL.

Reagentes

Ácido cítrico
Fosfato de sódio dibásico

Solução-tampão de ácido cítrico/fosfato de sódio dibásico, pH 3 – Misture 79,45 mL de ácido cítrico 0,1 M e 20,55 mL de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ajuste o pH a 3 com uma ou outra solução. A solução 0,1 M de ácido cítrico dihidratado contém 21,01 g/L de $C_6H_8O_7.2H_2O$. A solução 0,2 M de fosfato de sódio dibásico contém 28,40 g/L de Na_2HPO_4 ou 35,6 g/L de $Na_2HPO_4.2H_2O$.

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 0,1 g de amostra e adicione a solução-tampão pH 3 até completar 100 mL. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância a 525 nm, utilizando a solução-tampão como branco e cubetas de 1 cm. Meça a absorbância (A) da amostra a 525 nm. Caso a absorbância não esteja entre 0,2 e 0,7, reajuste a massa inicial.

Cálculo

$$\frac{A \times 10}{P} = \text{Intensidade de cor}$$

A = absorbância a 525 nm
P= massa da amostra em g

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.613**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

104/IV Corantes naturais – Identificação de carmim de cochonilha

O corante carmim de cochonilha é a laca de alumínio ou cálcio-alumínio obtido a partir do extrato aquoso dos corpos dessecados das fêmeas de insetos *Dactylopius coccus costa (Coccus cacti L)*. Seu principal constituinte é o ácido carmínico (ácido 7-beta-d-gluco piranosil-3,5,6,8-tetra-hidroxi-1-metil-9,10-dioxo-antraceno-2-carboxílico), o qual pode ser comercializado na forma de solução (corante natural ácido carmínico) ou na forma de laca de alumínio ou cálcio-alumínio (corante natural carmim de cochonilha). O corante carmim de cochonilha apresenta-se na forma de pó friável, de coloração vermelha ou vermelha-escura ou solução de coloração vermelha-violácea. O carmim deve apresentar no mínimo 42% de ácido carmínico, calculado em base seca.

Material

Chapa elétrica, béqueres de 25 mL, balões volumétricos de 100 e 1000 mL, pipeta graduada de 1 mL, funil de separação, pipeta graduada de 5 mL e proveta graduada de 500 mL.

Reagentes

Hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio
Cristais de ditionito de sódio - $Na_2S_2O_4$
Ácido sulfúrico
Ácido clorídrico
Álcool amílico
Éter de petróleo

Acetato de uranila
Solução aquosa de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio a 10%
Solução aquosa de ácido clorídrico a 10% v/v – Dilua 266 mL de HCl com água em um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume.

Solução aquosa de acetato de uranila a 5% m/v – Pese 5 g de acetato de uranila, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Procedimentos

1. Alcalinize levemente uma dispersão aquosa da amostra pela adição de uma gota de solução de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio a 10%. Forma-se uma coloração violeta.

2. A adição de pequena quantidade de cristais de ditionito de sódio às soluções da amostra, em meio ácido, neutro ou alcalino, não descora a solução.

3. Leve à secura, em banho-maria, uma pequena quantidade da amostra em cápsula de porcelana. Esfrie totalmente e trate o resíduo seco com uma ou duas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Não se observa alteração da cor.

4.Transfira uma dispersão aquosa da amostra para um funil de separação, cuja capacidade seja três vezes o volume da dispersão. Adicione 1/3 do volume (correspondente ao da dispersão) de solução de ácido clorídrico a 10% v/v e agite. Adicione álcool amílico de maneira a dobrar o volume do conteúdo do funil de separação e agite. Deixe separar e despreze a fase aquosa (inferior). Lave a fase amílica 2 a 4 vezes com água para eliminar resíduos de ácido clorídrico. Dilua a fase amílica com igual volume de éter de petróleo e agite. Adicione uma pequena quantidade de água (cerca de 1/6 do volume total). Adicione gota a gota solução de acetato de uranila a 5%, agitando após cada adição. Forma-se uma coloração verde-esmeralda característica, na fase inferior.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.616**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

105/IV Corantes naturais – Determinação de ácido carmínico em carmim de cochonilha

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, béqueres de 100 mL, proveta graduada de 100 mL, balões volumétricos de 200 e 500 mL e pipeta volumétrica de 10 mL.

Reagentes

Ácido clorídrico 2 M

Procedimento – Dissolva 100 mg do corante carmim em 30 mL de ácido clorídrico 2 M em ebulição. Resfrie e transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, complete o volume com água e homogeneíze. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância a 494 nm, utilizando uma solução de ácido clorídrico 2 M como branco e cubetas de 1 cm. Meça a absorbância da amostra a 494 nm.

Cálculo

$$\frac{A \times 100}{0{,}139} = \text{ácido carmínico porcento, m/m}$$

A = absorbância da amostra a 494 nm
0,139 = absorbância do ác. carmínico numa solução contendo 100 mg/1000 mL.

Referências bibliográficas

SUBCOMMITTEE ON CODEX SPECIFICATIONS ET AL. S**econd Supplement to the Food Chemicals Codex,** 2nd ed., Washington D. C.: National Academy of Sciences, 1975. p.18-20.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.617**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

106/IV Corantes naturais – Identificação de cúrcuma

A cúrcuma ou açafrão das Índias, é o rizoma da *Cúrcuma longa L*. dessecado e pulverizado. Apresenta coloração amarelo-castanho ou amarelo-castanho-escura e tem como

princípio ativo principal a curcumina (um corante amarelo-alaranjado) cujo teor geralmente varia de 1 a 5% nos produtos vendidos comercialmente.

Material

Placa de toque, pipeta graduada de 5 mL, béquer de 25 mL., banho-maria, papel de filtro, funil de vidro, tubo de ensaio, béquer de 125 mL, proveta graduada de 50 mL e bastão de vidro.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Álcool
Ácido bórico
Ácidos oxálico
Ácido acético

Procedimentos

1. Acidifique levemente a amostra em pó, com ácido sulfúrico: aparece uma coloração vermelha-intensa.
2. A adição de álcool na amostra em pó, extrai o corante amarelo.
3. Extraia algumas gramas da amostra com 20 mL de ácido acético em um béquer de 125 mL. Agite com um bastão de vidro. Filtre para um tubo de ensaio e coloque em banho fervente, por alguns minutos. Uma coloração vermelha indica a presença de cúrcuma.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

TAKAHASHI, M. Y.; INOMATA, E.I.; YABIKU, H. Y.; GIANNATTASIO, C.M.P. Beta-caroteno, urucum e cúrcuma em massas alimentícias vitaminadas com ovos. **Rev. do Inst. Adolfo Lutz**, 50(1/2), p. 257-260, 1990.

107/IV Corantes naturais – Determinação do teor de curcumina na cúrcuma

Material

Balança analítica, chapa elétrica, espectrofotômetro UV/VIS, balão de extração com fundo chato de 100 mL e junta esmerilhada, condensador de bolas de 30 a 40 cm com junta esmerilhada, béquer de 25 mL, balões volumétricos de 100 e 250 mL, pipeta volumétrica de

20 mL e proveta graduada de 50 mL.

Reagente

Álcool

Procedimentos – Pese, com precisão, cerca de 0,1 g de cúrcuma em pó e passe com auxílio de álcool para um frasco de extração. Adicione cerca de 30 mL de álcool e refluxe por duas horas e meia. Esfrie o frasco e filtre quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com álcool. Pipete 20 mL deste extrato para um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com álcool. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância a 425 nm, utilizando álcool como branco e cubetas de 1 cm. Meça a absorbância da amostra a 425 nm.

Cálculo

Calcule o teor de curcumina usando o valor de absortividade $E^{1\%}_{1cm}$ = 1607.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.624**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

108/IV Corantes naturais – Identificação de curcumina

A curcumina em pó é obtida por extração dos rizomas da *Cúrcuma longa L*. com solventes e posterior purificação do extrato por cristalização. Possui coloração de alaranjada à amarela e deve conter no mínimo 90% de pureza. É insolúvel em água e em éter e solúvel em álcool e ácido acético glacial.

Material

Pipetas graduadas de 10 mL, béquer de 25 mL e bastão de vidro.

Reagentes

Álcool

Ácido sulfúrico

Procedimento

Dissolva a amostra em álcool e observe a cor amarela e a fluorescência esverdeada. Adicione ácido sulfúrico e verifique a formação de intensa coloração carmesim.

Referência bibliográfica

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

109/IV Corantes naturais – Identificação de curcumina por cromatografia em camada delgada

Material

Balança analítica, placas de celulose microcristalina de 0,1 mm, câmara ultravioleta, cuba de vidro para cromatografia, provetas graduadas de 100 mL, pipeta graduada de 1 mL e béquer de 5 mL.

Reagentes

Álcool a 95%
3-Metil-1-butanol
Hidróxido de amônio

Fase móvel: 3-metil-1-butanol:álcool:água:hidróxido de amônio (4:4:2:1).

Procedimento – Sature a cuba de vidro com a fase móvel. Pese 0,01 g da amostra e adicione 1 mL de álcool a 95%. Aplique 5 µL da solução da amostra na placa de celulose microcristalina de 0,1 mm. Coloque a placa na cuba de vidro e deixe correr cerca de 15 cm. Examine à luz do dia e sob luz ultravioleta: três manchas amarelas aparecem entre R_f 0,2 e 0,4, à luz do dia e manchas com R_f cerca de 0,6 e 0,8 aparecem sob luz ultravioleta; todas as manchas apresentam distintas fluorescências amarelas sob luz ultravioleta.

Referência bibliográfica

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

110/IV Corantes naturais – Determinação do teor de curcumina

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, balões volumétricos de 100 e 200 mL, pipeta volumétrica de 1 mL, béquer de 10 mL.

Reagente

Álcool

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 0,08 g da amostra, transfira para um balão volumétrico de 200 mL, com auxílio de álcool, agite para dissolver e complete o volume com o mesmo solvente. Pipete 1 mL para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com álcool. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância a 425 nm, utilizando álcool como branco e cubetas de 1 cm. Meça a absorbância da amostra a 425 nm.

Cálculo

Calcule o teor de matéria corante total na amostra, usando o valor de absortividade $E^{1\%}_{1cm}$ = 1607.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.624**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

111/IV Corantes naturais – Identificação de urucum lipossolúvel

Extratos de urucum são os produtos oleosos (urucum lipossolúvel) ou alcalinos (urucum hidrossolúvel) obtidos por remoção da camada externa das sementes da árvore de urucum (*Bixa orellana L*). Também pode-se encontrar o pigmento bruto na forma de pó, de

coloração vermelha-escura, obtido pela extração mecânica das sementes. O extrato de urucum lipossolúvel, de cor vermelha a castanho-avermelhada, contém diversos componentes coloridos, sendo o principal a bixina.

Material

Coluna de vidro de 1 cm de diâmetro e 8 a 10 cm de altura, béqueres de 150 mL, provetas de 10 mL, pipetas de 5 mLe espectrofotômetro UV/VIS.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Ciclohexano
Clorofórmio, desidratado com carbonato de potássio anidro
Alumina para coluna cromatográfica
Tricloreto de antimônio
Sulfato de sódio anidro
Lã de vidro
Reativo de Carr-Price – Pese 25 g de tricloreto de antimônio, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com clorofórmio. Deixe em repouso por um dia, em frasco bem fechado e em geladeira. O frasco não deve ser aberto enquanto a solução estiver gelada.

Procedimento – Dissolva uma quantidade da amostra em ciclohexano de modo a se obter uma coloração semelhante à de uma solução de dicromato de potássio a 0,1%. Prepare uma coluna de 1 cm de diâmetro e 8 a 10 cm de altura com emulsão de alumina em ciclohexano e tampão de lã de vidro na extremidade afilada da coluna de vidro. Escoe lentamente o solvente. Passe pela coluna a solução da amostra obtida anteriormente. Lave 3 vezes com 10 mL de ciclohexano sem deixar secar a coluna. A bixina é fortemente adsorvida pela alumina na parte superior da coluna e forma uma zona vermelho-alaranjada brilhante (o que a diferencia da crocetina). Uma zona de cor amarela-pálida migra através da coluna e é eliminada na lavagem com ciclohexano. Elua a coluna três vezes com 5 mL de clorofórmio. A zona da bixina adsorvida não é eluída em ciclohexano, éter de petróleo, clorofórmio, acetona, álcool e metanol (com os dois últimos solventes, a cor passa à laranja). Quando a última porção for eluída, adicione 1 mL do reativo de Carr-Price. A bixina adsorvida torna-se imediatamente azul-esverdeada, diferente da crocetina que ficaria vermelha.

Notas
O extrato de urucum lipossolúvel é insolúvel em água e pouco solúvel em álcool.
Os extratos de urucum reagem em ácido sulfúrico dando coloração azulada devida à bixina.

O extrato de urucum lipossolúvel diluido com clorofórmio apresenta absorbância máxima a 439, 470 e 501 nm.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.631**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

112/IV Corantes naturais – Determinação do teor de bixina

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, béquer de 25 mL, balões volumétricos de 100 mL, pipeta volumétrica de 10 mL.

Reagente

Clorofórmio

Procedimento – Pese, com precisão, a quantidade de mg da amostra que pode ser encontrada pela fórmula: m = 0,153, dividida pela porcentagem de bixina esperada, transfira para um balão volumétrico de 100 mL com clorofórmio e complete o volume. Transfira 10 mL desta solução para outro balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com clorofórmio. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância, a 470 nm, utilizando clorofórmio como branco e cubetas de 1 cm. Meça a absorbância da amostra a 470 nm.

Cálculo

Calcule o teor de carotenóides totais expresso em bixina usando o valor de absortividade $E^{1\%}_{1cm}$ = 2826.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.632**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

113/IV Corantes naturais – Identificação do urucum hidrossolúvel

O extrato de urucum hidrossolúvel, de coloração castanho-avermelhada a castanho, contém como componente colorido principal a norbixina, produto de hidrólise da bixina, na forma de sal de sódio ou potássio.

Material

Coluna de vidro de 1 cm de diâmetro e 8 a 10 cm de altura, béqueres de 150 mL, provetas de 10 e 100 mL, pipetas de 5 mL, funil de separação de 250 mL, balão volumétrico de 1000 mL e espectrofotômetro UV/VIS.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Ciclohexano
Clorofórmio, desidratado com carbonato de potássio anidro
Alumina para coluna cromatográfica
Tricloreto de antimônio
Sulfato de sódio anidro
Lã de vidro
Ácido sulfúrico 1 M
Reativo de Carr-Price

Procedimento – Transfira 2 mL ou 2 g da amostra para um funil de separação de 250 mL. Adicione ácido sulfúrico 1 M suficiente para se obter uma reação fortemente ácida (a norbixina é separada como precipitado vermelho). Adicione 50 mL de ciclohexano e agite fortemente. Após a separação das fases, descarte a aquosa e lave a fase ciclohexânica com água até eliminação do ácido. Centrifugue a emulsão que se forma, por 10 min, a 2500 rpm. Decante a solução límpida de norbixina e seque sobre sulfato de sódio anidro. Prepare uma coluna de 1 cm de diâmetro e 8 a 10 cm de altura com emulsão de alumina em ciclohexano e tampão de lã de vidro na extremidade afilada da coluna de vidro. Escoe lentamente o solvente. Adicione 3 a 5 mL da solução obtida anteriormente no topo da coluna de alumina e proceda como descrito em **0111/IV**. A norbixina forma uma zona vermelho-alaranjada na superfície da coluna e dá a mesma reação com reativo de Carr-Price da bixina.

Notas
O extrato de urucum hidrossolúvel é pouco solúvel em álcool.
Os extratos de urucum reagem com ácido sulfúrico dando coloração azul-esverdeada devido à norbixina.
O extrato de urucum hidrossolúvel diluído com água apresenta absorbância máxima a 453 e 483 nm.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.634**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

114/IV Corantes naturais – Determinação do teor de norbixina

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, béqueres de 25 mL, balões volumétricos de 100, 500 e 1000 mL e pipeta volumétrica de 1 mL.

Reagentes

Hidróxido de potássio

Solução aquosa de hidróxido de potássio a 0,5% – Pese 5 g de hidróxido de potássio e transfira para um balão volumétrico de 1000 mL.

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 0,1 g do corante em pó, transfira para um balão volumétrico de 500 mL com Hidróxido de potássio 0,5% e complete o volume. Pipete 1 mL desta solução para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume comHidróxido de potássio 0,5%. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância a 453 nm, utilizando a solução de Hidróxido de potássio 0,5% como branco e cubetas de 1 cm. Leia em espectrofotômetro a 453 nm.

Cálculo

Calcule o teor de carotenóides totais expresso em norbixina usando o valor de absortividade $E^{1\%}_{1cm}$ = 3473.

Nota: para expressar o resultado em bixina, deve-se multiplicar o teor de norbixina encontrado pelo fator 1,037.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

YABIKU, H. Y.; TAKAHASHI, M. Y. Determinação de bixina em sementes de urucum: estudo colaborativo. **Rev. do Inst. Adolfo Lutz**, 52(1/2), p. 31-36, 1992.

115/IV Corantes naturais – Identificação de corante caramelo

Este método se aplica à misturas de aditivos e à bebidas.

Material

Balança analítica, béquer de 100 mL, funil, papel de filtro, proveta graduada de 10 mL, proveta graduada de 50 mL com tampa de vidro esmerilhada, tubo de ensaio e pipetas graduadas de 2 e 5 mL.

Reagentes

Óxido de magnésio
Acetato neutro de chumbo
Mistura de álcool butílico-éter de petróleo (1:5)
Resorcina a 5% em ácido clorídrico, preparada no dia do uso

Procedimento – Adicione 1 g de acetato neutro de chumbo e 0,5 g de óxido de magnésio a 50 mL da amostra, evaporando antes o álcool quando for o caso. Agite bem. Filtre, recolha de 30 a 35 mL do filtrado em uma proveta com tampa de vidro esmerilhada. Adicione 10 mL da mistura álcool-éter. Agite com cuidado (abrindo vez por outra o frasco) durante 5 minutos. Deixe em repouso. Retire, com uma pipeta, 5 mL da camada etérea para um tubo de ensaio. Adicione 2 mL de solução de resorcina, de tal modo que escorra pelas paredes do tubo até o fundo. Na presença de caramelo, na zona de contato das duas camadas forma-se um anel vermelho.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1:

Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 114.

116/IV Corante caramelo processo amônio – Determinação da intensidade de cor

O corante caramelo obtido pelo processo amônio é composto por substâncias resultantes do tratamento térmico de carboidratos, em presença de hidróxido de amônio, por tecnologia adequada. Apresenta-se na forma de líquido denso de cor marrom-escura a preta, tendo odor característico de açúcar queimado e sabor amargo. São solúveis em água, soluções diluídas de álcool, ácidos minerais, soluções de hidróxido de sódio e insolúveis em álcool absoluto, acetona, éter de petróleo e clorofórmio. A intensidade de cor é definida como a absorbância de uma solução a 0,1% m/v, a 610 nm em cubeta de 1 cm, calculada sobre o conteúdo de sólidos. Para o corante caramelo processo amônio, esta intensidade de cor deve estar entre 0,08 e 0,36.

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, centrífuga, béquer de 50 mL e balões volumétricos de 100 mL.

Procedimento – Pese 100 mg a amostra em béquer de 50 mL, dissolva em água e transfira para um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume e homogeneíze. Se a solução ficar turva, centrifugue. A solução não pode ser filtrada. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância, a 610 nm, utilizando água como branco e cubetas de 1 cm. Meça a absorbância da solução a 610 nm.

Cálculo

$$\frac{A_{610} \times 100}{\%\ \text{sólidos}} = \text{intensidade de cor}$$

A_{610} = absorbância de solução da amostra a 610 nm.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.660-13.661**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

117/IV Corante caramelo processo amônio – Determinação de sólidos

Material

Estufa a vácuo, mufla, peneiras de malha n° 40 e 60 *mesh*, béquer de 250 mL, cápsula de porcelana.

Reagentes

Ácido clorídrico

Areia pura de quartzo – Utilize areia pura de quartzo que passe através de uma peneira de malha nº 40 *mesh* e fique retida na peneira de nº 60. Esta areia é preparada pela digestão com ácido clorídrico (por exemplo, a 10%) e em seguida lavada até ficar livre de ácido, seca e calcinada em mufla a 600°C por 4 horas.

Procedimento – Misture 30 g de areia preparada com (1,5 - 2,0)g do corante caramelo e seque até peso constante a 60°C sob 50 mm/Hg de pressão. Registre a massa final da areia mais corante caramelo.

Cálculo

$$\frac{(P_f - P_a) \times 100}{P_c} = \text{sólidos por cento, m/m}$$

P_f = massa final da areia + caramelo
P_a = massa da areia
P_c = massa do caramelo

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.660**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

118/IV Corante caramelo processo amônio – Determinação do 4-metilimidazol (MEI)

Material

Estufa, cuba cromatográfica com tampa, placas de vidro para cromatografia (20 x 20)cm, balões volumétricos de 10, 100 e 1000 mL, provetas graduadas de 100 mL, nebulizador, funil de separação de 125 mL, pipetas volumétricas de 5, 25 e 50 mL, béqueres de 10 e 25 mL, lã de vidro e rotavapor.

Reagentes

Sílica gel GF 254
Celite 545
Hidróxido de sódio
Clorofórmio
Álcool
Metanol
Ácido sulfúrico
Bicarbonato de sódio
Éter
Nitrito de sódio
Ácido sulfanílico
Ácido clorídrico
Carbonato de sódio
Padrão analítico de 4-metilimidazol
Ácido sulfúrico 0,025 M
Soluções-padrão – Prepare soluções aquosas de 4-metilimidazol contendo 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 mg/Kg.

Hidróxido de sódio 2 M – Pese 90 g de hidróxido de sódio e transfira para um frasco com rolha de borracha com auxílio de 1000 mL de água isenta de gás carbônico. Adicione, gota a gota, solução saturada de hidróxido de bário até não se formar mais precipitado e agite. Conserve o frasco fechado em repouso durante 12 horas. Decante e transfira o líquido claro para o frasco de polietileno. Conserve protegido contra o gás carbônico do ar.

Solução de bicarbonato de sódio a 8% m/v – Pese 8 g de bicarbonato de sódio, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução de nitrito de sódio a 0,5% m/v – Pese 0,5 g de nitrito de sódio, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Ácido sulfanílico a 0,5% em ácido clorídrico a 2% m/v – Pese 0,5 g de ácido sulfanílico, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com solução aquosa de ácido clorídrico a 2% v/v.

Solução de carbonato de sódio a 20% m/v – Pese 20 g de carbonato de sódio, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Preparação das placas – Prepare placas de vidro com uma mistura de sílica gel GF 254 e duas partes de solução aquosa de bicarbonato de sódio a 8%. Seque as placas ao ar livre e coloque-as em estufa a 120°C, durante 2 horas. Deixe saturando na cuba de vidro com o solvente: éter-clorofórmio-metanol (80:20:20).

Revelador – Misture, imediatamente antes de usar, uma parte da solução de nitrito de sódio a 0,5% e uma parte de solução de ácido sulfanílico a 0,5% em ácido clorídrico a 2%.

Extração em coluna de Celite 545 – Coloque um tampão de lã de vidro no fundo de uma coluna cromatográfica de (25 x 250)mm, com torneira de *teflon*. Sobre a mesma, coloque uma mistura de 3 g de Celite e 2 mL de hidróxido de sódio 2 M. A coluna deve ficar firme e uniformemente compactada. Pese 10 g de corante caramelo num béquer e adicione 6 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20%, misturando bem. Adicione 10 g de Celite, homogeneizando bem. Coloque todo o conteúdo sobre o empacotamento da coluna. Limpe o béquer com um grama de Celite e transfira para a coluna. Coloque um tampão de lã de vidro no topo da mesma. A coluna deve estar firmemente compactada, sem rachaduras. Elua a coluna com uma mistura de clorofórmio-álcool (80:20) v/v, com uma vazão de aproximadamente 5 mL/min até obter 125 mL do eluído. Se necessário, use vácuo nesta operação. Transfira o eluído para um funil de separação de 125 mL e extraia com 25 mL de ácido sulfurico 0,025 M e depois com mais 5 mL. Transfira os extratos obtidos para o frasco de um rotavapor e concentre até 5 mL aproximadamente. Controle a temperatura do banho para que não exceda 55°C. A parte final da concentração deve ser cuidadosamente controlada a fim de que não haja carbonização. Transfira o concentrado para um balão volumétrico de 10 mL, lavando o frasco com várias porções de 1 mL de água e complete o volume. Na hora de aplicar sobre a placa, trate a solução obtida com pequenas porções de carbonato de sódio sólido até que não dê mais efervescência e a solução esteja alcalina (pH 9).

Procedimento – Aplique, sobre a placa, 2 µL das soluções-padrão de 4-metilimidazol contendo 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 mg/kg. Desenvolva o cromatograma com a mistura éter-clorofórmio-metanol (80:20:20) até que o solvente tenha atingido aproximadamente 15 cm. Retire a placa, seque à temperatura ambiente e borrife com o revelador. Compare a intensidade da cor da mancha amarela-alaranjada obtida com as manchas dos padrões de concentração conhecida. As manchas permanecem estáveis por 30 min, clareando em seguida.

Cálculo

Quando o limite de 4-metilimidazol é expresso baseando-se na equivalência de cor, a concentração é primeiramente calculada sobre o conteúdo de sólidos C_s, usando-se a fórmula:

$$\frac{C_1 \times 100}{\%\ \text{sólidos}} = C_s$$

C_1 = quantidade de impureza (MEI) encontrada no produto
C_s = conteúdo de sólidos

A seguir, calcule o teor de 4-metilimidazol baseado na equivalência de cor:

$$\frac{C_s \times 0{,}1}{IC} = \text{teor de 4-metilimidazol}$$

IC = intensidade de cor
C_s = conteúdo de sólidos

O teor de 4-metilimidazol é expresso em termos de um corante caramelo (processos à base de amônio) cuja absorbância é igual a 0,1.

Referências sbibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITTIVES C**ompendium of Food Additive Specifications**. Rome, 1992. p. 346, 349.

119/IV Corante caramelo processo sulfito/amônio – Determinação da intensidade de cor

O corante caramelo processo sulfito/amônio é composto de substâncias obtidas a partir do tratamento térmico de carboidratos, em presença de catalisador químico constituído da mistura de hidróxido de amônio e dióxido de enxofre, por tecnologia adequada. Apresenta-se na forma de pó ou líquido denso de cor marrom-escura a preta, tendo odor característico de açúcar queimado e sabor amargo.Para o corante caramelo processo sulfito-amônio, esta intensidade de cor deve estar entre 0,1 e 0,6.

Procedimento – Siga o mesmo procedimento descrito em **116/IV**.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.660-13.661**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

120/IV Corante caramelo processo sulfito/amônio – Determinação de sólidos

Procedimento – Siga o mesmo procedimento descrito em **117/IV.**

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.660**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

121/IV Corante caramelo processo sulfito/amônio – Determinação do 4-metilimidazol (MEI)

Procedimento – Siga o mesmo procedimento descrito em **0118/IV**.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Compendium of Food Additive Specifications.** Rome, 1992. p. 346, 349.

122/IV Corantes naturais – Identificação de beta-caroteno

Beta-caroteno idêntico ao natural é um carotenóide obtido por síntese química. 0,6 µg de beta-caroteno correspondem a uma unidade internacional de vitamina A. Apresenta-se na forma de pós (cristais vermelhos ou pó cristalino) ou suspensão. Pode ser adicionado de antioxidantes permitidos. Os cristais são insolúveis em água, praticamente insolúveis em álcool e metanol, mas pouco solúveis em óleo vegetal.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, aparelho medidor de ponto de fusão, béqueres de 25 mL

Reagentes

Éter de petróleo
Álcool

Procedimentos

1. O espectro de absorção da solução da amostra, em éter de petróleo, apresenta picos de absorção máximo em 475, 448 e 450 nm. Em álcool, apresenta absorções em 475, 449 e 427 nm.

2. O intervalo de fusão da amostra varia entre (178-184)^{o}C, com decomposição.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.669**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

123/IV Carotenóides lipossolúveis (preparações a 30%) – Determinação do teor de beta-caroteno

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, béquer de 25 mL, balões volumétricos de 100 mL e pipeta volumétrica de 20 mL.

Reagente

Éter de petróleo

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 50 mg da amostra, dissolva em éter de petróleo, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com o mesmo solvente. Transfira uma alíquota de 20 mL para outro balão volumétrico de 100 mL e complete o volume. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância, a

448 nm, utilizando éter de petróleo como branco e cubetas de 1 cm. Meça a absorbância da amostra a 448 nm.

Nota: Os ensaios devem ser feitos com a maior rapidez possível, evitando exposição demasiada ao ar e à luz. Utilize vidraria de baixa permeabilidade aos raios actínicos.

Cálculo

Calcule a porcentagem de beta-caroteno usando $E^{1\%}_{1cm}$ = 2592.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.670**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

124/IV Carotenóides hidromiscíveis (preparações com 10%) – Determinação do teor de beta-caroteno

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, béquer de 50 mL, funil de separação de 250 mL, pipeta volumétrica de 20 mL, balões volumétricos de 100 e 500 mL, provetas de 100 e 200 mL e frasco Erlenmeyer de 250 mL.

Reagentes

Éter de petróleo
Acetona
Sulfato de sódio anidro

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 70 mg de amostra, transfira para um balão volumétrico de 500 mL com auxílio de água, disperse totalmente e complete o volume. Transfira uma alíquota de 20 mL para um funil de separação, adicione 80 mL de acetona e agite por 5 min. Adicione 60 mL de éter de petróleo, seguido de água para auxiliar a transferência do pigmento para a fase de éter. Após a separação das fases, descarte a fase inferior. Lave 3 vezes com aproximadamente 150 mL de água. Recolha em frasco Erlenmeyer contendo sulfato de sódio anidro para retirar gotas de água. Transfira para um balão volumétrico

de 100 mL e complete o volume com éter de petróleo. Ajuste o zero do espectrofotômetro em unidades de absorbância a 448 nm, utilizando éter de petróleo como branco. Meça a absorbância da amostra em cubeta de 1 cm, a 448 nm.
Nota: os ensaios devem ser realizados com a maior rapidez possível, evitando exposição demasiada ao ar e à luz. Utilize vidraria de baixa permeabilidade aos raios actinicos.

Cálculo

Calcule a porcentagem de beta-caroteno usando $E^{1\%}_{1cm}$ = 2592.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, M. Y. (coord.). Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de identidade e qualidade. 2. ed., São Paulo, 1987. 114 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.671**: Coletânea de normas de corantes naturais para fins alimentícios. São Paulo, 1996.

125/IV Edulcorantes – Determinação de acesulfame-K por cromatografia líquida de alta eficiência

Este método é aplicado para a determinação de acesulfame-K em adoçantes.

Material

Balança analítica, cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de ultravioleta, coluna analítica Lichrospher 100 RP-18 (5µm) ou equivalente, integrador, balões volumétricos de 100, 200 e 1000 mL, pipeta de 5 mL, membranas filtrantes descartáveis de 0,45 µm, bomba de vácuo, sistema de filtração da fase móvel e seringa de vidro de 5 mL.

Reagentes

Metanol grau CLAE
Hidrogenosulfato de tetrabutil amônio - $C_{16}H_{37}NO_4S$
Água ultra-pura

Solução–padrão estoque de acesulfame-K – Pese, com precisão, 100 mg de acesulfame-K e transfira para balão volumétrico de 200 mL. Dissolva o acesulfame-K em água e complete o volume.
Solução-padrão de trabalho do acesulfame-K – Pipete 5 mL da solução-estoque para balão

volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Filtre através de membranas filtrantes de 0,45 µm, antes de injetar no cromatógrafo.
Fase móvel: metanol-solução aquosa de hidrogênio sulfato de tetrabutilamônio 0,01M (35:65) – Pese 3,3954 g de hidrogênio sulfato de tetrabutil amônio e transfira para um balão volumétrico de 1000 mL. Misture 650 mL da solução com 350 mL de metanol, homogeneíze, filtre através de membranas de 0,45 µm e degaseifique.

Procedimento – Pese uma quantidade de amostra que contenha aproximadamente 2,5 mg de acesulfame-K. Dissolva em água e transfira para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água. Filtre através de membranas filtrantes de 0,45 µm, antes de injetar no cromatógrafo. Ajuste o comprimento de onda do detector para 227 nm e o fluxo da fase móvel para 0,6 mL/min. Injete 5 µL da solução-padrão de trabalho no cromatógrafo, ajustado às condições experimentais estabelecidas. Efetue a operação em triplicata para verificar a repetitividade. A diferença não deve ser superior a 2%. Injete 5 µL da amostra em triplicata.

Cálculo

Calcule o teor de acesulfame-K na amostra analisada por meio das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas.

$$\frac{100 \times Cp \times Aa}{Ca \times Ap} = \text{acesulfame K por cento, m/m}$$

Cp = concentração do padrão em mg/mL
Ca = concentração da amostra em mg/mL
Aa= área do pico da amostra
Ap =área do pico do padrão

Referência bibliográfica

H.GROPIETSCH and H.HACHENBERG, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 171:41-43, 1980.

126/IV Edulcorantes – Determinação de aspartame por cromatografia líquida de alta eficiência

Este método é aplicado para a determinação de aspartame, em adoçantes e refrigerantes.

Material

Balança analítica, cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector ultravioleta, coluna analítica Lichrospher 100 RP-18 (5 µm) ou equivalente, integrador, balões volumétricos de 100 e 200 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, béquer de 10 mL, provetas de 50 e 100 mL, membranas filtrantes descartáveis de 0,45 µm, bomba de vácuo, pHmetro, sistema de filtração da fase movel e seringa de vidro de 5 mL.

Reagentes

Acetonitrila grau CLAE
Água ultra-pura
Fosfato de potássio monobásico
Ácido fosfórico
Metanol

Solução-estoque de aspartame – Pese, com precisão, aproximadamente 140 mg de aspartame, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e dissolva em metanol ou água com auxílio do ultra-som, e complete o volume com metanol ou água. O padrão deve ser preparado mensalmente.
Solução-padrão de trabalho de aspartame – Pipete 10 mL da solução-estoque e dilua com água para um balão volumétrico de 100 mL. Prepare no dia de uso. Filtre através de membranas filtrantes de 0,45 µm, antes injetar no cromatógrafo.

Fase móvel: tampão fosfato pH 3,5-acetonitrila (9:1) – Pese 3,3913 g de fosfato de potássio monobásico e transfira para balão volumétrico de 2000 mL, dilua em água e acerte o pH para 3,5 com ácido fosfórico, homogeneíze e complete o volume. Misture 1800 mL desta solução-tampão com 200 mL de acetonitrila. Homogeneíze, filtre através de membranas de 0,45 µm e degaseifique.

Procedimento – Ajuste o comprimento de onda do detector para 214 nm e o fluxo da fase móvel para 1,5 mL/min.

Refrigerantes – Degaseifique em ultra-som e passe em membranas filtrantes de 0,45 µm. Dilua, em água se necessário.

Adoçante líquido e em pó – Pese uma quantidade de amostra que contenha aproximadamente 14 mg de aspartame, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Filtre em membranas filtrantes de 0,45 µm. Injete 5 µL da solução–padrão de trabalho no cromatógrafo ajustado às condições experimentais estabelecidas. Efetue a

operação em triplicata para verificar a repetitividade. A diferença não deve ser maior que 2%. Injete 5 µL da amostra em triplicata.

Cálculo

Calcule o teor de edulcorante na amostra analisada por meio das áreas dos picos obtidas nos cromatogramas.

$$\frac{100 \times C_p \times A_a}{C_a \times A_p} = \text{aspartame por cento, m/m}$$

C_p = concentração do padrão em mg/mL
C_a = concentração da amostra em mg/mL
A_a = área do pico da amostra
A_p = área do pico do padrão

Nota: este método também pode ser aplicado para a determinação de ácidos benzóico e sórbico em bebidas, alterando o comprimento de onda para 234 nm e o fluxo para 2,0 mL/min Neste caso, pese 100 mg dos ácidos benzóico e sórbico para o preparo da solução-padrão estoque e pipete 5 mL desta solução para um balão volumétrico de 100 mL e dilua até o volume com água (solução-padrão de trabalho).

Referências bibliográficas

ABREU, R.W.,; OLIVEIRA, I.R.; ZENEBON, O. Quantificação de aspartame por cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) em pós para o preparo de sobremesas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 53(1/2), p. 77-80, 1993.

TYLER, T. A. Liquid Chromatographic Determination of Sodium Saccharin, Caffeine, Aspartame and Sodium Benzoate in Cola Beverages. **J. Assoc. Off. Anal. Chem**. 67(4), p. 745-47, 1984.

127/IV Edulcorantes – Determinação de ciclamatos

Faça a determinação conforme o método **258/IV**.

128/IV Edulcorantes – Determinação de esteviosídeo por cromatografia líquida de alta eficiência

Este método é aplicado para a determinação de esteviosídeo em adoçantes.

Material

Balança analítica, cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de ultravioleta, coluna analítica Lichrospher 100 RP – 18 (5 µm) ou equivalente, integrador, ultra-som, balões volumétricos de 100 e 1000 mL, pipeta de 10 mL, membranas filtrantes descartáveis de 0,45 µm, bomba de vácuo, seringa de vidro de 5 mL e sistema de filtração de fase móvel.

Reagentes

Metanol grau CLAE
Hidróxido de sódio
Água ultra-pura

Solução-padrão estoque de esteviosídio – Pese, com precisão, 200 mg de esteviosídeo e transfira para balão volumétrico de 100 mL. Dissolva em água no ultra-som e complete o volume. Prepare o padrão todo mês.

Solução-padrão de trabalho de esteviosídeo – Pipete 10 mL da solução-estoque para balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Prepare no dia do uso.

Fase móvel: metanol-solução aquosa de hidróxido de sódio 5 mM (65:35) – Pese 0,1125 g de hidróxido de sódio e transfira para balão volumétrico de 500 mL e complete o volume com água. Misture 350 mL desta solução com 650 mL de metanol, homogeneíze, filtre através de membranas de 0,45 µm e degaseifique.

Procedimento – Pese uma quantidade de amostra que contenha, aproximadamente, 20 mg de esteviosídeo. Dissolva em água, transfira para balão volumétrico de 100 mL e complete o volume. Ajuste o comprimento de onda do detector para 210 nm e o fluxo para 1,0 mL/min.Filtre em membranas filtrantes descartáveis de 0,45 µm. Injete 10 µL da solução-padrão de trabalho no cromatógrafo ajustado às condições experimentais estabelecidas. Efetue a operação em triplicata para verificar a repetitividade. A diferença não deve ser maior que 2%. Injete 10 µL da amostra em triplicata.

Cálculo

Calcule o teor de esteviosídeo na amostra analisada por intermédio das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas.

$$\frac{100 \times C_p \times A_a}{C_a \times A_p} = \text{esteviosídio por cento, m/m}$$

C_p = concentração do padrão em mg/mL
C_a = concentração da amostra em mg/mL
A_a = área do pico da amostra
A_p = área do pico do padrão

Referência bibliográfica

ALVAREZ, M.; KUSUMOTO, I.T. Análise quantitativa dos glicosídeos edulcorantes da *Stevia rebaudiana* e dos seus produtos de hidrólise através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC). **Arq. Biol. Tecnol.** 30 (2), p. 337-348, 1987.

129/IV Edulcorantes – Determinação de polióis (manitol e sorbitol) por cromatografia líquida de alta eficiência

Este método é aplicado para a determinação de manitol e sorbitol em adoçantes. Estes edulcorantes são separados em uma coluna de divinil estireno amina, eluídos com água e detectados por diferença dos índices de refração.

Material

Balança analítica, cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de índice de refração, coluna analítica Bio-Rad Aminex HPX-87C – 4,0 x 250 mm ou equivalente, integrador, béquer de 10 mL, balão volumétrico de 50 mL, bastão de vidro, funil de vidro, membranas filtrantes descartáveis de 0,45 µm, bomba de vácuo, sistema de filtração da fase móvel e seringa de vidro de 5 mL.

Reagentes

água ultra-pura

Solução-padrão de trabalho de manitol ou sorbitol – Inicialmente, coloque aproximadamente 300 mg de sorbitol em dessecador com sílica por 24 horas. Utilize um pesa-filtro contendo cloreto de cálcio anidro no interior da balança analítica por 15 minutos antes de pesar o sorbitol. Para o manitol, seque-o a 105°C por 4 horas. Pese, com precisão, em um béquer de 10 mL, 0,24 g de sorbitol ou manitol. Transfira para balão volumétrico de 50 mL, dissolva em água e complete o volume. Filtre através de membranas filtrantes de 0,45 µm, antes de injetar no cromatógrafo.

Fase móvel – Água ultra-pura

Procedimento – Ajuste a temperatura da coluna para 65°C e o fluxo da fase móvel para 0,4

mL/min, estabilize o detector de índice de refração. Pese uma quantidade de amostra que contenha aproximadamente 0,24 g de sorbitol ou de manitol. Dissolva em água e transfira para balão volumétrico de 50 mL, completando o volume. Filtre através de membranas filtrantes de 0,45 µm, antes de injetar no cromatógrafo. Injete 5 µL da solução-padrão de trabalho no cromatógrafo ajustado às condições experimentais estabelecidas. Efetue a operação em triplicata para verificar a repetitividade. A diferença não deve ser maior que 2%. Injete 5 µL da amostra em triplicata.

Cálculo

Calcule o teor de poliol na amostra analisada por meio das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas.

$$\frac{100 \times C_p \times A_a}{C_a \times A_p} = \text{poliol por cento, m/m}$$

C_p = concentração do padrão em mg/mL
C_a = concentração da amostra em mg/mL
A_a = área do pico da amostra
A_p = área do pico do padrão

Referência bibliográfica

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX. **Food Chemicals Codex**. 4. ed., Washington D.C.: National Academic Press, 1996. p. 773-774.

130/IV Edulcorantes – Determinação de sacarina por cromatografia líquida de alta eficiência

Este método é aplicado para a determinação de sacarina em adoçantes.

Material

Balança analítica, cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector ultravioleta, coluna analítica Lichrospher 100 RP-18 (5 µm) ou equivalente, integrador, pipeta volumétrica de 10 mL, béquer de 10 mL, balões volumétricos de 200, 250 e 2000mL , provetas de 50 e 100 mL, membranas filtrantes descartáveis de 0,45 µm, bomba de vácuo, sistema de filtração da fase móvel e seringa de vidro de 5 mL.

Reagentes

Acetonitrila grau CLAE
Água ultra-pura
Fosfato de potássio monobásico
Ácido fosfórico

Solução-padrão estoque de sacarina – Pese, com precisão, 100 mg de sacarina transfira para balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão de trabalho de sacarina – Pipete 4 mL da solução-estoque e dilua com água para balão volumétrico de 200 mL. Filtre através de membranas filtrantes de 0,45 µm, antes de injetar no cromatógrafo.

Fase móvel: tampão fosfato pH 3,5-acetonitrila (9:1) – Pese 3,3913 g de fosfato de potássio monobásico e transfira para balão volumétrico de 2000 mL, dilua em água e acerte o pH para 3,5 com ácido fosfórico, homogeneíze e complete o volume. Misture 1800 mL da solução-tampão com 200 mL de acetonitrila, homogeneíze, filtre através de membranas de 0,45 µm e degaseifique.

Procedimento – Ajuste o comprimento de onda do detector para 214 nm e o fluxo da fase móvel para 0,4 mL/min. Pese uma quantidade de amostra que contenha aproximadamente 1,6 mg de sacarina. Dissolva em água e transfira para balão volumétrico de 200 mL. Filtre em membranas filtrantes de 0,45 µm. Injete 5 µL da solução-padrão de trabalho no cromatógrafo ajustado às condições experimentais estabelecidas. Efetue a operação em triplicata para verificar a repetitividade. A diferença não deve ser maior que 2%. Injete 5 µL da amostra em triplicata.

Cálculo

$$\frac{100 \times C_p \times A_a}{C_a \times A_p} = \text{sacarina por cento, m/m}$$

C_p = concentração do padrão em mg/mL
C_a = concentração da amostra em mg/mL
A_a = área do pico da amostra
A_p = área do pico do padrão

Referência bibliográfica

ABREU, R.W., OLIVEIRA, I.R.; ZENEBON, O. Quantificação de aspartame por cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) em pós para o preparo de sobremesas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 53 (1/2), p. 77-80, 1993.

131/IV Edulcorantes – Determinação de sucralose por cromatografia líquida de alta eficiência

Este método é aplicado para a determinação da sucralose pura e em adoçantes.

Material

Balança analítica, cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de índice de refração, coluna analítica (Lichrospher 100 RP-18 ou equivalente), integrador, membranas filtrantes descartáveis de 0,45 µm de diâmetro de poro ou equivalente, filtros descartáveis de 0,45 µm de diâmetro de poro ou equivalente, bomba de vácuo para filtração da fase móvel, balões volumétricos de 25 e 1000 mL, proveta de 200 mL, seringas de vidro de 5 mL, sistema de filtração de fase móvel (Millipore ou equivalente).

Reagentes

Acetonitrila grau CLAE
Água ultra pura
Padrão analítico de sucralose

Fase móvel – Adicione 150 mL de acetonitrila a 850 mL de água. Homogeneíze, filtre através de membranas de 0,45 µm e degaseifique.

Solução-padrão – Pese, com precisão, 100 mg de sucralose em um balão volumétrico de 100 mL. Dissolva e complete o volume com a fase móvel. Filtre com filtros de 0,45 µm.

Procedimento – Pese uma quantidade da amostra que contenha aproximadamente 100 mg de sucralose. Transfira para balão volumétrico de 100 mL, dissolva e complete o volume com a fase móvel. Filtre com filtros de 0,45 µm. Ajuste o fluxo da fase móvel para que o tempo de retenção da sucralose esteja em torno de 9 minutos (geralmente 1,5 mL/min). Trabalhe em temperatura ambiente. Injete 20 µL do padrão no cromatógrafo ajustado às condições experimentais estabelecidas. Efetue a operação em triplicada para verificar a repetitividade. A diferença não deve ser maior que 2%. Injete 20 µL da amostra em triplicata.

Cálculo

Calcule o teor de edulcorante na amostra analisada por meio das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas.

$$\frac{100 \times C_p \times A_a}{C_a \times A_p} = \text{sucralose por cento, m/m}$$

C_p = concentração do padrão em mg/mL
C_a = concentração da amostra em mg/mL
A_a = área do pico da amostra
A_p = área do pico do padrão

Referência bibliográfica

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX **Food Chemicals Codex**. 4. ed; Washington D. C.: National Academic Press, 1996. p. 398-399.

132/IV Espessantes – Extração de gomas em alimentos

As gomas podem ser identificadas em formulações de aditivos ou em alimentos nos quais é permitido seu uso, com reações características e diferentes reagentes.

Material

Balança semi-analítica, centrífuga, banho-maria, provetas graduadas de 50, 100 e 200 mL, pipeta graduada de 1 mL, béqueres de 100, 250 e 500 mL, balão volumétrico de 100 mL, tubo de centrífuga e vidro de relógio.

Reagentes

Dioxano
Álcool
Éter
Ácido tricloroacético
Cloreto de sódio

Solução de ácido tricloroacético a 50% m/v – Dissolva 50 g de ácido tricloroacético em água suficiente para 100 mL.

Solução aquosa saturada de cloreto de sódio – Utilize o sobrenadante.

Procedimento – Pese 50 g da amostra. Adicione 150 mL de dioxano, coloque em tubo de centrifuga e extraia usando centrifugação a 1800 rpm para separar o solvente. Extraia novamente o resíduo com 30 mL de éter, agitando vigorosamente. Decante o éter. Seque o resíduo em banho-maria. Adicione 50 mL de água a 80°C. Agite vigorosamente a fim de dispersar o resíduo. Adicione 20 mL de ácido tricloroacético a 50%. Agite. Centrifugue a 1200 rpm, durante 10 minutos. Decante a solução através de papel de filtro para outro tubo de centrifugação. Adicione 100 mL de álcool e 1 mL da solução saturada de cloreto de sódio. Deixe em repouso durante a noite. Havendo formação de precipitado, há presença de goma. Decante. Purifique o precipitado dissolvendo novamente em 30 mL de água a 80°C e reprecipite com álcool e solução saturada de cloreto de sódio. Decante, despreze o álcool e redissolva o precipitado em água a 80°C, resfrie, e use esta solução para as reações de identificação.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 121.

133/IV Espessantes – Extração de gomas em formulações de aditivos

Material

Balança semi-analítica, banho-maria, provetas graduadas de 50, 100 e 200 mL, pipeta graduada de 1 mL, béquer de 500 mL e vidro de relógio.

Reagentes

Álcool
Cloreto de sódio
Solução aquosa saturada de cloreto de sódio – Utilize o sobrenadante.

Procedimento – Pese 10 g da amostra, aumentando ou diminuindo essa quantidade se o teor de goma for menor ou maior que 1% e dissolva em 100 mL de água a 80°C em um béquer de 500 mL. Adicione, com agitação, 1 mL de solução saturada de cloreto de sódio e 300 mL de álcool. Se houver precipitação, indica a presença de gomas. Deixe em repouso durante a noite, cobrindo o béquer com vidro de relógio. Decante. Purifique o precipitado redissolvendo em 100 mL de água a 80°C, e reprecipitando com álcool e solução saturada de cloreto de sódio como anteriormente. Decante, despreze a fase alcoólica, redissolva o precipitado em água a 80°C, resfrie, e use esta solução para as reações de identificação.

134/IV Espessantes – Identificação de goma guar

Material

Estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio, pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Solução de bórax a 4% m/v
Solução de ácido tânico a 10% m/m

Procedimentos

1. Em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **0132/IV** ou **0133/IV** ou a 5 mL de uma solução a 0,5 % m/v da goma, adicione 2 mL de solução de bórax. A formação de um gel confirma a presença de goma guar.
2. Adicione 2 mL de solução de ácido tânico a 10% m/v e visualize a formação de um precipitado.

Referências bibliográficas

GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press, 1969. 590 p.

KIMURA, I.A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A.; MICHELATO, S.R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, ano 13, n. 1, p. 21-24, 2003.

135/IV Espessantes – Identificação de goma carragena (musgo irlandês)

Material

Balança semi-analítica, estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio, pipetas graduadas de 1 e 5 mL, balão volumétrico de 100 mL e proveta de 100 mL.

Reagentes

Cloreto de bário
Azul de metileno
Solução aquosa saturada de cloreto de bário – Utilize o sobrenadante.
Solução aquosa de azul de metileno a 0,5% m/v.

Procedimentos

1. Em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **0132/IV** ou **0133/IV** ou a 5 mL de uma solução a 0,5% m/v da goma, adicione 2 mL de solução saturada de cloreto de bário. Há a formação de um precipitado branco gelatinoso.

2. Adicione algumas gotas de azul de metileno a 0,5%.m/v. A precipitação de fibras coloridas de púrpura indica a presença de goma carragena.

Referências bibliográficas

COMMITEE ON CODEX SPECIFICATIONS. **Food Chemicals Codex.** 3. ed; Washington D.C.: National Academic Press, 1981. p. 74.
GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press. 1969. 590 p.

KIMURA, I.A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A.; MICHELATO, S.R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, ano 13, n. 1, p. 21-24, 2003.

136/IV Espessantes – Identificação de goma arábica (acácia)

Material

Estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio e pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Sub-acetato de chumbo
Indicador vermelho congo

Solução aquosa de sub-acetato de chumbo – Triture 14 g de monóxido de chumbo com 10 mL de água, transfira para um frasco lavando com mais 10 mL de água. Dissolva 22 g de acetato de chumbo em 70 mL de água e adicione esta solução na mistura de monóxido de chumbo. Agite vigorosamente por cinco minutos. Guarde esta mistura durante sete dias, agitando freqüentemente. Filtre para um balão volumétrico de 100 mL, lave o filtrado com água, esfrie e complete o volume com água recentemente fervida. Dilua 3,25 mL desta solução em 100 mL de água recentemente fervida.

Solução aquosa de indicador vermelho congo a 0,5% m/v.

Procedimentos

1. Em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **132/IV** ou **133/IV** ou a 5 mL de uma solução a 0,5% m/v da goma, adicione 2 mL de solução de sub-acetato de chumbo. Forma-se um precipitado branco floculento.

2. Adicione algumas gotas de solução de vermelho congo. Forma-se um precipitado fino azul-escuro.

Referências bibliográficas

COMMITEE ON CODEX SPECIFICATIONS **Food Chemicals Codex.** 3. ed., Washington D.C.: National Academic Press, 1981. p. 7, 561.

GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press, 1969. 590 p.

KIMURA, I.A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A.; MICHELATO, S.R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, ano 13, n. 1, p. 21-24, 2003.

137/IV Espessantes – Identificação de alginato de sódio

Material

Estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio e pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Cloreto de cálcio
Solução de acido sulfúrico 4 M
Solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2.2H_2O$) a 7,5% m/v

Procedimentos

1. Em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **132/IV** ou **133/IV** ou a 5 mL de uma solução 0,5% m/v da goma, adicione 2 mL da solução de cloreto de cálcio. Forma-se um gel levemente branco.

2. Adicione 2 mL de solução de ácido sulfúrico. Forma-se um gel.

Referências bibliográficas

COMMITEE ON CODEX SPECIFICATIONS **Food Chemicals Codex.** 3. ed., Washington D.C.: National Academic Press, 1981. p. 274.

GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press, 1969. 590 p.

KIMURA, I.A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A.; MICHELATO, S.R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, ano 13 ,n. 1, p. 21-24, 2003.

138/IV Espessantes – Identificação de goma Konjak

Material

Estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio e pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Solução de bórax a 4% m/v
Solução de hidróxido de potássio a 10% m/v

Procedimentos

1. Em um tubo de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **132/IV** ou **133/IV** ou a 5 mL de uma solução 0,5% m/v da goma, adicione 2 mL de solução de bórax a 4% m/v. Forma-se um precipitado.

2. Adicione 2 mL de solução de hidróxido de potássio. Forma-se um gel rígido.

Referências bibliográficas

GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press, 1969. 590 p.

KIMURA, I.A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A.; MICHELATO, S.R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, ano 13, n. 1, p. 21-24, 2003.

139/IV Espessantes – Identificação de agar-agar

Material

Estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio, pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Solução de sub-acetato de chumbo, triture 14 g de monóxido de chumbo com 10 mL de água, transfira para um frasco, lavando com mais 10 mL de água. Dissolva 22 g de acetato de chumbo em 70 mL de água e adicione esta solução na mistura de óxido de chumbo. Agite vigorosamente por 5 minutos. Guarde esta mistura durante 7 dias, agitando freqüentemente. Filtre, para um balão volumétrico de 100 mL, lave o filtrado com água, esfrie e complete o volume com água recentemente fervida. Dilua 3,25 mL desta solução em 100 mL de água recentemente fervida.

Solução de indicador vermelho congo a 0,5% m/v.
Solução de azul de metileno a 1 % m/v

Procedimentos

1. Em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **132/IV** ou **133/IV** ou a 5 mL de uma solução 0,5% m/v da goma, adicione 2 mL de solução de solução de sub-acetato de chumbo. Forma-se um precipitado floculento com gel.

2. Adicione algumas gotas de solução de indicador vermelho-congo. Forma-se um precipitado fino azul-escuro.

3. Adicione algumas gotas de solução de azul de metileno a 1% m/v. Forma-se um precipitado de cor púrpura.

Referências bibliográficas

COMMITEE ON CODEX SPECIFICATIONS **Food Chemicals Codex.** 3. ed., Washington D.C.: National Academic Press, 1981. p. 74, 561.

GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press, 1969. 590 p.

KIMURA, I.A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A.; MICHELATO, S.R.

Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, ano 13, n. 1, p. 21-24, 2003.

140/IV Espessantes – Identificação de goma jataí

Material

Estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio, pipetas graduadas de 1 e 5 mL.
Reagentes

Solução de bórax a 4% m/v

Solução de acetato de chumbo a 20% m/v – Dissolva o sal em água, aqueça até a ebulição, esfrie e utilize a solução sobrenadante.

Procedimentos

1. Em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **0132/IV** ou **0133/IV** ou a 5 mL de uma solução 0,5% m/v da goma, adicione 2 mL de solução de solução de bórax. Forma-se um gel.

2. Adicione 2 mL de solução de acetato de chumbo. Forma-se um precipitado floculento branco.

Referências bibliográficas

GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press, 1969. 590 p.

KIMURA, I.A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A.; MICHELATO, S.R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, ano 13, n. 1, p. 21-24, 2003.

141/IV Espessantes – Identificação de carboximetilcelulose

Material

Estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio e pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Solução aquosa de sulfato cúprico a 12,5% m/v

Solução aquosa de acetato de chumbo a 20% m/v – Dissolva o sal em água, aqueça até a ebulição, esfrie e utilize a solução sobrenadante.

Procedimentos

1. Em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **132/IV** ou **133/IV** ou a 5 mL de uma solução 0,5% m/v da goma, adicione 2 mL de solução de sulfato cúprico. Forma-se um precipitado branco-azulado.

2. Adicione 2 mL de solução de acetato de chumbo. Forma-se um gel floculento.

Referências bibliográficas

COMMITEE ON CODEX SPECIFICATIONS **Food Chemicals Codex.** 3. ed., Washington D.C.: National Academic Press, 1981. p. 280.

GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press, 1969. 590 p.

KIMURA, I.A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A.; MICHELATO, S.R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, ano 13, n. 1, p. 21-24, 2003.

142/IV Espessantes – Identificação de pectina

Material

Estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio e pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Solução de cloreto de cálcio a 7,5% m/v

Solução de acetato de chumbo a 20% m/v – Dissolva o sal em água, aqueça até a ebulição, esfrie e utilize a solução sobrenadante.

Solução saturada de cloreto de bário – Utilize o sobrenadante.

Solução de sulfato cúprico a 12,5% m/v

Procedimentos

1. Em um tubo de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **132/IV** ou **133/IV** ou a 5 mL de uma solução 0,5% m/v da goma, adicione 2 mL de solução de acetato de chumbo. Forma-se um gel.

2. Adicione 2 mL de solução de cloreto de cálcio. Forma-se um gel.

3. Adicione 2 mL de solução saturada de cloreto de bário. Formam-se partículas floculentas em suspensão.

4. Adicione 2 mL de solução de sulfato cúprico a 12,5% m/v. Formam-se partículas brancas em suspensão.

Referências bibliográficas

COMMITEE ON CODEX SPECIFICATIONS **Food Chemicals Codex.** 3. ed., Washington D.C.: National Academic Press, 1981. p. 280.

GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press, 1969. 590 p.

KIMURA, A. I.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A; MICHELATO, S.R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, ano 13, n. 1, p. 21-24, 2003.

143/IV Espessantes – Identificação de goma xantana

Material

Estante para tubos de ensaio, tubos de ensaio e pipetas graduadas de 1 e 5 mL.

Reagentes

Solução de sub-acetato de chumbo – Triture 14 g de monóxido de chumbo com 10 mL de água, transfira para um frasco, lavando com mais 10 mL de água. Dissolva 22 g de

acetato de chumbo em 70 mL de água e adicione esta solução na mistura de óxido de chumbo. Agite vigorosamente por 5 minutos. Guarde esta mistura durante 7 dias, agitando freqüentemente. Filtre, para um balão volumétrico de 100 mL, lave o filtrado com água, esfrie e complete o volume com água recentemente fervida. Dilua 3,25 mL desta solução em 100 mL de água recentemente fervida.

Solução aquosa de acetato de chumbo a 20% m/v – Dissolva o sal em água, aqueça até a ebulição, esfrie e utilize a solução sobrenadante.

Procedimentos

1. Em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do extrato obtido em **0132/IV** ou **0133/IV** ou a 5 mL de uma solução 0,5% m/v da goma, adicione 2 mL de solução de acetato de chumbo. Forma-se um gel floculento.

2. Adicione 2 mL de solução de sub-acetato de chumbo. Forma-se um gel.

Referências bibliográficas

COMMITEE ON CODEX SPECIFICATIONS **Food Chemicals Codex.** 3. ed., Washington D.C.: National Academic Press, 1981. p. 7, 561.

GLICKSMAN, M. **Gum Technology in the Food Industry**. New York: Academic Press, 1969. 590 p.

KIMURA, I.A.; ALABURDA, J.; MARTINS, M.S.; DIAS, N.A; MICHELATO, S.R. Análise de gomas em aditivos alimentares. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, ano 13, n. 1, p. 21-24, 2003.

144/IV Estabilizantes – Determinação de fosfatos, em P_2O_5, por gravimetria

Em amostras de aditivos contendo tripolifosfatos, hexametafosfatos, pirofosfatos, etc., pode-se fazer a determinação do teor de fósforo (em P_2O_5) por meio de técnica gravimétrica ou colorimétrica (espectrofotometria na região do visível). Quando o teor de P_2O_5 for superior a 50%, recomenda-se utilizar o método gravimétrico.

Material

Balança analítica, balança semi-analítica, chapa elétrica, bomba para filtração a vácuo, estufa, béqueres de 250, 400 e 600 mL, funil de vidro, provetas graduadas de 50, 100 e 250 mL, vidro de relógio, balões volumétricos de 500 e 1000 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL, pipetas volumétricas de 5,

20 e 25 mL, cadinho filtrante de vidro com capacidade de 30 mL e porosidade fina (n°4) e kitassato de 500 mL.

Reagentes

Ácido nítrico
Molibdato de sódio
Ácido cítrico
Quinolina sintética
Acetona

Solução de Quimociac – Dissolva 70 g de molibdato de sódio ($Na_2MoO_4.2H_2O$) em 150 mL de água (solução A). Dissolva 60 g de ácido cítrico numa mistura de 85 mL de ácido nítrico e 150 mL de água e deixe esfriar (solução B). Gradualmente, adicione a solução A na solução B, com agitação, para produzir a solução C. Dissolva 5 mL de quinolina sintética numa mistura de 35 mL de ácido nítrico e 100 mL de água (solução D). Gradualmente, adicione a solução D na solução C, misture bem e deixe em repouso uma noite. Filtre a mistura recolhendo em um balão volumétrico de 1000 mL, adicione 280 mL de acetona no filtrado, complete o volume e homogeneíze. Guarde em frasco de polietileno.

Procedimento – Pese, com precisão, 800 mg da amostra num béquer de 400 mL. Adicione 100 mL de água e 25 mL de ácido nítrico e tampe com um vidro de relógio. Ferva por 10 minutos numa chapa elétrica. Lave o vidro de relógio recolhendo a água de lavagem no béquer e esfrie a solução até a temperatura ambiente. Transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL, complete o volume com água e homogeneíze. Transfira uma alíquota de 20 mL num frasco Erlenmeyer de 500 mL, adicione 100 mL de água e aqueça até a ebulição. Adicione, com agitação, 50 mL de solução de Quimociac, cubra com vidro de relógio e ferva por 1 minuto dentro de uma capela. Esfrie até a temperatura ambiente, agitando de vez em quando, durante o resfriamento. Filtre em um cadinho de vidro de placa porosa nº 4, previamente tarado a 225°C, e lave o precipitado com 5 porções de 25 mL de água. Seque na estufa a 225°C por 30 minutos, esfrie e pese.

Cálculo

Cada mg de precipitado obtido é equivalente a 32,074 μg de P_2O_5.

Referência bibliográfica

COMMITEE ON CODEX SPECIFICATIONS. **Food Chemicals Codex.** 3. ed.,

Washington D.C.: National Academic Press, 1981. p. 370.

145/IV Estabilizantes – Determinação de fosfatos, em P_2O_5, por espectrofotometria

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, balança analítica, banho de areia, béqueres de 50 e 400 mL, tubos de ensaio, balões volumétricos de 10, 100, 250, 500 e 1000 mL, pipeta graduada de 5 mL e pipetas volumétricas de 5 e 50 mL.

Reagentes

Fosfato ácido de potássio
Molibdato de amônio
Vanadato de amônio
Ácido nítrico
Ácido sulfúrico

Solução-padrão de fosfato – Dissolva 0,9587 g de fosfato ácido de potássio (KH_2PO_4), previamente seco em estufa a 105°C por 1 hora, em água e transfira para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume. Transfira 50 mL para um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com água (1 mL desta solução contém 0,2 mg de P_2O_5).

Reagente e vanado-molibdato de amônio – Dissolva, separadamente, 20 g de molibdato de amônio, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, em água quente e 1 g de vanadato de amônio (NH_4VO_3) também em água quente, filtrando se necessário. Misture as soluções, acidifique com 140 mL de ácido nítrico e dilua para 1 litro.

Procedimento – Em um tubo de ensaio, pese uma quantidade de amostra cuja concentração final de P_2O_5 esteja dentro dos valores da curva-padrão. Adicione 4 gotas de ácido sulfúrico e 2 mL de ácido nítrico. Faça um branco dos reagentes. Aqueça em banho de areia até completa carbonização da amostra. Faça as diluições necessárias e transfira uma alíquota para um balão volumétrico de 10 mL. Adicione 2,5 mL de vanado-molibdado de amônio em cada balão, complete o volume com água e espere 10 minutos. Ajuste o zero do espectrofotômetro, em unidades de absorbância a 420 nm, utilizando um branco contendo 2,5 mL de vanado-molibdato de amônio em 10 mL de água e cubetas de 1 cm. Determine a absorbância a 420 nm usando o branco dos reagentes e determine a quantidade de P_2O_5 correspondente, utilizando a curva-padrão previamente estabelecida.

Preparação da curva-padrão – Coloque em uma série de balões volumétricos de 10 mL, volumes da solução-padrão equivalente aos valores entre 0,02 e 0,4 mg de P_2O_5 em 10 mL. Adicione 2,5 mL de vanado-molibdato de amônio em cada balão, complete o volume com água e espere 10 minutos. Determine a absorbância a 420 nm usando o branco dos reagentes à temperatura ambiente. Construa o gráfico concentração de fosfato em mg/10 mL x absorbância.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p 33.

146/IV Estabilizantes – Determinação de fluoretos em fosfatos por potenciometria

O método destina-se à determinação de fluoretos em fosfatos utilizados como aditivos para alimentos, por potenciometria direta, utilizando eletrodo seletivo de íon fluoreto. O método baseia-se na destilação prévia do íon fluoreto na amostra, para eliminar a matriz interferente, e posterior determinação deste íon por potenciometria direta, com eletrodo seletivo de fluoreto. Alguns cátions como Al^{3+}, Fe^{3+}, Si^{4+} e outros polivalentes interferem na determinação de fluoretos, uma vez que formam complexos. O grau de complexação depende da constante de formação do complexo, da concentração do agente complexante, da concentração total do íon fluoreto, do pH e da força iônica total da solução. Os ânions, de maneira geral, não interferem na resposta do eletrodo seletivo de fluoreto, com exceção do íon hidroxila. Alguns ânions, como CO_3^{2-} ou PO_4^{3-}, não interferem diretamente na leitura do eletrodo, porém aumentam a concentração de OH^- do meio, tornando assim necessária a destilação da amostra. O pH da solução de leitura também é um parâmetro importante e deve estar entre 5,0 e 5,5, pois abaixo desse valor ocorre a formação de HF não dissociado e do íon HF_2^- e, acima desse pH, ocorre a interferência devido ao íon OH^-. Por esse motivo, é necessário adicionar tanto aos padrões quanto às amostras, no momento da determinação potenciométrica de fluoretos, uma alíquota adequada de uma solução de TISAB, a fim de manter a força iônica elevada, o íon fluoreto livre em solução e o pH da solução ajustado.

Material

Analisador de íons (potenciômetro para uso com eletrodo seletivo), eletrodo seletivo de fluoreto combinado, agitador magnético, balança analítica, manta elétrica aquecedora, termômetro, suportes, garras, condensador de Liebig, balão de fundo redondo de 125 mL com saída lateral (para destilação), alonga para destilação, funil de separação tipo pêra de 125 mL com haste alongada, balões volumétricos de 1000, 200, 100 e 50 mL, pipetas vo-

lumétricas, béqueres de polietileno.

Limpeza da vidraria – Para evitar contaminação da amostra e diminuir o valor do branco, o balão de destilação deve passar pelo seguinte procedimento de limpeza: lave com solução de hidróxido de sódio a 10%, a quente e enxágüe com água destilada e deionizada. Coloque no balão 15 a 20 mL de ácido sulfúrico (1:2) e aqueça até o desprendimento de fumaça (usar a capela). Esfrie, descarte o ácido, trate o balão novamente com solução de hidróxido de sódio a 10% e enxágüe bem com água.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Solução de hidróxido de sódio a 10% m/v
Ácido 1,2-diaminociclohexano-N,N,N'N'-tetracético - $C_{14}H_{22}N_2O_8.H_2O$ (Titriplex IV)

Solução-padrão estoque de fluoreto 100 mg/L – Pese 221 mg de fluoreto de sódio anidro, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água. Estoque esta solução em frasco de polietileno.

Solução-padrão estoque intermediária de fluoreto 10 mg/L – Prepare, a partir da solução-padrão estoque, diluindo com água destilada e desmineralizada. Estoque em frasco de polietileno.

Solução de TISAB – Pese 58 g de cloreto de sódio, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL, adicione 57 mL de ácido acético glacial, 4 g de titriplex IV, ajuste o pH desta solução a 5,0-5,5 com solução de hidróxido de sódio 5 M e complete o volume com água.

Nota: a água utilizada para o preparo de todas as soluções deve ser destilada e deionizada.

Procedimento – Transfira 8 g da amostra previamente homogeneizada, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, 30 mL de água e algumas pérolas de vidro para um balão de destilação conectado a um condensador de Liebig. Na boca do balão adapte uma rolha pela qual se introduz um funil de separação (com haste alongada para que o gotejamento seja lento e próximo à solução) e um termômetro, o qual deve estar mergulhado na solução. Coloque o balão na manta de aquecimento para fazer a destilação e recolha o destilado em frasco plástico. Durante a destilação, quando a temperatura atingir 140°C, adicione água lentamente através do funil de separação para manter a temperatura entre 130 e 140°C. Destile durante 3 horas contadas a partir do momento em que a temperatura atingiu 140°C, ou até que o volume do destilado esteja próximo de 200 mL. Transfira o destilado quantitativamente para balão volumétrico de 200 mL, complete o volume com

água e em seguida transfira para um frasco de polietileno. Ajuste o aparelho analisador de íons e, calcule o *slope* do eletrodo, conforme o recomendado no manual do fabricante. Em balão volumétrico de 50 mL, pipete uma alíquota adequada da amostra (de tal forma que a leitura esteja compreendida na curva-padrão) e 15 mL de TISAB. Complete o volume com água desmineralizada. Transfira para béqueres de polietileno. Faça a leitura da concentração, mantendo as mesmas condições experimentais da curva-padrão.

Teste do eletrodo (cálculo do *slope)* – Calcule o *slope* da maneira recomendada no manual do eletrodo. O *slope* (tangente de curva log [F^-] x E), corresponde à variação do potencial (E) quando a concentração do fluoreto varia 10 vezes.
Curva-padrão – Pipete, em balões volumétricos de 50 mL, alíquotas adequadas da solução-padrão estoque de fluoreto. As concentrações podem variar de acordo com a sensibilidade e a faixa linear de trabalho do equipamento. A cada balão adicione 15 mL de TISAB e complete o volume com água deionizada. Transfira as soluções-padrão para béqueres de polietileno e faça a leitura da concentração, sob agitação não turbulenta.

Notas
As soluções-padrão devem ser preparadas no momento da leitura.
Lave o eletrodo com água entre cada leitura e enxágüe-o com a próxima solução a ser lida.

Cálculo

$$\frac{c \times V \times V_1}{m \times V_2} = \text{concentração de fluoretos na amostra, em mg/kg}$$

c = concentração de fluoretos na solução de leitura, em mg/L
V = volume do destilado, em mL
V_1 = volume do balão de leitura, em mL
V_2 = alíquota da amostra utilizada para leitura, em mL
m = massa da amostra, em g

Limite de quantificação do equipamento = 0,1 mg/L
Limite de quantificação do método = 5 mg/kg (levando em consideração a diluição da amostra)

Referências bibliográficas

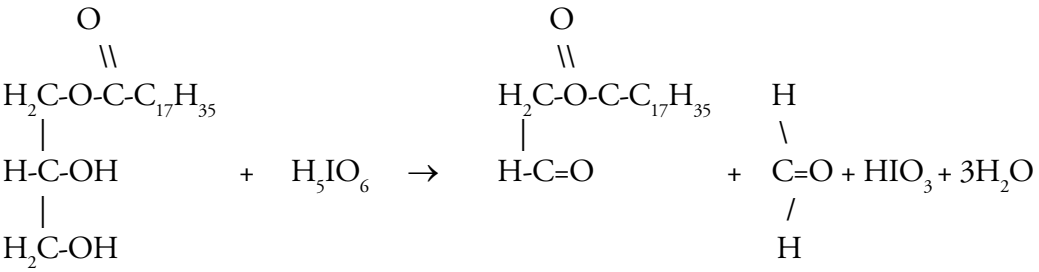
ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 16th, Arlington: A.O.A.C., 1996, chapter 9. p. 11-15.

COMMITEE ON CODEX SPECIFICATIONS **Food Chemicals Codex**. 4. ed., Washington D.C.: National Academic Press, 1996. p. 758-760.

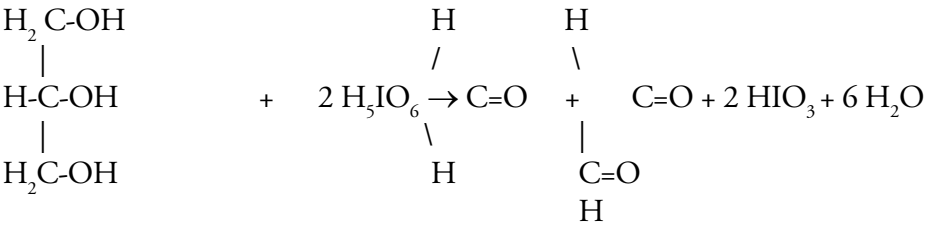
147/IV Estabilizantes – Determinação de mono e diglicerídios e glicerol livre

Os mono e diglicerídios são formados por uma mistura de mono, di e triésteres de glicerol com ácidos graxos comestíveis. Este método determina somente o teor de monoéster, podendo ser utilizado em produtos puros ou em formulações. Quando estiver em mistura com gomas estas devem ser separadas por filtração antes da etapa da extração.

O princípio do método analítico para determinação de mono e diglicerídios e glicerol livre está baseado nas seguintes reações químicas:



monoestearato de glicerila
(extrato orgânico)



glicerol (extrato aquoso)
Na titulação acontecem as seguintes reações:

$$H_5IO_6 + HIO_3 + 12KI + 12CH_3COOH \rightarrow 7I_2 + 9H_2O + 12CH_3COOK \text{ (amostra)}$$

$$H_5IO_6 + 7KI + 7\,CH_3COOH \rightarrow 4I_2 + 6\,H_2O + 7\,CH_3COOK \text{ (branco)}$$

$$2Na_2S_2O_3 + I_2 \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2NaI \text{ (titulação)}$$

Material

Balança analítica, balança semi-analítica, banho-maria, papel de filtro (se necessário), béquer de 50 mL, bastão de vidro, proveta de 50 mL, funil de separação tipo pêra de 250 mL, pipetas graduadas de 5, 10 e 20 mL, pipetas volumétricas de 25 ou 50 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL com tampa, bureta de 25 ou 50 mL e funil de vidro, se necessário.

Reagentes

Tiossulfato de sódio
Acetato de etila
Sulfato de sódio
Ácido acético glacial
Ácido periódico H_5IO_6
Iodeto de potássio
Amido
Solução de $Na_2S_2O_3$ 0,4 M
Solução de amido 0,5% m/v

Solução de sulfato de sódio a 10% m/v – Dissolva 100 g de Na_2SO_4 em água suficiente para 1000 mL.

Solução de ácido acético e periódico – Dissolva 11 g de ácido periódico em 200 mL de água e complete o volume para 1000 mL com ácido acético.

Solução de iodeto de potássio a 25% m/v – Dissolva 25 g de KI em água suficiente para 100 mL.

Procedimento -- Pese, com precisão, em um béquer de 50 mL, certa quantidade de amostra calculada de acordo com a seguinte fórmula: massa de amostra = 30/% de monoéster esperado na amostra.

Dissolva a amostra com pequenos volumes de acetato de etila, triturando-a após cada adição com bastão de vidro. Transfira cada um dos volumes do sobrenadante para um funil de separação, filtrando se necessário, até a dissolução total dos monoglicerídios em 50 mL do solvente. Extraia com três porções de 15 mL de Na_2SO_4 a 10% agitando vigorosamente após cada adição e colete o extrato aquoso, da camada inferior do funil de separação, em um frasco Erlenmeyer de 250 mL com tampa. Receba o extrato em acetato de etila da camada superior, em outro frasco Erlenmeyer. Lave o funil de separação

com duas porções de 5 mL de ácido acético, recebendo-as no frasco Erlenmeyer com o extrato em acetato de etila. Prepare uma prova em branco com 50 mL de acetato de etila e 10 mL de ácido acético em um terceiro frasco Erlenmeyer. Adicione 50 mL de solução de ácido acético-periódico nos três frascos Erlenmeyer, tampe-os, agite-os bem e coloque-os em banho-maria por 45 minutos no escuro, em temperatura não superior a 50°C. Após este tempo, retire os respectivos frascos do banho-maria, adicione 10 mL de solução de KI a 25% em cada um e titule-os com solução de $Na_2S_2O_3$ 0,4 M, usando amido como indicador.

Nota: no caso de se usar 25 mL de solução de ácido acético-periódico e titular com bureta de 25 mL, utilize metade da massa calculada acima.

Cálculo

$$\frac{(B-A) \times f \times 7,17}{P} = \text{monoglicerídios, em } \alpha\text{-monoestearato de glicerila (extrato orgânico), por cento, m/m}$$

Nota: utilize os fatores 2,68 e 2,99, para expressar o resultado, respectivamente, em α-monoacetato de glicerila e α-monoestearato de sorbitana

$$\frac{(B-A) \times f \times 0,92}{P} = \text{glicerol livre (extrato aquoso), por cento, m/m}$$

Nota: utilize os fatores 1,52 e 1,21, para expressar o resultado, respectivamente, em propilenoglicol livre e sorbitol livre

B= mL de $Na_2S_2O_3$ 0,4 M, gastos na prova em branco.
A= mL de $Na_2S_2O_3$ 0,4 M, gastos na titulação da amostra
f = fator da solução de $Na_2S_2O_3$ 0,4 M
P= massa da amostra

Referência bibliográfica
CRAM, D.J.; HAMMOND, G.S. **Organic Chemistry**, Mc Graw-Hill Book Company Inc. 1964. p. 546-547.

148/IV Realçador de sabor – Identificação de glutamato de sódio

Material

Pipeta de 1 mL, proveta de 50 mL, béquer de 100 mL, banho-maria, balança analítica e balão volumétrico de 100 mL.

Reagentes

Ninidrina (tricetohidrindeno hidratado) – Dissolva 200 mg de tricetohidrindeno hidratado ($C_9H_4O_3$ H_2O) em água até 100 mL. Prepare a solução no dia do uso.

Acetato de sódio

Procedimento – A 1 mL da solução aquosa da amostra diluída em 1:30 (em glutamato de sódio), adicione 1 mL de ninidrina e 100 mg de acetato de sódio e aqueça em banho-maria por 10 min. Uma intensa cor violeta azulada é formada.

Referência bibliográfica

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX. **Food Chemicals Codex**. 4. ed., Washington D.C.: National Academic Press, 1996. p. 260.

149/IV Identificação de bromatos pelo método direto

O bromato é identificado direta ou indiretamente em preparados para produtos de panificação, melhoradores de farinha ou outras formulações de aditivos para panificação.

Material

Balança semi-analítica, agitador magnético, barra magnética, rotavapor, placas para cromatografia em camada delgada de sílica gel 60G, papel de filtro qualitativo, béqueres de 100, 250 e 1000 mL, bastão de vidro, funil de vidro, provetas de 25, 50 e 200 mL, tubo capilar de vidro para cromatografia, cuba de vidro para cromatografia e pulverizador.

Reagentes

Butanol
Propanol
Álcool
Orto-tolidina
Sulfato de zinco
Ácido clorídrico
Hidróxido de sódio
Bromato de potássio
Solução de bromato de potássio a 1% m/v.

Solução de orto-tolidina a 0,02% em álcool
Solução de ácido clorídrico em álcool na proporção 25:65
Solução de sulfato de zinco 20 g/L.
Solução de hidróxido de sódio 0,4 M
Antiespumante: por exemplo, dimetil silicone

Procedimento - Para amostras sólidas ou em pastas, siga o procedimento: transfira 200 mL da solução de sulfato de zinco 20 g/L para um béquer de 1000 mL. Agite em agitador magnético com velocidade constante. Adicione aproximadamente 50 g da amostra, mantendo a agitação. Adicione 50 mL da solução de hidróxido de sódio 0,4 M. Continue agitando por mais 15 minutos. Filtre em papel de filtro qualitativo. Concentre o filtrado em rotavapor com temperatura não superior a 70°C. Adicione, se necessário, uma gota de antiespumante ao filtrado. Reduza até um volume inferior a 50 mL. Aplique o concentrado, paralelamente ao padrão, em placa de camada delgada de sílica gel 60 G, numa cuba previamente saturada com a fase móvel butanol-propanol-água na proporção de 1:3:1. Revele o cromatograma seqüencialmente com a solução de o-tolidina a 0,02% e ácido clorídrico em álcool na proporção de 25:65. Na presença de bromato aparecerá uma mancha amarela em R_f 0,64, aproximadamente. Para amostras líquidas, aplique diretamente na placa de camada delgada e proceda como descrito acima.

Referência bibliográfica

YABIKU, H.Y.; KIMURA, I.A.; DIAS, N. A.; MARSIGLIA, D.A.P.; ZENEBON, O. Bromato de potássio em farinha de trigo e melhoradores de panificação. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, ano 6, n. 1, p. 4-6, 1996.

150/IV Identificação de bromatos pelo método indireto com o reativo fucsina-bissulfito

Após a incineração da amostra, é realizada a identificação do brometo formado pela decomposição térmica do bromato.

Material

Balança semi-analítica, mufla, cápsula de porcelana, béquer de 50 mL, bastão de vidro, pipetas graduadas de 1 e 5 mL e agitador magnético com barra magnética

Reagentes

Água oxigenada
Ácido sulfúrico
Fucsina

Ácido sulfúrico 10% m/v
Água oxigenada 30% m/v
Solução de brometo de potássio a 1% m/v

Solução descorada de fucsina a 0,1% m/v – Dissolva 0,1 g de fucsina em pequenas porções de água, triturando-a com bastão de vidro, até atingir 100 mL. Adicione, com agitação, bissulfito de sódio em pó até descorar totalmente a solução. Caso a solução não descore totalmente, filtre em papel de filtro contendo carvão ativado.

Procedimento – Incinere, aproximadamente, 50 g de amostra em uma cápsula de porcelana em mufla a 550°C. Dissolva as cinzas obtidas em volume de ácido sulfúrico a 10% m/v suficiente para sua dissolução, agitando com bastão de vidro. Filtre, se necessário. Em seguida, adicione 2 mL de água oxigenada a 30% e 3 mL do reativo fucsina-bissulfito. Agite e aguarde aproximadamente 5 minutos. O aparecimento de coloração lilás persistente, que pode aparecer em até 24 horas, indica a presença de brometos formados pela decomposição térmica do bromato. Faça paralelamente uma prova em branco com água e uma prova com o padrão de brometo de potássio a 1%.

Referência bibliográfica

YABIKU, H.Y.; KIMURA, I.A.; DIAS, N. A.; MARSIGLIA, D.A.P.; ZENEBON, O. Bromato de potássio em farinha de trigo e melhoradores de panificação. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, ano 6, n. 1, p. 4-6, 1996.

151/IV Identificação de bromatos por método indireto com fluoresceína

Material

Balança semi-analítica, mufla, estufa, cápsula de porcelana, placas para cromatografia em camada delgada de sílica gel 60 G, papel de filtro qualitativo, béqueres de 100 e 250 mL, bastão de vidro, funil de vidro, provetas de 25, 50 e 200 mL, tubo capilar de vidro para cromatografia, cuba de vidro para cromatografia e pulverizador.

Reagentes

Fase móvel: butanol-acetona-hidróxido de amônio (1:3:1)
Solução de ácido acético glacial- água oxigenada a 30% (10:1), recém preparada
Solução-padrão de brometo de potássio a 1% m/v
Solução alcoólica de fluoresceína a 0,01% m/v – Dissolva 0,01g de fluoresceína em álcool a 50% até completar 100 mL.

Procedimento – Incinere, aproximadamente, 50 g da amostra em uma cápsula de porcelana. Dissolva as cinzas em 10 mL de água. Filtre ou transfira o sobrenadante para outra cápsula de porcelana, reservando alguns mL para a cromatografia em camada delgada. Adicione uma gota de solução de fluoresceína a 0,01%, seguida de uma gota da mistura de ácido acético glacial em água oxigenada e evapore em banho-maria até à secura. Faça, paralelamente, uma prova em branco utilizando água. O aparecimento de uma coloração rósea persistente pode indicar a presença de brometos. Para confirmação, aplique a porção restante do sobrenadante em placa de camada delgada de sílica gel 60 G com a fase móvel butanol-acetona-hidróxido de amônio (1:3:1), correndo paralelamente o padrão de brometo de potássio a 1%. Revele com a mistura de partes iguais das soluções de fluoresceína a 0,01% e ácido acético em água oxigenada. Coloque em estufa a 105°C, até o aparecimento de manchas. Na presença de brometo aparecerá uma mancha rósea em R_f aproximado de 0,65, a qual pode aparecer em até 24 horas.

Referência bibliográfica

YABIKU, H.Y.; KIMURA, I.A.; DIAS, N. A.; MARSIGLIA, D.A.P.; ZENEBON, O. Bromato de potássio em farinha de trigo e melhoradores de panificação. **Bol. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, ano 6, n. 1, p. 4-6, 1996.

152/IV Determinação de arsênio em aditivos

O método baseia-se, fundamentalmente, na liberação de arsina (um gás de odor desagradável extremamente venenoso) a qual é absorvida em uma solução de dietilditiocarbamato de prata, formando um complexo de cor vermelha, cuja intensidade pode ser estimada a olho nu ou espectrofotometricamente. As reações envolvidas são:

$As^{+5} + Sn^{+2} \rightarrow As^{+3} + Sn^{+4}$ (redução do $As^{+5} \rightarrow As^{+3}$)
$Zn^{0} + 2H^{+} \rightarrow Zn^{+2} + H_2 \rightarrow$ (produção de H_2 com adição de zinco metálico)
$2\ As^{+3} + 3\ H_2 \rightarrow 2\ AsH_3$ (formação de arsina)
$AsH_3 + 6\ (C_2H_5)_2NCSSAg \rightarrow 6\ Ag + 3\ (C_2H_5)_2NCSSH + [(C_2H_5)_2NCSS]_3As$
(complexo vermelho)

Os metais ou sais de metais, a seguir mencionados, interferem na liberação da arsina: cromo, cobalto, cobre, mercúrio, molibdênio, níquel, paládio e prata. O antimônio, que forma a estibina, (SbH_3) é o elemento que pode produzir interferência positiva, porque dá cor com o dietilditiocarbamato de prata. A estibina forma um complexo que tem máximo de absorção a 510 nm; entre 535 e 540 nm, a absorbância deste

complexo é diminuída de tal maneira que os resultados de dosagem do arsênio não são alterados de uma maneira significativa. Por outro lado, o antimônio é igualmente tóxico e indesejável.

Material

Algodão hidrófilo, balança semi-analítica, aparelho para determinação de arsênio, frasco Erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada 24/40, béqueres de 10, 50, 150 e 600 mL, provetas graduadas de 100 mL, provetas graduadas de 100 mL com tampa, pipetas graduadas de 1, 2, 5 e 10 mL, pipetas volumétricas de 3, 5 e 10 mL, balões volumétricos de 100 e 1000 mL e frasco Kjeldahl de 800 mL.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Água oxigenada a 30%
Ácido clorídrico
Cloreto estanoso
Iodeto de potássio
Acetato de chumbo
Piridina
Dietilditiocarbamato de prata
Trióxido de arsênio
Hidróxido de sódio
Zinco granulado isento de arsênio

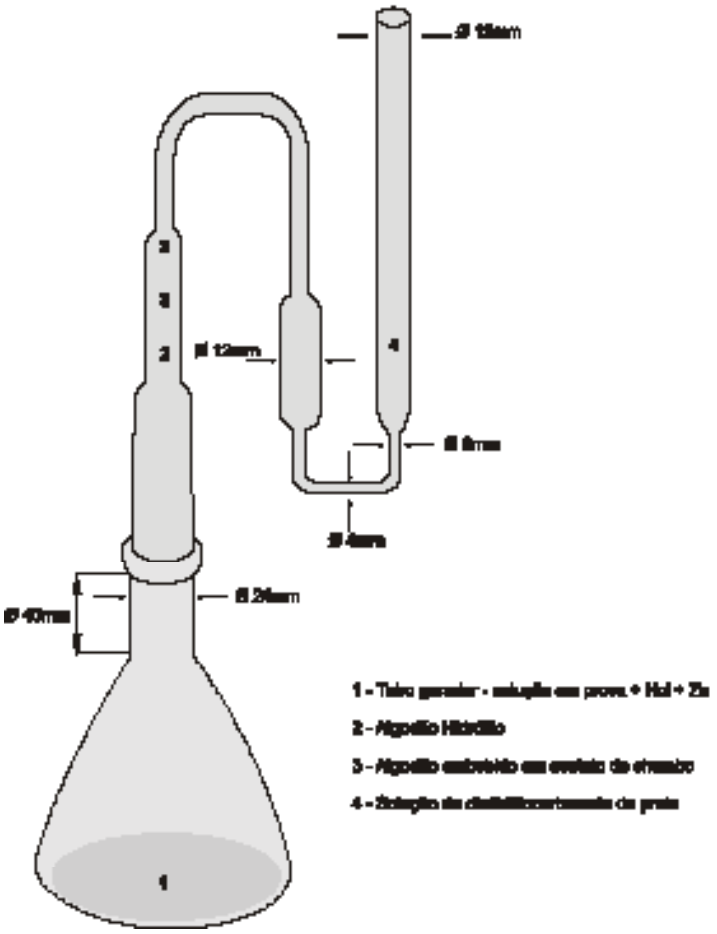


Figura 2 - Aparelho para determinação de arsênio

Solução-padrão estoque de arsênio – Pese, com precisão, 0,132 g de trióxido de arsênio finamente pulverizado e seco. Dissolva em 5 mL de solução (1:5) de NaOH. Neutralize a solução com ácido sulfúrico a 10% e adicione um excesso de 10 mL. Transfira para um balão volumétrico de 1 L e complete o volume com água recentemente fervida.

Solução-padrão de trabalho de arsênio – No dia do uso, pipete 10 mL da solução-padrão estoque de arsênio para um balão volumétrico de 1000 mL, adicione 10 mL de ácido sulfúrico a 10% e complete o volume com água recentemente fervida. Esta solução contém 1 µg de arsênio por mL. Conserve-a por até três dias.

Solução de dietilditiocarbamato de prata 0,5% em piridina – Pese 0,5 g de $AgSCSN(C_2H_5)_2$

em um balão âmbar de 100 mL. Adicione piridina para dissolver e complete o volume. Conserve esta solução até um mês, em frasco âmbar.

Solução de ácido sulfúrico a 10% m/v – Dilua, com as precauções habituais, 57 mL de ácido sulfúrico a 1000 mL com água.

Solução de cloreto estanoso em ácido clorídrico - Dissolva 40 g de $SnCl_2.2H_2O$ em 100 mL de ácido clorídrico concentrado. Conserve esta solução até três meses, em frasco de vidro.

Solução de iodeto de potássio a 15% m/v - Dissolva 15 g de iodeto de potássio em 100 mL de água.

Algodão contendo acetato de chumbo – Embeba o algodão hidrófilo em uma solução saturada de acetato de chumbo. Extraia o excesso de solução e seque sobre vidro à temperatura ambiente.

Procedimento – Instale o aparelho conforme a **Figura 2**. Introduza no tubo de absorção, com auxílio de pinça, três tampões de algodão nesta ordem: um hidrófilo, um embebido em solução saturada de acetato de chumbo e outro hidrófilo. Dependendo da natureza da amostra, siga um dos seguintes procedimentos: no caso de substâncias orgânicas que, em meio clorídrico turvam, existe a necessidade da mineralização por via úmida; em caso contrário (por ex. ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, citrato de cálcio, etc), a mineralização não é necessária. Em presença de sais de ferro (por ex. pirofosfato de ferro, citrato férrico amoniacal, sacarato de ferro, etc) adicione 1 g de ácido ascórbico à solução de dosagem. O ácido ascórbico reduz e complexa o ferro que interfere na liberação da arsina. Para matérias-primas solúveis em meio clorídrico, calcule a massa necessária para comparação com um padrão conhecido de arsênio e dissolva de maneira a se obter sempre um volume final de (35 ± 2) mL.

Mineralização por via úmida – Numa proveta com tampa, adicione 30 mL de água oxigenada e 7 mL de ácido sulfúrico. Homogeneíze e deixe em repouso uma noite. Pese a massa de amostra necessária (*Nota 3*) e transfira para o frasco Kjeldahl com auxílio da mistura: água oxigenada/ácido sulfúrico. Aqueça até que toda a água oxigenada seja consumida (agite, de vez em quando). Esfrie. Caso a solução ainda esteja escura, adicione mais água oxigenada e aqueça novamente. Quando houver forte desprendimento de fumaças brancas (SO_3) e a solução não mais escurecer, a mineralização está terminada. Lave 3 vezes o frasco Kjeldahl com água, aquecendo até reduzir o volume a mais ou menos 5 mL após cada adição (caso a solução escureça novamente, adicione mais água oxigenada, aqueça e lave novamente com água (três vezes). Esfrie o frasco e transfira a solução para um frasco Erlenmeyer de 500 mL

de boca esmerilhada. Lave as paredes do frasco Kjedahl e transfira para o frasco Erlenmeyer com auxílio de água suficiente para completar o volume para 35 mL. Adicione, nesta ordem, nos frascos Erlenmeyer: 10 mL de ácido clorídrico, 2 mL da solução de KI e 0,5 mL da solução de cloreto estanoso. Conecte os tubos de absorção, agite e deixe repousar por 30 minutos à temperatura ambiente. Pipete 3 mL da solução de dietilditiocarbamato de prata em piridina nos tubos de absorção (parte superior). Após os 30 minutos, introduza 4 g de zinco granulado nos frascos Erlenmeyer, conecte rapidamente os tubos de absorção nestes frascos, agite e deixe a reação ocorrer durante 45 minutos à temperatura ambiente, compreendida entre 25°C e 35°C, com agitações casuais de 10 minutos. A liberação de hidrogênio deve ser regular e suficiente sem ser excessiva (a adição de uma pequena quantidade de isopropanol no frasco Enlermeyer pode melhorar e uniformizar a liberação do gás). Após os 45 minutos, compare a intensidade de coloração nos tubos de absorção da amostra, branco e padrão. A reação segue a Lei de Beer de 0 a 10 µg de arsênio. É possível estabelecer uma curva-padrão para um comprimento de onda máximo determinado entre 535 e 540 nm, com um espectrofotômetro ou colorímetro, usando a solução de dietililditiocarbamato de prata em piridina como branco. Como a intensidade de coloração é muito instável, é importante que se faça a medida em temperatura constante, não inferior a (25 $\pm$ 2)°C e logo após os 45 minutos, tanto para as amostras como para os padrões.

Repetitividade: para comparação visual com os padrões desenvolvidos conjuntamente com os testes, o limite visual de detecção é de 0,2 mg/kg. Em trabalhos com espectrofotômetro, a diferença entre os resultados de duas determinações executadas simultaneamente, pelo mesmo analista, não deve ser maior que 0,2 µg.

Nota 1 : é necessário fazer, conjuntamente com as determinações, uma prova em branco (com os reagentes) e um padrão de concentração conhecida: prepare, simultaneamente, padrões de 1, 2, 3, etc, µg de arsênio por pipetagem de 1, 2, 3, etc., mL da solução padrão de 1 µg/mL e dilua a aproximadamente 35 mL de água.

*Nota 2: e*m presença de íon férricos, o KI é oxidado com liberação de iodo. Adicione um excesso de cloreto estanoso para uma redução completa. A liberação de hidrogênio da reação é neste caso catalisada e acelerada.

Nota 3: exemplo de cálculo da massa de amostra a ser pesada: sabe-se por norma que o corante artificial pode conter no máximo 1 µg de As por g de corante. Na dosagem comparativa usa-se um padrão de 3 µg de Arsênio. Desta maneira, a fórmula que fornece a massa de amostra a ser pesada será:

$$\frac{P_a}{n} = m_a = \frac{3}{1} g \Rightarrow \text{pese 3 g de corante}$$

$$\frac{P_a}{n} = 3 = m_a$$

m_a = massa da amostra a ser pesada
p_a = padrão para comparação
n = limite de arsênio estabelecido na especificação de cada matéria-prima

Referências bibliográficas

YABIKU, H. Y.; DIAS, N. A.; MARTINS, M.S. Estudo comparativo de métodos usuais para determinação de arsênio. São Paulo, **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** 49(1), p. 51-55, 1989.

BABKO, A. K.; PILIPENKO, A. T. **Photometric analysis. Methods of determining non-metals**. Moscow: Mir Publishers. 1976. 374 p.

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX **Food Chemicals Codex.** 4. ed., Washington D. C.: National Academic Press, 1996. p. 755-757.

153/IV Determinação de benzo(a)pireno em aromas de fumaça e alimentos defumados

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) representam um importante grupo de compostos químicos, muitos dos quais têm elevado potencial carcinógenico, dentre estas substâncias, destaca-se o benzo(a)pireno , por ter sido o primeiro hidrocarboneto a ser identificado e reconhecido como carcinógeno, e ser considerado um indicador da presença de outros do grupo. São formados principalmente devido à combustão incompleta, à altas temperaturas, de matérias orgânicas e estão distribuídos no meio ambiente em baixas concentrações; podem ser encontrados em plantas terrestres e aquáticas, solos, sedimentos, águas e na atmosfera. A contaminação nos alimentos é normalmente resultado da defumação, contaminação dos solos, poluição do ar e da água, processos de cozimento ou preparação de alimentos e dos aditivos alimentares. Este método se aplica à determinação de benzo(a) pireno em aromas de fumaça e alguns alimentos defumados, tais como: bacon, presunto, lingüiça, lombo, peru, chester, costela de boi, etc. Baseia-se na extração do benzo(a)pireno, posterior separação e quantificação por CLAE em fase reversa, usando uma coluna analítica de octadecilsilano (C_{18}) e detector de fluorescência.

Material

Cromatógrafo líquido de alta eficiência, coluna analítica de 4,0 mm x 12,5 cm, Lichrosphere 100 RP-18 (5 µm) ou equivalente, detector de fluorescência, processador e registrador/ integrador de dados, balança analítica, processador de carnes ou equivalente, manta de aquecimento de 500 mL, rotavapor, membranas filtrantes descartáveis de 0,45 µm de diâmetro de poro, filtros descartáveis de 0,45 µm de diâmetro de poro, torpedo de nitrogênio,

pipetador automático de 100 a 1000 µL com respectiva ponteira, pipetador automático de 1000 e 5000 µL com respectiva ponteira, condensador de bola com junta esmerilhada 24/40, comprimento de 400 mm, funis de separação de 125, 250 e 500 mL com torneiras de *teflon,* balão de fundo chato de 250 mL com junta esmerilhada 24/40, coluna de vidro de 22 cm de comprimento, com reservatório para 60 mL e torneira de *teflon*, funil de vidro, frascos de vidro tipo pêra de 400 mL com junta esmerilhada 24/40, funil de Büchner, frasco concentrador graduado de 10 mL com tampa, seringas de 5 mL, balões volumétricos de 10, 50 e 100 mL e pipetas volumétricas.

Reagentes

Água ultra-pura
Álcool
Metanol grau CLAE
Acetonitrila grau CLAE
1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoretano (TCTFE) grau CLAE
Dimetilsulfóxido (DMSO) grau espectrofotométrico
Ciclohexano grau CLAE
Óxido de alumínio 90, tamanho de partícula 70-230 *mesh*
Sílica gel 60 , tamanho de partícula 70-230 *mesh*
Hidróxido de potássio

Solução-estoque – Dissolva 1 mg de benzo(*a*)pireno (B*a*P) em 10 mL de ciclohexano e deixe em ultra-som por 15 minutos.

Solução-intermediária – Pipete 0,5 mL da solução-estoque, leve para um balão de 50 mL e complete o volume com acetonitrila-metanol (1:1).
Solução de trabalho – Pipete 4 mL da solução intermediária e leve para um balão de 100 mL, completando o volume com acetonitrila-metanol (1:1). Concentração final de benzo(*a*) pireno: 0,04 µg/mL.
Alumina desativada – Determine a perda aparente de peso da alumina, por aquecimento ao rubro com bico de Bünsen de 10 g de alumina em cápsula de porcelana ou platina tarada. Cubra a cápsula imediatamente e coloque em dessecador para esfriar, depois pese (as pesagens devem ser feitas rapidamente, pois a alumina adsorve imediatamente a água atmosférica). Calcule o conteúdo de água. Descarte a alumina que tenha sido aquecida. Adicione suficiente quantidade de água para molhar a alumina, desde que para o total de água adicionado, se considere 10% do peso final da alumina desativada. Agite vigorosamente a alumina por 15 minutos e guarde em vidro âmbar por no mínimo 4 horas antes do uso.

Cálculo

$$\frac{(Y+X)}{(M+X)} \times 100 = 10\,\% \text{ (porcentagem de água desejada)}$$

Y = quantidade de água presente na alumina
X = quantidade de água a ser adicionada na alumina
M = massa de alumina inicial

Sílica gel desativada – Aqueça porções de sílica gel em frasco Erlenmeyer tarado a 160°C por 16 horas e aqueça também a tampa já tarada em um béquer. Remova o frasco Erlenmeyer da estufa, tampe imediatamente e esfrie em dessecador. Pese o frasco para determinar o peso da sílica gel seca. Adicione quantidade suficiente de água à sílica gel, desde que a soma das adições não ultrapasse 15% do peso final da sílica gel desativada. Imediatamente tampe o frasco e agite vigorosamente por 15 minutos. Aguarde 4 horas ou mais antes do uso.

Cálculo

$$\frac{X}{X+M} \times 100 = 15\,\% \text{ (porcentagem de água desejada)}$$

X = quantidade de água a ser adicionada na sílica;
M = massa de sílica inicial.

Preparação da coluna cromatográfica – Adicione na coluna de vidro, contendo lã de vidro na extremidade inferior, 5 g de sílica gel desativada (contendo 15% de água), 5 g de alumina desativada (contendo 10% de água) e 10 g de sulfato de sódio, nesta ordem, batendo levemente durante cada adição. Lave a coluna com 50 mL de TCTFE. Pare o fluxo quando o nível do líquido alcançar o topo da camada de sulfato de sódio

Recuperação da coluna cromatográfica – Teste antes do uso. Prepare 2 colunas como descrito acima (uma coluna para o branco e uma para a recuperação). Adicione 40 mL de TCTFE à uma coluna e à outra adicione 40 mL de TCTFE contaminado com 2 mL de uma solução de benzo(*a*)pireno (BaP) 0,25 µg/mL. Deixe o solvente percolar as colunas e colete separadamente os eluatos em frascos tipo pêra de 400 mL. Repita a eluição da coluna com duas porções de 25 mL de TCTFE. Deixe cada eluente escoar até o topo da camada de sulfato de sódio antes das próximas adições. Concentre as soluções eluídas de TCTFE a 5 mL em um rotavapor com banho-maria a 30°C. Transfira os concentrados para um frasco concentrador graduado de 10 mL, com pipetador automático ou pipeta tipo Pasteur. Lave cada frasco tipo pêra com 3 porções de 1 mL de TCTFE e transfira para o frasco concentrador respectivo. Colo-

que os frascos em um banho-maria a 30°C e concentre as soluções à secura sob leve fluxo de nitrogênio. Adicione 2 mL de acetonitrila-metanol (1:1) e leve ao ultra-som por 3 minutos. Filtre a solução em membranas de 0,45 µm. Submeta à cromatografia líquida de alta eficiência. Os cromatogramas dos solventes devem estar livres de picos interferentes e a recuperação para o benzo(*a*)pireno (B*a*P) deve ser maior que 90%.

Fase móvel
Solvente A: acetonitrila-metanol (1:1)
Solvente B: água
Filtre os solventes A e B através de membranas de 0,45 µm e degaseifique.

Solventes
para extração – Água saturada com TCTFE e água saturada com ciclohexano. Em um funil de separação, sature a água com o solvente específico em excesso, agite e descarte a fase orgânica.

Procedimento – Ajuste o detector de fluorescência para os seguintes comprimentos de onda: λ_{ex} = 295 nm e λ_{em} = 405 nm. Ajuste a proporção da fase móvel para 80% do solvente A e 20% do solvente B, o fluxo para 1 mL/min e a temperatura para 35°C. Programe o gradiente da fase móvel como descrito abaixo:

Tabela 10 – Programação do gradiente da fase móvel

Tempo (min)	% Solvente A (acetonitrila-metanol 1:1)	% Solvente B (água)
0	80	20
20	100	0
40	100	0
45	80	20
65	80	20

Triture a amostra e dissolva 25 g em 500 mL e m um balão de fundo redondo para ebulição, com algumas pérolas de vidro. Adicione 100 mL de álcool e 4 g de hidróxido de potássio. Coloque o frasco na manta de aquecimento, adapte o condensador de bolas e deixe digerindo por 2 horas. Deixe esfriar à temperatura ambiente. Coloque lã de vidro em um funil e umedeça com álcool, passe a solução fria através da lã de vidro e recolha o filtrado em um funil de separação de 500 mL. Faça lavagens seqüenciais com 90 mL de água saturada com TCTFE, 40 mL de TCTFE e 50 mL de álcool, recolha as soluções no funil de separação de 500 mL. Feche o funil e então inverta e abra a torneira enquanto agita suavemente o conteúdo por al-

guns segundos para escape. Feche a torneira e extraia agitando o funil por 2 minutos. Deixe as camadas separarem e então escoe a camada de TCTFE através da coluna cromatográfica (como preparada anteriormente). Repita as extrações com 2 porções de 40 mL de TCTFE. Deixe cada extrato percolar a coluna e colete aproximadamente 300 mL em um frasco tipo pêra. Quando o terceiro extrato atingir o topo da camada de sulfato de sódio, adicione 50 mL de TCTFE para lavagem da coluna e colete este eluído no frasco. Adicione 10 mL de DMSO à solução no frasco e evapore o TCTFE em um rotavapor com banho a 30°C, deixando o DMSO. Transfira quantitativamente o concentrado de DMSO para um funil de separação de 125 mL, usando 5 mL de DMSO em pequenas porções. Lave o frasco com 50 mL e adicione as lavagens ao funil. Agite o funil para extração por 2 minutos. Depois que as fases se separarem, descarte a camada inferior para um funil de separação de 250 mL contendo 25 mL de ciclohexano e 90 mL de água saturada com ciclohexano. Repita a extração de ciclohexano no funil de 125 mL com duas alíquotas de 15 mL de DMSO. Adicione os extratos de DMSO ao funil de 250 mL, agite vigorosamente por 2 minutos para extração. Depois da separação das fases, transfira a camada inferior para outro funil de 250 mL contendo 25 mL de ciclohexano e agite por 2 minutos para extração. Depois da separação das fases, descarte a camada inferior, aquosa. Combine os dois extratos de ciclohexano no primeiro funil de 250 mL. Lave o segundo funil de 250 mL com duas alíquotas de 10 mL de ciclohexano e adicione as lavagens ao primeiro funil de 250 mL. Lave a solução, duas vezes, com suave agitação por 15 segundos com 100 mL de água saturada com ciclohexano. Descarte a camada aquosa depois de cada lavagem. Coloque 10 g de alumina desativada (10% de água) seguida por 50 g de Na_2SO_4 em um funil de Büchner de 60 mL. Lave com 50 mL de ciclohexano e descarte. Passe os extratos combinados de ciclohexano do funil de separação, através do funil de Büchner para um frasco tipo pêra de 400 mL. Lave o funil de separação com duas alíquotas de 25 mL de ciclohexano, e passe cada uma através do funil de Büchner para o frasco. Use um rotavapor com banho-maria a 40°C, até reduzir o volume para cerca de (2-5) mL. Transfira o conteúdo quantitativamente para o frasco concentrador usando um pipetador automático ou pipeta tipo Pasteur, utilizando 5 mL ou menos de ciclohexano para lavagem. Leve o conteúdo do tubo à secura em banho-maria a 30°C sob uma suave corrente de nitrogênio. Leve para 2 mL com acetonitrila-metanol (1:1) e deixe no ultra-som por 3 minutos. Filtre o extrato para um flaconete de 2 mL. Injete 20 µL do extrato de amostra ou da solução-padrão na coluna Lichrosphere 100 RP-18 (5 µm) ou equivalente e inicie a programação de gradiente de fase móvel. Entre as injeções, lave o *loop* de amostra. Compare os tempos de retenção do pico observado com o padrão de benzo(*a*)pireno cromatografado sob as mesmas condições. Injete o padrão a cada 3 amostras. Calcule a quantidade de benzo(*a*)pireno no extrato de amostra pelo procedimento de padrão externo.

Cálculo

$$\frac{A_a \times M_p}{A_p} = \text{massa de benzo(a)pireno, em ng}$$

A_a = área do pico da amostra de benzo(a)pireno no extrato da amostra
A_p = área do pico de padrão externo de benzo(a)pireno
M_p = massa de padrão externo de benzo(a)pireno na injeção

Finalize o cálculo, levando em consideração as diluições efetuadas e o peso inicial de amostra.

Referências bibliográficas

YABIKU, H.Y.; MARTINS, M.S.; TAKAHASHI, M.Y. Levels of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. **Food Addit. and Contam.**, v. 10(4), p. 399-405, 1984.

JOE Jr, F.L.; SALEMME, J.; FAZIO, T. Liquid chromatographic of trace residues of polynuclear aromatic hydrocarbons in smoked foods **J. Assoc. Off. Anal. Chem**., v. 67(6), p. 1076-1082, 1982.

Colaboradores:

Iracema de A. Tamura; Maristela Satou Martins e Nelson Aranha Dias.

CAPÍTULO **VI**

ANÁLISE SENSORIAL

1ª Edição Digital

VI ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é realizada em função das respostas transmitidas pelos indivíduos às várias sensações que se originam de reações fisiológicas e são resultantes de certos estímulos, gerando a interpretação das propriedades intrínsecas aos produtos. Para isto é preciso que haja entre as partes, indivíduos e produtos, contato e interação. O estímulo é medido por processos físicos e químicos e as sensações por efeitos psicológicos. As sensações produzidas podem dimensionar a intensidade, extensão, duração, qualidade, gosto ou desgosto em relação ao produto avaliado. Nesta avaliação, os indivíduos, por meio dos próprios órgãos sensórios, numa percepção somato-sensorial, utilizam os sentidos da visão, olfato, audição, tato e gosto.

Visão

No olho humano, ocorre um fenômeno complexo se um sinal luminoso incide sobre a capa fotossensível, a retina, provocando impulsos elétricos que, conduzidos pelo nervo óptico ao cérebro, geram a sensação visual que é, então, percebida e interpretada. O olho, como órgão fotorreceptor, percebe a luz, o brilho, as cores, as formas, os movimentos e o espaço. As cores são percebidas pelo indivíduo fisiologicamente normal quando a energia radiante da região visível do espectro (380 a 760) nm atinge a retina. As características da cor são, essencialmente, o tom ou matiz, a saturação ou grau de pureza e a luminosidade ou brilho. Na avaliação da acuidade visual de indivíduos, alguns testes podem ser aplicados como, por exemplo, o de Munsell - Farnsworth 100 Hue Test (GretagMacbeth, 1997).

Olfato

A mucosa do nariz humano possui milhares de receptores nervosos e o bulbo olfativo está ligado no cérebro a um "banco de dados" capaz de armazenar, em nível psíquico, os odores sentidos pelo indivíduo durante toda a vida. Na percepção do odor, as substâncias

desprendidas e aspiradas são solubilizadas pela secreção aquosa que recobre as terminações ciliadas, entrando em contato com os receptores nervosos e produzindo impulsos elétricos. Estes, quando chegam ao cérebro, geram informações que, comparadas aos padrões conhecidos por ele se encaixam como num sistema de "chave-fechadura". Em média, o ser humano pode distinguir de 2000 a 4000 impressões olfativas distintas. Para avaliar o poder de discriminação, certas substâncias químicas comuns ou raras podem ser apresentadas ao indivíduo para reconhecimento e identificação, como por exemplo: acético, alcoólico, amoníaco, sulfídrico, pinho, lenhoso, cítrico, caramelo, mentol, eugenol, etc.

Audição

O ouvido humano tem a função de converter uma fraca onda mecânica no ar em estímulos nervosos que são decodificados e interpretados por uma parte do cérebro, o córtex auditivo, de forma a reconhecer diferentes ruídos. Para avaliar a capacidade de discriminação de indivíduos, algumas características peculiares dos produtos podem ser empregadas utilizando simultaneamente os sentidos da audição e tato, como por exemplo: a dureza do pé-de-moleque, a crocância do biscoito ou da batata frita, a mordida da maçã ou da azeitona e o grau de efervescência da bebida carbonatada, cujos sons ou ruídos são reconhecidos pela quebra e mordida entre os dentes e o borbulhar do alimento.

Tato

É toda sensibilidade cutânea humana. É o reconhecimento da forma e estado dos corpos por meio do contato direto com a pele. Ao tocar o alimento com as mãos ou com a boca, o indivíduo facilmente avalia sua textura, mais do que quando utiliza a visão e a audição. A textura, considerada como o grau da dureza, é definida como a força requerida para romper uma substância entre os dentes molares (sólidos) ou entre a língua e o palato (semi-sólidos). Para avaliar o poder de discriminação dos indivíduos, podem ser apresentados para reconhecimento alguns produtos de diferentes graus de dureza, como, por exemplo: a amêndoa (dura), a azeitona (firme), o requeijão (mole), etc.

Gosto

Na boca, a língua é o maior órgão sensório e está recoberta por uma membrana cuja superfície contém as papilas, onde se localizam as células gustativas ou botões gustativos e os corpúsculos de Krause, com as sensações táteis. O mecanismo de transmissão da sensação gustativa se ativa quando estimulado por substâncias químicas solúveis que se difundem pelos poros e alcançam as células receptoras que estão conectadas, de forma única ou conjuntamente com outras, a uma fibra nervosa que transmite a sensação ao cére-

bro. A sensibilidade não se limita apenas à língua, pois outras regiões também respondem aos estímulos, como o palato duro, amídalas, epiglote, mucosa dos lábios, as bochechas e superfície inferior da boca. A percepção mais conhecida envolve quatro gostos primários: doce, salgado, ácido e amargo, sendo citado também o umami. Algumas soluções químicas em concentrações diferentes são utilizadas para avaliar o poder de discriminação pelo reconhecimento, como por exemplo: a sacarose, 5,76 g/L (doce); o cloreto de sódio, 1,19 g/L (salgado); a cafeína, 0,195 g/L (amargo); o ácido cítrico, 0,43 g/L (ácido); o glutamato monossódico, 0,595 g/L (umami) e o sulfato heptahidratado de ferro II, 0,00475 g/L (metálico) (ISO/DIS 3972/1979). O espectro de gostos também pode incluir a presença de gostos secundários (alcalino e metálico) e os elementos sensíveis à química comum (adstringente, refrescante, ardente, quente e frio). As sensações denominadas "picantes" também definidas como "ardentes" ou "pungentes", não são consideradas estímulos puros, pois se percebe em toda a língua e garganta.

Preparo e apresentação de amostras

Os procedimentos de preparo e apresentação de amostras são etapas críticas e devem ser padronizados segundo o tipo, a espécie ou a variedade de produto. Basicamente, recomendam-se os seguintes procedimentos:

- Amostra representativa e, se necessário, acompanhada da amostra de referência ou padrão, similar, de mesma procedência, marca e/ou fabricante, que possa servir como comparação. Sempre na quantidade suficiente para análise e, se for o caso, com medidas de massa ou peso e volumes bem definidos.

- Modo de preparo adequado da amostra e, de preferência, conforme a orientação do fabricante nos rótulos. Durante o preparo, determinadas variações físicas devem ser controladas com utilização de cronômetros, termômetros ou termopares. Prepare todas as amostras de forma idêntica, estimando tempos mínimos e máximos de espera até a apresentação. Para todas as unidades de amostras, a porção, a quantidade, o formato e o tamanho (espessura) devem ser controlados segundo as características do produto.

- Amostras servidas em recipientes próprios ou os comumente utilizados nas refeições de indivíduos, como, por exemplo, recipientes de vidro, porcelana ou plásticos descartáveis. Se necessário, sirva em bandejas de cor branca ou neutra. Utilize talheres compatíveis, descartáveis ou não, guardanapos, toalhas absorventes e vasilhames para o descarte de resíduos. Todos os recipientes devem estar bem limpos, secos e livres de odores estranhos.

- Antes da apresentação da amostra verifique e controle a temperatura, sendo um importante fator de variação na percepção do odor e do sabor. Melhor avaliar a amostra na temperatura em que é normalmente consumida. Um grande número de produtos pode ser avaliado em sua temperatura ambiente. O **Quadro 1** indica algumas faixas de temperaturas usualmente empregadas na avaliação sensorial de alimentos.

- As condições ambientais devem ser controladas antes da análise sensorial levando em consideração a utilização de cabines individuais, o grau de luminosidade, temperatura climatizada adequada, ausência de ruídos e odores estranhos.

Quadro 1 – Faixas de temperaturas indicadas para avaliação do odor e sabor em alguns produtos alimentícios

Produto	Temperatura (ºC)
Água	20 – 22
Alimentos preparados quentes	35 – 45
Bebida carbonatada	06 – 10
Café	68 – 71
Cerveja	04 – 05
Chá	68 – 71
Leite	07 – 10
Licores destilados	20 – 22
Manteiga e margarina	20 – 22
Maionese	20 – 22
Óleos comestíveis	40 – 43
Pão	20 – 22
Sopa	68 – 71
Sorvete	10 – 12
Vinho	20 – 22 ou gelado

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (Baseado em ELLIS, 1961).

Formação da equipe sensorial

Uma equipe sensorial efetiva deve ser formada a partir de critérios específicos que podem influir na percepção do indivíduo que avalia um produto, como os fatores ligados à fisiologia (receptores sensoriais, sistema nervoso), psicologia (relação estímulo-resposta) e sociologia (idade, sexo, etnia, hábitos alimentares, grau de instrução). Na escolha de indivíduos que irão compor a equipe sensorial, alguns requisitos devem ser considerados, tais como:

- O indivíduo deve estar ciente de que a participação nos testes é espontânea e voluntária. Verifique se cada membro da equipe tem interesse, disponibilidade, pontualidade, tranqüilidade e vontade de avaliar grande parte das categorias de produtos nos dias marcados para teste, seleção e treinamento previamente agendados.

- Verifique se o candidato revela boa forma de expressão, habilidade verbal e vocabulário próprio que possa definir e descrever adequadamente os atributos sensoriais. Deve-se evitar qualquer tipo de comunicação com os colegas durante os testes, pois a resposta de cada um é própria, independente e de responsabilidade exclusiva.

- O candidato deve apresentar boas condições de saúde, ausência de gripes e alergias, comunicando quando houver doenças como diabetes, hipercolesterolemia ou qualquer outra. Evite o indivíduo que use aparelho dentário corretivo, pois os dentes têm papel importante na avaliação sensorial. Evite os fumantes, caso contrário, alerte a não fumar pelo menos uma hora antes dos testes.

- Avalie a acuidade sensorial e o poder de discriminação para cores, textura, odores e gostos primários. Fique atento nos casos de ocorrência de anomalias nos órgãos da visão, olfato, audição e paladar. A faixa etária recomendável situa-se entre 18 a 50 anos, pois, após esta idade o indivíduo pode revelar certa dessensibilização dos órgãos sensores.

- Oriente o julgador a não fazer uso de cosméticos e perfumes fortes e a não consumir alimentos muito picantes nos dias marcados para os testes. Os medicamentos também podem influenciar na sensibilidade do gosto do indivíduo.

Características sensoriais

Método subjetivo utilizado para avaliar as características sensoriais de alimentos, bebidas e água. Este método considera as opiniões de indivíduos na interpretação de efeitos do estímulo sensorial, simples ou múltiplos, segundo as impressões percebidas pelos órgãos sensórios (visão, olfato, gosto, tato e audição) que irão gerar as interpretações e descrições das propriedades intrínsecas aos produtos. A forma de definir atributos sensoriais é descrever os componentes relativos às propriedades dos produtos, como os seguintes:

Aparência – Refere-se às propriedades visíveis como o aspecto, cor, transparência, brilho, opacidade, forma, tamanho, consistência, espessura, grau de efervescência ou carbonatação e as características de superfície. A cor, propriedade capaz de provocar estimulação da retina por raios luminosos de comprimentos de onda variáveis, tem sua percepção limitada à fonte de luz, devendo ser avaliada com iluminação adequada como, por exemplo, a luz

do dia, natural ou artificial. Na avaliação, geralmente, são utilizadas cabines especiais de controle visual de cores. Ela também é definida com maior coerência e uniformidade, por meio de quadros cromáticos, discos ou dicionários de cor. Na avaliação da aparência e cor, um quadro com expressões usuais e comuns poderá auxiliar na sua melhor denominação (**Quadro 2**).

Odor e aroma – O odor é perceptível pelo órgão olfativo quando certas substâncias voláteis são aspiradas e o aroma, via retronasal durante a degustação. O julgador deve aproximar a amostra da narina e dar cheiradas curtas, evitando longas inalações que cansem o olfato pela adaptação. O cansaço olfativo pode ser amenizado se for cheirada a pele do próprio pulso ou por outro aroma que neutralize o anterior. Nesta avaliação, pode-se fazer comparações com padrões de referência conhecidos, que serão identificados e descritos pelos seus odores ou aromas peculiares. No **Quadro 3** são citados alguns termos usuais e comuns para produtos alimentícios.

Textura oral e manual – Refere-se às propriedades reológicas e estruturais (geométricas e de superfície) dos produtos. Geralmente é percebida por três ou quatro sentidos: os receptores mecânicos, táteis e, eventualmente, os visuais e auditivos. Relaciona-se com a sensibilidade térmica e cinestésica. A avaliação da textura é mais complexa nos alimentos sólidos, como nos ensaios de corte, compressão, relaxação, penetração, cisalhamento, dobramento, etc. O julgador deve utilizar a pele da mão, da face e/ou da boca (cavidade bucal e dentes). Quando avaliado pela boca pode ser definido como sensação bucal, utilizando-se também termos como: adstringente, metálico, quente, frio, etc. Algumas sensações são também nasais, como: pungente, refrescante, etc. Uma listagem de termos próprios pode ser utilizada para melhor definição das propriedades de textura (**Quadro 2**).

Sabor e gosto – É considerada como uma experiência mista, mas unitária de sensações olfativas, gustativas e táteis percebidas durante a degustação. O sabor é percebido, principalmente, através dos sentidos do gosto e olfato, também influenciado pelos efeitos táteis, térmicos, dolorosos e/ou cinestésicos. O julgador deve tomar uma certa quantidade da amostra, sem excessos, e proceder à deglutição, tomando o cuidado em evitar a fadiga sensorial. Entre uma amostra e outra é aconselhável lavagem da cavidade oral com água filtrada ou a neutralização do paladar ingerindo-se uma maçã, pão ou biscoito tipo *cream craker*. O julgador deve evitar sensações fortes de gostos pelo menos 30 minutos antes do teste, não deve apresentar nenhuma indisposição no organismo. Alguns termos usuais e comuns para o sabor estão descritos no **Quadro 3**.

Quadro 2 – Atributos de aparência, textura e cor comuns a produtos alimentícios

Aparência / Textura			Cor*	
Abaulada	Derretida	Manchada	Acromática	Marrom-avermelhado
Aderente	Dessecada	Massa	Alaranjada	Marrom-acinzentado
Adsorvida	Desintegrada	Maturada	Alaranjado-claro	Marrom-claro
Afilada	Depositada	Mofada	Alaranjado-escuro	Marrom-escuro
Aglomerada	Dura	Moída	Amarela	Marrom-esverdeado
Alongada	Efervescente	Mole	Amarelo-alaranjado	Rosada
Amanteigada	Elástica	Oleosa	Amarelo-âmbar	Rósea
Amassada	Embolorada	Ondulada	Amarelo-claro	Róseo-avermelhado
Amolecida	Entremeada	Pasta	Amarelo-cinzento	Róseo-claro
Aquosa	Esfarelenta	Pastilha	Amarelo-escuro	Róseo-escuro
Áspera	Esférica	Pastosa	Amarelo-esverdeado	Róseo-purpúreo
Avariada	Esmigalhada	Pegajosa	Amarelo-fosco	Róseo-violáceo
Bastão	Espessa	Película	Amarelo-ouro	Ocre
Bastonete	Espumante	Pó	Amarelo-pálido	Parda
Barra	Exsudato	Porosa	Amarelo-palha	Pardacenta
Borbulhante	Fatiada	Polpa	Amarelo-pardacento	Perolada
Borrachenta	Fermentada	Precipitada	Amarelo-torrado	Prateada
Brilhosa	Fibrosa	Prensada	Âmbar	Preta
Butirosa	Filete	Pulverulenta	Âmbar-escuro	Roxa
Calcinada	Fina	Quebradiça	Argentada	Verde
Caldo	Firme	Rachada	Azul	Verde-abacate
Caramelada	Floco	Rala	Azul-celeste	Verde-acinzentado
Coagulada	Floculosa	Recheada	Azul-claro	Verde-amarelado
Cobertura	Fluido	Recheio	Azul-escuro	Verde-azulado
Cominuída	Fresca	Repicada	Azul-esverdeada	Verde-bandeira
Compacta	Friável	Resíduo	Azul-marinho	Verde-claro
Comprimida	Fundida	Ressecada	Azul-piscina	Verde-escuro
Com cortes	Gasosa	Resistente	Azul-turquesa	Verde-esmeralda
Com depósito	Gaseificada	Retalhada	Bege	Verde-folha
Com fragmentos	Gelatinosa	Rija	Branca	Verde-garrafa
Com furos	Gomosa	Rodela	Branco-de-giz	Verde-mar
Com partículas	Gordurosa	Seca	Branco-amarelado	Verde-musgo
Com polpa	Grão	Sedimentada	Branco-marfim	Verde-oliva
Com precipitado	Granulada	Semidura	Branco-pérola	Verde-piscina
Com riscas	Granulosa	Semente	Branco-sujo	Vermelha
Congelada	Grossa	Sólida	Brilhante	Vermelho-alaranjado
Consistente	Grumosa	Solta	Brilho-metálico	Vermelho-arroxeado
Cozida	Grudenta	Suculenta	Castanha	Vermelho-cereja
Creme	Heterogênea	Tenra	Cinza	Vermelho-pardacento
Cremosa	Homogênea	Translúcida	Cinzenta	Vermelho-rosado
Cristal	Íntegra	Transparente	Cor opaca	Vermelho-rubro
Cristalino	Irregular	Tolete	Cor uniforme	Vermelho-violáceo
Cristalizada	Lâmina	Turva	Cor pálida	Vinho
Crocante	Limo	Uniforme	Creme	Violeta
Crosta	Limosa	Úmida	Dourada	Violeta-avermelhado
Crua	Líquida	Untuosa	Incolor	Violeta-azulado
Drágea	Límpida	Viscosa	Marrom	Violeta-claro
Deformada	Macia	Xarope	Marrom-amarelado	Violeta-escuro

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (Baseado em MELO, 1946).

* Relativa à tonalidade, luminosidade e saturação ou pureza. A cor pode ser primária (como: azul, vermelho e amarelo); secundária (misturas proporcionais das cores primárias, como: vermelho + amarelo = laranja; amarelo + azul = verde; azul + vermelho = violeta) e terciárias (misturas proporcionais das cores primárias e secundárias, como: branco + azul = azul claro; preto + branco = cinza; verde + amarelo = verde-amarelado; laranja + azul = marrom; branco + azul + vermelho = lilás; amarelo + vermelho + pouco preto = bege; verde forte + alaranjado + preto = verde azeitona; violeta + vermelho + preto = vinho, etc.)

Nota: as definições dos atributos citados podem ser encontradas na literatura, por intermédio de um glossário de termos empregados em análise sensorial.

Exemplos: consistente = propriedade de fluxo detectada pela estimulação dos receptores mecânicos e táteis, especialmente na cavidade oral, e que varia com a textura do produto; cristalino = relativo à forma e orientação das partículas ou cristais de um produto, como o açúcar cristal; crocante = produto duro que ao ser quebrado produz som característico, como da batata frita "chips"; efervescente = aquele que desprende gás carbônico na superfície, observado em bebidas gaseificadas ou carbonatadas; esfarelenta = que esfarela ou desintegra, como o bolo-de-fubá; fibrosa = propriedade da textura em relação à percepção da forma e presença de partículas, como fibras do palmito e manga espada; gomosa = relativa à energia necessária para desintegrar um produto semi-sólido a fim de que possa ser ingerido, resultado de um fraco grau de dureza e alto grau de coesão, como flocos de aveia bem cozidos. Líquido, ralo, untuoso, viscoso = propriedade de resistência ao escoamento, como a água (baixa), leite (média-baixa), creme de leite (média), cuja correspondência pode ser a viscosidade; macio, firme, dura = relativa à força necessária para obter dada deformação, penetração e/ou cizalhamento, como o queijo cremoso (macio-baixa resistência); azeitona (firme-média resistência); bala (dura-alta resistência); translúcida = aquela substância que permite a passagem da luz, mas não permite a distinção de uma imagem distinta; transparente = aquela substância que permite a passagem da luz e o aparecimento de uma imagem nítida.

Quadro 3 – Atributos de odor e sabor comuns a alguns produtos alimentícios

Odor e Sabor				
Ácido	Amanteigado	Cáustico	Graxo	Nauseante
Acre	Amendoado	Carbonatado	Impróprio	Odorífico
Acético	Amiláceo	Condimentado	Impuro	Picante
Achocolatado	Amoniacal	Cúprico	Inadequado	Penetrante
Açucarado	Anormal	Defumado	Inodoro	Perfumado
Adamascado	Ardente	Desagradável	Irritante	Próprio
Adoçado	Ardido	Desodorante	Insípido	Pungente
Adocicado	Apimentado	Diluído	Insosso	Putrefato
Adiposo	Aromático	Doce	Insuportável	Pútrido
Adstringente	Atípico	Enfumaçado	Horrível	Rançoso
Adulterado	Artificial	Enjoativo	Láctico	Refrescante
Afumado	Azedo	Envelhecido	Leve	Remanescente
Agradável	Azeitonado	Estragado	Licoroso	Repulsivo
Agre	Balsâmico	Estranho	Maresia	Salgado
Agridoce	Benzênico	Etéreo	Maturado	Salino
Aguado	Bouquet	Fermentado	Medicinal	Sápido
Alcalino	Butírico	Ferruginoso	Melado	Saponáceo
Alcoólico	Cacau	Fétido	Mentolado	Suave
Aliáceo	Café-com-leite	Floral	Metálico	Sulfuroso
Alterado	Cafeinado	Frutado	Mofado	Oxidado
Amargo	Caramelado	Frutoso	Natural	Queimado
Amargoso	Característico	Gorduroso	Normal	Velho

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (Baseado em MELO, 1946).

Nota: as definições dos atributos citados podem ser encontradas na literatura, por meio de um glossário de termos empregados em análise sensorial. Exemplos: acre = odor e sabor picante, irritante e áspero, como o do alho, fósforo e solução de ácido fórmico a 90% (p/v); agre = qualifica a sensação gustativa com predomínio ácido, onde alguns fatores que contribuem para esta sensação se relacionam a um processo de fermentação (acético ou láctico); adstringente = sensação produzida pela contração da mucosa da boca, como por uma solução aquosa diluída de alguns taninos, como do caqui ou banana verde; alcalino = sensação escorregadia devido à alcalinidade, como solução de bicarbonato de sódio; azedo = sensação complexa olfativa e/ou gustativa, geralmente devido à presença de ácidos orgânicos. Entretanto não pode ser usado como sinônimo de gosto primário ácido e pode ter algumas vezes, uma conotação hedônica negativa. Bouquet = conjunto de caracteres olfativos específicos de um produto, como vinho, licores; cúprico = com sabor de cobre, áspero e penetrante; estranho = aquele odor ou sabor não característico do produto; inodoro = qualifica um produto que não tem odor; insosso = ou "flat", produto que não atinge nível sensorial adequado, como sem sal,

sem tempero; metálico = sensação de metal na mucosa da boca; pungente = sensação de dor causada, por exemplo, ao cheirar uma solução de ácido acético (2-5%); sápido = qualifica um produto que produz sabor. O contrário é insípido = falta de sabor, ou que possui aroma e sabor típicos, mas em níveis inferiores ao que poderia conter o produto (sinônimo de insosso).

154/IV Análise das características sensoriais

Procedimento – Para análise das características sensoriais, o julgador deve expressar suas impressões em relação aos atributos sensoriais e descrevê-los utilizando vocabulário próprio, conforme modelo na **Ficha 1**. A reunião de julgadores se dá em torno de uma mesa redonda confortável, com as condições ambientais controladas, tais como: iluminação, temperatura, ausência de sons ou ruídos e livre de odores estranhos. Durante o teste, o julgador deve omitir-se de conversas paralelas. Depois, inicia-se uma conversação, na qual, por consenso, são definidos os termos ou componentes perceptíveis que melhor definem cada um dos atributos sensoriais e, conseqüentemente, a conclusão do resultado de análise. Recomenda-se que o número de julgadores selecionados seja no mínimo 3, de preferência número ímpar, para que, se houver divergência de opiniões, possa haver desempate, prevalecendo o resultado consensual da maioria.

Ficha 1 – Modelo para teste de características sensoriais

Amostra:	Julgador:	Data:
Aparência		
Odor e aroma		
Textura		
Sensação bucal		
Sabor e gosto		
Comentários		

Testes discriminativos

Os testes sensoriais discriminativos ou de diferença são considerados métodos objetivos utilizados em análise sensorial de alimentos, bebidas e água, com os efeitos das opiniões dos indivíduos minimizados. Medem atributos específicos pela discriminação simples, in-

dicando por comparações, se existem ou não diferenças estatísticas entre amostras. Exigem cuidados na padronização do preparo e apresentação das amostras e na formação da equipe sensorial. Todas as amostras devem ser codificadas com números aleatórios de três dígitos, casualizadas e apresentadas à equipe pré-selecionada e treinada. Os testes devem ser conduzidos em cabines individualizadas com controle das condições ambientais, tais como: iluminação, temperatura, ausência de sons ou ruídos e livre de odores estranhos. Os testes discriminativos ou de diferença mais empregados em análise sensorial são o triangular, duo-trio, ordenação, comparação pareada e comparação múltipla ou diferença do controle.

155/IV Testes discriminativos – Teste triangular

Procedimento – O teste triangular detecta pequenas diferenças entre amostras. São apresentadas simultaneamente três amostras codificadas, sendo duas iguais e uma diferente. Cabe ao julgador identificar a amostra diferente (**Ficha 2**). A escolha é forçada. A probabilidade de acertos é p = 1/3. A interpretação do resultado se baseia no número total de julgamentos versus o número de julgamentos corretos (**Quadro 4**). Se o número de julgamentos corretos for maior ou igual ao valor tabelado (**Tabela 1**), conclui-se que existe diferença significativa entre as amostras no nível de probabilidade correspondente. O número de julgadores selecionados deve ser de 20 a 40, embora apenas 12 possam ser utilizados quando as diferenças entre amostras são razoavelmente grandes. As amostras devem ser apresentadas casualizadas em igual número de vezes nas permutações distintas: AAB, BAA, ABA, ABB, BBA e BAB.

Ficha 2 – Modelo para teste triangular

Amostra:	Julgador:	Data:
Você está recebendo três amostras codificadas, sendo duas iguais e uma diferente. Identifique com um círculo a amostra diferente.		
_____	_____	_____
Comentários:		

Fonte: ABNT, NBR 12995, 1993.

Quadro 4 – Modelo de casualização e resultado do teste triangular

Amostra: Nº de codificação: (A) _____/_____ (B) _____/_____						
Nº	Nome do julgador	Ordem de apresentação			Resposta do julgador* (C) ou (E)	Comentários
1		A	A	B		
2		B	A	A		
3		A	B	A		
4		A	B	B		
5		B	B	A		
6		B	A	B		
7		A	A	B		
p						
nº de julgamentos totais						
nº de julgamentos corretos						
Valor tabelado (nível de probabilidade)						

* Correta (C)

Errada (E).

p = nº de julgadores

Tabela 1 – Teste triangular (unilateral, p = 1/3). Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância a vários níveis de probabilidade.

Nº total de julgamentos	Níveis de probabilidade (α)						
	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,1%
5	4	5	5	5	5	5	-
6	5	5	5	5	6	6	-
7	5	6	6	6	6	7	7
8	6	6	6	6	7	7	8
9	6	7	7	7	7	8	8
10	7	7	7	7	8	8	9
11	7	7	8	8	8	9	10
12	8	8	8	8	9	9	10
13	8	8	9	9	9	10	11
14	9	9	9	9	10	10	11
15	9	9	10	10	10	11	12
16	9	10	10	10	11	11	12
17	10	10	10	11	11	12	13
18	10	11	11	11	12	12	13
19	11	11	11	12	12	13	14
20	11	11	12	12	13	13	14
21	12	12	12	13	13	14	15
22	12	12	13	13	14	14	15
23	12	13	13	13	14	15	16
24	13	13	13	14	15	15	16
25	13	14	14	14	15	16	17
26	14	14	14	15	15	16	17
27	14	14	15	15	16	17	18
28	15	15	15	16	16	17	18
29	15	15	16	16	17	17	19
30	15	16	16	16	17	18	19
31	16	16	16	17	18	18	20
32	16	16	17	17	18	19	20
33	17	17	17	18	18	19	21
34	17	17	18	18	19	20	21
35	17	18	18	19	19	20	22
36	18	18	18	19	20	20	22
37	18	18	19	19	20	21	22
38	19	19	19	20	21	21	23
39	19	19	20	20	21	22	23
40	19	20	20	21	21	22	24
41	20	20	20	21	22	23	24
42	20	20	21	21	22	23	25
43	20	21	21	22	23	24	25
44	21	21	22	22	23	24	26
45	21	22	22	23	24	24	26
46	22	22	22	23	24	25	27
47	22	22	23	23	24	25	27
48	22	23	23	24	25	26	27
49	23	23	24	24	25	26	28
50	23	24	24	25	26	26	28
60	27	27	28	29	30	31	33
70	31	31	32	33	34	35	37
80	35	35	36	36	38	39	41
90	38	39	40	40	42	43	45
100	42	43	43	44	45	47	49

Fonte: ABNT, NBR 12995, 1993.

156/IV Testes discriminativos – Teste duo-trio

Procedimento – O teste duo-trio detecta diferença sensorial entre uma amostra e um padrão (P). São apresentados simultaneamente o padrão e duas amostras codificadas, sendo uma delas idêntica ao padrão. Cabe ao julgador identificar a amostra igual ao padrão (**Ficha 3**). A escolha é forçada. A probabilidade de acertos é de 50% (p = 1/2). A interpretação do resultado se baseia no número total de julgamentos versus o número de julgamentos corretos (**Quadro 5**). Se o número de julgamentos corretos for maior ou igual ao valor tabelado (**Tabela 2**), conclui-se que existe diferença significativa entre as amostras no nível de probabilidade correspondente. O número de julgadores deve ser no mínimo de sete julgadores especialistas ou no mínimo de 15 julgadores selecionados. As amostras podem ser apresentadas casualizadas nas permutações: AB, BA (para P = A) e AB, BA (para P = B).

Ficha 3 – Modelo para teste duo-trio

Amostra: Julgador: Data:

Você está recebendo uma amostra padrão (P) e duas amostras codificadas. Uma das amostras codificadas é igual ao padrão, faça um círculo nesta amostra.

_____ _____

Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 13169, 1994.

Quadro 5 – Modelo de casualização e resultado do teste duo-trio

Amostra:
nº de codificação: (P = A) (A)_____/ (B)_____ (P = B) (A)_____/ (B)_____

Nº	Nome do julgador	Ordem de apresentação		Resposta do julgador* (C) ou (E)	Comentários
1		A	B		
2		B	A		
3		A	B		
4		B	A		
5		A	B		
6		B	A		
p					
nº de julgamentos totais					
nº de julgamentos corretos					
Valor tabelado (nível de probabilidade)					

* Correta (C) Errada (E) p = nº de julgadores P = padrão

Tabela 2 – Teste duo-trio (unilateral p = 1/2). Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância a vários níveis de probabilidade.

Nº total de julgamentos	Níveis de probabilidade (α)						
	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,1%
7	7	7	7	7	7	-	-
8	7	7	8	8	8	8	-
9	8	8	8	8	9	9	-
10	9	9	9	9	10	10	10
11	9	9	10	10	10	11	11
12	10	10	10	10	11	11	12
13	10	11	11	11	12	12	13
14	11	11	11	12	12	13	13
15	12	12	12	12	13	13	14
16	12	12	13	13	14	14	15
17	13	13	13	14	14	15	16
18	13	14	14	14	15	15	16
19	14	14	15	15	15	16	17
20	15	15	15	16	16	17	18
21	15	15	16	16	17	17	18
22	16	16	16	17	17	18	19
23	16	17	17	17	18	19	20
24	17	17	18	18	19	19	20
25	18	18	18	19	19	20	21
26	18	18	19	19	20	20	22
27	19	19	19	20	20	21	22
28	19	20	20	20	21	22	23
29	20	20	21	21	22	22	24
30	20	21	21	22	22	23	24
31	21	21	22	22	23	24	25
32	22	22	22	23	24	24	26
33	22	23	23	23	24	25	26
34	23	23	23	24	25	25	27
35	23	24	24	25	25	26	27
36	24	24	25	25	26	27	28
37	24	25	25	26	26	27	29
38	25	25	26	26	27	28	29
39	26	26	26	27	28	28	30
40	26	27	27	27	28	29	30
41	27	27	27	28	29	30	31
42	27	28	28	29	29	30	32
43	28	28	29	29	30	31	32
44	28	29	29	30	31	31	33
45	29	29	30	30	31	32	34
46	30	30	30	31	32	33	34
47	30	30	31	31	32	33	35
48	31	31	31	32	33	34	36
50	32	32	33	34	34	35	37
60	37	38	38	39	40	41	43
70	43	43	44	45	46	47	49
80	48	49	49	50	51	52	55
90	54	54	55	56	57	58	61
100	59	60	60	61	63	64	66

Fonte: ABNT, NBR 13169, 1994.

157/IV Testes discriminativos – Teste de ordenação

Procedimento – O teste de ordenação avalia três ou mais amostras, simultaneamente, ordenando-as em relação à intensidade de um atributo específico ou de sua preferência. Não quantifica o grau da diferença ou preferência entre amostras. Este teste pode ser aplicado para pré-seleção entre grande número de amostras. Uma série de três ou mais amostras codificadas aleatorizadas é apresentada ao julgador para que ordene em ordem crescente ou decrescente da intensidade do atributo específico ou mais preferido (**Ficha 4**). O resultado é dado pela soma das ordens obtidas dos julgadores a cada uma das amostras (**Quadro 6**). A avaliação estatística deve ser feita pelo teste de Friedman utilizando a tabela de Newell e MacFarlane para verificar se há ou não diferença significativa entre amostras. Se a diferença entre as somas das ordens for maior ou igual ao valor tabelado, conclui-se que existe diferença significativa entre as amostras ao nível de significância correspondente. O número de julgadores deve ser no mínimo de cinco especialistas ou 15 julgadores selecionados. Para o teste de preferência em laboratório, utilizam-se 30 ou mais julgadores e, para o teste de consumidor, 100 ou mais. As amostras devem ser apresentadas de forma balanceada ou casualizada.

Ficha 4 – Modelo para teste de ordenação

Amostra: Julgador: Data:
Você está recebendo quatro amostras codificadas. Avalie cada uma, colocando-as em ordem crescente da intensidade do atributo específico.
_____ _____ _____ _____ primeira segunda terceira quarta
Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 13170 / 1994.

Quadro 6 – Modelo de casualização e tabulação de resultado do teste de ordenação

Amostra: nº de codificação: (A)_____ (B)_____ (C)_____ (D)_____						
nº	Nome do julgador	Ordem de apresentação				Comentários
1		A	B	C	D	
2		A	C	B	D	
3		B	A	D	C	
4		B	C	A	D	
5		C	D	B	A	
4		C	A	D	B	
5		D	B	A	C	
6		D	C	B	A	
7		A	B	C	D	
p						
Tipos de amostras ou tratamentos		(A)	(B)	(C)	(D)	
Soma das ordens		Σ (A)	Σ(B)	Σ(C)	Σ(D)	
nº de julgamentos (p)						
nº de amostras ou tratamentos (t)						
Valor tabelado (nível de significância)						

Teste de Friedman – Com o número de amostras ou tratamentos avaliados (t) e o número de julgamentos (p) obtidos, utiliza-se a tabela de Newel e MacFarlane (**Tabelas 3** ou **4,** respectivamente, para os níveis de significância de 5% e 1%), para obter a diferença crítica entre os totais de ordenação. Se as diferenças entre as soma das ordens de duas amostras **(Quadro 7)** diferirem por um valor maior ou igual ao valor tabelado (crítico), existe diferença significativa entre elas ao nível testado.

Quadro 7 – Módulos de diferenças entre somas das ordens de amostras

Amostras	(A)	(B)	(C)	(D)
Somatória total	Σ (A)	Σ (B)	Σ (C)	Σ(D)
Diferenças versus A	-	Σ (A) - Σ (B)	Σ (A) - Σ(C)	Σ (A) - Σ(D)
Diferenças versus B	-	-	Σ (B) - Σ(C)	Σ(B) - Σ (D)
Diferenças versus C	-	-	-	Σ (C) - Σ(D)

Nota: para saber quais amostras diferem entre si, primeiro coloque-as em ordem crescente da somatória total e, depois, dê letras diferentes para as que diferirem por um número maior ou igual ao valor tabelado e letras iguais para as que não diferirem entre si.

Tabela 3 – Valores críticos para comparação com os módulos das diferenças entre as somas das ordens do teste de ordenação, a 5% de significância

Nº de julgamentos	nº de amostras ou tratamentos									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	8	11	14	17	21	24	27	30	34	37
6	9	12	15	19	22	26	30	34	37	42
7	10	13	17	20	24	28	32	36	40	44
8	10	14	18	22	26	30	34	38	43	47
9	10	15	19	23	27	32	36	41	46	50
10	11	15	20	24	29	34	38	43	48	53
11	11	16	21	25	30	35	40	45	51	56
12	12	17	22	27	32	37	42	48	53	58
13	12	18	23	28	33	39	44	50	55	61
14	13	18	24	29	34	40	46	52	57	63
15	13	19	24	30	36	42	47	53	59	66
16	14	19	25	31	37	42	49	55	61	67
17	14	20	26	32	38	44	50	56	63	69
18	15	20	26	32	39	45	51	59	65	71
19	15	21	27	33	40	46	53	60	66	73
20	15	21	28	34	41	47	54	61	68	75
21	16	22	28	35	42	49	56	63	70	77
22	16	22	29	36	43	50	57	64	71	79
23	16	23	30	37	44	51	58	65	73	80
24	17	23	30	37	45	52	59	67	74	82
25	17	24	31	38	46	53	61	68	76	84
26	17	24	32	39	46	54	62	70	77	85
27	18	25	32	40	47	55	63	71	79	87
28	18	25	33	40	48	56	64	72	80	89
29	18	26	33	41	49	57	65	73	82	90
30	19	26	34	42	50	58	66	75	83	92
31	19	27	34	42	51	59	67	76	85	93
32	19	27	35	43	51	60	68	77	85	95
33	20	27	36	44	52	61	70	78	87	96
34	20	28	36	44	53	62	71	79	89	98
35	20	28	37	45	54	63	72	81	90	99
36	20	29	37	46	55	63	73	82	91	100
37	21	29	38	46	55	64	74	83	92	102
38	21	29	38	47	56	65	75	84	94	103
39	21	30	39	48	57	66	76	85	95	105
40	21	30	39	48	57	67	76	86	96	106
41	22	31	40	49	58	68	77	87	97	107
42	22	31	40	49	59	69	78	89	98	109
43	22	31	41	50	60	69	79	89	99	110
44	22	32	41	51	60	70	80	90	101	111
45	23	32	41	51	61	71	81	91	102	112
46	23	32	42	52	62	72	82	92	103	114
47	23	33	42	52	62	72	83	93	104	115
48	23	33	43	53	63	73	84	94	105	116
49	24	33	43	53	64	74	85	95	106	117
50	24	34	44	54	64	75	85	95	107	118
55	25	35	46	56	67	78	90	101	112	124
60	26	37	48	59	70	82	94	105	117	130
65	27	38	50	61	73	85	97	110	122	135
70	28	40	52	64	76	88	101	114	127	140
75	29	41	53	66	79	91	105	118	131	145
80	30	42	55	68	81	94	108	122	136	150
85	31	44	57	70	84	97	111	125	140	154
90	32	45	58	72	86	100	114	129	144	159
100	34	47	61	76	91	105	121	136	151	167

Fonte: ABNT – NBR 13170, 1994.

Tabela 4 – Valores críticos para comparação com os módulos das diferenças entre as somas das ordens do teste de ordenação, a 1% de significância

Nº de julgamentos	nº de amostras ou tratamentos									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	9	13	16	19	23	26	30	33	37	41
6	10	14	18	21	25	29	33	37	41	45
7	11	15	19	23	28	32	36	40	45	49
8	12	16	21	25	30	34	39	43	48	53
9	13	17	22	27	32	36	41	46	51	56
10	13	18	23	28	33	38	44	49	54	59
11	14	19	24	30	35	40	46	51	57	63
12	15	20	26	31	37	42	48	54	60	66
13	15	21	27	32	38	44	50	56	62	68
14	16	22	28	34	40	46	52	58	65	71
15	16	22	28	35	41	48	54	60	67	74
16	17	23	30	36	43	49	56	63	70	77
17	17	24	31	37	44	51	58	65	72	79
18	18	25	31	38	45	52	60	67	74	81
19	18	25	32	39	46	54	61	69	76	84
20	19	26	33	40	48	55	63	70	78	86
21	19	27	34	41	49	56	64	72	80	88
22	20	27	35	42	50	58	66	74	82	90
23	20	28	35	43	51	59	67	75	84	92
24	21	28	36	44	52	60	69	77	85	94
25	21	29	37	45	53	62	70	79	87	96
26	22	29	38	46	54	63	71	80	89	98
27	22	30	38	47	55	64	73	82	91	100
28	22	31	39	48	56	65	74	83	92	101
29	23	31	40	48	57	66	75	85	94	103
30	23	32	40	49	58	67	77	86	95	105
31	23	32	41	50	59	69	78	87	97	107
32	24	33	42	51	60	70	79	89	99	108
33	24	33	42	52	61	71	80	90	100	110
34	25	34	43	52	62	72	82	92	102	112
35	25	34	44	53	63	73	83	93	103	113
36	25	35	44	54	64	74	84	94	105	115
37	26	35	45	55	65	75	85	95	106	117
38	26	36	45	55	66	76	86	97	107	118
39	26	36	46	56	66	77	87	98	109	120
40	27	36	47	57	67	78	88	99	110	121
41	27	37	47	57	68	79	90	100	112	123
42	27	37	48	58	69	80	91	102	113	124
43	28	38	48	59	70	81	92	103	114	126
44	28	38	49	60	70	82	93	104	115	127
45	28	39	49	60	71	82	94	105	117	128
46	28	39	50	61	72	83	95	106	118	130
48	29	40	51	62	74	85	97	109	121	133
50	30	41	52	63	75	87	99	111	123	135
60	32	45	57	60	82	95	108	121	135	148
70	35	48	61	75	89	103	117	131	146	160
80	37	51	66	80	95	110	125	140	156	171
100	42	57	73	89	106	123	140	157	174	191

Fonte: ABNT, NBR 13170, 1994

158/IV Testes discriminativos – Teste de comparação pareada

Procedimento – O teste de comparação pareada pode ser direcional, detectando pequenas diferenças entre amostras quanto a um atributo específico ou estabelecendo a existência de uma preferência. Pode ser aplicado para selecionar e treinar julgadores. Duas amostras são apresentadas simultaneamente. Cabe ao julgador identificar a amostra codificada que apresenta o atributo específico diferente (**Ficha 5**) ou a amostra preferida. Ao julgador deve-se fazer uma pergunta específica relevante, referindo-se à diferença, diferença direcional ou preferência. Perguntas sobre diferença e preferência não devem ser combinadas. A escolha é forçada. A probabilidade de acertos é de 50% (p = 1/2). A interpretação do resultado se baseia no número de julgamentos totais versus o número de julgamentos corretos. Se o número de julgamentos corretos for maior ou igual ao valor tabelado (**Tabela 5**, unilateral e bilateral) conclui-se que existe diferença significativa entre as amostras ao nível de probabilidade correspondente (**Quadro 8**). O teste unilateral é utilizado quando *a priori* se sabe que existe diferença entre amostras, mas, deseja saber se esta diferença é perceptível sensorialmente. O teste bilateral é empregado quando não se sabe se existe diferença entre amostras ou na avaliação da preferência. O número de julgadores selecionados deve ser no mínimo 15, porém com equipe altamente treinada pode-se trabalhar com 8 a 9 julgadores. Ao julgador deve ser fornecido um ou mais pares de amostras codificadas, apresentadas em ordem balanceada ou ao acaso nas permutações AB e BA.

Ficha 5 – Modelo para teste de comparação pareada

Amostra: Julgador: Data:
Você está recebendo duas amostras codificadas. Uma amostra codificada é mais intensa no atributo (especificar). Identifique-a com um círculo.
_____ _____
Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 13088, 1994.

Quadro 8 – Modelo de casualização e resultado para comparação pareada

Amostra: nº de codificação: (A) _____ (B) _____					
nº	**Nome do julgador**	**Ordem de apresentação**		**Resposta do julgador* (C) ou (E)**	**Comentários**
1		A	B		
2		B	A		
3		A	B		
4		B	A		
5		A	B		
6		B	A		
p					
nº de julgamentos totais (p)					
nº de julgamentos corretos					
Valor tabelado (nível de probabilidade)					

* Correta (C) Errada (E) p = nº de julgadores ou julgamentos

Tabela 5 – Teste de comparação pareada. Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância em vários níveis de probabilidade.

nº total de julgamentos	**Níveis de probabilidade (α)**					
	Bilateral (p=1/2), preferência			**Unilateral (p=1/2), diferença**		
	5%	**1%**	**0,1%**	**5%**	**1%**	**0,1%**
5	-	-	-	5	-	-
6	6	-	-	6	-	-
7	7	-	-	7	7	-
8	8	8	-	7	8	-
9	8	9	-	8	9	-
10	9	10	-	9	10	10
11	10	11	11	9	10	11
12	10	11	12	10	11	12
13	11	12	13	10	12	13
14	12	13	14	11	12	13
15	12	13	14	12	13	14
16	13	14	15	12	14	15
17	13	15	16	13	14	16
18	14	15	17	13	15	16
19	15	16	17	14	15	17
20	15	17	18	15	16	18
21	16	17	19	15	17	18
22	17	18	19	16	17	19
23	17	19	20	16	18	20
24	18	19	21	17	19	20
25	18	20	21	18	19	21
26	19	20	22	18	20	22
27	20	21	23	19	20	22
28	20	22	23	19	21	23
29	21	22	24	20	22	24
30	21	23	25	20	22	24

nº total de julgamentos	Níveis de probabilidade (α)					
	Bilateral (p=1/2), preferência			Unilateral (p=1/2), diferença		
	5%	1%	0,1%	5%	1%	0,1%
31	22	24	25	21	23	25
32	23	24	26	22	24	26
33	23	25	27	22	24	26
34	24	25	27	23	25	27
35	24	26	28	23	25	27
36	25	27	29	24	26	28
37	25	27	29	24	26	29
38	26	28	30	25	27	29
39	27	28	31	26	28	30
40	27	29	31	26	28	30
41	28	30	32	27	29	31
42	28	30	32	27	29	32
43	29	31	33	28	30	32
44	29	31	34	28	31	33
45	30	32	34	29	31	34
46	31	33	35	30	32	34
47	31	33	36	30	32	35
48	32	34	36	31	33	36
49	32	34	37	31	34	36
50	33	35	37	32	34	37
60	39	41	44	37	40	43
70	44	47	50	43	46	49
80	50	52	56	48	51	55
90	55	58	61	54	57	61
100	61	64	67	59	63	66

Fonte: ABNT, NBR 13088, 1994

159/IV Testes discriminativos – Teste de comparação múltipla

Procedimento – O teste de comparação múltipla ou diferença-do-controle avalia, simultaneamente, uma ou mais amostras quanto a um atributo específico, determinando a diferença e o grau da diferença em relação a um controle (C). Apresenta-se o controle (C), a amostra-controle codificada e uma ou mais amostras-teste codificadas. Cabe ao julgador avaliar e dar valores às amostras-teste codificadas em comparação ao controle através da escala de grau de diferença (**Ficha 6**) que poderá ser verbal, numérica ou mista. Para análise dos dados faça correspondência entre os valores verbais e numéricos. Deve-se comunicar ao julgador que uma das amostras pode ser igual ao controle. A interpretação do resultado (**Quadro 9**) é realizada por meio da análise de variância (**Quadro 10** – **Tabela 6**) e teste de comparação múltipla de médias. Quando o interesse é comparar amostra-teste com a amostra-controle, o teste apropriado é o de Dunnett, unilateral ou bilateral (**Tabelas 7** ou **8**). O número de julgadores deve ser no mínimo 7 especialistas ou, 15 treinados. As amostras são geralmente apresentadas em delineamento experimental de blocos completos balanceados ou casualizados.

Ficha 6 – Modelo para teste de comparação múltipla ou diferença-do-controle

Amostra: Julgador: Data:

Você está recebendo uma amostra controle (C) e três amostras codificadas. Compare cada uma com o controle quanto ao atributo (especificar). Expresse o valor da diferença utilizando a escala abaixo:

1	2	3	4	5
nenhuma	ligeira	moderada	muita	extrema

	valor
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 13526, 1995.

Quadro 9 – Modelo de casualização e resultados do teste de comparação múltipla ou diferença-do-controle

Amostra:
nº de codificação: (A = controle codificado) _____ (B) _____ (C) _____

nº	Nome do julgador	Ordem de apresentação			Comentários
1		A	B	C	
2		A	C	B	
3		B	C	A	
4		B	A	C	
5		C	A	B	
6		C	B	A	
p					
Soma de valores por amostra		Σ am (A)	Σ am (B)	Σ am (C)	Σ total $_{am}$
Soma de valores por julgador		Σ julg (1)	Σ julg (2)	Σ julg (3)	Σ total $_{julg}$
Média dos valores por amostra		Σ am(A)/p	Σ am(B)/p	Σ am(C)/p	
nº de julgadores ou julgamentos (p)					
nº de amostras ou tratamentos (n)					
nº de observações (N = n x p)					

Análise de Variância – Utilizando as fórmulas a seguir, realize a ANOVA tomando como orientação o **Quadro 10**.

Cálculos

$FC = (\Sigma \text{ total}_{am \text{ ou } julg})^2 / N$
$N = n \times p$
$SQ_{am} = \{[\Sigma_{am} (A)]^2 + [\Sigma_{am} (B)]^2 + [\Sigma_{am} (C)]^2 / p\} - FC$
$SQ_{julg} = \{[\Sigma_{julg} (1)]^2 + [\Sigma_{julg} (2)]^2 + [\Sigma_{julg} (3)]^2 / n\} - FC$
$SQ_{tot} = \Sigma$ (cada valor atribuído às amostras pelos julgadores) ^{2} - FC
$SQ_{res} = SQ_{tot} - (SQ_{am} + SQ_{julg})$

Quadro 10 – Modelo para análise de variância (ANOVA)

FV	GL	SQ	QM	Fc
Amostra	(n – 1)	SQ_{am}	$SQ_{am / n - 1}$	QM_{am} / QM_{res}
Julgador	(p – 1)	SQ_{julg}	$SQ_{julg / p - 1}$	QM_{julg} / QM_{res}
Resíduo	(N – 1) – (n – 1) – (p – 1)	SQ_{res}	$SQ_{res / N - n - p + 1}$	-
Total	(N – 1)	SQ_{tot}	-	-

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; Fo = valor observado de estatística "F" de Snedecor (**Tabela 6**); Fc = valor calculado.

Nota: se Fc_{am} for maior que Fo, existe diferença significativa ($p<0,05$) entre pelo menos duas amostras codificadas.

Diferença mínima significativa (DMS) pelo teste de Dunnett – Para verificar qual amostra-teste difere da amostra-controle (C) ao nível de significância de 5%, utilize a fórmula:

$$d \times \sqrt{\frac{2QM_{res}}{n}} = DMS$$

QM_{res} = quadrado médio do resíduo
n = número de repetições de cada amostra (número de julgadores)
d = valor crítico para teste unilateral ou bilateral de Dunnett (**Tabela 7** ou **8**)

As amostras que diferirem do controle codificado por uma diferença maior ou igual ao valor de DMS, são consideradas significativamente diferentes do controle ao nível de significância de 5%. Utilize o teste de Dunnett unilateral (**Tabela 7**) quando *a priori* sabe-se

que existe diferença entre amostras, ou bilateral (**Tabela 8**) quando não se sabe se existe diferença entre amostras.

Tabela 6 – Valores de F para o nível de erro α = 5%, segundo número de graus de liberdade de n_1 e n_2

n_2	n_1										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,70
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,03
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,60
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,31
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,10
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,94
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,82
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,72
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,63
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,56
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,51
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,45
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,41
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,37
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,34
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,31
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,28
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,26
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,24
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,22
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,20
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,18
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	2,16
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,15
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,14
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,12
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,04
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,95
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96	1,91	1,86

Fonte: ABNT, NBR 13526, 1995.

n_1 = graus de liberdade da causa de variação (amostra);

n_2 = graus de liberdade do resíduo.

Tabela 7 – Valores de d para teste de Dunnett, unilateral, nível de erro α = 5%, segundo o número de tratamentos P excluindo o controle, e o número de graus de liberdade do resíduo n^1

n^1	P								
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
5	2,02	2,44	2,68	2,85	2,98	3,08	3,16	3,24	3,30
6	1,94	2,34	2,56	2,71	2,83	2,92	3,00	3,07	3,12
7	1,89	2,27	2,48	2,62	2,73	2,82	2,89	2,95	3,01
8	1,86	2,22	2,42	2,55	2,66	2,74	2,81	2,87	2,92
9	1,83	2,18	2,37	2,50	2,60	2,68	2,75	2,81	2,86
10	1,81	2,15	2,34	2,47	2,56	2,64	2,70	2,76	2,81
11	1,80	2,13	2,31	2,44	2,53	2,60	2,67	2,72	2,77
12	1,78	2,11	2,29	2,41	2,50	2,58	2,64	2,69	2,74
13	1,77	2,09	2,27	2,39	2,48	2,55	2,61	2,66	2,71
14	1,76	2,08	2,25	2,37	2,46	2,53	2,59	2,64	2,69
15	1,75	2,07	2,24	2,36	2,44	2,51	2,57	2,62	2,67
16	1,75	2,06	2,23	2,34	2,43	2,50	2,56	2,61	2,65
17	1,74	2,05	2,22	2,33	2,42	2,49	2,54	2,59	2,64
18	1,73	2,04	2,21	2,32	2,41	2,48	2,53	2,58	2,62
19	1,73	2,03	2,20	2,31	2,40	2,47	2,52	2,57	2,61
20	1,72	2,03	2,19	2,30	2,39	2,46	2,51	2,56	2,60
24	1,71	2,01	2,17	2,28	2,36	2,43	2,48	2,53	2,57
30	1,70	1,99	2,15	2,25	2,33	2,40	2,45	2,50	2,54
40	1,68	1,97	2,13	2,23	2,31	2,37	2,42	2,47	2,51
60	1,67	1,95	2,10	2,21	2,28	2,35	2,39	2,44	2,48
120	1,66	1,93	2,08	2,18	2,26	2,32	2,37	2,41	2,45

Fonte: ABNT, NBR 13526, 1995.

Tabela 8 – Valores de d para teste de Dunnett, bilateral, nível de erro α = 5%, segundo o número de tratamentos P excluindo o controle, e o número de graus de liberdade do resíduo n^1

n^1	P								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,82	3,90	3,97
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,57	3,64	3,71
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,41	3,47	3,53
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,29	3,35	3,41
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,20	3,26	3,32
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,14	3,19	3,24
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,08	3,14	3,19
12	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,98	3,04	3,09	3,14
13	2,16	2,48	2,65	2,78	2,87	2,94	3,00	3,06	3,10
14	2,14	2,46	2,63	2,75	2,84	2,91	2,97	3,02	3,07
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	2,95	3,00	3,04

16	2,12	2,42	2,59	2,71	2,80	2,87	2,92	2,97	3,02
n[1]	**P**								
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
17	2,11	2,41	2,58	2,69	2,78	2,85	2,90	2,95	3,00
18	2,10	2,40	2,56	2,68	2,76	2,83	2,89	2,94	2,98
19	2,09	2,39	2,55	2,66	2,75	2,81	2,87	2,92	2,96
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,86	2,90	2,95
24	2,06	2,35	2,51	2,61	2,70	2,76	2,81	2,86	2,90
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,77	2,82	2,86
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,73	2,77	2,81
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,69	2,73	2,77
120	1,98	2,24	2,38	2,47	2,55	2,60	2,65	2,69	2,73

Fonte: ABNT, NBR 13526, 1995.

160/IV Testes com escalas

Procedimento – Os testes usando escalas indicam o tipo ou a intensidade de uma resposta sensorial. As escalas são classificadas em quatro classes: nominal, ordinal, intervalo e de proporção. A escala nominal especifica somente classes ou categorias, as quais não possuem nenhuma relação quantitativa entre si como, por exemplo, a escala de classificação da bebida de café. A escala ordinal especifica as categorias como uma série ordenada, porém sem expressar o tamanho da diferença entre elas, sendo utilizada nos testes de ordenação. A escala de intervalo assume igualdade de distância (intervalos) entre pontos (categorias) da escala e origem arbitrária. Estas escalas são ancoradas em vários pontos, geralmente nas extremidades e às vezes no meio da escala, com termos que indicam a magnitude da resposta. Costumam variar de 5 a 15 pontos (5-15) cm nas escalas não estruturadas). São utilizadas nas avaliações de atributos específicos, nos testes de perfil de textura, na análise descritiva quantitativa (ADQ) e nos testes de preferência e aceitação (escala hedônica e de atitude). A escala hedônica é uma escala de intervalo que expressa o grau de gostar ou desgostar de uma amostra pelo consumidor. As escalas de intervalo se classificam em estruturada e não estruturada e em unipolar e bipolar. Na escala estruturada (numérica e/ou verbal) os intervalos são associados a números e/ou termos descritivos. Na escala não estruturada, linear ou gráfica, a linha é demarcada por expressões quantitativas nas extremidades ou distantes destas (0,5-1,25) cm. A escala unipolar apresenta extremidade zero enquanto que a bipolar revela descrições opostas nas duas extremidades. A escala de proporção envolve a livre atribuição de números pelos julgadores para indicar as proporções das intensidades sensoriais em relação a uma amostra de referência, fornecendo a relação de proporção entre o estímulo e a resposta. É utilizada no teste de estimativa da magnitude. Nos testes de escala, as amostras codificadas e aleatorizadas são apresentadas simultaneamente ou não ao julgador para que avalie o atributo específico utilizando uma escala pré-definida (**Ficha 7**). Os resultados obtidos são avaliados estatisticamente segundo o objetivo proposto. Ge-

ralmente, é realizada análise de variância (**Quadro 10**) e testes de comparação de médias como, por exemplo, de Tukey (**Tabela 9**), Ducan ou SNK (Student-Newman-Keuls), com nível de significância pré-fixado. Escolha o delineamento experimental estatístico segundo o objetivo. Pode-se optar pelo delineamento experimental de blocos completos casualizados ou blocos incompletos, se o número de amostras for grande e/ou o atributo revelar intenso grau de fadiga sensorial. Outros delineamentos experimentais também conhecidos podem ser empregados. No delineamento de blocos completos casualizados todos os tratamentos são casualizados dentro de cada bloco. Cada provador avalia todas as amostras, em uma só sessão de teste. Blocos incompletos casualizados é o delineamento onde os blocos não contêm todos os tratamentos.

Ficha 7 – Modelo de escala estruturada de 7 pontos (numérica, verbal, bipolar)

Amostra: Julgador: Data:

Você está recebendo três amostras codificadas. Avalie cada uma segundo a intensidade de dureza (atributo de textura), utilizando a escala abaixo:

(1) Muito duro
(2) Duro _____ ( )
(3) Levemente duro
(4) Nem duro nem mole _____ ( )
(5) Levemente mole
(6) Mole _____ ( )
(7) Muito mole

Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 14141, 1998.

Tabela 9 – Valores de q para teste de Tukey, nível de erro α = 5%, segundo o número de tratamentos P e graus de liberdade do resíduo *n* [1]

n_1	P									
	2	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**15**
1	17,97	26,98	32,82	37,08	40,41	43,12	45,40	47,36	49,07	55,36
2	6,08	8,33	9,80	10,88	11,74	12,44	13,03	13,54	13,99	15,65
3	4,50	5,91	6,82	7,50	8,04	8,48	8,85	9,18	9,45	10,53
4	3,93	5,04	5,76	6,29	6,71	7,05	7,35	7,60	7,83	8,66
5	3,64	4,60	5,22	5,67	6,03	6,33	6,58	6,80	6,99	7,72
6	3,46	4,34	4,90	5,30	5,63	5,90	6,12	6,32	6,49	7,14
7	3,34	4,16	4,68	5,06	5,35	5,61	5,82	6,00	6,16	6,76
8	3,26	4,04	4,53	4,89	5,17	5,40	5,60	5,77	5,92	6,48
9	3,20	3,95	4,41	4,76	5,02	5,24	5,43	5,59	5,74	6,28

n_1	P									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15
10	3,15	3,88	4,33	4,65	4,91	5,12	5,30	5,46	5,60	6,11
11	3,11	3,82	4,26	4,57	4,82	5,03	5,20	5,35	5,49	5,98
12	3,08	3,77	4,20	4,51	4,75	4,95	5,12	5,27	5,39	5,88
13	3,06	3,73	4,15	4,45	4,69	4,88	5,05	5,19	5,32	5,79
14	3,03	3,70	4,11	4,41	4,64	4,83	4,99	5,13	5,25	5,71
15	3,01	3,67	4,08	4,37	4,59	4,78	4,94	5,08	5,20	5,65
16	3,00	3,65	4,05	4,33	4,56	4,74	4,90	5,03	5,15	5,59
17	2,98	3,63	4,02	4,30	4,52	4,70	4,86	4,99	5,11	5,54
18	2,97	3,61	4,00	4,28	4,49	4,67	4,82	4,96	5,07	5,50
19	2,96	3,59	3,98	4,25	4,47	4,65	4,79	4,92	5,04	5,46
20	2,95	3,58	3,96	4,23	4,45	4,62	4,77	4,90	5,01	5,43
24	2,92	3,53	3,90	4,17	4,37	4,54	4,68	4,81	4,92	5,32
30	2,89	3,49	3,85	4,10	4,30	4,46	4,60	4,72	4,82	5,21
40	2,80	3,44	3,79	4,04	4,23	4,39	4,52	4,63	4,73	5,11
60	2,83	3,40	3,74	3,98	4,16	4,31	4,44	4,55	4,65	5,00
120	2,80	3,36	3,68	3,92	4,10	4,24	4,36	4,47	4,56	4,90
∞	2,77	3,31	3,63	3,86	4,03	4,17	4,29	4,39	4,47	4,80

Fonte: DA SILVA (1998).

Nota: diferença mínima significativa, DMS, utilizando o teste de Tukey

$$q \times \sqrt{\frac{QM_{res}}{n}} = DMS$$

QM_{res} = quadrado médio do resíduo
n = número de julgamentos por tratamento
q = valor crítico tabelado a nº de tratamentos e graus de liberdade do resíduo

Testes sensoriais descritivos

Métodos utilizados em análise sensorial de alimentos, bebidas e água. Descrevem os componentes ou parâmetros sensoriais e medem a intensidade em que são percebidos. Alguns dos componentes mais empregados em testes descritivos são os observados no **Quadro 11** que se referem à aparência, odor e aroma, textura oral e manual, sensações táteis e superficiais, sabor e gosto. Geralmente, a equipe sensorial define previamente os termos relativos às propriedades mais relevantes do produto e sua seqüência de avaliação. Na análise descritiva o provador também avalia, através de uma escala, o grau de intensidade com que cada atributo está presente. Os julgadores devem ser treinados a usar a escala de forma consistente em relação à equipe e às amostras, durante todo período de avaliação. Exige-se cuidado na padronização do preparo e apresentação de amostras e na formação da equipe sensorial. As amostras devem ser codificadas com números de três dígitos aleatórios, casualizadas e apresentadas à equipe treinada e selecionada. As técnicas descritivas mais utilizadas são o do perfil de sabor, perfil de textura, a análise descritiva quantitativa (ADQ) e o de tempo-intensidade. As técnicas descritivas de espectro e de perfil livre também têm sido utilizadas.

Quadro 11 – Parâmetros ou componentes sensoriais utilizados em análise descritiva

Aparência	Tamanho e forma: dimensão, geometria. Textura superficial: maciez, aspereza. Interação entre partículas e fragmentos: viscosidade, aglomerado, partícula solta. Cor: matiz, croma, uniformidade, profundidade, brilho.
Odor e aroma	Sensações olfativas: floral, frutado, pútrido, baunilha. Sensações nasais: frescor, quente, pungente.
Textura manual	Mecânicos de reação à força e pressão: dureza e firmeza; força de compressão ou extensão ou tensão; elasticidade, volta à posição ou forma original após compressão. Geométricos e/ou tamanho, forma e orientação das partículas: áspero, arenoso, floculoso, frisado, nervuras ou com listas. Presença e absorção de umidade: seco, dessecado, oleoso, untuoso, embebido.
Textura oral	Mecânicos de reação à força e pressão: firmeza; viscosidade; deformação; fraturabilidade. Geométricos e/ou tamanho, forma e orientação das partículas: arenoso; granuloso, fibroso, floculoso. Umidade e gordura e/ou presença e absorção de água, óleo e gordura: aguado ou úmido, suculento, ensopado, untuoso ou besuntado.
Sensações táteis e superficiais	Mecânicos de reação à força e pressão: densidade, espessura ou grossura, lisa ou escorregadiça, elasticidade ou expandida, distendida, espalhada, estendida. Umidade, gordura e/ou presença de absorção de água, óleo ou gordura: aguado ou umedecido, ensopado, oleoso, untuoso ou besuntado, seco ou secura ou dessecado. Geométricos e/ou tamanho, forma e orientação das partículas táteis após contato: arenoso, floculoso, espumoso ou escumoso. De aparência, mudanças visuais durante o uso do produto: polido ou lustroso, brancura ou pálido, macilento ou emaciado, pontiagudo.
Sabor e gosto	Sensações olfativas: floral, frutado, cacau ou chocolate, pútrido, rançoso. Sensações gustativas: doce, salgado, ácido, amargo, umami. Sensações orais: frio, quente, adstringente, metálico, queimado.

Fonte: MEILGAARD et al. 1991

161/IV Testes descritivos – Perfil de sabor

Procedimento – Pelo método perfil de sabor (Arthur D. Little, 1940 em Meilgaard *et al*, 1987) pode ser realizada descrição completa do odor e aroma, do sabor e das sensações bucais residuais perceptíveis pelos julgadores, determinando graus de diferenças entre amostras ou suas misturas e impressão global do produto. Os julgadores, com a ajuda do líder definem os atributos e os materiais de referência. É empregada escala constante de categoria. Sempre se avalia a amplitude do aroma e sabor, definida como a intensidade geral, ou seja, o primeiro impacto causado pelo aroma ou sabor. Embora os julgamentos sejam individuais, após cada avaliação, o líder da equipe discute com seus membros os valores de intensidade dados a cada atributo. O perfil de aroma e sabor de cada amostra é construído por consen-

so. Os resultados são expressos de forma tabular ou gráfica. Em geral não são conduzidas análises estatísticas dos dados obtidos. A equipe é composta por número de quatro a seis julgadores treinados. Estes devem manifestar interesse e potencial para trabalhar em grupo, habilidade para identificar e para discriminar as intensidades de gostos e odores.

162/IV Testes descritivos – Perfil de textura

Procedimento – O método Perfil de Textura (Brandt, 1963; Civille e Szczesniak, 1973; Civille e Liska, 1975 em Meilgaard *et al*, 1987) pode fornecer uma descrição completa da textura, segundo parâmetros mecânicos, geométricos, de gordura e umidade, com definição do grau em que estão presentes e da ordem com que são percebidos desde a primeira mordida até a mastigação e fases finais de deglutição. Com base nas avaliações são utilizadas classificações e definições dos termos de textura, bem como referências de intensidade descritos na literatura. Todos os termos descritivos são definidos com o objetivo de reduzir a variabilidade entre julgadores. Dependendo da escala utilizada, o tratamento dos dados pode ser obtido por consenso da equipe em cada atributo ou análise estatística pela análise de variância (ANOVA), análise m ultivariada (MANOVA) e análise de componentes principais (ACP). A apresentação dos resultados pode ser tabular ou gráfica. O número de julgadores pode variar de 6 a 10 e são inicialmente selecionados com base no interesse, disponibilidade e atitude, por entrevista. Os julgadores são treinados em definição de textura, procedimento de avaliação e nas escalas de referência, sendo então selecionados pela habilidade de discriminação em atributos de textura.

163/IV Testes descritivos – Análise descritiva quantitativa

Procedimento – O método da Análise descritiva quantitativa (ADQ) desenvolvida por STONE *et al.* (1974) é muito utilizado para traçar, de forma a mais completa possível, o perfil sensorial quanto aos atributos de aparência, odor, textura e sabor. O método identifica os atributos e os quantifica na ordem de ocorrência. Primeiramente, os atributos são decompostos pela equipe sensorial que busca os termos descritores, seus significados, materiais de referências adequados e a melhor seqüência de avaliação. Para isto, é muito empregado o método de rede de MOSKOWITZ (1983), onde o julgador descreve as similaridades e diferenças entre pares de amostras (**Ficha 8**). Os termos gerados são listados por consenso (**Ficha 9**) permanecendo os citados em maior número de vezes para compor a ficha (**Ficha 10**). As escalas não estruturadas, de (9-15) cm, são mais empregadas. Os dados obtidos, normalmente, são submetidos à análise de variância (fontes de variação: julgador (J), tratamento (T), interação (J*T) e resíduo). Podem ser utilizados outros tratamentos estatísticos, como técnicas de análise multivariada, de acordo com os objetivos do teste. Diferenças entre tratamentos devem ser analisadas utilizando-se testes de comparação de médias, tais como de Tukey (**Tabela 9**), de Ducan ou SNK (Student-Newman-Keuls). A ADQ pode ser representada por gráfico aranha e por análise de componentes principais (ACP), onde a primeira sugere similaridades e diferenças entre as amostras e a segunda aponta relações existentes entre

elas, evidenciando o que mais as caracterizam. Recomenda-se que o número de julgadores selecionados seja entre 8 e 25 julgadores treinados. Avalie o desempenho de cada julgador por testes com duas ou mais amostras diferentes, em pelos menos três repetições. O critério de seleção é para os julgadores que discriminam amostras com probabilidade (p) menor ou igual a 0,50 pela ANOVA. Pode haver o retreinamento dos julgadores selecionados. Vários delineamentos experimentais estatísticos são recomendados, podendo-se optar pelo de blocos completos casualizados ou blocos incompletos casualizados, conforme o caso; estes são os mais freqüentemente utilizados.

Ficha 8 – Modelo de ficha para o método de rede

Amostra: Julgador: Data:

Você está recebendo duas amostras codificadas. Avalie cada uma quanto aos atributos abaixo apontando suas similaridades e diferenças.

Códigos das amostras: _____ / _____

	Similaridades	Diferenças
Aparência:		
Odor:		
Textura:		
Sabor:		

Ficha 9 – Modelo para listagem consensual de atributos e número de vezes em que foram citados pelo método de rede

Termos descritivos ou descritores - Atributos		Número de vezes
Aparência:	1:	
	2:	
	n:	
Odor:	1:	
	2:	
	n:	
Textura:	1:	
	2:	
	n:	
Sabor:	1:	
	2:	
	n:	

Ficha 10 – Modelo de escala não estruturada para análise descritiva quantitativa

Amostra: **Julgador:** **Data:**

Você está receb o três amostras codificadas. Av da uma segundo a intensidade do atributo específico, assin do com um traço vertical as es baixo:

Aparência:

Atributo 1
Fra Forte

Atributo 2
Fra Forte

Odor:

Atributo 3
Fra Forte

Atributo 4
Fra Forte

Textura:

Atributo 5
Pouca Muita

Atributo 6
Fraco Forte

Sabor:

Atributo 7
Fraco Forte

Atributo 8
Ausente Forte

Comentário:

Fonte: ABNT, NBR 14140, 1998.

Testes afetivos

Método utilizado em análise sensorial de alimentos, bebidas e água. O julgador expressa seu estado emocional ou reação afetiva ao escolher um produto pelo outro. É a forma usual de se medir a opinião de um grande número de consumidores com respeito as suas preferências, gostos e opiniões. As escalas mais empregadas são: de intensidade, a hedônica, do ideal e de atitude ou de intenção. Os julgadores não precisam ser treinados bastando ser consumidores freqüentes do produto em avaliação. Os testes afetivos em função do local de aplicação podem ser de laboratório, localização central e uso doméstico. Basicamente, os testes afetivos podem ser classificados em duas categorias: de preferência (escolha) e de aceitação (categoria).

164/IV Testes afetivos – Testes de preferência

Procedimento – O indivíduo manifesta sua preferência em relação ao produto que lhe é oferecido. As escalas mais utilizadas são de ordenação-preferência e comparação pareada. No teste de ordenação-preferência (**Ficha 11**) uma série de amostras é apresentada para que seja ordenada de acordo com a preferência do julgador. Na comparação pareada (**Ficha 12**) são apresentados pares de amostras para serem comparadas pelo julgador em relação a sua preferência.

Ficha 11 – Modelo para teste ordenação-preferência

Amostra: Julgador: Data:

Você está recebendo três amostras codificadas, avalie cada uma na ordem crescente de sua preferência.

_____	_____	_____
(1)	(2)	(3)
(menos preferida)		(mais preferida)

Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 13170, 1994.

Ficha 12 – Modelo para teste pareado-preferência

Amostra: Julgador: Data:
Você está recebendo duas amostras codificadas, identifique com um círculo a sua amostra preferida.
_____ _____
Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 13088, 1994.

165/IV Testes afetivos – Testes de aceitação por escala hedônica

Procedimento – Com o teste da escala hedônica, o indivíduo expressa o grau de gostar ou de desgostar de um determinado produto, de forma globalizada ou em relação a um atributo específico. As escalas mais utilizadas são as de 7 e 9 pontos, que contêm os termos definidos situados, por exemplo, entre "gostei muitíssimo" e "desgostei muitíssimo" contendo um ponto intermediário com o termo "nem gostei; nem desgostei". É importante que as escalas possuam número balanceado de categorias para gosto e desgosto. As amostras codificadas com algarismos de três dígitos e aleatorizadas são apresentadas ao julgador para avaliar o quanto gosta ou desgosta de cada uma delas através da escala previamente definida (**Ficha 13**). Sua preferência é obtida por inferência. Os dados coletados podem ser avaliados estatisticamente pela análise de variância, ANOVA (**Quadro 10**) e comparação das médias de pares de amostras pelo teste de Tukey (**Tabela 9**). Se for empregada escala hedônica com comparação a um padrão de referência, será utilizado o teste de Dunnett. Recomenda-se que o número de julgadores seja entre 50 e 100. O delineamento experimental a ser utilizado deve ser previamente escolhido, podendo-se optar pelo de blocos completos balanceados ou casualizados ou blocos incompletos casualizados, conforme a situação.

Ficha 13 – Modelo de escala hedônica (estruturada verbal, numérica, bipolar, nove pontos).

Amostra: Julgador: Data:

Você está recebendo quatro amostras codificadas. Avalie globalmente cada uma segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo.

(9) gostei extremamente	_____	( )
(8) gostei moderadamente		
(7) gostei regularmente	_____	( )
(6) gostei ligeiramente		
(5) não gostei, nem desgostei	_____	( )
(4) desgostei ligeiramente		
(3) desgostei regularmente	_____	( )
(2) desgostei moderadamente		
(1) desgostei extremamente		

Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 14141, 1998.

166/IV Testes afetivos – Testes de aceitação por escala do ideal

Procedimento – Na escala do ideal o indivíduo expressa o quão ideal o produto está em relação à intensidade de um atributo específico. Geralmente, a escala possui de 3 a 5 pontos, podendo conter termos opostos como, por exemplo, "muito fraco" a "muito forte" e no centro da escala o termo "ideal", de tal forma que tenha números iguais de categorias de ambos os lados. São apresentadas ao julgador amostras codificadas e aleatorizadas para indicar o quão ideal está certo produto em relação a termos pré-definidos (**Ficha 14**). Geralmente, os dados obtidos são avaliados na forma de porcentagem de julgamentos, podendo ser utilizado um limite de 70% de respostas para o termo "ideal". O resultado também pode ser avaliado elaborando-se um gráfico de freqüências das respostas através de histogramas ou comparando-se a distribuição das respostas das amostras avaliadas com uma amostra-padrão pelo teste Qui-quadrado ou por regressão linear simples. Recomenda-se que o número de julgadores selecionados esteja entre 50 e 100. O delineamento experimental deverá ser previamente definido, podendo-se optar pelo de blocos completos balanceados ou casualizados ou blocos incompletos casualizados, conforme a situação.

Ficha 14 – Modelo de escala do ideal (estruturada verbal, numérica, cinco pontos)

Amostra: Julgador: Data:
Você está recebendo três amostras codificadas. Indique o quão ideal está cada amostra em relação à ....., utilizando a escala abaixo.
(1) muito fraca (2) fraca (3) ideal (4) forte (5) muito forte
_____ ( ) _____ ( ) _____ ( )
Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 14141, 1998.

167/IV Testes afetivos –Testes de escala de atitude ou de intenção

Procedimento – Por meio das escalas de atitude ou de intenção, o indivíduo expressa sua vontade em consumir, adquirir ou comprar, um produto que lhe é oferecido. As escalas mais utilizadas são as verbais de 5 a 7 pontos. As amostras codificadas e aleatorizadas podem ser apresentadas seqüencialmente ao julgador para serem avaliadas através da escala pré-definida (**Ficha 15**). Os termos definidos podem se situar, por exemplo, entre "provavelmente compraria" a "provavelmente não compraria" e, no ponto intermediário "talvez compraria, talvez não compraria". É importante que a escala possua número balanceado de categorias entre o ponto intermediário e os extremos. Os dados são avaliados pelas freqüências através dos gráficos de histogramas. Recomenda-se que o número de julgadores esteja entre 50 a 100. O delineamento experimental deverá ser previamente definido, podendo-se optar pelo de blocos completos balanceados ou casualizados ou blocos incompletos casualizados, conforme a situação.

Ficha 15 – Modelo de escala de atitude ou de intenção (estruturada verbal, numérica, bipolar, sete pontos)

Amostra: Julgador: Data:

Você está recebendo três amostras codificadas. Avalie cada uma segundo a sua intenção de consumo, utilizando a escala abaixo.

(7) Comeria sempre
(6) Comeria muito freqüentemente _____ ( )
(5) Comeria freqüentemente
(4) Comeria ocasionalmente _____ ( )
(3) Comeria raramente
(2) Comeria muito raramente _____ ( )
(1) Nunca comeria

Comentários:

Fonte: ABNT, NBR 14141, 1998.

Referências bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12806**: Análise sensorial de alimentos e bebidas. Terminologia. Rio de Janeiro, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12994**: Métodos de análise sensorial dos alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12995**: Teste triangular em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13088**: Teste de comparação pareada em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13169**: Teste duo-trio em análise sensorial. Rio de Janeiro, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13170**: Teste de ordenação em análise sensorial. Rio de Janeiro, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13526**: Teste de comparação múltipla em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1995.
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14140**: Alimentos e bebidas. Análise Sensorial. Teste de análise descritiva quantitativa (ADQ). Rio de Janeiro, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14141**: Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1998.

BRANDT, M.A.; SKINNER, E.Z.; COLEMAN, J.A. Texture profile method. **J. Food. Sci**. v. 28, p. 404-409, 1963.

BODYFELT, F.W.; TOBIAS, J.; TROUT, G.M. **The sensory evaluation of dairy products**. 1st ed., New York/USA: AVI Book, 1988, 598 p.

CAUL, J.F. The profile method of flavour analysis. **Advances in food research**. v. 7, p. 1-40, 1957.

DA SILVA, M. A. A. P. **Análise sensorial e instrumental de alimentos.** Apostila de Disciplina. FEA/UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

ELLIS, B. H. **A guide book for sensory testing**. Continental Can Co., Chicago, III., 1961, 55 p.

FARIA, E.V.; MORI, E.E.M.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de análise sensorial.** Apostila de Curso. LAFISE/ITAL, Campinas, SP, 2000, 103 p.

GRETAGMACBETH (USA). *FM Test:* **Quick Guide to Operation – Munsell Color**. New York /USA, 1997. 31 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/DIS 3972/1979**. Sensory analysis: method of investigating sensitivity of taste. Geneva: ISO 1990, 5 p.

LARMOND, E. **Laboratory methods for sensory evaluation of food.** Agriculture Canadá, 1987, 73 p.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 1 ed., Flórida: CRC Press, 1987.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. 2 ed., Flórida: CRC press, 1991. 354 p.

MELO, M.S. Caracteres Organolépticos de Alimentos e Bebidas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 6, n. 1, p. 77-95, 1946.

MOSKOWITTZ, H.R. **Product Testing and Sensory Evaluation of Foods. Marketing and R & D** Appproaches, **Food and Nutrition Press**, Inc. Westport, 1983. 605 p.

SANCHO, J.; BOTA, E.; DE CASTRO, J.J. **Introducción al análisis sensorial de los alimentos**. 1 ed., Barcelona: Universitat de Barcelona, 1999. 336 p.

SHALLENBERGER, R.S. **Taste Chemistry.** 1 ed., Cambridge/ USA: Chapman & Hall, 1993. 613 p.

STONE, H.; SIDEL, J.; OLIVER, S.; WOOLSEY, A; SINGLETON, R.C. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technol.**, v. 28, n. 11, p. 24-34, 1974.

Colaboradores

Maria Auxiliadora de Brito Rodas e Jussara Carvalho de Moura Della Torre

CAPÍTULO **VII**

AÇÚCARES E PRODUTOS CORRELATOS

VII

AÇÚCARES E PRODUTOS CORRELATOS

Neste capítulo são abordados os métodos de análise para produtos com alto teor de açúcar, tais como: açúcares refinado, cristal e mascavo, rapadura, melaço, xaropes de diversos tipos e mel.

Com relação ao poder adoçante dos diferentes açúcares, não existem aparelhos específicos para a sua determinação. Para a comparação desta propriedade, recorre-se a provas sensoriais.

O poder adoçante relativo de alguns açúcares e a sua rotação específica estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Poder adoçante de alguns açúcares e sua rotação específica

Açúcar	Poder adoçante relativo	Rotação específica $[\alpha]_D^{20}$
Lactose	16	+ 52,5º
Rafinose	22	+ 104,0º
Galactose	32	+ 80,2º
Raminose	32	+ 8,3º
Maltose	32	+ 137,0º
Xilose	40	+ 18,8º
Dextrose	74	+ 52,5º
Sacarose	100	+ 66,5º
Açúcar invertido	130	-
Frutose	173	- 92,3º

O açúcar, sem outra designação específica, é a sacarose obtida da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) ou da beterraba (*Beta vulgaris*). De acordo com a tecnologia empregada, o açúcar é obtido em diferentes tipos e graus de pureza. As determinações para açúcar compreendem: sacarose por desvio polarimétrico direto, umidade, cor ICUMSA, cinzas **(018/IV)** e, eventualmente, minerais e metais pesados **(cap. XXIII)** e dióxido de enxofre **(050/IV)**.

As análises de glicose anidra e outros açúcares em pó mais usuais são as de glicídios redutores, glicídios não redutores, cinzas **(018/IV)** e, eventualmente minerais e metais pesados **(cap. XXIII)**.

A determinação quantitativa dos açúcares redutores pode ser efetuada por diferentes procedimentos, sendo o método de redução das soluções de Fehling o mais empregado.

Xarope, sem outra especificação, consiste de uma solução de açúcar em água, contendo aproximadamente dois terços de seu peso em sacarose ou de outros tipos de açúcares tais como: maltose, frutose ou glicose.

Melaço é o líquido que se obtém como resíduo de fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar bruto.

A análise de xaropes de diversos tipos de açúcares e melaço inclui as seguintes determinações: glicídios redutores, glicídios não redutores, graus Brix, umidade, cinzas **(018/IV)** e, eventualmente, minerais e metais pesados **(cap. XXIII)**.

Rapadura é o produto sólido obtido pela concentração a quente do caldo de cana (*Saccharum officinarum).*

Na análise de rapadura, as determinações incluem: glicídios redutores em glicose, glicídios não redutores em sacarose, umidade **(012/IV)**, cinzas **(018/IV)** e, eventualmente, minerais e metais pesados **(cap. XXIII)**.

O mel consiste basicamente de diferentes açúcares, predominantemente de frutose e glicose. Contém em menor proporção uma mistura complexa de outros carboidratos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, minerais e pólen.

As determinações usuais em mel incluem, entre outras, umidade, acidez total, açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas **(018/IV)**, sólidos insolúveis em água, hidroximetilfurfural (HMF), atividade diastásica e as diferentes reações que podem fornecer indicações

sobre a adulteração do mel: reações de Lund, Fiehe e de Lugol.

168/IV Preparação da amostra de açúcares para análise

No caso de amostras em torrões ou grânulos grandes, faça uma homogeneização quebrando no almofariz com o auxílio de um pistilo.

Para xaropes densos, aqueça a amostra a (40 ± 1)°C, em banho-maria e esfrie à temperatura ambiente, antes de realizar os ensaios.

Mel líquido – Se a amostra estiver livre de cristalização, homogeneíze a amostra cuidadosamente, antes das pesagens. Tome cuidado com possíveis bolhas de ar que possam se formar prejudicando algumas determinações.

Mel cristalizado – Coloque a amostra em um recipiente fechado em banho-maria a (40 ± 1)°C até 20 minutos, agitando ocasionalmente. Resfrie à temperatura ambiente antes de pesar. Não aqueça o mel que será utilizado para a determinação da atividade diastásica e do hidroximetilfurfural. Se estiverem presentes matérias estranhas, tais como: cera de abelha, partículas de favos, etc, filtre através de gaze e coloque num funil aquecido na estufa.

169/IV Açúcares – Sacarose por desvio polarimétrico direto

Este método é aplicável a açúcares. A polarização é a porcentagem em massa da sacarose aparente contida em uma solução açucarada, determinada pelo desvio da luz polarizada ao atravessar esta solução. As rotações na escala são designadas como graus sacarimétricos (°S) ou desvio polarimétrico $[\alpha]_D^{20°}$. De acordo com a International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA), uma solução normal de sacarose quimicamente pura corresponde a 100°S, sendo a base de calibração do sacarímetro. 100°S correspondem a um desvio polarimétrico de (34,620 ± 0,002)°C, a 20°C, no λ = 589,2 nm (lâmpada de sódio).

Material

Polarímetro com leitura em escala em graus sacarimétricos (°S) ou desvio polarimétrico (α_D^{20}), tubo de vidro para polarímetro (200 ± 0,03) mm, termômetro, béquer de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, proveta de 50 mL, bastão de vidro, funil de vidro de tamanho pequeno, papel de filtro qualitativo e vidro de relógio.

Reagentes

Creme de alumina
Acetato básico de chumbo

Procedimento – Pese, com precisão, (26,000±0,002)g da amostra totalmente homogeneizada em um béquer de 50 mL. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL, com o auxílio de 50 mL de água. Complete o volume com água a 20ºC. Enxugue a haste do balão volumétrico com papel de filtro e agite. Filtre e cubra o funil com vidro de relógio ao iniciar a filtração. Despreze os primeiros 25 mL do filtrado. Ajuste o polarímetro, conforme o manual do equipamento. Lave o tubo polarimétrico com o próprio filtrado e preencha com a mesma solução, evitando formação de bolhas no seu interior. Proceda a leitura com a luz monocromática de sódio (λ= 589,2 nm) em % de sacarose ou desvio polarimétrico, à temperatura constante de (20 ± 0,5)ºC.

Nota: para soluções mais escuras, emprega-se creme de alumina ou acetato de chumbo seco. No caso deste último, adicione pequena quantidade do sal seco à solução de açúcar após ter completado o volume e misture. Repita, se necessário, as adições do sal até completar a precipitação e observe se a solução está sendo clarificada, tomando o cuidado de não se adicionar excesso do referido sal.

Cálculo

$$\frac{L \times 100}{34{,}62} = \text{sacarose por cento m/m}$$

L = leitura no polarímetro $[\alpha]_D^{20^o}$

Nota: se a leitura for realizada à temperatura de (20 ± 0,5)ºC não é necessária fazer correção da polarização. Caso contrário, deve ser feita a correção utilizando a expressão abaixo.

$$P_t\,[1 + 0{,}00014\,(t - 20)] = P_{20}$$

P_{20} = polarização corrigida a 20ºC
P_t = polarização lida à temperatura do ensaio
t= temperatura da solução

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of**

Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed. Arlington: A.O.A.C., (method 925.46) 1995. chapter 44. p. 4.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 8869:** Açúcar refinado - determinação de polarização. Rio de Janeiro, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 157.

170/IV Açúcares – Determinação da cor ICUMSA

Este método é usado para a determinação da cor em açúcares, podendo ser aplicado em todos os açúcares brancos cristalizados ou em pó. Baseia-se na determinação da absorbância da solução açucarada, no comprimento de onda de 420 nm. A solução é preparada e filtrada para eliminar a turbidez. A cor ICUMSA é expressa em unidades ICUMSA.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, suporte para a cubeta de 5 a 10 cm de caminho óptico, refratômetro com escala em graus Brix, balança analítica, pHmetro, agitador magnético e barra magnética, banho de ultra-som, conjunto de filtração para membranas de 47 mm de polissulfona, bomba de vácuo, membranas filtrantes de fibra de vidro tipo AP25 e membrana hidrofílica (HA) tipo *triton-free* de (0,45 µm) e ambas com diâmetro de 47 mm, espátula metálica, frasco Erlenmeyer de 250 mL, cubetas de quartzo de 5 cm e 10 cm de percurso óptico, proveta graduada de 100 mL, bastão de vidro e béqueres de 100 e 250 mL.

Reagentes

Solução de trietanolamina 0,1 M – Pese, com precisão, 7,460 g de trietanolamina e transfira com água para um balão volumétrico de 500 mL. Complete o volume com água.

Solução de ácido clorídrico 0,1 M – Pipete, cuidadosamente, 8,9 mL de ácido clorídrico para um balão volumétrico de 1000 mL, contendo cerca de 750 mL de água. Complete o volume com água.

Solução-tampão trietanolamina/ácido clorídrico (tampão TEA/HCl) – Transfira 500 mL da solução de trietanolamina para um béquer de 1000 mL. Ajuste o pH para 7, colocando cerca de 420 mL da solução de ácido clorídrico para um volume final de 920 mL de solução-

tampão TEA/HCl. Prepare a solução-tampão um dia antes de usar e guarde em refrigerador. Estabilize a solução à temperatura ambiente antes de usar. Meça o pH e ajuste para 7, se necessário, com solução de ácido clorídrico. Esta solução é estável por 2 dias, se mantida em refrigerador a aproximadamente 4ºC.

Procedimento – Ligue, para estabilizar, o pHmetro e faça os ajustes para a operação. Calibre com as soluções-tampão 7 e 4 ou 7 e 10, de acordo com as instruções do fabricante. Circule água à temperatura constante pelo refratômetro, preferivelmente a 20ºC, por tempo suficiente para equilibrar a temperatura do prisma e da amostra e mantenha a água circulando durante a leitura, observando se a temperatura permanece constante. Ligue e ajuste o espectrofotômetro conforme as instruções do fabricante, para leituras da absorbância a 420 nm. Pese (50 ± 0,5) g da amostra em um béquer de 250 mL. Adicione (50 ± 0,1) g, ou (50 ± 0,1) mL da solução-tampão TEA/HCl e agite no agitador magnético até a dissolução do açúcar. Filtre a solução sob vácuo através das duas membranas, sendo a membrana de vidro sobreposta à de HA. Transfira o filtrado para um béquer e coloque no banho de ultra-som por 3 minutos. Meça o grau Brix no refratômetro e corrija a temperatura a 20ºC **(Tabela 2)** e em seguida multiplique o valor do Brix corrigido a 20ºC pelo fator de correção 0,989. Obtenha a concentração da sacarose (g/mL) conforme descrito na Tabela 2. Faça a leitura da absorbância da solução a 420 nm, empregando-se a cubeta de 10 cm para açúcar refinado e de 5 cm para o açúcar cristal. A escolha da cubeta deve ser tal que a leitura da transmitância da solução esteja dentro da faixa de (25 - 75) %. Utilize como branco a solução-tampão TEA/HCl. A diferença absoluta entre dois resultados em duplicata de açúcares com valor de cor ICUMSA abaixo de 50 UI, não deve ser maior que 3 UI. Para açúcares com valor de cor ICUMSA acima de 50 UI, a diferença absoluta entre dois resultados em duplicata, não deve ser maior que 7 UI.

Cálculo

$$\frac{1000 \times A}{b \times c} = \text{cor ICUMSA (UI)}$$

A = absorbância da solução a 420 nm
b = espessura da cubeta em cm
c = concentração da solução em g/mL

Tabela 2 – Concentração de sacarose (g/mL) em função do grau Brix a 20ºC

%	Concentração em g/mL									
Grau Brix	**,0**	**,1**	**,2**	**,3**	**,4**	**,5**	**,6**	**,7**	**,8**	**,9**
41	0,4845	0,4855	0,4872	0,4886	0,4900	0,4914	0,4928	0,4942	0,4956	0,4970
42	0,4985	0,4999	0,5013	0,5027	0,5041	0,5055	0,5069	0,5083	0,5097	0,5111
43	0,5126	0,5140	0,5154	0,5168	0,5182	0,5197	0,5211	0,5225	0,5239	0,5254
44	0,5268	0,5282	0,5297	0,5311	0,5325	0,5340	0,5354	0,5368	0,5383	0,5397
45	0,5411	0,5426	0,5440	0,5455	0,5469	0,5484	0,5498	0,5513	0,5527	0,5542
46	0,5556	0,5571	0,5585	0,5600	0,5615	0,5629	0,5644	0,5658	0,5673	0,5688
47	0,5702	0,5717	0,5732	0,5746	0,5761	0,5776	0,5790	0,5805	0,5820	0,5835
48	0,5850	0,5864	0,5879	0,5894	0,5909	0,5924	0,5939	0,5953	0,5968	0,5983
49	0,5998	0,6013	0,6028	0,6043	0,6058	0,6073	0,6088	0,6103	0,6118	0,6133
50	0,6148	0,6163	0,6178	0,6193	0,6208	0,6223	0,6238	0,6254	0,6269	0,6284
51	0,6299	0,6314	0,6329	0,6345	0,6360	0,6375	0,6390	0,6406	0,6421	0,6436
52	0,6451	0,6467	0,6482	0,6497	0,6513	0,6528	0,6543	0,6559	0,6574	0,6590
53	0,6603	0,6621	0,6638	0,6651	0,6667	0,6682	0,6698	0,6713	0,6729	0,6745
54	0,6760	0,6776	0,6791	0,6807	0,6823	0,6838	0,6854	0,6869	0,6885	0,6901
55	0,6916	0,6932	0,6948	0,6954	0,6979	0,6995	0,7011	0,7027	0,7043	0,7058
56	0,7074	0,7090	0,7106	0,7122	0,7138	0,7154	0,7169	0,7185	0,7211	0,7217
57	0,7233	0,7249	0,7265	0,7281	0,7297	0,7313	0,7329	0,7345	0,7362	0,7378
58	0,7394	0,7410	0,7426	0,7442	0,7458	0,7474	0,7491	0,7507	0,7523	0,7539
59	0,7556	0,7572	0,7588	0,7604	0,7621	0,7637	0,7653	0,7670	0,7686	0,7702
60	0,7719	0,7735	0,7752	0,7768	0,7784	0,7801	0,7817	0,7834	0,7850	0,7867

Referências bibliográficas

ICUMSA. Methods Book – **Method GS2/3-9**. The determination of white sugar solution colour – Official, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9724:** Açúcar – Determinação da cor ICUMSA. Rio de Janeiro, 1987.

171/IV Açúcares – Determinação da umidade por secagem à pressão atmosférica

Este método é aplicável para os diversos tipos de açúcares, inclusive rapadura. Baseia-se na determinação da perda de massa por secagem em condições especificadas de temperatura e tempo.

Material

Balança analítica, estufa, termômetro, espátula de metal, dessecador com sílica gel e cápsula de níquel, platina ou de alumínio com fundo chato e tampa.

Procedimento – Pese de 5 a 10 g da amostra totalmente homogeneizada em uma cápsula de fundo chato com tampa, previamente tarada. Seque em estufa durante 2 horas a (105±2)°C. Remova a cápsula da estufa, cubra, resfrie em dessecador e pese. Repita as operações de secagem por 30 minutos e de resfriamento até que o peso entre duas secagens tenha uma diferença ≤ 2 mg.

Cálculo

$$\frac{N \times 100}{P} = \text{umidade por cento m/m}$$

N = perda de massa em g
P = massa da amostra em g

Referências bibliográficas

ICUMSA. Methods Book – **Method GS2/1/3-15**. Determination of sugar moisture by loss on drying official. 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 8870**: Açúcar Cristal e refinado, perda por secagem. Rio de Janeiro, 1985.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16th. ed. Arlington: A.O.A.C., (method 925.45 B) 1995. chapter 44. p.2.

172/IV Açúcares – Determinação de anidrido sulfuroso pelo método modificado de Monier-Williams

Procedimento – Pese (50 ± 1) g de açúcar homogeneizado e transfira para o balão de destilação e proceda conforme descrito no método **050/IV**.

173/IV Méis – Determinação da umidade por refratometria

Aplicável na determinação de umidade em mel e também em xaropes e baseia-se no método refratométrico de Chataway, revisado por Wedmore, onde utiliza a medida de índice de refração da amostra para ser convertida em porcentagem de umidade.

Material

Refratômetro de Abbé ou digital, com escala que permita estimar pelo menos 0,0005 *n*, banho-maria, espátula metálica, algodão hidrofílico e frasco de vidro de capacidade de 10 mL com tampa.

Procedimento – Circule água à temperatura constante pelo aparelho, preferivelmente a 20°C, por tempo suficiente para equilibrar a temperatura do prisma e da amostra e mantenha a água circulando durante a leitura, observando se a temperatura permanece constante.

Amostras líquidas – Transfira 3 a 4 gotas da amostra para o prisma do refratômetro. Faça a leitura do índice de refração a 20°C. Se a determinação tiver sido feita a uma temperatura diferente de 20°C, corrija a leitura do índice de refração para a temperatura padrão de 20°C, de acordo com a nota de rodapé da tabela. Obtenha a porcentagem de umidade segundo a **Tabela 3**.

Amostras cristalizadas – Transfira uma pequena porção para um frasco com tampa, feche bem o frasco e coloque no banho-maria à temperatura de (50 ± 0,2)°C para que todos os cristais sejam dissolvidos. Esfrie à temperatura ambiente. Em seguida proceda conforme as amostras líquidas.

Tabela 3 – Relação entre o índice de refração e a porcentagem de água dos méis

Índice de refração a 20ºC	Umidade %	Índice de refração a 20ºC	Umidade %	Índice de refração a 20ºC	Umidade %	Índice de refração a 20ºC	Umidade %
1,5044	13,0	1,4961	16,2	1,4880	19,4	1,4800	22,6
1,5038	13,2	1,4956	16,4	1,4875	19,6	1,4795	22,8
1,5033	13,4	1,4951	16,6	1,4870	19,8	1,4790	23,0
1,5028	13,6	1,4946	16,8	1,4865	20,0	1,4785	23,2
1,5023	13,8	1,4940	17,0	1,4860	20,2	1,4780	23,4
1,5018	14,0	1,4935	17,2	1,4855	20,4	1,4775	23,6
1,5012	14,2	1,4930	17,4	1,4850	20,6	1,4770	23,8
1,5007	14,4	1,4925	17,6	1,4845	20,8	1,4765	24,0
1,5002	14,6	1,4920	17,8	1,4840	21,0	1,4760	24,2
1,4997	14,8	1,4915	18,0	1,4835	21,2	1,4755	24,4
1,4992	15,0	1,4910	18,2	1,4830	21,4	1,4750	24,6
1,4987	15,2	1,4905	18,4	1,4825	21,6	1,4745	24,8
1,4982	15,4	1,4900	18,6	1,4820	21,8	1,4740	25,0
1,4976	15,6	1,4895	18,8	1,4815	22,0	-	-
1,4971	15,8	1,4890	19,0	1,4810	22,2	-	-
1,4966	16,0	1,4885	19,2	1,4805	22,4	-	-

Nota: na correção do índice de refração para temperatura diferente de 20°C:

- Adicione 0,00023 ao índice de refração para cada grau acima de 20°C, antes de usar a **Tabela 3.**
- Subtraia 0,00023 do índice de refração para cada grau abaixo de 20°C, antes de usar a **Tabela 3.**

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16th. ed. Arlington: A.O.A.C., (method 969.38 B) 1995. chapter 44. p.20-21.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. HARMONISED METHODS OF THE EUROPEAN HONEY COMMISSION. **Apidologie**, Paris: Issue Spec. 1997. p.11-13.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 160.

174/IV Méis – Determinação da acidez livre, lactônica e total

Este método baseia-se na determinação da acidez livre, lactônica e total. A acidez livre é a medida obtida da titulação com hidróxido de sódio até o ponto de equivalência. A acidez lactônica é obtida pela adição de um excesso de hidróxido de sódio que é titulado com ácido clorídrico. A acidez total é obtida pela somatória entre acidez livre e lactônica.

Material

pHmetro, agitador magnético e barra magnética, balança analítica, espátula metálica, béqueres de 50 e 250 mL e bureta de 25 mL.

Reagentes

Solução padronizada de hidróxido de sódio 0,05 N
Solução de ácido clorídrico 0,05 N
Soluções-tampão pH 4 e 7

Procedimento – Ligue e faça a calibração do pHmetro conforme as instruções do fabricante, com as soluções tampão 4 e 7. Pese 10 g da amostra em um béquer de 250 mL e dissolva

com 75 mL de água. Agite com agitador magnético. Mergulhe o eletrodo na solução e anote o pH. Titule com solução de hidróxido de sódio 0,05 N até pH 8,5 e anote o volume (V). Imediatamente, adicione nesta solução 10 mL de solução de hidróxido de sódio 0,05 N e, sem demora, titule com solução de ácido clorídrico 0,05 N até o pH 8,30 (Va). Titule 75 mL de água com hidróxido de sódio 0,05 N (Vb) até pH 8,5.

Cálculos

Acidez livre

$$\frac{(V - V_b) \times 50 \times f}{P} = \text{acidez livre, em milequivalentes por kg}$$

V = n.º de mL da solução de NaOH 0,05 N gasto na titulação
V_b = n.º de mL de solução de NaOH 0,05 N gasto na titulação para o branco
f = fator da solução de NaOH 0,05 N
P = massa da amostra em g

Acidez lactônica

$$\frac{(10 - V_a) \times 50 \times f'}{P} = \text{Acidez lactônica, em milequivalentes por kg}$$

V_a = nº de mL de solução de HCl 0,05 N gasto na titulação
f' = fator da solução de HCl 0,05 N
P = massa da amostra em g

Acidez total em milequivalentes por kg = acidez livre + lactônica

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,** 16th ed. Arlington: A.O.A.C., (mothod 962.19) 1995. chapter 44. p. 31.

175/IV Méis – Determinação de hidroximetilfurfural

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, cubeta de quartzo de 1 cm, balança analítica, banho de ultra-

som, espátula metálica, papel de filtro qualitativo, béqueres de 25 e 50 mL, balão volumétrico de 50 mL, pipetas volumétricas de 0,5 e 5 mL, tubos de ensaio de tamanho médio, proveta de 25 mL, funil de vidro de tamanho médio e bastão de vidro.

Reagentes

Solução de Carrez I – Dissolva 15 g de ferrocianeto de potássio - K_4 [Fe $(CN)_6$] . $3H_2O$ em água e complete para 100 mL.

Solução de Carrez II – Dissolva 30 g de acetato de zinco – Zn $(CH_3COO)_2$. $2H_2O$ em água e complete para 100 mL.

Solução de bissulfito de sódio - $NaHSO_3$ a 0,2% m/v – Dissolva 0,20 g de bissulfito de sódio em água e dilua a 100 mL. Se necessário, dilua 1+1 com a solução de referência.

Procedimento – Ligue e ajuste o espectrofotômetro conforme as instruções do fabricante, para leituras das absorbâncias a 284 e 336 nm. Pese, com precisão, cerca de 5 g do mel em um béquer de 50 mL e transfira, no máximo, com 25 mL de água para um balão volumétrico de 50 mL. Adicione 0,5 mL de solução de Carrez I e misture. Adicione 0,5 mL de solução de Carrez II e misture. Se necessário, adicione uma gota de álcool para suprimir a espuma. Complete o volume com água. Filtre, descartando os primeiros 10 mL do filtrado. Pipete 5 mL para cada um dos dois tubos de ensaio. Adicione 5 mL de água em um dos tubos (amostra) e 5 mL de solução de bissulfito de sódio 0,2% no outro (referência). Misture bem em banho de ultra-som por 3 minutos e determine a absorbância da amostra a 284 e 336 nm em cubeta de 1 cm. Se a absorbância for maior que 0,6, dilua a solução de amostra com água e a solução de referência com solução de bissulfito de sódio 0,10%, na mesma proporção e corrija a absorbância para a diluição.

Nota: não aqueça o mel antes desta determinação.

Cálculos

$$\frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149{,}7 \times 5}{P} = \text{HMF mg/kg}$$

A_{284} = leitura da absorbância a 284 nm
A_{336} = leitura da absorbância a 336 nm
P = massa da amostra em g
5 = massa nominal da amostra
149,7 = (126/16830) x (1000/10) x (1000/5)

126 = peso molecular do HMF
16830 =absortividade molar do HMF a 284 nm
1000 = conversão de g para mg
10 = diluição de 5 g de mel para 50 mL
1000 = conversão de g para kg

Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed. Arlington: A.O.A.C., (method 980.23), 1995. chapter 44. p. 26.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. HARMONISED METHODS OF THE EUROPEAN HONEY COMMISSION **Apidologie**, Paris: Issue Spec., 1997. p. 25-27.

176/IV Méis – Determinação de açúcares redutores pelo método A

É aplicável na determinação de açúcares redutores em mel, calculados como açúcar invertido (glicose + frutose) e baseia-se no método modificado de Lane & Eynon.

Material

Balança analítica, banho-maria, chapa elétrica, espátula metálica, balão de fundo chato de 250 mL, balões volumétricos de 100, 200, 250, 500 e 1000 mL, pipetas volumétricas de 5 e 50 mL, pipeta graduada de 1 mL, buretas de 10 e 25 mL e funil pequeno.

Reagentes

Solução de azul de metileno a 0,2 % m/v -- Dissolva 2 g de azul de metileno em água e dilua a 1 L.

Ácido clorídrico
Solução de hidróxido de sódio 1 M

Solução-padrão de açúcar invertido (10 g/L) – Pese com precisão 9,5 g de sacarose e transfira para um balão de 1000 mL. Adicione 5 mL de ácido clorídrico e dilua com água até cerca de 100 mL. Mantenha esta solução acidificada por vários dias (aproximadamente 7 dias de 12 a 15ºC ou 3 dias de 20 a 25ºC). Complete o volume com água. A solução ácida de açúcar

invertido a 1% permanece estável por vários meses. Pipete 50 mL da solução ácida para um balão volumétrico de 250 mL. Imediatamente antes de usar e diluir, neutralize com solução de hidróxido de sódio 1 M. Complete o volume com água, para obter a concentração de 2 g/L.

Soluções de Fehling modificadas por Soxhlet - Solução A – Dissolva 69,28 g de sulfato de cobre - $CuSO_4 . 5H_2O$ - com água em um balão volumétrico de 1 L. Complete o volume com água. Solução B - Dissolva 346 g de tartarato duplo de sódio e potássio - $K Na (C_4 H_4 O_6). 4 H_2O$ e 100 g de hidróxido de sódio com água em um balão volumétrico de 1L. Complete o volume e filtre em papel de filtro qualitativo.
Padronização – Pipete 5 mL da solução A e 5 mL da solução B para um balão de fundo chato de 250 mL. Adicione, com uma bureta de 25 mL, solução-padrão de açúcar invertido, cerca de 0,5 a 1 mL a menos do volume total necessário para reduzir todo o cobre. Aqueça a solução até a ebulição. Mantenha em ebulição moderada por 2 minutos. Sem remover da chapa elétrica, adicione 1 mL da solução de azul de metileno. Complete a titulação, dentro de um tempo total de ebulição de 3 minutos, adicionando gota a gota a solução de açúcar invertido, até a descoloração do indicador. Após a redução completa do cobre, o azul de metileno é reduzido a um composto incolor e a solução retorna à coloração que tinha antes da adição do indicador. Na padronização, as soluções de Fehling deverão reagir completamente com 0,05 g de açúcar invertido, que corresponde a 25 mL da solução-padrão de açúcar invertido (2 g/L).

Procedimento – Pese cerca de 2 g da amostra homogeneizada de mel em um béquer de 25 mL. Dissolva com água e transfira para um balão volumétrico de 200 mL. Complete o volume com água. Pipete 50 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume. Pipete 5 mL da solução A e 5 mL da solução B para um balão de fundo chato de 250 mL. Adicione 7 mL de água. Na bureta de 25 mL, coloque a solução de mel diluída e adicione 15 mL no balão de fundo chato. Aqueça a solução e mantenha em ebulição moderada por 2 minutos. Adicione 1 mL de solução de azul de metileno enquanto ainda em ebulição e complete a titulação, dentro de um tempo total de ebulição de 3 minutos, adicionando gota a gota a solução diluída de mel até a descoloração do indicador. O volume total para completar a titulação deve ser de 35 mL (soma da solução de Fehling A e B, amostra diluída de mel e água). Anote o volume gasto da solução de mel (V mL). Repita a titulação, usando 5 mL de cada solução de Fehling, (25 - V mL) de água e adicione com uma bureta o volume da solução diluída de mel gasto na titulação preliminar menos 1,5 mL. Aqueça a solução até a ebulição. Adicione 1 mL de solução de azul de metileno e complete a titulação, dentro de 3 minutos, adicionando gota a gota a solução diluída de mel até a descoloração do indicador. As titulações em duplicata devem concordar dentro de 0,1 mL.

Cálculo

$$\frac{2 \times 1000}{P \times V} = \text{açúcares redutores, em açúcar invertido, g/100 g}$$

P = massa de amostra em g
V = nº de mL da solução diluída da amostra gasto na titulação

Referências bibliográficas

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **CAC/VOL III**, Suppl. 2. ed. 1. Rome: FAO/WHO, 1989. p. 7-13.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. HARMONISED METHODS OF THE EUROPEAN HONEY COMMISSION. **Apidologie**, Paris: Issue Spec., 1997. p. 38-41.

177/IV Méis – Determinação de açúcares redutores pelo método B

Procedimento -- Pese 2 g de amostra de mel homogeneizada e proceda conforme a técnica descrita nos glicídios redutores em glicose **(038/IV)**.

178/IV Méis – Determinação de sacarose aparente pelo método A

Baseia-se na determinação dos açúcares, após a inversão por hidrólise ácida, pelo método modificado de Lane & Eyon.

Material

Balança analítica, banho-maria, chapa elétrica, espátula metálica, papel indicador universal de pH, balão de fundo chato de 250 mL, balão volumétrico de 100 mL, pipetas volumétricas de 2, 10 e 50 mL, pipeta graduada de 1 mL, buretas de 10 e 25 mL e funil pequeno.

Reagentes

Solução-padrão de açúcar invertido (10 g/L)
Soluções de Fehling, modificadas por Soxhlet
Solução de azul de metileno 0,2 % m/v
Solução de ácido clorídrico 5 M
Solução de hidróxido de sódio 5 M

Procedimento – Pipete 50 mL da solução de mel obtida na determinação de açúcares redutores **176/IV** para um balão volumétrico de 100 mL. Adicione 25 mL de água. Aqueça a 65 ºC em banho-maria. Remova o frasco do banho e adicione 10 mL de solução de ácido clorídrico. Deixe a solução resfriar naturalmente até a temperatura ambiente. Neutralize com solução de hidróxido de sódio, usando papel indicador de pH. Complete o volume com água. Proceda como em **176/IV**.

Cálculo

$$\left[\frac{(2\times 1000)}{P\times V_1} - C\right]\times 0{,}95 = \text{sacarose aparente, em g/100 g}$$

P = massa da amostra em g
V_1 = n.º de mL da solução diluída da amostra gasto na titulação
C = n.º de g de açúcar invertido por cento, obtido antes da inversão, açúcares redutores

Referências bibliográficas

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **CAC/VOL III**, Suppl. 2. ed. 1. Rome: FAO/WHO, 1989, p. 9-13.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. HARMONISED METHODS OF THE EUROPEAN HONEY COMMISSION. **Apidologie**, Paris: Issue Spec., 1997. p. 38-41.

179/IV Méis – Determinação de sacarose aparente pelo método B

Procedimento - Pese 2 g de amostra de mel homogeneizado e proceda conforme a técnica descrita no método **039/IV**.

180/IV Méis – Determinação de sólidos insolúveis em água por gravimetria

Material

Balança analítica, estufa, bomba de vácuo, chapa elétrica, termômetro, dessecador com sílica gel, espátula metálica, béquer de 150 mL, cadinho de vidro (15-40 μm), kitassato de 1000 mL e alonga de filtração.

Reagentes

Solução alcoólica de floroglucina a 1% m/v
Ácido sulfúrico

Procedimento – Pese cerca de 20 g da amostra homogeneizada de mel. Dissolva em quantidade adequada de água a 80 ºC e misture bem. Filtre sob vácuo através de um cadinho de vidro previamente tarado a (135 ± 2)ºC e lave com água a 80ºC. Recolha parte do filtrado em um tubo de ensaio e adicione algumas gotas da solução de floroglucina e de ácido sulfúrico (se houver a formação de névoa esbranquiçada existe ainda açúcar). Continue a lavagem com água a 80°C até que o filtrado esteja livre de açúcares. Seque o cadinho a 135ºC por 1 hora, resfrie e pese. Retorne para a estufa a 135ºC em um intervalo de 30 min até que o peso constante seja atingido.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{sólidos insolúveis em água g/100 g}$$

N = massa seca de sólidos insolúveis em g
P = massa da amostra em g

Referências bibliográficas

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **CAC/VOL III**, Suppl. 2. ed. 1. Rome: FAO/WHO, 1989, p.14-15.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. HARMONISED METHODS OF THE EUROPEAN HONEY COMMISSION. **Apidologie**, Paris: Issue Spec., 1997. p. 51-52

181/IV Méis – Determinação da atividade diastásica

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, cubeta 1 cm, balança analítica, banho de ultra-som, pHmetro, espátula metálica, termômetro, cronômetro, banho-maria, frasco Erlenmeyer de 250 mL, balões volumétricos de 100 e 500 mL, proveta graduada de 50 mL, béquer de 50 mL, pipetas volumétricas de 5, 10 e 20 mL.

Reagentes

Acetato de sódio
Ácido acético

Solução de amido – Pese, com precisão, 2 g de amido solúvel anidro (próprio para a determinação de poder diastásico) e misture com 90 mL de água em um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Rapidamente, leve à ebulição, agitando a solução tanto quanto possível. Reduza o aquecimento e mantenha em ebulição moderada por 3 minutos, cubra, e deixe resfriar até a temperatura ambiente. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução-estoque de iodo – Dissolva 8,8 g de iodo ressublimado em (30 - 40) mL de água contendo 22 g de iodeto de potássio e dilua para 1000 mL com água.

Solução de iodo a 0,00035 M – Dissolva 20 g de iodeto de potássio e 5 mL da solução-estoque de iodo em água e dilua para 500 mL. Prepare uma nova solução a cada dois dias.

Solução-tampão de acetato pH 5,3 (1,59 M) – Dissolva 87 g de acetato de sódio em 400 mL de água, adicione cerca de 10,5 mL de ácido acético, transfira para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume com água. Ajuste o pH para 5,3, usando o pHmetro, com acetato de sódio ou ácido acético, se necessário.

Solução de cloreto de sódio 0,5 M – Dissolva 14,5 g de cloreto de sódio em água, transfira para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume com água.

Padronização da solução de amido – Pipete 5 mL da solução de amido para um béquer contendo 10 mL de água e misture bem. Pipete 1 mL desta solução para várias provetas de 50 mL, contendo 10 mL da solução de iodo 0,00035 M. Misture bem e determine o volume de água necessário para a diluição da solução de amido, para se obter uma leitura de absorbância de 0,760 ± 0,02, a 660 nm, utilizando um branco com água. Repita a padronização a cada nova preparação da solução de amido.

Procedimento – Ligue e ajuste o espectrofotômetro conforme as instruções do fabricante, para leituras da absorbância a 660 nm. Ligue para estabilizar o pHmetro e faça os ajustes para a operação. Calibre o pHmetro com as soluções tampão 7 e 4. Pese cerca de 10 g de amostra de mel em um béquer de 50 mL e dissolva com 15 mL de água, adicione 5 mL da solução-tampão e transfira para um balão volumétrico de 50 mL, contendo 3 mL da solução de cloreto de sódio 0,5 M e complete o volume com água. É importante que o mel seja tamponado antes da adição da solução de cloreto de sódio. Pipete 5 mL da solução de amido num tubo contendo 10 mL desta solução de mel tamponada e coloque em banho de água a (40 ± 1)ºC por 15 minutos, agite essa solução periodicamente. Em intervalos

de 5 minutos, pipete alíquotas de 1 mL desta solução e adicione rapidamente 10 mL de solução de iodo diluída 0,00035 M, em uma proveta de 50 mL. Misture e dilua com água, se necessário, conforme descrito na padronização do amido. Determine a absorbância a 660 nm. Continue tomando alíquotas de 1 mL em intervalos de 5 minutos, até obter um valor de absorbância menor que 0,235.

Nota: não aqueça o mel antes desta determinação.

Construa a curva-padrão da absorbância versus o tempo em minutos. Trace uma linha reta, para determinar o tempo (t_x) em que a reação alcançou a absorbância de 0,235. Divida 300 pelo tempo (t_x) minutos para obter a atividade diastásica (AD). O resultado é expresso em unidades de Gothe ou Schade por grama de mel.

Cálculo

$$\frac{300}{t_x} = \text{atividade diastásica}$$

t_x = o tempo da reação em minutos

Referências bibliográficas

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria nº 001, de 24 de março de 1980, Secretaria de inspeção de Produto Animal. *Diário Oficial*, Brasília, 28 de mar. de 1980. Seção I, p. 5561-5572. Aprova as Normas Higiênico-sanitárias e Técnicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados...

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **CAC/VOL III,** Suppl. 2. ed. 1. Rome: FAO/WHO, 1989, p. 17-21.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. HARMONISED METHODS OF THE EUROPEAN HONEY COMMISSION. **Apidologie**, Paris: Issue Spec., 1997, p. 31-34.

182/IV Méis – Reação de Lund

A reação de Lund é aplicável em amostra de mel e indica a presença de albuminóides. Sua ausência indica fraude.

Material

Balança analítica, espátula metálica, proveta de (50 ± 0,1) mL com tampa, béquer de 25 mL, pipeta volumétrica de 5 mL, funil pequeno e bastão de vidro.

Reagentes

Solução de ácido tânico a 0,5% m/v -- Dissolva 0,5 g de ácido tânico em 100 mL de água.

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 2 g da amostra. Transfira para uma proveta de 50 mL, com tampa, com o auxílio de 20 mL de água. Adicione 5 mL de solução de ácido tânico 0,5%. Adicione água até completar o volume de 40 mL. Agite para misturar totalmente. Deixe em repouso por 24 horas. Na presença de mel puro, será formado um precipitado no fundo da proveta no intervalo de 0,6 a 3,0 mL. Na presença de mel adulterado, não haverá formação de precipitado ou excederá o volume máximo do referido intervalo.

Referências bibliográficas

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria nº 001, de 24 de março de 1980, Secretaria de Inspeção de Produto Animal. *Diário Oficial*, Brasília, 28 de mar. de 1980. Seção I, p. 5561-5572. Aprova as Normas Higiênico-sanitárias e Técnicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados...

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 163.

183/IV Méis – Reação de Fiehe

A reação de Fiehe com resorcina em meio ácido pode indicar a presença de substâncias produzidas durante o superaquecimento de mel ou a adição de xaropes de açúcares.

Material

Balança analítica, espátula metálica, provetas de 10 e 50 mL, béquer de 50 mL, pipeta graduada de 1 mL, bastão de vidro e tubo de ensaio pequeno.

Reagentes

Éter

Solução clorídrica de resorcina - Dissolva 0,5 g de resorcina em 50 mL de ácido clorídrico. Esta solução deverá ser recém-preparada.

Procedimento - Pese 5 g de amostra em um béquer de 50 mL. Adicione 5 mL de éter e agite vigorosamente. Transfira a camada etérea para um tubo de ensaio e adicione 0,5 mL de solução clorídrica de resorcina e deixe em repouso por 10 minutos. Na presença de glicose comercial ou de mel superaquecido, aparecerá uma coloração vermelha intensa, indicando a fraude.

Referências Bibliográficas

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria nº 001, de 24 de março de 1980, Secretaria de Inspeção de Produto Animal. *Diário Oficial*, Brasília, 28 de mar. de 1980. Seção I, p. 5561-72. Aprova as Normas Higiênico-sanitárias e Técnicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados...

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3ª ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 164.

0184/IV Méis – Reação de Lugol

A reação com solução de Lugol pesquisa a presença de amido e dextrinas no mel.

Material

Balança analítica, banho-maria, espátula metálica, proveta de 50 mL, béquer de 50 mL, pipeta graduada de 1 mL e bastão de vidro.

Reagentes

Solução de Lugol - Dissolva 1 g de iodo ressublimado em 10 mL de água contendo 3 g de iodeto de potássio e dilua para 50 mL com água e armazene a solução em frasco âmbar.

Procedimento – Pese 10 g da amostra em um béquer de 50 mL. Adicione 20 mL de água e agite. Deixe no banho-maria fervente por 1 hora e em seguida resfrie à temperatura ambiente. Adicione 0,5 mL da solução de Lugol. Na presença de glicose comercial ou xaropes de açúcar, a solução ficará colorida de marrom-avermelhada a azul. A intensidade da cor depende da qualidade e da quantidade das dextrinas ou amido, presentes na amostra fraudada. Faça a mesma prova para um mel puro para comparação.

Referências bibliográficas

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria nº 001, de 24 de março de 1980, Secretaria de Inspeção de Produto Animal. *Diário Oficial*, Brasília, 28 de mar. de 1980. Seção I, p. 5561-72. Aprova as Normas Higiênico-sanitárias e Técnicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados...

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3ª ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 165.

Colaboradores

Cristiane Bonaldi Cano; Letícia Araújo Farah Nagato e Maria Cristina Duran

CAPÍTULO **VIII**

ÁGUAS

VIII

ÁGUAS

A água é importante para a manutenção da vida e a sua sanidade e utilização racional são de impacto para a economia e preservação da saúde da coletividade. A água para o consumo humano é aquela cujos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e radioativos atendem aos padrões de potabilidade e não oferecem risco à saúde da população. Essas águas são captadas de mananciais superficiais.

De acordo com a origem e tratamento recebido, as características das águas potáveis variam, sendo de grande importância o conjunto de determinações físico-químicas, a seguir descritas, que avaliam essas propriedades. Esses referidos ensaios são destinados à verificação da qualidade de águas provenientes de poços, minas, água mineral e de abastecimento público.

185/IV Determinação de dureza

A dureza total é definida como a soma das concentrações de cálcio e magnésio, ambas expressas como carbonato de cálcio, em miligramas por litro. O ácido etilenodiaminotetracético e seus sais sódicos (EDTA) formam complexos quelados solúveis com certos cátions metálicos. Uma solução contendo íons de cálcio e magnésio, com uma pequena quantidade do indicador negro de eriocromo T, em pH (10,0±0,1) torna-se púrpura. Titulando-se essa solução com EDTA, cálcio e magnésio serão quelados e uma viragem de cor púrpura a azul indicará o ponto final.

Material

Pipeta de 50 mL (ou balão volumétrico), pipeta de 2 mL, frasco Erlenmeyer de (250 e 500) mL, buretas de (10 e 25) mL e balões volumétricos de 250 e 1000 mL.

Reagentes

Solução-padrão de cálcio – Transfira, para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, 1 g de carbonato de cálcio previamente aquecido a 105°C por 15 horas. Adicione, por meio de um funil, ácido clorídrico diluído a 50%, aos poucos, até dissolver todo o carbonato. Adicione 200 mL de água. Aqueça até ebulição para eliminar todo gás carbônico. Esfrie, adicione duas gotas do indicador vermelho de metila e ajuste para cor alaranjada, adicionando hidróxido de amônio 3 M ou ácido clorídrico 50%.Transfira a solução para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água. Um mL desta solução equivale a 1 mg de carbonato de cálcio.

Solução-tampão – Dissolva 16,9 g de cloreto de amônio em 143 mL de hidróxido de amônio. Adicione 1,25 g do sal Mg-EDTA e dilua para 250 mL com água destilada.

Nota: Se o sal Mg-EDTA não for disponível, alternativamente, dissolva 1,179 g de EDTA dissódico e 780 mg de sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) ou 644 mg de cloreto de magnésio ($MgCl_2.6H_2O$) em 50 mL de água destilada. Adicione à esta solução 16,9 g de cloreto de amônio e 143 mL de hidróxido de amônio concentrado com agitação e dilua para 250 mL com água destilada.

Solução indicadora – Misture, em almofariz, 0,5 g de negro de eriocromo T - sal sódico do ácido 1-(1-hidroxi-2-naftilazo)-5-nitro-2-naftol-4-sulfônico) - com 100 g de cloreto de sódio. Conserve em frasco com rolha esmerilhada.

Solução de EDTA 0,01 M – Dissolva 3,72 g do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético dihidratado em água bidestilada e deionizada e complete a 1000 mL.

Padronização – Transfira 50 mL de água destilada e deionizada para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 2 mL da solução-tampão e 0,05 g do indicador negro de eriocromo T. Adicione 20 mL da solução-padrão de cálcio. Titule com a solução de EDTA até viragem da cor púrpura para azul. Calcule a massa de $CaCO_3$ eqüivalente a 1 mL da solução de EDTA.

Procedimento – Transfira 50 mL da amostra para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 1 mL da solução-tampão e pequena porção (0,05 g) do indicador negro de eriocromo T. Titule com a solução de EDTA 0,01 M até que a coloração púrpura passe a azul.

Cálculo

$$\frac{1000 \times v \times A}{V} = \text{mg de carbonato de cálcio por litro}$$

v = nº de mL de solução de EDTA gasto na titulação
A= mg de $CaCO_3$ eqüivalente a 1 mL da solução de EDTA 0,01 M

V = n° de mL da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 307-308.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association,1995. chapter 2, p. 2-37.

186/IV Determinação de dureza de carbonatos e de não-carbonatos

Quando a dureza é numericamente maior que a soma da alcalinidade de carbonato e de bicarbonato, a quantidade de dureza equivalente à alcalinidade total é denominada "dureza de carbonatos"; a quantidade de dureza em excesso à anterior é denominada "dureza de não-carbonatos".

$D \leq A$ - Dureza de carbonatos = D

$D > A$ - Dureza de carbonatos = A

A = alcalinidade de carbonatos + alcalinidade de bicarbonatos
D = dureza total

Calcule a dureza de não-carbonatos subtraindo a dureza de carbonato da dureza total.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 309.

187/IV Determinação da alcalinidade total por método volumétrico com indicador visual

A alcalinidade total de uma solução é, geralmente, devida aos íons hidroxila, carbonato e bicarbonato dissolvidos na água e a soma das concentrações desses íons é expressa em carbonato de cálcio. O conteúdo de cloro residual não deve ser superior a 1,8 mg/L, pois pode destruir o indicador colorimétrico; esse excesso de cloro pode ser eliminado pela adição de solução de tiossulfato de sódio (1 litro de água com concentração de cloro de 1,8 mg/L

necessita de 1 mL de solução de tiossulfato de sódio contendo 3,2 g/L). A alcalinidade total é determinada por titulação da amostra de água com solução padronizada de ácido, com pontos finais estabelecidos em pH 4,5 e 8,3. As medidas podem ser realizadas por volumetria, com emprego de indicadores ácido-base. As reações que se processam são:

$H_3O^+ + OH^- \leftrightarrow 2H_2O$

$CO_3^{-2} + H_3O^+ \leftrightarrow HCO_3^- + H_2O$

$HCO_3^- + H_3O^+ \leftrightarrow H_2CO_3 + H_2O$

Material

Pipeta volumétrica de 50 mL, balões volumétricos de 100 e 1000 mL, pipetas, frascos Erlenmeyer de 250 mL, bureta de 25 mL, pesa-filtro, balança analítica e frasco conta-gotas.

Reagentes

Solução-padrão de carbonato de sódio 0,025 M

Solução-padrão de ácido sulfúrico 0,05 M ou clorídrico 0,1 M – Dilua em um balão volumétrico de 1000 mL, 3 mL de ácido sulfúrico ou 8,3 mL de ácido clorídrico e complete o volume com água. Coloque a solução ácida na bureta e padronize, por titulação, com 40 mL de solução de carbonato de sódio 0,025 M.

Padronização da solução de ácido sulfúrico 0,05 M ou ácido clorídrico 0,1 M, utilizando indicador visual – Em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, adicione 40 mL de solução-padrão de carbonato de sódio e 60 mL de água bidestilada e deionizada. Coloque na bureta o ácido a ser padronizado (H_2SO_4 0,05 M ou HCl 0,1 M). Adicione duas gotas de indicador fenolftaleína e acrescente lentamente o ácido até viragem de cor rósea a incolor (formação de HCO_3^-). A seguir, adicione 2 gotas de indicador verde de bromocresol ou da mistura de verde de bromocresol e vermelho de metila. Continue a titulação até viragem de cor azul para verde (ou verde para amarela, no caso de mistura de indicadores).

Nota: 1 mL da solução ácida = 5 mg de $CaCO_3$

Indicador verde de bromocresol – Pese 100 mg do indicador verde de bromocresol (sal sódico), transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água bidestilada e deionizada.

Indicador verde de bromocresol-vermelho de metila – Dissolva 100 mg de verde de bromocresol (sal sódico) e 20 mg de vermelho de metila (sal sódico) em 100 mL de água, ou

alternativamente, em 100 mL de álcool a 95% ou álcool isopropílico.

Solução de fenolftaleína – Pese 1 g de fenolftaleína, transfira para um balão volumétrico de 100 mL, dissolva com álcool a 95% e complete o volume.

Solução de tiossulfato de sódio – Pese 3,2 g de tiossulfato de sódio, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL, dissolva com água destilada e deionizada e complete o volume .

Solução de ácido sulfúrico 0,005 M ou de ácido clorídrico 0,01 M – Transfira 100 mL da solução de ácido sulfúrico 0,05 M ou 100 mL da solução de ácido clorídrico 0,1 M para um balão de 1000 mL. Complete o volume com água bidestilada e deionizada.
Procedimento – Transfira 50 mL da amostra para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 2 gotas da solução indicadora de fenolftaleína. Se aparecer cor, hidróxidos ou carbonatos estão presentes, e então titule esta solução, sob agitação constante, com solução padronizada 0,005 M de ácido sulfúrico ou 0,01 M de ácido clorídrico até o desaparecimento da cor rósea. Anote o volume gasto na bureta (alcalinidade referente a íons hidroxila livres). Adicione 2 gotas do indicador verde de bromocresol (ou da mistura dos indicadores verde de bromocresol e vermelho de metila) à solução incolor acima obtida. Titule com solução de ácido sulfúrico 0,005 M (ou ácido clorídrico 0,01 M), até a mudança da cor azul para verde (ou de verde para amarelada, no caso da mistura dos indicadores). Leia na bureta o volume total de ácido gasto (alcalinidade total).

Cálculo

$$\frac{v \times M \times 50}{Va} = \text{mg de carbonato de cálcio por litro (usando HCl 0,01M)}$$

$$\frac{v \times M \times 100}{Va} = \text{mg de carbonato de cálcio por litro (usando } H_2SO_4 \text{ 0,005M)}$$

v = volume do ácido sulfúrico (ou clorídrico) gasto, em L
M = molaridade da solução de ácido
Va = volume da amostra de água, em L

Nota: a alcalinidade referente a íons hidroxila livres (F) e total (AT) pode ser usada para se calcular a alcalinidade em termos de hidróxido, carbonato e bicarbonato. A realização deste cálculo é feita utilizando a tabela 1.

Tabela 1 – Cálculo de alcalinidade da água

Resultado da titulação	Alcalinidade (em mg/L como $CaCO_3$)		
	Hidróxidos	Carbonatos	Bicarbonatos
F = 0	0	0	AT

F < ½ AT	0	2 F	AT – 2 F
F = ½ AT	0	2 F	0
F > ½ AT	2 F – AT	2 (AT – F)	0
F = AT	AT	0	0

F = alcalinidade fenolftaleína, AT = alcalinidade total

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association,1995. chapter 2, p. 25-28.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo:IMESP, 1985. p. 307-310.

188/IV Determinação de amônia por método potenciométrico

A presença de amônia nas águas de superfície pode ser resultante da desaminação de compostos orgânicos que contêm nitrogênio por atividade microbiológica ou pela hidrólise da uréia. Pode também ter origem durante o tratamento da água, para formar resíduo combinado de cloro (cloraminas). O método potenciométrico é aplicado para a determinação de amônia em águas de superfícies, domésticas e de resíduos industriais. Interferem nesta metodologia altas concentrações de íons dissolvidos, porém a cor e turbidez não são interferentes. O eletrodo seletivo para amônia possui uma membrana hidrofóbica gás-permeável, para separar a amostra da solução interna do eletrodo (cloreto de amônio). Obtém-se NH_3 aquosa quando, na solução contendo a mistura de NH_3 e NH_4^+, por mudança de pH com base forte (aproximadamente 11), os íons NH_4^+ se convertem em NH_3 aquosa.

Material

Potenciômetro, eletrodo seletivo, agitador magnético, balança analítica, béqueres de 150 mL, balões volumétricos de 100 e 1000 mL e pipetas volumétricas.

Reagentes

Cloreto de amônio
Hidróxido de sódio
Tiossulfato de sódio
Tetraborato de sódio

Solução-estoque de cloreto de amônio – Pese 3,819 g de cloreto de amônio, seco a 105°C por duas horas. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água bidestilada e deionizada, livre de amônia. Transfira 10 mL desta solução para balão volumétrico de 1000 mL. Complete o volume (cada mL desta solução contém 1 mg de N ou 1,22 mg de NH_3).

Soluções-padrão de cloreto de amônio – Prepare, a partir de diluições de uma solução-estoque de cloreto de amônio com água, uma série de soluções de concentrações 0,1; 1, 10 e 100 mg/L de NH_3.

Curva-padrão – Transfira 100 mL de cada solução-padrão para béqueres de 150 mL. Mergulhe o eletrodo no padrão de mais baixa concentração e agite lentamente (para minimizar as perdas de NH_3) com um agitador magnético. Mantenha a agitação à temperatura de 25°C e adicione aproximadamente 1 mL de NaOH 10 M para elevar o pH até 11. O eletrodo deve permanecer na solução até que a leitura, em milivolts, permaneça estável. Não adicione NaOH antes de imergir o eletrodo na solução. Repita o procedimento para todas as soluções-padrão, aguardando estabilização das leituras. Construa a curva: concentração de amônia, em mg/L *versus* potencial, em milivolts, utilizando papel semi-logarítimico.

Procedimento – Transfira 100 mL da amostra de água para um béquer de 150 mL e proceda como na curva-padrão. A partir da leitura obtida para amostra, interpole a concentração de NH_3, na curva-padrão previamente construída.

Referência bibliográfica

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 4, p. 78-79.

189/IV Determinação de amônia por método espectrofotométrico

Este método utiliza o reagente de Nessler que reage, quando adicionado a uma solução diluída de amônia, formando um composto de cor amarelada, o qual pode flocular após

certo tempo. A determinação espectrofotométrica deve ser efetuada antes que isto ocorra.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, sistema de destilação, balança analítica, balões volumétricos de 50 e 1000 mL e pipetas volumétricas de 1, 2 e 10 mL.

Reagentes

Cloreto de amônio
Carbonato de sódio
Hidróxido de sódio
Iodeto de mercúrio II
Iodeto de potássio
Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
Monohidrogenofosfato de potássio ($K_2HPO_4.3H_2O$)
Água bidestilada e deionizada, livre de amônia para preparo de reagentes

Reagente de Nessler: solução A – Pese 100 g de iodeto de mercúrio II e 70 g de iodeto de potássio, transfira para um balão volumétrico de 200 mL, dissolva e complete o volume com água destilada e deionizada; solução B – Pese 160 g de hidróxido de sódio e dissolva com 500 mL de água destilada e deionizada. Resfrie à temperatura ambiente. Adicione vagarosamente e sob agitação, a solução A à solução B e dilua para 1000 mL com água bidestilada e deionizada. Manuseie a solução na penumbra e armazene-a em frasco plástico rígido ao abrigo da luz.

Solução-tampão de fosfato de potássio – Pese 14,3 g de dihidrogenofosfatode potássio e 90,15 g de monohidrogenofosfato de potássio. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Esta solução deverá apresentar pH (7,4 ± 0,2). Confira com medida potenciométrica. Caso não coincida o valor com o mencionado, acerte, via potenciométrica, pela adição de um dos sais sólidos mencionados, sob agitação.

Solução-padrão de cloreto de amônio – Pese 0,0785 g de cloreto de amônio e transfira para um balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água bidestilada e deionizada. Esta solução tem concentração equivalente a 25 mg de NH_3/L.

Procedimento

Teste qualitativo – Transfira 50 mL da amostra de água para uma cápsula de porcelana e adicione 1 mL do reagente de Nessler, sem agitação. Aguarde 10 minutos e observe o desenvolvimento de coloração amarela, comparando-a com um branco com água bidestilada e deionizada. Se houver aparecimento de cor amarela, proceda a destilação da amostra.

Destilação da amostra – Transfira, para o sistema de destilação, 50 mL de solução saturada de carbonato de sódio e 500 mL de água destilada. Destile aproximadamente 300 mL e despreze. Continue a destilação, recolha 50 mL de destilado e adicione 1 mL de reagente de Nessler. A coloração amarela indica resultado positivo. Continue a destilação até que o teste seja negativo. Esfrie o sistema e substitua o volume restante do balão por 500 mL da amostra. Adicione 10 mL da solução-tampão de fosfato de potássio. Proceda a destilação de modo que o tubo de saída do destilado fique imerso na solução coletora (50 mL de ácido sulfúrico 0,02 M) contida em um Erlenmeyer de 250 mL. A velocidade de destilaçao deverá ser de 6 a 10 mL/min. Colete aproximadamente 180 mL do destilado, transfira para um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume. Transfira 50 mL do destilado para balão volumétrico, adicione 1 mL de reagente de Nessler e homogeneíze. Deixe em repouso por 10 minutos e meça a coloração desenvolvida, em espectrofotômetro a 425 nm e determine a quantidade de amônia correspondente, usando a curva-padrão previamente estabelecida.

Curva-padrão – A partir de diluições da solução-padrão de cloreto de amônio, prepare uma série de soluções de concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg de NH_3/L, transferindo, respectivamente, 1, 2, 3, e 4 mL da solução-mãe para balões volumétricos de 50 mL e completando o volume com água destilada e deionizada. Adicione a cada balão 1 mL de reagente de Nessler e homogeneíze. Deixe em repouso por 10 minutos e meça a coloração desenvolvida, em espectrofotômetro, a 425 nm. Construa a curva-padrão.

Cálculo

Determine a concentração de amônia utilizando a curva-padrão estabelecida com soluções-padrão de cloreto de amônio. Multiplique o resultado por 0,5, pois foi tomada uma alíquota de 50 mL de um volume de 250 mL contendo 200 mL de distilado de 500 mL da amostra.

Nota: para expressar o resultado em nitrogênio amoniacal, o procedimento será o mesmo, bastando multiplicar o resultado obtido para amônia por 14/17 (ou 0,824).

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION WATER ,ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 4, p. 75-76.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo:IMESP, 1985. p. 313-315.

190/IV Determinação de cloreto

Íons cloreto podem ser encontrados em águas provenientes de depósitos minerais e de fontes poluídas, tais como esgotos e resíduos industriais. Em solução com pH entre 6,0 e 7,5, íons cromato são usados para indicar o ponto final da titulação de íons cloreto com íons prata. O cloreto de prata é precipitado quantitativamente antes do cromato de prata, de cor vermelha.

Material

Banho-maria, estufa, dessecador, balança analítica, cápsula de porcelana de 150 mL, buretas de 10 e 25 mL, bastão de vidro, balões volumétricos de 50 e 1000 mL, pipetas volumétricas de 25 e 50 mL e bureta de 25 mL.

Reagentes

Cromato de potássio
Cloreto de sódio
Nitrato de prata

Solução-padrão de nitrato de prata 0,0282 M – Pese 4,7909 g de nitrato de prata, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL, dissolva e complete o volume com água destilada e deionizada.

Indicador cromato de potássio 10% m/v – Pese 5 g de cromato de potássio, transfira para um balão volumétrico de 50 mL, dissolva e complete o volume com água destilada e deionizada.

Solução-padrão de cloreto de sódio – Aqueça o cloreto de sódio em estufa a 200°C, por três

horas. Resfrie em dessecador, pese 1,6484 g do sal e dilua a 1000 mL, em balão volumétrico, com água destilada e deionizada. Um mL desta solução corresponde a 1 mg de íon cloreto. Transfira 25 mL de solução de cloreto de sódio para o interior da cápsula de porcelana de 150 mL. Adicione 4 gotas de indicador de cromato de potássio. Adicione o nitrato de prata pela bureta de 25 mL, lentamente, sob agitação até o aparecimento de um precipitado levemente avermelhado. Anote o volume gasto e calcule a molaridade da solução de nitrato de prata, usando a fórmula:

$$\frac{M \times v}{v_1} = \text{molaridade da solução de nitrato de prata}$$

M = molaridade da solução de nitrato de prata
v = volume da solução de cloreto de sódio
v_1 = volume da solução de nitrato de prata

Procedimento – Pipete 50 mL da amostra para uma cápsula de porcelana de 150 mL. Aqueça em banho-maria até reduzir o volume a aproximadamente 20 mL. Adicione 4 gotas do indicador cromato de potássio. Titule com a solução de nitrato de prata em bureta de 10 mL até o aparecimento de uma coloração avermelhada.

$$\frac{M \times v \times 35{,}453 \times 1000}{v_a} = \text{mg de cloreto por litro}$$

M = molaridade do nitrato de prata
v = volume de nitrato de prata gasto na titulação
v_a = volume da amostra, em mL

Referências bibliográficas

THEROUX, F.R.; ELDRIDGE, E.F.; MALLMANN, W.R. **Laboratory Manual for Chemical and Bacterial Analysis of Water and Sewage**. 3.ed. London: McGraw-Hill Book Company, 1943. p. 15,68,164.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed.. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 4, p.48-50.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo:IMESP, 1985. p. 320-321.

191/V Determinação da cor pelo método de comparação óptica por via instrumental

A presença de cor na água pode ser devida ao seu conteúdo de íons metálicos (geralmente ferro e manganês), plâncton, resíduo industrial, húmus e outros materiais orgânicos e poderá ser expressa como "aparente" ou como "verdadeira". A aparente é originária dos materiais dissolvidos e em suspensão. Por sedimentação ou centrifugação dos materiais em suspensão, pode-se determinar a cor verdadeira. Se a cor aparente é a dos materiais em suspensão, pode-se determinar a cor verdadeira. Se a cor aparente é a que se quer determinar, proceda à análise da amostra sem submetê-la à separação de materiais em suspensão (não filtrada). A cor é determinada por comparação visual entre a amostra e soluções coloridas de concentrações conhecidas. A comparação poderá ser feita por via instrumental, com discos coloridos especiais.

Material

Aparelho comparador visual munido de disco padrão de cor; tubos de cristal próprios para a leitura ou tubos de Nessler de 50 mL, peças de cristal homogêneo e *plunger.*

Reagentes

Solução-padrão de cor – Pese 1,246 g de hexacloroplatinato de potássio (K_2PtCI_6), 1 g de cloreto cobaltoso $CoCI_2.6H_2O$ e meça 100 mL de ácido clorídrico. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água bidestilada e deionizada. Esta solução-estoque apresenta cor equivalente a 500 unidades internacionais. Prepare padrões contendo cores de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, e 70 unidades, diluindo 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0 e 7,0 mL da solução-padrão estoque em balões volumétricos de 50 mL. Proteja estes padrões contra a evaporação e a contaminação quando não estiverem sendo usados.

Procedimento – Encha um dos tubos com água bidestilada e deionizada, de modo a não formar bolhas. Mergulhe o *plunger* no interior do tubo de água de modo a homogeneizar o conteúdo da coluna. Proceda analogamente com o segundo tubo, utilizando agora a amostra cuja cor se quer determinar. Leve os tubos ao comparador visual, colocando-os corretamente em cada presilha do aparelho. Gire o disco até que a cor da amostra coincida com a cor apresentada no disco padrão. Faça a leitura da escala. O resultado é expresso em uH (unidade de Hazen).

Nota: Caso deseje medir a cor verdadeira, faça a decantação e, se necessário, centrifugue previamente uma porção da amostra (como opção, pode-se efetuar filtração com papel quantitativo para precipitados finos).

Referências Bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewate**r, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 2, p. 1-3.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo:IMESP, 1985. p. 322-323.

192/IV Determinação de ferro

Os compostos de ferro, muito abundantes na natureza, são integrantes da composição química do solo, das rochas e da matéria vegetal. Em condições redutoras, o ferro existe no estado ferroso. Em águas expostas ao ar ou em condições oxidantes, os íons ferrosos são oxidados ao estado férrico, o qual se hidrolisa formando hidróxido de ferro III insolúvel. O ferro ocorre em solução aquosa, em estado coloidal que pode ser peptizado por matéria orgânica, em complexos inorgânicos ou orgânicos ou em partículas em suspensão.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, chapa elétrica, pHmetro, balança analítica, béqueres de 100, 250, 500, 1000 e 2000 mL, balões volumétricos de 50, 100 e 1000 mL, barra magnética, buretas de 10 mL e 25 mL, frascos Erlenmeyer de 125 e 250 mL, funil de haste longa, lã de vidro, pipetas volumétricas de 5, 25 e 50 mL, pipetas graduadas de 5 mL, proveta de 100 mL e vidro de relógio.

Nota: recomenda-se não usar espátula metálica

Reagentes

Acetato de sódio
Ácido acético glacial
Ácido clorídrico
Ácido fosfórico
Ácido sulfúrico
1,10-Fenantrolina
Cloreto de hidroxilamina
Oxalato de sódio
Permanganato de potássio
Sulfato ferroso amoniacal

Zinco em pó
Ácido sulfúrico 0,4 M
Solução de permanganato de potássio 0,02 M
Ácido clorídrico a 50%
Ácido sulfúrico a 50% (para padronização do $KMnO_4$).

Solução-padrão de ferro II – Pese 7 g de sulfato de amônio e ferro $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$, dissolva em 50 mL de água bidestilada e deionizada, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e adicione 5 mL de ácido sulfúrico. Complete o volume com água destilada e deionizada e homogeneíze. Esta solução contém cerca de 1 g de ferro. Pipete 25 mL da solução-estoque em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 70 mL de água bidestilada e deionizada, 0,1 g de zinco em pó. Ferva lentamente, até dissolver todo o zinco, agitando o frasco Erlenmeyer, de tempos em tempos, com movimentos circulares. Se a solução ficar turva, adicione, lentamente, solução de ácido sulfúrico 1 M até a turvação desaparecer. Esfrie, cobrindo o frasco Erlenmeyer com vidro de relógio. Adicione 1 mL de ácido fosfórico e titule imediatamente com solução-padrão de permanganato de potássio 0,02 M até cor levemente rosada. A solução original deve estar com concentração ao redor de 0,0178 M em íons de Fe II.

Nota: quando disponível, poderá ser usada a solução-padrão 1000 mg/kg (em Fe) para espectrometria de absorção atômica.

Reagente cloreto de hidroxilamônio (cloridrato de hidroxilamina) – Pese 10 g de cloreto de hidroxilamônio $NH_2OH.HCl$, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água destilada e deionizada.

Solução-tampão de acetato de sódio – Dissolva 250 g de acetato de sódio em 150 mL de água destilada e deionizada em béquer de 1000 mL. Mergulhe um eletrodo de vidro combinado previamente calibrado, conectado a pHmetro, uma barra magnética e, sob agitação, adicione lentamente 500 mL de ácido acético glacial. Após homogeneização, sob agitação constante, continue adicionando o ácido acético até o pH ficar entre 4,4 e 5,0. Complete o volume a 1000 mL com água bidestilada e deionizada. Transfira para frasco de vidro e guarde em geladeira, para se evitar a formação de fungos. Retire da geladeira, uma hora antes do uso, quantidades suficientes recolhidas em béqueres ou frascos pequenos de polietileno e mantidas à temperatura ambiente.

Solução-reagente – Pese 1 g de 1,10-fenantrolina monoidratada $C_{12}H_8N_2.H_2O$, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL com 100 mL de água bidestilada e deionizada, adicione duas gotas de HCl, dissolva sob agitação e complete o volume com água bidestilada e deionizada.

Curva-padrão – Pipete 1 mL da solução-estoque com pipeta volumétrica em um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água bidestilada e deionizada. Esta solução contém 10 mg de Fe ou o confirmado pela padronização. Seguindo o mesmo tratamento dado às amostras, abaixo descrito, prepare soluções-padrão de ferro contendo 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/L de ferro, a partir da solução-estoque de 10 mg/L. Com bureta de 10 mL, adicione quantidades de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL em balão volumétrico de 50 mL. Complete o volume com água bidestilada e deionizada e transfira para um béquer de 250 mL. Adicione 4 mL de HCl a 50% e 1 mL de solução de $NH_2OH.HCl$. Ferva até que o volume se reduza a 15 ou 20 mL. Esfrie à temperatura ambiente. Adicione 10 mL do tampão de acetato de sódio, 2 mL de solução de 1,10-fenantrolina. Transfira para outro balão volumétrico de 50 mL, lavando as paredes do béquer e complete o volume com água bidestilada e deionizada. Homogeneíze e deixe em repouso por 10 a 15 minutos, para o completo desenvolvimento da cor. Meça a absorbância em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda igual a 510 nm. Construa o gráfico de absorbância em função da concentração da solução-padrão de ferro (em mg Fe/L).

Procedimento – Agite bem a amostra e transfira 50 mL para um béquer de 250 mL. Adicione 4 mL de HCl 50% (v/v) e 1 mL de solução de cloreto de hidroxilamônio10% (m/v). Ferva até que o volume se reduza a 15 ou 20 mL. Esfrie à temperatura ambiente. Adicione 5 mL de tampão acetato e 2 mL de solução de fenantrolina. Transfira para um balão volumétrico de 50 mL, lavando as paredes do béquer e complete o volume com água destilada e deionizada. Homogeneíze e deixe em repouso por 10 a 15 minutos, para o completo desenvolvimento da cor. Acerte o "zero" do equipamento com a prova em branco. Meça a absorbância da amostra analisada.

Nota: quando o teor de ferro na amostra for superior a 1 mg/L, dilua, cuidadosamente, uma alíquota da amostra original até 50 mL e proceda de maneira análoga à descrita no procedimento. Jamais dilua a solução colorida final.

Cálculo

Obtenha a concentração da amostra diretamente da curva-padrão.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 3, p. 68-70.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 319-320.

193/IV Determinação de fluoreto pelo método colorimétrico

O íon fluoreto em águas pode ocorrer naturalmente ou proveniente do processo de fluoretação, o qual consiste na adição controlada de compostos de flúor na água de abastecimento público. Quando presente em concentrações adequadas, o flúor produz efeitos benéficos, promovendo a redução da incidência de cáries dentais, porém pode originar a fluorose quando em concentrações acima das recomendadas.

Entre os métodos analíticos sugeridos para a determinação do íon fluoreto em águas, o método potenciométrico com eletrodo íon seletivo é o mais indicado, mas pode-se também usar o colorimétrico com o reagente de SPADNS. Ambos estão sujeitos a erros devido à interferência de outros íons presentes. A fim de eliminar estas interferências, pode ser necessária a destilação prévia da amostra; no caso de águas potáveis, onde a concentração destes íons interferentes é pequena, a destilação da amostra, normalmente, não é necessária.

Tabela 2 – Concentração limite das substâncias que causam interferência na determinação do íon fluoreto

Substância ou parâmetro	Método potenciométrico		Método colorimétrico	
	mg/L	tipo de erro	mg/L	tipo de erro
alcalinidade ($CaCO_3$)	7000	+	5000	-
alumínio	3	-	0,1*	-
cloreto	20000		7000	+
cloro	5000		remoção com arsenito de sódio	
cor e turbidez			remoção por destilação	
ferro	200	-	10	-
hexametafosfato	50000		1,0	+
fosfato	50000		16	+
sulfato	50000	-	200	-

(*) para leitura imediata, a tolerância aumenta com o tempo: após 2 h, 3 mg/L; depois de 4 h, 30 mg/L

O método colorimétrico utilizando como reagente o SPADNS tem uma faixa analítica de 0 a 1,40 mg/L com desenvolvimento de cor virtualmente instantânea. A determinação da concentração do íon fluoreto é feita por meio da medida de absorbância da amostra. Este método baseia-se na reação entre o fluoreto e o composto colorido formado entre o zircônio

e o SPADNS. O fluoreto reage com este composto resultando em um complexo sem cor (ZrF_6^{-2}) e liberando o ligante orgânico. Com o aumento da concentração de fluoreto, ocorre um decréscimo na intensidade da cor da solução. Algumas interferências podem ser eliminadas pelo uso de reagentes específicos, como o arsenito de sódio para eliminação de cloro ou o aumento do tempo de repouso da amostra após a adição do reagente analítico, no caso específico do alumínio. Para as demais interferências, tais como: hexametafosfato (1 mg/L), fosfato (16 mg/L) e sulfato (200 mg/L), é necessária a destilação prévia da amostra.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, balões volumétricos de 50, 100, 500 e 1000 mL, bureta de 10 mL, pipetas volumétricas de 5, 10 e 50 mL e proveta de 10 mL.

Reagentes

Fluoreto de sódio anidro
Sal trissódico do ácido 4,5-di-hidróxido-3-(para-sulfo-fenil-azo)- 2,7-naftileno-dissulfônico – SPADNS
Oxicloreto de zircônio octahidratado
Ácido clorídrico
Arsenito de sódio

Solução-padrão de fluoreto 100 mg/L – Pese 221 mg de fluoreto de sódio anidro, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete com água bidestilada e deionizada. Armazene esta solução (1 mL = 0,1 mg F^-) em frasco plástico (polipropileno). Dilua 100 mL da solução-estoque de fluoreto a 1000 mL com água destilada e deionizada, (1 mL = 0,01 mg F^-). A partir desta solução, prepare uma série de padrões de fluoreto com concentrações no intervalo de 0,05 a 1,4 mg F^-/L, com volume final de 100 mL.

Solução de SPADNS – Pese 958 mg de SPADNS, transfira para um balão volumétrico de 500 mL e complete com água destilada e deionizada. Esta solução é estável por um ano, se protegida da luz direta.

Solução de oxicloreto de zircônio – Pese 133 mg de oxicloreto de zircônio, $ZrOCl_2$. $8H_2O$ e transfira para um balão volumétrico de 500 mL, aproximadamente 25 mL de água bidestilada e deionizada e 350 mL de ácido clorídrico. Complete o volume com água destilada e deionizada.

Solução mistura SPADNS-oxicloreto de zircônio – Misture volumes iguais das soluções de SPADNS e de oxicloreto de zircônio. Armazene em frasco âmbar, protegido da luz. A solução é estável por 2 anos.

Solução de referência – Misture 10 mL da solução de SPADNS e 100 mL de água bidestilada e deionizada. Adicione 10 mL ácido clorídrico diluído (7 mL de ácido clorídrico mais 3 mL de água bidestilada e deionizada). A solução resultante é utilizada para estabelecer o ponto de referência (zero) de absorbância do instrumento. Esta solução é estável por um ano.

Solução de arsenito de sódio 0,5% (m/v) – Pese 5 g de arsenito de sódio, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada.

Procedimento – Ajuste o equipamento para comprimento de onda igual a 570 nm. Determine o ponto de referência (zero) do espectrofotômetro a partir da solução de referência. Se a amostra contiver cloro residual, o mesmo deve ser eliminado pela adição de solução de arsenito de sódio. Meça 50 mL da amostra de água a ser analisada. Adicione 1 mL de arsenito de sódio a 0,5% (se a amostra contiver cloro residual), agite e espere 1 minuto. Adicione 5 mL da solução SPADNS e 5 mL da solução de oxicloreto de zircônio, ou 10 mL do reagente SPADNS-oxicloreto de zircônio, e misture bem. Leia as absorbâncias das amostras a 570 nm. Se o valor de absorbância da amostra não estiver dentro do intervalo da curva-padrão, repita o procedimento usando uma amostra diluída.

Curva-padrão – Meça porções de 50 mL de soluções-padrão de concentrações no intervalo de 0,05 a 1,4 mg F^-/L. Adicione a cada uma, 5 mL de solução SPADNS e 5 mL de oxicloreto de zircônio, ou 10 mL do reagente SPADNS-oxicloreto de zircônio e misture. Faça as leituras de absorbância de cada uma das soluções-padrão na mesma temperatura em que serão lidas as amostras. Construa o gráfico de absorbância em função da concentração de fluoreto. Deve-se obter uma reta com coeficiente angular negativo.

Nota: prepare uma nova curva-padrão sempre que alguma das soluções reagentes seja refeita.

Cálculo

Determine a concentração de fluoreto diretamente da curva-padrão.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 325-326.

194/IV Determinação de fluoreto pelo método potenciométrico

O método potenciométrico com eletrodo de íon seletivo de fluoreto é adequado para concentrações de íon fluoreto acima de 0,2 mg/L. A adição de solução-tampão elimina algumas interferências e, nestes casos, evita-se a destilação prévia. As vantagens deste método são: alta seletividade, simplicidade e rapidez. O eletrodo de fluoreto é um sensor íon-seletivo. O elemento principal do eletrodo de fluoreto, basicamente, é um monocristal de fluoreto de lantânio, através do qual se estabelece um potencial entre a solução de fluoreto interna do eletrodo e a solução cuja concentração do referido íon pretende-se determinar. O cristal entra em contato com a amostra em uma face e uma solução interna de referência com a outra face. A cela eletrolítica pode ser representada por:

Ag/AgCl, Cl^- (0,3M), F^- (0,001M)/LaF_3 / amostra/ eletrodo de referência

O eletrodo de íon fluoreto pode ser usado com um eletrodo de referência de calomelano em qualquer pHmetro com precisão de 0,1 mV (milivolt). A atividade do íon depende da força iônica total, do pH e das espécies complexantes de íon fluoreto na solução. A adição de um tampão adequado permite manter a força iônica uniforme e constante, ajustar o pH e liberar o íon fluoreto dos complexos existentes.

Material

Potenciômetro com eletrodos de referência e de íon seletivo de fluoreto, agitador magnético com barras magnéticas revestidas com *teflon*, balões volumétricos de 50, 100 e 1000 mL, béquer de plástico de 100 mL e pipetas volumétricas de 5, 10 e 50 mL.

Reagentes

Fluoreto de sódio anidro
Ácido 1,2-ciclohexilenodinitrilotetracético (CDTA)
Hidróxido de sódio

Solução-padrão de fluoreto 1000 mg/L – Pese 2,21 g de fluoreto de sódio anidro, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Armazene a solução em frasco plástico. A partir de diluições adequadas da solução-estoque, prepare soluções-padrão de trabalho.

Tampão TISSAB (T_3) – Num béquer de 2000 mL, coloque, sob agitação, 500 mL de água deionizada e 18 g de CDTA . Adicione, gota a gota, uma solução de NaOH a 40% até dissolução do sal e, em seguida, 300 g de citrato de sódio dihidratado e 58 g de NaCl . Após a

dissolução dos sais, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL, acerte o pH em torno de 6,0 (± 0,2) e complete o volume com água destilada e deionizada. Confirme, novamente, o pH. Armazene em frasco plástico, sob refrigeração.

Procedimento – Meça 50 mL da amostra e transfira para um béquer de plástico de 100 mL. Adicione, com pipeta volumétrica, 5 mL da solução-tampão T3. Coloque uma barra magnética no béquer e homogeneíze sob agitação magnética. Com o potenciômetro e os eletrodos calibrados, proceda à leitura das amostras. Faça as leituras das amostras utilizando agitação magnética constante e velocidade similar à que foi utilizada para a leitura dos padrões.

Curva-padrão – Nos casos em que o equipamento permite a calibração em leituras automáticas em concentração direta, construa a curva interna de calibração, seguindo as instruções expressas no manual do aparelho. Quando o equipamento não permite a calibração em leituras automáticas em concentração, proceda às leituras em milivolts, utilizando soluções padrão de 0,2 a 2 mg/L de fluoreto. Construa uma curva milivolts x [F^-] em papel monolog. O coeficiente angular da reta (*slope*), deve estar entre -54 a -60 mV/[F^-].

Referência bibliográfica

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods fort he Examination of Water and Wastewater**, 19th Ed. Washington, DC: American Public Health Association,1995. chapter 4, p. 61-62.

195/IV Determinação de nitrato pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta

O íon nitrato geralmente ocorre em pequenas quantidades nas águas superficiais, mas atinge elevadas concentrações em algumas águas subterrâneas. Este método baseia-se na leitura direta da absorbância da amostra de água, com adição de ácido clorídrico 1,0 M, para águas de abastecimento e mineral.

A região do espectro eletrônico em que são feitas as medidas de absorbância é muito sujeita a interferências espectrais. Assim, este ensaio somente é aplicável em águas com baixo conteúdo em matéria orgânica (águas naturais não contaminadas e águas de abastecimento público). O uso do ácido clorídrico é para previnir a interferência de concentrações de hidróxido ou carbonato acima de 1000 mg $CaCO_3$/L. Interferentes: máteria orgânica dissolvida, surfactantes, NO^-_2 e Cr^{6+}, íons inorgânicos não encontrados em águas naturais, tais como cloreto e clorato.

Método I - Determinação de nitrato na região do ultravioleta a 205 nm

O método baseia-se na leitura direta da absorbância da amostra de água, com adição de ácido clorídrico 1,0 M, em espectrofotômetro a 205 nm, para águas de abastecimento e mineral.

Material

Estufa, espectrofotômetro UV/VIS, balões volumétricos de 100 e 1000 mL e pipetas volumétricas de 1, 2, 4, 5 e 7 mL.

Reagentes

Nitrato de potássio
Nitrato de sódio
Ácido clorídrico

Solução ácido clorídrico 1 M – Meça, em proveta de 100 mL, 85 mL de ácido clorídrico e transfira para um balão volumétrico de 1000 mL , completando o volume com água destilada e deionizada.

Solução-estoque de nitrato a 100 mg/L – Pese 0,1631 g de nitrato de potássio, seco a 105°C ou 0,1371 g de nitrato de sódio, seco a 105°C, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada.

Procedimento – Transfira quantitativamente a amostra de água para um balão volumétrico seco de 100 mL. Adicione 1 mL de ácido clorídrico 1,0 M e homogeneíze. Leia a absorbância a 205 nm. Determine a quantidade de nitrogênio nítrico correspondente, usando a curva-padrão previamente estabelecida.

Curva-padrão – A partir da solução-padrão estoque, prepare a curva-padrão transferindo alíquotas de 1, 2, 3, 4, 5, e 7 mL da solução para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada e deionizada. Adicione em cada balão volumétrico 1 mL de HCl 1,0 M e homogeneíze. Proceda à leitura a 205 nm, obtendo-se soluções de 1, 2, 3, 4, 5 e 7 mg/L de nitrato.

Nota: obtendo-se leitura de absorbância acima de 1, dilua a amostra original como descrito acima e faça uma nova leitura.

Referência bibliográfica

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 4, p. 85-86.

Método II - Determinação de nitrato na região do ultravioleta a 220 nm e 275 nm

Este método baseia-se na leitura direta da absorbância da amostra de água, com adição de ácido clorídrico 1 M, em espectrofotômetro a 220 e 275 nm

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, balões volumétricos de 50 e 1000 mL, pipetas volumétricas de 5,10,15,20 e 25 mL

Reagentes

Nitrato de potássio ou nitrato de sódio, com pureza mínima de 99%

Solução de ácido clorídrico 1 M - veja método I

Solução-estoque de nitrato 100 mg/L - veja método I

Solução-padrão intermediária de nitrato 10 mg/L

Procedimento - Transfira, quantativamente, a amostra de água para um balão volumétrico de 50 mL. Adicione 1 mL de ácido clorídrico 1 M e homogeneíze. Leia a absorbância a 220 nm e 275 nm. Determine a quantidade de nitrogênio nítrico correspondente, usando a curva-padrão previamente estabelecida.

Curva-padrão - A partir da solução-padrão intermediária, prepare a curva-padrão transferindo alíquotas de 5, 10, 15, 20 e 25 mL da solução-padrão de nitrato 10 mg/L para balões volumétricos de 50 mL, completando o volume com água destilada e deionizada. Adicione a cada balão volumétrico 1 mL de HCl 1 M e homogeneíze. As soluções preparadas apresentarão concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 mg NO^-_3 /L, respectivamente.

Medidas espectrofotométricas - Leia a absorbância no comprimento de onda 220 nm para relacionar com a concentração de nitrato e a 275 nm para determinar a interferência devida à matéria orgânica dissolvida.

Cálculo

Para amostras e padrões, multiplique por 2 a leitura de absorbância em 275 nm e subtraia pela absorbância obtida em 220 nm. Usando também as absorbâncias corrigidas (Acorrigida = A_{220} - 2xA_{275}), obtenha as concentrações das amostras diretamente a partir da curva-padrão (A x concentração). Se a concentração de nitrato da amostra for maior que 5 mg/L, proceda a diluição da amostra original com água destilada e deionizada, adicione 1 mL de HCl a 50 mL da amostra diluída e repita a leitura. Neste caso, o resultado deverá ser multiplicado pelo fator da diluição.

Nota: se o valor da correção (2xA_{275}) for maior que 10% do valor da leitura da absorbância em 220 nm, este método não poderá ser utilizado.

Referência bibliográfica

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 4, p. 85-86.

196/IV Determinação de nitrato pelo método espectrofotométrico com desenvolvimento de cor

O método baseia-se na reação de íons nitrato com ácido fenol dissulfônico e posterior alcalinização com hidróxido de sódio, obtendo-se um composto amarelo. Este composto é o sal sódico do ácido pícrico formado pela nitração do fenol, cuja coloração é medida em espectrofotômetro.

$$C_6H_3(OH)(SO_3H)_2 + 3\,HNO_3 \leftrightarrow C_6H_2(OH)(NO_2)_3 + 2\,H_2SO_4 + H_2O$$

$$C_6H_2(OH)(NO_2)_3 + NaOH \leftrightarrow C_6H_2(NO_2)_3ONa + H_2O$$

Os íons cloreto interferem no processo porque formam HCl com o excesso de H_2SO_4 contido na mistura ácido fenol dissulfônico/ácido sulfúrico e o HCl reage com o HNO_3 formado:

$$6\,HCl + 2HNO_3 \leftrightarrow 2\,NO + 4\,H_2O + 3\,Cl_2$$

Acima da concentração de $5x10^{-4}$ M, os íons cloreto podem ser precipitados com Ag_2SO_4 e separados previamente. Abaixo dessa concentração a interferência permanece, com diminuição da concentração de nitrato medida, mas com efeito significativo baixo, pois a tolerância legal de nitrato em águas é da ordem de 10 mg/L.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, banho-maria, balança analítica, placa aquecedora, béquer de 100 mL, balões volumétricos de 50, 100, 500 e 1000 mL, pipeta graduada de 10 mL, pipetas volumétricas de 10 e 50 mL, bureta de 25 mL, cápsula de porcelana de 150 mL e bastão de vidro.

Reagentes

Nitrato de potássio
Nitrato de sódio
Ácido sulfúrico
Fenol
Hidróxido de sódio
Sulfato de prata
Sulfato de alumínio e potássio
Hidróxido de amônio

Solução-padrão estoque de nitrato a 100 mg/L – Pese 0,1631 g de nitrato de potássio, seco a 105°C ou 0,1371 g de nitrato de sódio, seco a 105°C. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL, dissolva e complete o volume com água destilada e deionizada.

Nota: 1 mL desta solução corresponde a 0,1 mg de nitrato.

Solução de ácido fenoldissulfônico – Pese 25 g de fenol e transfira para um béquer com 225 mL de ácido sulfúrico. Aqueça em placa aquecedora a 100°C por duas horas, em capela. Resfrie, transfira para um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com ácido sulfúrico.

Solução hidróxido de sódio a 50% m/v – Pese 50 g de hidróxido de sódio, transfira para um balão de 100 mL, dissolva e complete o volume com água destilada e deionizada. Transfira a solução para um frasco limpo de plástico.

Solução de sulfato de prata (para amostras com cloretos) – Pese 0,4397 g de sulfato de prata, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água destilada e deionizada.

Nota: 1 mL desta solução reage com 1 mg de íons cloreto.

Creme de alumina (para amostras turvas) – Prepare uma solução saturada de sulfato duplo de alumínio e potássio. Alcalinize com hidróxido de amônio até pH 10. Agite e deixe o precipitado sedimentar. Lave com água por decantação até que a água de lavagem não dê reação para sulfatos. Decante o líquido sobrenadante.

Procedimento – Transfira 50 mL da amostra para uma cápsula de porcelana de 150 mL. Evapore até a secura, em banho-maria. Adicione 1 mL da solução de ácido fenoldissulfônico. Misture, com um bastão de vidro, o ácido e o resíduo eventualmente presente nas paredes da cápsula. Lave com pequena porção (10 mL) de água destilada e deionizada e adicione 3 a 5 mL de solução de hidróxido de sódio a 50% sob agitação, até obter uma cor amarela estável. Transfira para um balão volumétrico de 50 mL, lavando a cápsula (quando a tonalidade amarela for muito intensa, faça diluições maiores, a partir da amostra original). Complete o volume com água bidestilada e deionizada, filtre se necessário, homogeneíze, aguarde 15 minutos e meça a absorbância em espectrofotômetro, a 410 nm, utilizando como branco água destilada e deionizada, preparado nas mesmas condições da amostra. Determine a quantidade de nitrato correspondente, usando a curva-padrão previamente estabelecida.
notas

Se a amostra contiver cloretos acima de 30 mg/L, precipite-os em pH 1 (acidule com ácido sulfúrico), usando uma alíquota conveniente de solução de sulfato de prata.

Quando a amostra se apresentar excessivamente turva, clarifique-a com uma ponta de espátula de solução de creme de alumina.

Curva-padrão – A partir da solução-estoque, prepare soluções-padrão de nitrato no intervalo de 0 a 7 mg NO_3^-/L. Com bureta de 25 mL, adicione quantidades de 0 (branco), 1, 2, 3, 4, 5, e 7 mL, respectivamente, em cápsulas de 150 mL. Evapore até a secura em banho-maria. Adicione em cada uma das cápsulas, 1 mL da solução de ácido fenoldissulfônico, misture bem com bastão de vidro a mistura e o eventual resíduo nas paredes das cápsulas. Lave com pequena porção (cerca de 10 mL) de água destilada e deionizada e adicione 5 mL de solução de hidróxido de sódio a 50%. Misture bem com bastão de vidro até obter cor amarela estável. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL, lavando as cápsulas e os bastões com água destilada e deionizada. Complete o volume, agite bem, aguarde 15 minutos e meça a absorbância em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 410 nm. Construa o gráfico de absorbância em função da concentração da solução-padrão de nitrato (em mg NO_3^-/L).

Cálculo

Determine a quantidade de nitrogênio nítrico (NO_3^-) correspondente, usando a curva-padrão pré-estabelecida.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS, ASSOCIATION WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 11th ed. Washington, DC: American Public Health Association,1960, p. 175.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS, ASSOCIATION WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association,1995. chapter 4, p. 85-86.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 317-319.

197/IV Determinação de nitrito pelo método espectrofotométrico com desenvolvimento de cor

O íon nitrito corresponde a um estágio intermediário de oxidação do nitrogênio. Forma-se tanto pela oxidação da amônia como pela redução do nitrato. Tais oxidações e reduções podem ocorrer em estações de tratamento de esgotos, em sistemas de distribuição de água e em águas naturais. O nitrito pode ainda ser proveniente de aditivos inibidores da corrosão em instalações industriais. O íon nitrito (NO_2^-) é determinado por meio da formação de uma cor vermelho-púrpura produzida em pH (2,0 - 2,5) pela reação de diazotação da sulfanilamida com dihidrocloreto de N-(1-naftil)etilenodiamina. Na estocagem da amostra de água para a determinação de íons nitrito, nunca use ácido para a sua preservação. A determinação deve ser efetuada na amostra recém-coletada, de modo a prevenir a conversão bacteriana de NO_2^- para NO_3^- ou NH_3. Para tempos de espera de 1 a 2 dias, conserve a 4°C.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, balança analítica, estufa, pesa-filtro, balões volumétricos de 50, 250 e 1000 mL, bureta de 10 mL, bastões de vidro, béquer de 100 mL, dessecador, pipetas volumétricas de 2 e 50 mL e pipetas graduadas de 10 mL.

Reagentes

Nitrito de sódio com pureza mínima de 99%, armazenado em dessecador
Nitrito de potássio com pureza mínima de 99%, armazenado em dessecador
Ácido fosfórico
Sulfanilamida
Dihidrocloreto de N-(1-naftil)etilenodiamina
Oxalato de sódio anidro, grau padrão primário
Ácido sulfúrico
Permanganato de potássio

Solução-padrão de íons nitrito (100 mg/L) – Em um béquer de 100 mL, pese exatamente 0,15 g de nitrito de sódio ou 0,1848 g de nitrito de potássio puros, previamente secos por 2 horas em estufa a 105°C e resfriados em dessecador por uma hora. Transfira, cuidadosamente, para um balão volumétrico de 1000 mL com água bidestilada e deionizada e complete o volume. Homogeneíze.

Nota: utilize sempre solução recém-preparada. Esta solução tem validade de 30 dias, desde que mantida sob refrigeração.

Solução de oxalato de sódio 0,025 M – Dissolva 3,350 g de oxalato de sódio em água destilada e deonizada, transfira para balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume.

Solução de permanganato de potássio 0,01 M – Dissolva 1,6 g de permanganato de potássio em 1 litro de água destilada e deionizada. Armazene a solução em um frasco âmbar (rolha de vidro), por uma semana. Cuidadosamente, de modo a não ressuspender o sedimento, decante ou pipete o sobrenadante para outro frasco âmbar (rolha de vidro). Padronize esta solução, freqüentemente, pelo seguinte procedimento (em triplicata): em Erlenmeyer de 250 mL, pese 0,200 g de oxalato de sódio anidro, adicione 100 mL de água destilada e deionizada e agite até dissolver o sal. Adicione 10 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1:1 e aqueça a 90-95º C. Titule, sob agitação e rapidamente, com a solução de permanganto de potássio preparada até que uma leve colaração rósea persista por, no mínimo, 1 minuto. Durante a titulação, não permita que a temperatura fique abaixo de 85º C (se necessário, aqueça o Erlenmeyer durante a titulaçao). Faça um branco com água destilada e ácido sulfúrico (1:1). A molaridade da solução de $KMnO_4$ é calculada por meio da média de três titulações a partir da seguinte equação:

$$\frac{m}{V_a - V_b \times 0{,}335} = M$$

M= Molaridade da solução de $KMnO_4$
m= Massa de $Na_2C_2O_4$
Va= volume da solução de $KMnO_4$ gasto na titulação do oxalato de sódio, em mL
vb= volume da solução de $KMnO_4$ gasto na titulação do branco, em mL

Padronização da solução de nitrito – Pipe, na ordem, em um Erlenmeyer de boca esmerilhada com tampa: 50 mL de solução de $KMnO_4$ 0,01 M, 5 mL de H_2SO_4 concentrado e 50 mL da solução de nitrito a ser padronizada (quando da adição da solução de nitrito, submerja a ponta da pipeta dentro da solução acidulada de $KMnO_4$). Com o frasco tampado, agite suavemente e aqueça a (70-80)º C em placa aquecedora. Faça a descoloração da solução pela adição de porções de 10 mL de solução-padrão de 0,025 M de $Na_2C_2O_4$. Titule o excesso de $Na_2C_2O_4$ adicionado com solução 0,01 M de $KMnO_4$ até o surgimento de coloração rósea fraca e persistente. Conduza uma titulação do branco (50 mL de água destilada e deionizada). Calcule a concentração da solução de nitrito por meio da seguinte equação:

$$\frac{7\,[5B \times C - 2D \times E]}{F} = A$$

A= mg NO_2^- – N/mL na solução estoque de $NaNO_2$ ou KNO_2
B= molaridade da solução de $KMnO_4$
C= volume total, em mL, da solução de $KMnO_4$
D= molaridade da solução de $Na_2C_2O_4$
E= volume total, em mL, da solução de $Na_2C_2O_4$
F= volume, em mL, da solução de $NaNO_2$ ou KNO_2

Reagente de N-(1-naftil)etilenodiamina – Em balão volumétrico de 250 mL, adicione um pouco de água destilada e deionizada, 25 mL de ácido fosfórico a 85%, 2,5 g de sulfanilamida e dissolva completamente. Adicione 0,25g de N-(1-naftil)etilenodiamina, e homogeneíze para dissolver completamente. Complete o volume com água destilada e deionizada. Homogeneíze novamente.

Nota: guarde a solução em frasco escuro, sob refrigeração. A solução tem validade de 1 mês.

Procedimento – Transfira 50 mL da amostra para um balão volumétrico, adicione 2 mL do reagente de cor e faça um branco nas mesmas condições da amostra, utilizando água destilada e deionizada. Aguarde de 30 a 45 minutos. Meça a absorbância da coloração vermelha desenvolvida a 543 nm, em espectrofotômetro.

Curva-padrão – Pipete 10 mL da solução-estoque num balão volumétrico de 100 mL, e complete o volume com água destilada e deionizada (1 mL desta solução de $NaNO_2$ contém 0,1 mg de NO_2^-). A partir desta solução de uso, prepare uma série de soluções de concentrações no intervalo de 0,0 a 0,5 mg/L em nitrito. Com bureta de 10 mL, adicione quantidades

de 0,0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL em balão volumétrico de 100 mL, complete o volume com água destilada e deionizada e adicione 4 mL do reagente de cor. Aguarde de 30 a 45 minutos. Meça a absorbância em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda igual a 543 nm. Construa o gráfico de absorbância em função da concentração da solução-padrão de nitrito (em mg NO_2^-/L).

Nota: prepare a curva-padrão a cada troca da solução reagente de cor.

Cálculo

Determine a quantidade de íons nitrito correspondente, usando a curva-padrão, previamente estabelecida.

Nota: caso a cor apresente intensidade acima daquela de concentrações usadas para a curva-padrão, repita o procedimento, diluindo a amostra, ou utilize balões volumétricos de maior volume para a leitura final, e considere as diluições no cálculo final. Deverá ser respeitada a faixa de aplicabilidade do método.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 4, p.83-84.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 316-317.

198/IV Determinação de nitrogênio albuminóide

O nitrogênio albuminóide origina-se de grupos amino de proteínas, polipeptídios ou aminoácidos. Estes materiais são constituintes importantes da poluição orgânica na fonte. Após a destilação do nitrogênio amoniacal, a adição de uma solução alcalina de permanganato de potássio produz desprendimento de amônia adicional, que corresponde ao nitrogênio albuminóide.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, balança analítica, estufa, sistema de destilação, proveta de 50 mL balões volumétricos de 50 e 100 mL e pipeta de 1 mL.

Reagentes

Permanganato de potássio
Hidróxido de sódio

Solução-padrão estoque de cloreto de amônio – Pese, com precisão, 3,141 g de cloreto de amônio, previamente seco a 105°C. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água bidestilada e deionizada. Cada mL desta solução contém 1 mg de NH_3.

Soluções-padrão de cloreto de amônio – Prepare, a partir de diluições de uma solução-estoque de cloreto de amônio com água, uma série de soluções de concentrações 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L de NH_3.

Solução alcalina de permanganato de potássio – Pese 16 g de permanganato de potássio, transfira para um béquer de 3000 mL, acrescente 1200 mL de água bidestilada e deionizada (fervida por 10 minutos). Adicione 800 mL de solução de NaOH a 36%, clarificada por decantação. Adicione água destilada e deionizada até completar 2500 mL. Aqueça até reduzir o volume a 2000 mL. Guarde a solução em frasco plástico rígido e ao abrigo da luz. Determine, numa prova em branco, o nitrogênio amoniacal correspondente a 50 mL da solução e use este resultado para as correções nas determinações.

Reagente de Nessler: Solução A – Pese 100 g de iodeto de mercúrio II, 70 g de iodeto de potássio, transfira para um balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Solução B – Pese 160 g de hidróxido de sódio, transfira para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Resfrie à temperatura ambiente. Adicione vagarosamente e sob agitação, a solução A à solução B e dilua para 1000 mL com água destilada e deionizada. Manuseie a solução na penumbra e armazene em frasco plástico rígido ao abrigo da luz.

Procedimento – Ao resíduo da destilação resultante da determinação de amônia (ou nitrogênio amoniacal) conforme método **189/IV**, adicione 50 mL da solução alcalina de permanganato de potássio. Adapte novamente o balão ao sistema refrigerante e destile. Receba 100 mL do destilado em um balão volumétrico. Transfira 50 mL para um balão volumétrico, adicione 1 mL do reagente de Nessler, homogeneíze, meça a coloração amarela desenvolvida, segundo procedimento descrito em **189/IV** e determine a quantidade correspondente de nitrogênio albuminóide.

Cálculo

Determine a concentração de nitrogênio albuminóide utilizando a curva-padrão pré-esta-

belecida com soluções-padrão de cloreto de amônio. Multiplique o resultado pelo fator 0,2, correspondente à alíquota de 50 mL tomada de um balão volumétrico de 100 mL contendo o destilado de 500 mL da amostra.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 315-316.

199/IV Determinação do oxigênio consumido em meio ácido

A determinação de oxigênio consumido indica a quantidade de substâncias oxidáveis presentes na água. No método analítico proposto, a amostra é oxidada com íons permanganato em meio ácido. Após a adição de excesso de íons oxalato, titula-se novamente com solução de permanganato.

Material

Banho-maria, balança analítica, pipeta volumétrica de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 300 mL, pipeta volumétrica de 5 mL, buretas de 10 e 25 mL, balão volumétrico de 1000 mL e béquer de 200 mL.

Reagentes

Permanganato de potássio
Ácido sulfúrico
Oxalato de sódio

Solução de permanganato de potássio a 0,0025 M – Pese 4 g de permanganato de potássio e dilua com aproximadamente 1100 mL de água destilada e deionizada. Aqueça a solução até reduzir o volume a aproximadamente 1000 mL. Esfrie à temperatura ambiente. Filtre, a vácuo, em placa de porcelana porosa, previamente purificada com ácido sulfúrico e exaustivamente lavada com água destilada e deionizada. Recolha o filtrado em balão volumétrico de 1000 mL, complete cuidadosamente o volume com água destilada e deionizada. Deixe a solução em repouso por uma semana, em frasco âmbar e dilua 100 mL desta solução com água destilada e deionizada, completando o volume até 1000 mL em balão volumétrico.

Padronização – Pese quantitativamente massas de oxalato de sódio, em torno de 0,01 g, secas em estufa a 100°C por duas horas. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 200 mL de água destilada e deionizada e 5 mL de ácido sulfúrico a 25% v/v. Leve ao banho-maria e aqueça entre (60–70)°C. Titule com a solução de permanganato de potássio

até a primeira coloração rósea.
Nota: nas primeiras gotas há uma viragem aparente; retorne então ao banho-maria até a descoloração completa e prossiga normalmente a titulação. Faça ao menos duas provas e calcule a molaridade média.

Cálculo

$$2\ MnO_4^- + 16\ H^+ + 5\ C_2O_4^{--} \leftrightarrow 2\ Mn^{++} + 10\ CO_2 + 8\ H_2O$$

$$\frac{2 \times m}{670 \times v} = \text{molaridade da solução de } KMnO_4$$

m = massa de oxalato de sódio empregada, em gramas
v = volume da solução de $KMnO_4$ gasto na titulação, em L

Solução aquosa de ácido sulfúrico 25% v/v – Dilua 25 mL de ácido sulfúrico concentrado em água destilada e deionizada, lentamente, deixando esfriar e completando o volume até 100 mL.

Solução de oxalato de sódio 0,00625 M – Pese 8,375 g de oxalato de sódio, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Transfira 100 mL desta solução para balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com a mesma água.

Procedimento – Transfira 100 mL da amostra para um frasco Erlenmeyer de 300 mL. Adicione 5 mL de ácido sulfúrico a 25% v/v. Adicione, com uma bureta, 5 mL de permanganato de potássio 0,0025 M. Aqueça em banho-maria por 30 minutos. Havendo descoloração da solução, adicione mais 10 mL da solução de permanganato. Caso descore novamente, repita o teste com a amostra diluída a 100 mL. Adicione, com uma bureta, uma quantidade de oxalato de sódio 0,00625 M exatamente igual a do total da solução de permanganato de potássio empregada. Leve ao banho-maria até descorar. Titule com solução de permanganato de potássio até coloração rósea.

Cálculo

O oxigênio consumido pela amostra (em mg/L) corresponde exatamente ao nº de mL de permanganato de potássio 0,0025 M gasto na titulação da amostra.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for**

the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 4, p.100 -101.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 311-313.

200/IV Determinação de sódio e potássio

Os íons de sódio estão presentes nas águas naturais, em concentrações que podem variar de menos de 1 mg/L a mais de 500 mg/L. Os íons de potássio também podem ocorrer naturalmente nas águas, sendo que sua concentração raramente excede 20 mg/L.

Quantidades traços de íons sódio e potássio podem ser determinadas por fotometria de emissão de chama sendo que o sódio emite luz no comprimento de onda de 589 nm e o potássio no comprimento de onda de 766,5 nm. A amostra é aspirada e dispersa numa chama de gás na forma de *spray* e a excitação é conduzida sob condições controladas e reprodutíveis. A linha espectral de interesse é isolada com o uso de filtros ou sistema óptico adequado. A intensidade da luz a 589 nm e a 766,5 nm é proporcional à concentração de íons sódio ou de potássio na amostra.

Material

Fotômetro de chama com filtros para sódio e potássio ou sistema óptico equivalente, bomba de vácuo, dessecador, estufa, balança analítica, balões volumétricos de 100 e 1000 mL, béquer de 50 mL e pipeta volumétrica de 10 mL.

Reagentes

Solução-padrão estoque de íons sódio – Pese 2,5421 g de cloreto de sódio, seco em estufa a 200°C por 3 horas e resfriado à temperatura ambiente, em dessecador. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada.

Nota: 1 mL desta solução corresponde a 1 mg de íons sódio.

Solução-padrão estoque de íons potássio – Pese 1,9067 g de cloreto de potássio, seco em estufa a 200°C por 3 horas e resfriado à temperatura ambiente, em dessecador, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada.

Nota: 1mL desta solução corresponde a 1 mg de íons potássio.

Soluções-padrão de íons sódio/potássio – A partir da solução-padrão estoque, prepare uma solução de concentração intermediária, diluindo 10 mL para um volume final de 100 mL com água destilada e deionizada. Use volumes adequados desta solução de concentração intermediária para preparar soluções-padrão na faixa de 0,1 a 10 mg de sódio/L ou de 0,1 a 10 mg de íons potássio/L, utilizando sempre água bidestilada e deionizada.
Nota: 1 mL corresponde a 0,1 mg de íons Na ou de K.

Procedimento – Ajuste o comprimento de onda para 589 nm para íons sódio ou a 766,5 nm para íons potássio ou coloque os filtros adequados para a determinação de sódio e potássio (ou siga as instruções do fabricante para o ajuste do aparelho). Zere a escala de medida com água destilada e deionizada. Agite bem a amostra e transfira cerca de 40 mL para um béquer seco e limpo. Com o fotômetro já calibrado e zerado, faça a leitura das amostras. Sempre cheque o zero da escala do aparelho com água bidestilada e deionizada, entre as medidas.

Curva-padrão – Confirme o zero da escala do aparelho com água destilada e deionizada. Faça a leitura das soluções-padrão, iniciando com a solução mais diluída. Após a leitura de cada amostra, cheque o zero da escala do aparelho com água destilada e deionizada. Repita a operação de leitura com os padrões de calibração, o número de vezes necessário para garantir que o valor médio obtido para a solução-padrão seja confiável e reprodutível. Construa o gráfico de intensidade de emissão em função da concentração de íons sódio (mg Na/L) ou de íons potássio (mg K/L).

Cálculo

A partir da curva-padrão e dos resultados obtidos para cada amostra, determine o valor da concentração de íons sódio (mg Na/L) ou de íons potássio (mg K/L) nas amostras analisadas.
Referência bibliográfica

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 3, p.83, 96-98.

201/IV Determinação do pH

A uma dada temperatura, a acidez ou a alcalinidade de uma solução é indicada pelo valor do pH ou pela atividade do íon hidrogênio. O pH é definido como o co-logarítmo

da atividade do íon hidrogênio (- log a_{H^+}); para soluções diluídas, a atividade do íon H^+ é praticamente igual à concentração molar e expressa a acidez do meio. O valor do pH para água pura, a 25°C, é igual a 7. Como resultado da presença de ácidos ou bases e também da hidrólise de sais dissolvidos, o valor do pH pode apresentar valores abaixo de 7 (meio ácido) ou acima de 7 (meio básico). Para efeitos práticos em análises de água, basta determinar o pH até segunda casa decimal.

A medida do pH baseia-se na determinação da atividade dos íons hidrogênio por meio da medida potenciométrica usando um eletrodo de vidro e um de referência ou um eletrodo de vidro combinado. A força eletromotriz medida com o sistema do eletrodo de vidro combinado varia linearmente com o pH. O instrumento de medida de pH é, incluindo o eletrodo combinado, calibrado com soluções-tampão de pH conhecido.

Material

pHmetro com compensador de temperatura, eletrodo de vidro combinado, agitador magnético com barra magnética, béqueres de 50 e 150 mL, balão volumétrico de 500 mL, cápsula de porcelana e dessecador com agente dessecante.

Reagentes

Solução-tampão – Podem ser adquiridas, no comércio, soluções-tampão certificadas. Em geral são fornecidas em três valores de pH: 4, 7 e 10 (ou próximo destes). Essas soluções também podem ser preparadas no laboratório. A calibração do aparelho com o uso de eletrodo de vidro combinado deve ser efetuada como indicado no manual do aparelho.

Solução-tampão de biftalato pH 4 (25°C) – Pese 5,06 g de biftalato ácido de potássio, previamente seco a 110°C por 2 horas. Dissolva em água destilada e deionizada, transfira para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume.

Solução-tampão de fosfato pH 6,86 (25°C) – Seque, separadamente, cerca de 2,5 g de fosfato diácido de potássio e de fosfato ácido dissódico por duas horas a (110–130)°C e deixe esfriar em dessecador. Pese 1,694 g de fosfato diácido de potássio e 1,767 g de fosfato ácido dissódico e dissolva em água destilada e deionizada. Transfira para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume com água destilada e deionizada.

Solução-tampão de borato pH 9,18 (25°C) – Pese 1,9 g de borato de sódio decahidratado; dissolva em água destilada e deionizada. Transfira para um balão volumétrico de 500 mL com água destilada e deionizada.

Nota: as soluções-tampão acima mencionadas devem ser mantidas em geladeira a cerca de 4°C, a fim de se evitar contaminação por fungos. Pelo menos uma hora antes do uso das mesmas, retire dos frascos de solução-estoque cerca de 20-30 mL que são transferidos a béqueres de 50 mL limpos e secos, de diâmetro suficiente para mergulhar o eletrodo de vidro combinado em seu interior. Lave o béquer com alguns mL do tampão, preencha com a solução, feche imediatamente e deixe sobre a bancada por uma hora pelo menos, para que a temperatura da solução atinja a temperatura ambiente. Após o uso no ensaio, descarte a solução.

Procedimento – Lave o eletrodo de vidro com água destilada e deionizada. Seque delicadamente com papel absorvente fino. Coloque o eletrodo na solução-tampão de fosfato preparada (béquer de 50 mL) com agitação suave e constante. Leia a temperatura da solução e verifique o valor do pH do tampão para esta temperatura (**tabela 3**). Retire o eletrodo da solução e lave com água destilada e deionizada. Verifique a linearidade do eletrodo com o segundo tampão. Para efeito de ajuste de aparelhagem, escolha o tampão de biftalato se as amostras apresentarem pH < 7 ou o tampão de borato se apresentarem pH > 7. Proceda de maneira semelhante ao descrito para tampão de fosfato. As amostras não requerem nenhuma preparação especial. Transfira cerca de 50 mL de amostra para um béquer de 100 mL. Lave o eletrodo e o compensador de temperatura com água bidestilada e deionizada, seque suavemente e coloque-os dentro do béquer com a amostra com agitação laminar. Espere a leitura ficar constante e anote o valor de pH da amostra

Tabela 3 – Valores de pH de soluções-tampão em relação à temperatura da solução

t (°C)	Valores de pH de soluções-tampão padrão		
	Biftalato de potássioo	Fosfato diácido de potássio e fosfato ácido dissódico (1:1)	Borato de sódio
15	3,999	6,900	9,276
20	4,002	6,881	9,225
25	4,008	6,865	9,180
30	4,015	6,853	9,139
35	4,024	6,844	9,102
38	4,030	6,840	9,081
40	4,035	6,838	9,068

Fonte: MIDGLEY, D.; TORRANCE, K. Potenciometric water analysis. 2nd ed. New York: Hohb Wiley & Sons, 1991. p. 168.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995. chapter 4, p. 65-69.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 310.

202/IV Determinação de sólidos totais secos a (103-105)°C

Os termos sólidos, sólidos suspensos e sólidos dissolvidos vêm substituir os antigos termos resíduo não filtrável e resíduo filtrável. O termo sólido se refere à matéria suspensa ou dissolvida na água. A designação de sólidos totais é aplicada para o resíduo material deixado no recipiente após a evaporação de uma amostra de água e a subseqüente secagem completa a uma temperatura definida, normalmente 105°C. Os sólidos totais incluem: sólidos totais suspensos, que é a porção dos sólidos totais retidos por um filtro de porosidade igual a 2,0 µm, e sólidos totais dissolvidos, que é a porção que passa através do filtro.

Os sólidos dissolvidos ou em suspensão, diferenciam-se em fixos e voláteis. "Sólidos fixos" é o termo aplicado ao produto da calcinação do resíduo total, da matéria suspensa ou dissolvida, por um tempo especifico a uma determinada temperatura, por exemplo: 2 horas e 500°C. A perda de peso durante a calcinação é denominada "sólidos voláteis". As determinações de sólidos fixos e voláteis não distinguem precisamente entre a matéria orgânica e a inorgânica, pois a perda por calcinação não é exclusiva de material orgânico, podendo ocorrer a decomposição ou volatilização de alguns sais minerais.

Sólidos totais são matérias suspensas ou dissolvidas presentes numa amostra de água. Este termo é aplicado ao resíduo de material deixado no recipiente após a evaporação de uma amostra e sua subseqüente secagem completa a uma temperatura definida.

Os sólidos totais são determinados pela verificação da massa do resíduo de uma amostra de água, após evaporação e secagem até peso constante, a (103-105)°C.

Material

Banho-maria, estufa, balança analítica, pinça metálica, cápsula de porcelana ou platina, balão volumétrico ou pipeta volumétrica de 100 mL e dessecador com sílica-gel.

Procedimento – Aqueça, em uma estufa, uma cápsula limpa de platina ou porcelana a (103-105)°C, por no mínimo 3 horas. Retire da estufa, transferindo para um dessecador, até a

temperatura ambiente e pese. Meça 100 mL da amostra de água não filtrada em um balão volumétrico e transfira quantitativamente para a cápsula já pesada. Evapore até secagem em um banho-maria ou numa chapa de aquecimento, evitando que a amostra entre em ebulição. Coloque a cápsula em uma estufa a (103 - 105)°C por 3 horas. Transfira a cápsula para um dessecador, deixando atingir o equilíbrio térmico com o ambiente e pese. Repita as operações até obter peso constante ou até que a diferença de peso seja menor do que 4% da medida anterior. As determinações devem ser feitas em duplicata e os resultados devem concordar em 5% entre as medidas.

Cálculo

$$\frac{(A-B)}{v} = \text{mg de sólidos totais, por litro}$$

A = massa (resíduo seco + cápsula) mg
B = massa da cápsula mg
v = volume da amostra em L

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 304.

203/IV Determinação de sólidos dissolvidos, secos a 180°C, pelo método gravimétrico

Os sólidos totais dissolvidos são os materiais que passam através de um filtro sinterizado padrão e que posteriormente são evaporados e secos à uma determinada temperatura por um determinado período de tempo. A amostra de água é filtrada em filtro de vidro de porosidade igual a 2 µm, ou através de papel de filtro quantitativo para precipitados finos, evaporada e seca em estufa a 180°C, até peso constante. O aumento de peso do recipiente utilizado para a realização da evaporação corresponde aos sólidos totais dissolvidos.

Material

Banho-maria ou chapa aquecedora, estufa, balança analítica, pinça metálica, agitador magnético com barra magnética, bomba de vácuo ou trompa de vácuo, cápsulas de porcelana ou platina, balão volumétrico de 100 mL, dessecador com sílica-gel e sistema de filtração a vácuo com filtro de vidro sinterizado de porosidade de 2 µm.

Procedimento – Monte o sistema de filtração, aplique vácuo e lave o filtro com três volumes sucessivos de 20 mL de água destilada e deionizada. Continue a sucção para remover todos os traços de água. Descarte as águas de lavagem. Agite a amostra com agitador magnético, transfira quantitativamente 100 mL da amostra medida em balão volumétrico e filtre sob

vácuo. Lave com três volumes de 10 mL de água destilada e deionizada, esperando a completa drenagem entre as lavagens e continue a sucção por cerca de 3 minutos após a filtração. A amostra filtrada mais os três volumes de 10 mL de água destilada e deionizada compõem a amostra para a análise. Aqueça, em estufa, uma cápsula limpa de platina ou porcelana a (180 ± 2)°C, por 3 horas. Retire da estufa e coloque em um dessecador para esfriar, deixando atingir o equilíbrio térmico com o ambiente. Pese e coloque a amostra de água filtrada juntamente com as três porções de 10 mL de água destilada e deionizada utilizadas na lavagem do filtro, em uma cápsula de porcelana ou platina, previamente pesada. Evapore até secagem em banho-maria ou em uma chapa aquecedora evitando que a amostra entre em ebulição. Coloque a cápsula em uma estufa a (180 ± 2)°C por 3 horas. Transfira a cápsula para um dessecador, deixando atingir o equilíbrio térmico com o ambiente onde se encontra a balança e pese. Repita as operações dos itens anteriores até obter peso constante ou até que a diferença de peso seja menor do que 4% da medida anterior. As determinações devem ser feitas em duplicata e os resultados devem concordar dentro de 5% entre suas medidas.

Cálculo

$$\frac{(A-B)}{v} = \text{mg de sólidos totais por 1000 mL}$$

A = peso (resíduo seco + cápsula) mg
B = peso da cápsula mg
v = volume da amostra, em mL

204/IV Determinação de sólidos dissolvidos, secos a 180°C, pelo método condutivimétrico

A condutivida de elétrica proporciona uma indicação da quantidade de sólidos totais dissolvidos presentes em uma amostra de água. Seu valor depende da concentração e do grau de dissociação dos íons, bem como da temperatura e da velocidade de migração dos íons no campo elétrico. A cela de condutividade não é seletiva, mede a soma total das concentrações dos eletrólitos dissolvidos na solução. Nenhuma conclusão pode ser fornecida sobre o tipo de íons presentes. O valor da concentração dos sólidos totais dissolvidos é estimado a partir de um eletrólito padrão como NaCl ou KCl.

Material

Condutivímetro com cela de condutividade, compensador de temperatura, béquer de 150 mL e termômetro (na ausência de compensador de temperatura).

Reagentes

Solução-padrão de NaCl 1000 mg/L – Pese 1000 mg de cloreto de sódio seco a 200°C por 3 horas e resfriado em dessecador, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada.

Procedimento – Calibre o equipamento com solução-padrão de cloreto de sódio. Em um béquer de 150 mL, coloque cerca de 100 mL de amostra de água homogeneizada. Insira a cela de condutividade na amostra, agite-a verticalmente para eliminar as bolhas de ar que possam estar presentes. Deixe a cela imersa e em repouso até o aparelho estabilizar-se. Faça a leitura, lave a cela com água deionizada antes e depois de cada leitura.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association,1995. chapter 2, p. 53,55.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 304-305.

205/IV Determinação da turbidez pelo método nefelométrico

A turbidez é a expressão usada para descrever a propriedade óptica referente ao espalhamento e a absorção da luz quando esta passa através de uma amostra. Esta propriedade é uma característica decorrente da presença de materiais suspensos, tais como areia, poeira, matéria orgânica e inorgânica, plâncton e organismos microscópicos. A presença destes sólidos suspensos, finamente divididos e geralmente em estado coloidal, impede a passagem da luz através da amostra de água. A correlação da turbidez com a concentração de matéria suspensa é difícil porque o tamanho, a forma e o índice de refração das partículas também afetam a propriedade de espalhamento da luz. A turbidez pode ser determinada para qualquer amostra livre de detritos e sedimentos, usando-se uma escala arbitrária em unidades de turbidez. O método compara a intensidade de luz espalhada pela amostra com a de uma amostra-padrão de referência, sob condições definidas. A nefelometria envolve a medida da luz espalhada numa direção específica normalmente a 90° da trajetória do raio incidente. O polímero de formazina é usado como suspensão-padrão de referência de turbidez. As paredes da cubeta contendo a amostra, assim como as janelas sujas do equipamento, a presença de bolhas de ar na amostra e vibrações que possam perturbar a superfície da amostra, fornecem resultados falsos. A "cor verdadeira", que é a cor da água devido às substâncias dissolvidas que absorvem luz, causa medidas menores de turbidez.

Material

Turbidímetro, balança analítica, cubetas de vidro, balões volumétricos de 100 e 1000 mL, pipetas volumétricas de 5 e 10 mL, sistema de filtração completo e filtro de membrana com porosidade 0,2 µm.

Reagentes

Água livre de turbidez – Passe água através de uma membrana de filtro de porosidade igual a 0,2 µm. O filtro de membrana convencional usado para exames bacteriológicos não é satisfatório. Lave o frasco coletor duas vezes com a água filtrada e descarte os próximos 200 mL. O método é satisfatório para se medir turbidez até 0,02 UT.

Suspensão-estoque de turbidez: Solução I – Pese 1000 mg de sulfato de hidrazina, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Solução II – Pese 10 g de hexametilenotetramina, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água bidestilada e deionizada. Em um balão volumétrico de 100 mL, misture 5 mL da solução I e 5 mL da solução II. Deixe em repouso por 24 horas a (25 ± 3)°C. Complete o volume com água destilada e deionizada e misture. A turbidez desta solução é de 400 UT (unidades de turbidez).

Nota: prepare as soluções e suspensão, mensalmente.

Suspensão-padrão de turbidez 40 UT Com uma pipeta volumétrica, transfira 10 mL da suspensão-padrão de polímero de formazina (400 UT) para um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com água destilada e deionizada livre de turbidez e misture. Prepare esta suspensão semanalmente.

Suspensão-padrão de turbidez menor que 40 UT A partir da suspensão-padrão de turbidez de 40 UT, utilizando-se pipeta e balão volumétrico de 100 mL, prepare diariamente soluções diluídas de acordo com a necessidade (**Tabela 4**).

Nota: alternativamente, use padrões disponíveis no comércio, tais como estireno-divinilbenzeno ou outros que sejam equivalentes à suspensão de polímero de formazina, recentemente preparada.

Tabela 4 – Dados referentes ao preparo de suspensões diluídas de turbidez (em balões volumétricos de 100 mL)

	Volume de suspensão necessário (mL)		
Padrão de turbidez UT requerido	Suspensão de 2 UT utilizada	Suspensão de 40 UT utilizada	Volume de água livre de turbidez (mL)
0,05	2,5	-	97,5
0,1	5,0	-	95
0,5	25	-	75
1,0	50	-	50
1,5	75	-	25
2,0	100	-	0
4,0	-	10	90
6,0	-	15	85
10	-	25	75
20	-	50	50
30	-	75	25
40	-	100	0

Procedimento – Agite a amostra, procurando evitar a formação de bolhas antes da realização da medida de turbidez. Deixe repousar para eliminar as bolhas de ar e transfira uma quantidade de amostra para a cubeta do turbidímetro. Quando possível, coloque a cubeta com a amostra num banho de ultra-som por 1 a 2 segundos, para eliminar qualquer bolha de ar. Dilua as amostras com 1 ou mais volumes de água livre de turbidez até que a turbidez das amostras se enquadre na faixa de 30 a 40 UT. Limpe bem as paredes da cubeta contendo a amostra e coloque-a no turbidímetro. Leia a turbidez diretamente na escala do aparelho ou a partir de uma curva-padrão adequada.

Curva-padrão – Nos instrumentos pré-calibrados, verifique a escala de calibração com o uso de padrões apropriados. Leia ao menos um padrão em cada faixa de leitura disponível no aparelho utilizado. Na ausência de uma escala pré-calibrada, prepare curvas de calibração para cada faixa de leitura do instrumento com as suspensões-padrão de turbidez listadas na **Tabela 4**. Essas suspensões-padrão não devem ser agitadas.

Cálculo

Determine a turbidez, com a curva-padrão previamente estabelecida.

Referência bibliográfica

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association,1995. chapter 2, p. 8,11.

206/IV Determinação da turbidez pelo método turbidimétrico

Material

Turbidímetro Hellige

Procedimento – Escolha a faixa de turbidez apropriada e selecione o filtro adequado a esta posição. Limpe e seque cuidadosamente a cela do turbidímetro de altura própria para a faixa de turbidez escolhida. Encha a cela até a marca com a amostra. Limpe o *plunger* e mergulhe no líquido que preenche a cela, cuidadosamente para evitar bolhas. Limpe o exterior da cela e coloque na plataforma espelhada. Feche a porta do aparelho e ligue a luz. Balanceie imediatamente a intensidade da luz do feixe central com a intensidade do fundo. Leia a escala graduada sobre o disco do botão quando o brilho dos dois campos estiver balanceado. Determine a turbidez da amostra, por meio do gráfico apropriado à faixa de operação utilizada.

Nota: estes gráficos acompanham o aparelho e variam segundo a turbidez da amostra, o filtro utilizado e a altura da cela.

Curva-padrão – Ao se trocar a lâmpada do aparelho, é necessária uma nova calibração e a elaboração de um novo gráfico para cada faixa de turbidez. A solução-padrão para a construção da curva consiste de um "kit de calibração de turbidez", contendo 500 mL de uma suspensão-padrão estoque de sílica (SiO_2) equivalente a 200 mg/L e papéis de gráfico em branco impressos especialmente para trabalhar com as cinco faixas de turbidez.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER, ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association,1995. chapter 2, p. 8, 11.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Méodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 303-304.

207/IV Determinação de resíduos de pesticidas e bifenilas policloradas pelo método multiresíduo

Este método determina resíduos de pesticidas e PCBs em água, referentes aos princípios ativos constantes da **Tabela 5**. O método baseia-se na extração dos referidos princípios ativos na amostra de água com uma mistura dos solventes diclorometano e n-hexano e cuja detecção e quantificação são realizadas por cromatografia em fase gasosa com os detectores de captura de elétrons (ECD) e fotométrico de chama (FPD) ou seletivo de nitrogênio e fósforo (NPD).

Tabela 5 – Distribuição de pesticidas e bifenilas policloradas-PCBs

(a)	(b)
Pesticidas	Pesticidas
Aldrin	Azinfós etílico
Lambda-cialotrina	Azinfós metílico
Cipermetrina	Carbofenotiona
DDT total (op'DDT, pp'DDT, op'DDE, pp'DDE, op'DDD, pp'DDD)	Clorfenvinfós
Dieldrin	Clorpirifós-etílico
Deltametrina	Clorpirifós-metílico
Dodecacloro	Diazinona
Endrin	Diclorvos
(a)	(b)
Endosulfam(alfa, beta e sulfato de endosulfam)	Dimetoato
HCH total (alfa, beta e gama)	Dissulfotona
Heptacloro	Etiona
Heptacloro epóxido	Etoprofós
Hexaclorobenzeno	Etrinfós
-	Fenamifós
-	Fentiona
BifenilasPolicloradas-PCBs congêneres	Fentoato
PCB 28	Folpete
PCB 52	Forato
PCB 101	Malationa

PCB138	Metamidofós
PCB153	Metidationa
PCB180	Mevinfós
-	Ometoato
-	Paration-etílica
-	Paration-metílica
-	Pirimifós-etílico
-	Pirimifós-metílico
-	Profenofós
-	Pirazofós
-	Terbufós
-	Triazofós

(a) Cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (ECD).
(b) Cromatografia a gás com detector fotométrico de chama (FPD) ou de nitrogênio e fósforo (NPD).

Material

Cromatógrafo a gás com detectores de captura de elétrons (ECD) e fotométrico de chama (FPD) ou de nitrogênio e fósforo (NPD), capela de exaustão para solventes, rotavapor, estufa, aparelho extrator de Soxhlet, funis de separação de 2000 mL, balões volumétricos de diferentes capacidades, pipetas volumétricas de diferentes capacidades, pipetas Pasteur, frasco Erlenmeyer com tampa, tubos graduados de 10 mL com tampa, funis analíticos, provetas 100 e 1000 mL, béqueres de 2000 mL, coluna cromatográfica de vidro de 15 mm de diâmetro por 30 cm de altura com torneira de *teflon* e reservatório de 300 mL, tubo de vidro com tampa e batoque de *teflon*, *vials* de vidro com tampas e septos de *teflon* para injetor automático

Reagentes

n-Hexano, grau resíduo
Isoctano, grau resíduo
Algodão tratado
Sulfato de sódio anidro granulado, grau resíduo
Cloreto de sódio

Água tratada – Transfira 1000 mL de água destilada para um funil de separação de 2000 mL e extraia três vezes com 60 mL da mistura de diclorometano:n-hexano (1:1). Despreze a fase

orgânica e armazene a água.

Sílica gel 60, 70-230 *mesh*

Nota: Faça, previamente, brancos de cada r eagente para certificar-se de que não possuem interferentes para a análise.

Solução-padrão dos princípios ativos – Pese 0,010 g de cada padrão analítico em béquer de 10 mL e transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com isoctano. Transfira para um frasco de vidro com tampa e batoque de *teflon*. Os frascos devem conter uma etiqueta com dados de procedência, identidade, concentração, estabilidade, data de preparação, prazo de validade e temperatura de armazenamento. Faça diluições necessárias com n-hexano em 5 níveis (1/2 LQ, 1 LQ, 2 LQ, 5 LQ e 10 LQ) para verificação da faixa de linearidade do detector e construção da curva-padrão.

Nota: LQ – Limite de quantificação: menor concentração do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, sob determinadas condições experimentais adotadas.

Diclorometano:n-hexano (1:4) – Transfira 200 mL de diclorometano para balão volumétrico de 1000 mL. Adicione n-hexano. Misture bem e complete o volume com n-hexano.

Diclorometano:n-hexano (1:1) – Transfira 500 mL de diclorometano para balão volumétrico de 1000 mL. Adicione n-hexano. Misture bem e complete o volume com n-hexano.

Sílica gel ativada – Calcine quantidade suficiente de sílica gel 60-70-230 *mesh* a 450°C durante 4 horas. Deixe em dessecador até temperatura ambiente. Armazene em frasco de vidro com tampa e batoque de *teflon.* Ative a sílica gel calcinada por 5 horas a 135°C de 2 em 2 dias. Armazene-a em dessecador.

Sílica gel desativada a 10% – Pese 13,5 g de sílica gel ativada em frasco Erlenmeyer com tampa. Adicione 1,5 g de água tratada. Homogeneíze.
Solução saturada de cloreto de sódio – Em um béquer de 100 mL, adicione água e cloreto de sódio até que a solução fique saturada. Transfira para frasco de vidro com tampa e batoque de *teflon.*

Algodão tratado – Coloque, em frasco de Soxhlet, algodão e extraia com 200 mL de n-hexano, no mínimo por cinco horas. Coloque em béquer e seque em estufa. Armazene em frasco de vidro com tampa.

Procedimento

Extração – Transfira 1000 mL da amostra homogeneizada para um funil de separação de 2000 mL. Extraia com 60 mL da mistura diclorometano:n-hexano (1:4) para análise dos pesticidas do item (a) da **Tabela 5**, exceto lambda-cialotrina, cipermetrina, deltametrina, sulfato de endosulfam e/ou com 60 mL da mistura diclorometano:n-hexano (1:1) para análise dos pesticidas: lambda-cialotrina, cipermetrina, deltametrina, sulfato de endosulfam e todos os pesticidas do item (b) da **Tabela 5**. Quando analisar todos os pesticidas da **Tabela 5**, extraia com 60 mL da mistura diclorometano:n-hexano (1:1). Adicione, aproximadamente, 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Tampe o funil. Inverta e abra a torneira para o escape de vapores de solventes. Agite. Deixe em repouso para separação das fases. Recolha a fase aquosa em béquer de 2000 mL. Passe a fase orgânica sobre sulfato de sódio anidro granulado através de um funil com algodão tratado e recolha em balão de fundo chato de 300 mL. Transfira a fase aquosa para funil de separação e extraia, como descrito, mais duas vezes. Os extratos recolhidos são evaporados em rotavapor até quase à secura. Adicione, aproximadamente, 5 mL de n-hexano e concentre novamente para eliminar o diclorometano. Transfira, quantitativamente, para tubo de vidro graduado com uma pipeta Pasteur. Complete o volume a 5 mL com n-hexano, lavando as paredes do balão. Injete nos respectivos cromatógrafos.

Purificação – Quando o extrato não estiver limpo, isto é, com muitos interferentes, purifique-o em coluna cromatográfica com 15 g de sílica gel desativada a 10% com água, eluíndo com 200 mL da mistura de diclorometano:n-hexano (1:4) e com 200 mL da mistura diclorometano:n-hexano (1:1). Recolha o eluído em balão de fundo chato de boca esmerilhada de 300 mL e concentre em rotavapor. Adicione, aproximadamente, 5 mL de n-hexano e concentre novamente para eliminar o diclorometano. Transfira, quantitativamente, para tubo de vidro graduado com uma pipeta Pasteur. Complete o volume a 5 mL com n-hexano, lavando as paredes do balão.Transfira uma alíquota para um *vial* e injete nos respectivos cromatógrafos.

Análise da amostra-testemunha e estudos de recuperação – Realize análise da testemunha e estudos de recuperação com cinco repetições em pelo menos dois níveis: 1LQ e 10 LQ.

Condições cromatográficas para a análise dos princípios ativos dos pesticidas do item (a) da **Tabela 5**:
Cromatógrafo a gás, com detector de captura de eletrons (ECD), equipado com workstation.
Coluna capilar – fase estacionária 5% de fenilmetil siloxano (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm de filme)
Temperatura do detector – 320°C
Temperatura do forno: 60°C (1 min), (60-220)°C (10°C/min), (220-280)°C

(3°C/min), 280°C (17 min) - tempo: 60 min.
Fluxo do gás de arraste-nitrogênio - 1 mL/min.
Temperatura do injetor - 240°C
Modo de injeção - *splitless*

Condições cromatográficas para a análise dos princípios ativos dos pesticidas do item (b) da **Tabela 5**:
Cromatógrafo a gás, com dector fotométrico de chama (FPD) ou de nitrogênio e fósforo (NPD)
Coluna *megabore* - fase estacionária 5% de fenilmetil siloxano (30 m x 0,53 mm x 2,65 µm de filme)
Temperatura do detector - 280°C
Temperatura do forno: (50 - 150)°C (30°C/min), (150 - 240)°C (10°C/min).
Fluxo do gás de arraste - nitrogênio – 18 mL/min.
Fluxo de Hidrogênio -75 mL/min .
Fluxo de ar sintético -100 mL/min.
Temperatura do injetor - 240°C
Modo de injeção - *splitless*

Curva-padrão – Injete as soluções de trabalho com diferentes concentrações por duas ou três vezes ou até que haja repetitividade dos cromatogramas. Construa a curva-padrão dentro da faixa de linearidade do detector.

Determinação – A análise qualitativa é feita por padronização externa, por meio de comparação do tempo de retenção dos respectivos princípios ativos e a confirmação em coluna de diferente polaridade ou por detector seletivo de massa.

Cálculo

A análise quantitativa é feita por meio da curva-padrão com padronização externa, por comparação de área, levando em consideração o fator de diluição e a quantidade da amostra. O resultado deve ser expresso em µg do princípio ativo por litro de amostra (µg/L).

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKSASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. Washington D.C.: A.P.H.A., 1995. chapter 6, p. 114-128. (com modificações).

STEIWANDTER, H. Contributions to sílica gel application in pesticide residue analysis. III. An on-line method for extracting and isolating chlorinated hidrocarbon pesticides and

polychlorinated biphenyls (PCBs) from milk and dairy products. **Fresenius Z. Anal. Chem**., v. 312, p. 342-345, 1982.

208/IV Determinação de arsênio total por espectrometria de absorção atômica com gerador de hidretos

Este método é aplicável à determinação de arsênio total em água para o consumo humano. O arsênio está na forma de arsenato (As^{5+}) e, no caso de poço profundo, algum arsenito (As^{3+}) pode estar presente. Espécies metiladas (ácidos monometilarsônico e dimetilarsínico) raramente estão presentes em águas de consumo. O arsênio orgânico é oxidado a arsênio inorgânico com $K_2S_2O_8$/HCl sob aquecimento e este é pré-reduzido a As^{3+} com KI/HCl. O As^{3+} é transformado em AsH_3 com $NaBH_4$, no gerador de hidretos e depois é reduzido ao estado elementar em cela de quartzo aquecida a 900ºC e determinado por espectrometria de absorção atômica.

Material

Espectrômetro de absorção atômica acoplado a sistema de geração de hidretos com injeção em fluxo, chapa aquecedora, lâmpada de catodo oco ou de descarga sem eletrodo de arsênio, balões volumétricos, pipetadores automáticos com volumes ajustáveis, pipetas volumétricas e béqueres

Reagentes

Ácido clorídrico para análise de traços de metais

Nota: antes de usar o ácido, borbulhe um gás inerte (por exemplo, argônio ou nitrogênio) ao frasco do reagente por aproximadamente três horas, para eliminar o Cl_2 dissolvido, pois interfere na reação, oxidando o hidreto formado.

Ácido nítrico para análise de traços de metais.

Solução de iodeto de potássio a 10% m/v .

Solução de ácido L(+)-ácido ascórbico a 10% m/v.

Solução de perssulfato de potássio a 4%.

Solução-padrão estoque de arsênio para absorção atômica - 1 000 mg/L, com certificado de análise e incerteza associada.

Solução de boridreto de sódio a 0,5% m/v em NaOH a 0,5% m/v – Pese 0,5 g de $NaHB_4$ e dissolva em 100 mL de solução a 0,5% de NaOH.

Solução-padrão estoque intermediária de arsênio 10 mg/L – Pipete 1 mL da solução-padrão estoque (1000 mg/L) em um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com solução de ácido nítrico a 2%.

Solução-padrão intermediária de arsênio 50 µg/L – Pipete 0,5 mL da solução-padrão estoque intermediária de arsênio 10 mg/L em um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Prepare no dia do ensaio.

Notas
Conserve todas as soluções-padrão estoque em frascos de polietileno.
Utilize água destilada e deionizada para preparar todos os reagentes.

Procedimento

Otimize os parâmetros instrumentais segundo o manual de instruções do fabricante. Colete as amostras de água em frasco de polietileno contendo ácido nítrico, de forma que a concentração final do ácido seja 0,2% e estoque sob refrigeração até a análise. Se a amostra estiver límpida, faça a pré-redução e a determinação. Se amostra contiver particulados ou matéria orgânica é necessário que ela seja previamente digerida antes da pré-redução.

Curva-padrão – Prepare as soluções-padrão de trabalho a partir da solução-padrão intermediária de 50 µg/L com 5 pontos, compreendendo a faixa linear de trabalho para o elemento. É recomendável que um dos pontos da curva-padrão seja o limite máximo estabelecido pela legislação. Faça o branco da curva-padrão. Em seguida, proceda à pré-redução.

Pré-redução das soluções-padrão de trabalho – Aos balões contendo os padrões, adicione alíquotas de HCl, da solução de KI e da solução de ácido ascórbico, de tal maneira que as concentrações desses reagentes na solução final sejam: 10%, 0,5% e 0,5%, respectivamente. Aguarde uma hora, complete o volume dos balões com água destilada e deionizada e efetue a determinação. Prepare as soluções-padrão no dia do ensaio.

Digestão da amostra – Pipete uma alíquota de 25 mL da amostra previamente acidificada (pH<2) com HNO_3 em béquer de 150 mL, adicione 8 mL de $K_2S_2O_8$ e aqueça a 95°C, em banho-maria, até que o volume seja reduzido a aproximadamente 10 mL. Adicione 12,5 mL de HCl, tampe o béquer com vidro de relógio e continue o aquecimento a 95°C por cerca de uma hora. Descubra o béquer e faça a redução do volume até aproximadamente 10 mL. Transfira para um balão volumétrico de 25 mL com água destilada e deionizada e proceda à pré-redução.

Pré-redução da amostra – Em balão volumétrico, pipete um volume adequado da amostra original ou a amostra digerida, conforme o caso, de tal maneira que a leitura esteja na faixa linear da curva-padrão e execute o mesmo procedimento da pré-redução das soluções-padrão de trabalho.

Determinação – Depois de determinar a curva-padrão pela leitura das soluções-padrão previamente preparadas, faça a leitura das amostras. Analise um ponto intermediário da curva-padrão após a leitura de dez amostras para verificar se o equipamento está mantendo a calibração. Se a leitura tiver uma variação maior que a estabelecida pelo laboratório, faça a recalibração.

Nota: caso a leitura da amostra fique fora da faixa linear da curva-padrão, não dilua a amostra. Tome uma alíquota menor e reinicie a análise a partir da digestão ou da pré-redução, de acordo com o tipo de amostra.

Cálculo

$$\frac{L \times v_1}{1000 \times v_2} = \text{concentração de arsênio, em mg/L}$$

L = leitura no equipamento, em µg/L
v_1 = volume do balão utilizado na pré-redução, em mL
v_2 = volume de amostra utilizada na pré-redução, em mL

Referência bibliográfica

NYGAARD, D. D.; LOWRY, J.H. Sample digestion procedures for simultaneous determination of arsenic, antimony, and selenium by Inductively Coupled Argon Plasma Emission Spectrometry with Hydride Generation. **Anal. Chem**. v. 54, p. 803-807, 1982.

209/IV Determinação de metais totais por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado

Este método é aplicável à determinação de metais totais (prata, alumínio, bário, cálcio, cobre, cromo, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo e zinco) em água para consumo humano. Os metais são determinados usando a técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES).

Material

Espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES), balões volumétricos, pipetadores automáticos com volumes ajustáveis, pipetas volumétricas, béquer, frascos de polietileno.

Reagentes

Ácido nítrico para análise de traços de metais

Soluções-padrão estoque monoelementares de 1000 mg/L de: alumínio, prata, bário, cromo, cobre e manganês para análise espectrométrica, com certificado de análise e incerteza associada.

Soluções-padrão estoque monoelementares de 10000 mg/L de: cálcio, ferro, fósforo, magnésio, potássio, sódio e zinco para análise espectrométrica, com certificado de análise e incerteza associada.

Nota: a solução-padrão de prata deve ser preparada separadamente da solução-padrão multielementar, pois este metal forma precipitado com haletos. Recomenda-se que as soluções para a construção da curva-padrão da prata sejam preparadas no dia do ensaio.

Procedimento

Otimize os parâmetros instrumentais segundo o manual de instruções do fabricante.

Curva-padrão – Prepare as soluções-padrão multi-elementares de trabalho para a construção da curva-padrão com seis pontos, incluindo o branco, a partir de uma solução-padrão intermediária, levando em consideração a sensibilidade do equipamento e a faixa linear de trabalho para cada elemento. As soluções são preparadas em ácido nítrico a 0,2% v/v e conservadas em frascos de polietileno. É recomendável que o ponto intermediário da curva-padrão compreenda o limite estabelecido pela legislação, para cada elemento.

Determinação – Zere o equipamento com solução de ácido nítrico a 0,2% v/v. Estabeleça as curvas-padrão para cada elemento a ser determinado usando regressão não linear. Verifique a calibração após analisar um número de amostras, utilizando uma das soluções-padrão da curva. Se a leitura apresentar uma variação maior que a estabelecida pelo laboratório, deve-se recalibrar. Se necessário, dilua a amostra para que a leitura fique inserida na faixa linear da curva-padrão. A diluição também deve ser feita com ácido nítrico a 0,2% v/v.

Cálculo

Como o metal é determinado diretamente na amostra de água, o valor lido no equipamento é o próprio valor da concentração, a não ser que alguma diluição ou pré-concentração tenha sido necessária. Nesse caso, deve-se dividir ou multiplicar o valor da leitura obtida pelo fator de diluição ou da pré-concentração.

Referência bibliográfica

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. Washington, DC: A.P.H.A., 1995. chapter 3, p. 5, 34-39.

210/IV Determinação de metais totais por espectrometria de absorção atômica com chama

O método é aplicável à determinação de bário, cálcio, cádmio, chumbo, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, sódio, potássio e zinco em águas, com exceção de água de efluentes e água do mar. Íons de metais em água podem ser determinados diretamente por espectrometria de absorção atômica com chama, dependendo da concentração do elemento na amostra. Para a determinação de alguns elementos é necessária a pré-concentração da amostra.

Material

Espectrômetro de absorção atômica com chama equipado com corretor de background e lâmpada de catodo oco do elemento a ser determinado, chapa aquecedora, balões volumétricos, pipetador automático com volume ajustável e béqueres.

Reagentes

Ácido nítrico para análise de traços de metais

Soluções-padrão estoque de 1000 mg/L dos seguintes elementos: bário, cálcio, cádmio, chumbo, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, sódio, potássio e zinco para uso em absorção atômica, com certificado de análise e incerteza associada.

Procedimento

Opere o equipamento de acordo com o manual de instruções do fabricante. Ajuste o queimador, a chama e a nebulização para obtenção de máxima absorbância, utilizando

uma solução-padrão da curva. Para a determinação de elementos tais como: bário, cádmio, chumbo, cromo e manganês, devido à baixa sensibilidade da técnica, é necessário pré-concentrar a amostra. Os outros elementos também podem ser lidos nessa solução da amostra pré-concentrada. As amostras de água que apresentam resíduo devem ser digeridas conforme o procedimento da digestão/pré-concentração. Os elementos: cobre, ferro e zinco podem ser lidos diretamente na solução original da amostra ou, então, na solução da amostra pré-concentrada.

Digestão/pré-concentração da amostra – Colete a amostra conforme procedimento recomendado no **cap. III** e transfira 250 mL da amostra homogeneizada para um béquer ou outro volume dependendo da concentração esperada do analito e do limite de detecção do método. Adicione 5 mL de ácido nítrico. Leve à ebulição lenta e evapore sobre chapa aquecedora até o volume aproximado de 10 mL ou antes que a precipitação ocorra. Adicione 2 mL de ácido nítrico e cubra com vidro de relógio para refluxar sobre as paredes do béquer. Continue aquecendo até que a solução fique clara e límpida. Se necessário, repita a adição de ácido nítrico. Reduza o volume ao mínimo, sem deixar secar a amostra durante o tratamento. Transfira, quantitativamente, para um balão volumétrico de 25 mL com água destilada e deionizada. Faça a determinação dos metais nessa solução. Prepare a amostra em triplicata e o branco dos reagentes, submetido às mesmas condições de análise.

Para a determinação de íons sódio e potássio, adicione um outro metal alcalino para evitar a interferência de ionização na chama. No caso da determinação de íons de potássio, adicione solução de cloreto de sódio à amostra, ao branco e às soluções-padrão de tal forma que a concentração final seja 0,1% em íon sódio. Na determinação de íons sódio, adicione solução de cloreto de potássio para que a concentração final seja 0,1% em íon potássio. As soluções de cloretos de sódio e de potássio podem ser substituídas por solução de césio de tal forma que a concentração final em césio seja 0,1%.

Para a determinação de íons cálcio e magnésio, adicione à amostra, ao branco e às soluções-padrão uma solução de íons lantânio, de tal forma que a concentração final seja 1% em lantânio.

Curva-padrão – Prepare as soluções-padrão da curva a partir da solução-padrão estoque, levando em consideração a sensibilidade do equipamento e a faixa linear de trabalho para cada elemento. As soluções-padrão de trabalho devem ser preparadas em ácido nítrico a 0,2% e conservadas em frascos de polietileno.

Zere o equipamento com o branco e faça a leitura das absorbâncias das soluções-padrão. Estabeleça as curvas-padrão para cada elemento a ser determinado usando regressão linear. Em seguida, faça a leitura das amostras. Se necessário, dilua a solução da amostra

para que a leitura da absorbância fique inserida na faixa linear da curva-padrão.

Cálculo

A partir da curva-padrão, obtenha a absortividade (coeficiente angular da curva absorbância versus concentração) para cada elemento.

$$\frac{(A_a - A_b) \times v \times d}{a \times v_1} = \text{concentração do elemento na amostra, em mg/L}$$

A_a = absorbância da amostra
A_b = absorbância do branco da amostra
A = absortividade, obtida a partir da curva-padrão
v = volume do balão no qual a amostra foi transferida após dissolução, em mL
d = fator de diluição da amostra, quando necessária
v_1 = volume da amostra original, em mL
m = massa da amostra original, em g

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods Association Of Official Analytical Chemists**. Arlington: AOAC, (method 973.53), 16th ed., chapter 11, 1995 p. 19.

PERKIN ELMER. **Analytical methods for atomic absorption spectroscopy**. Norwalk, U.S.A, 1996.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS, ASSOCIATION WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. Washington, DC: APHA, 1995, chapter 3, p. 3-9, 13-15.

211/IV Determinação de mercúrio total por espectrometria de absorção atômica com gerador de vapor frio

Este método é aplicável à determinação de mercúrio total em água. O mercúrio orgânico é oxidado a mercúrio inorgânico com a mistura de $KMnO_4$ /$K_2S_2O_8$ com aquecimento e reduzido ao estado elementar com cloreto estanoso. O mercúrio é determinado por espectrometria de absorção atômica com gerador de vapor frio, utilizando-se sistema de injeção em fluxo e amalgamador.

Material

Espectrômetro de absorção atômica acoplado ao gerador de vapor frio com sistema de injeção em fluxo e amalgamador, chapa aquecedora, lâmpada de catodo oco ou de descarga sem eletrodo de mercúrio, balões volumétricos, pipetadores automáticos com volumes ajustáveis, pipetas volumétricas e béqueres.

Reagentes

Ácido nítrico isento de mercúrio
Ácido sulfúrico isento de mercúrio
Ácido clorídrico isento de mercúrio
Ácido clorídrico 5% v/v
Permanganato de potássio isento de mercúrio

Solução-padrão estoque de mercúrio 1000 mg/L com certificado de análise e incerteza associada.

Solução-padrão estoque intermediária 10 mg/L de mercúrio – Pipete 1 mL da solução-padrão estoque 1000 mg/L em um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com solução contendo os ácidos ácido sulfúrico a 2% e nítrico a 2%.

Solução-padrão intermediária de trabalho de mercúrio 50 µg/L – Pipete 0,5 mL da solução-padrão intermediária (10 mg/L) em um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com solução de ácido sulfúrico e nítrico a 2%. Prepare no dia do ensaio.

Solução de cloreto estanoso a 5% em HCl 5% – Pese 5 g de $SnCl_2$ em béquer, adicione 5 mL de HCl e aqueça para dissolver o cloreto estanoso. Adicione água destilada e deionizada até completar 100 mL, com agitação constante.
Solução de permanganato de potássio a 5% m/v – Pese 5 g de $KMnO_4$ em béquer, dissolva em 100 mL de água destilada e deionizada. Guarde em frasco protegido da luz.

Solução de persulfato de potássio a 5% m/v – Pese 5 g de $K_2S_2O_8$ em béquer e dissolva em 100 mL de água destilada e deionizada.

Solução de cloridrato de hidroxilamina a 5% m/v – Pese 5 g de NH_2OHCl e dissolva em 100 mL de água destilada e deionizada.

Nota: Armazene todas as soluções-padrão estoque em frascos de polietileno.

Procedimento

Os parâmetros instrumentais devem ser otimizados segundo o manual de instruções do fabricante. As amostras de água devem ser coletadas em frasco de polietileno contendo ácido nítrico e cloreto de sódio, de forma que a concentração final, tanto de NaCl quanto de HNO_3, sejam 2% e estocadas sob refrigeração até a análise. Se a amostra apresentar particulados ou matéria orgânica é necessário que seja digerida.

Digestão da amostra – Pipete uma alíquota de 25 mL da amostra em béquer de 150 mL. Lentamente, adicione 1,3 mL de H_2SO_4 e 0,6 mL de HNO_3 e misture. Adicione 3,5 mL de $KMnO_4$ a 5% e aguarde por cerca de 15 minutos. Adicione 2 mL de $K_2S_2O_8$ e aqueça a 95°C em banho-maria por 2 horas e resfrie. Se necessário, elimine o excesso de permanganato com algumas gotas de solução de hidroxilamina a 5%. Transfira para um balão volumétrico de 25 mL com água destilada e deionizada. Se a amostra estiver límpida, faça a leitura diretamente sem digestão prévia.

Curva-padrão

A partir da solução-padrão intermediária de trabalho de mercúrio (50 µg/L), prepare 6 concentrações para a curva compreendendo a faixa linear de trabalho, de acordo com a sensibilidade do equipamento. As soluções-padrão são preparadas em meio ácido sulfúrico a 2% e nítrico a 2%. Estas soluções-padrão devem ser preparadas no dia do ensaio.

Nota: é recomendável que um dos pontos da curva-padrão seja o limite estabelecido pela legislação.

Determinação – Zere o equipamento com solução de H_2SO_4/HNO_3 a 2% e faça a leitura das soluções-padrão. Depois de completar a calibração, as amostras podem ser analisadas. Se necessário, dilua as amostras para que as leituras fiquem compreendidas na faixa linear da curva-padrão. Verifique a calibração, analisando um ponto intermediário da curva-padrão. Se a leitura tiver uma variação maior que a estabelecida pelo laboratório, recalibre.

Cálculo

Como o metal é determinado diretamente na água coletada, o valor lido no equipamento é o próprio valor da concentração, a não ser que alguma diluição tenha sido necessária. Nesse caso, deve-se multiplicar o valor da leitura obtida pela diluição efetuada.

Referência bibliográfica

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. Washington, DC: APHA, 1995, chapter 3, p. 18-19.

212/IV Determinação de metais totais por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

Este método é aplicável à determinação de metais totais (antimônio, cádmio, chumbo, cromo e alumínio), em níveis de traços (µg/L) em águas para consumo. Os metais são determinados usando a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (ETAAS).

Material

Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite e corretor de fundo (*Background)*, lâmpadas de catodo oco ou de descarga sem eletrodo do elemento a ser analisado, balões volumétricos, pipetadores automáticos com volumes ajustáveis, pipetas volumétricas, béqueres e balões volumétricos de polimetilpenteno ou polipropileno para a determinação de íons alumínio.

Reagentes

Ácido nítrico para a análise de traços de metais

Soluções-padrão estoque de 1000 mg/L de: alumínio, antimônio, cádmio, chumbo e cromo para uso em absorção atômica com certificado de análise e incerteza associada.

Soluções de modificadores químicos:

a) Mistura de dihidrogenofosfato de amônio a 0,5% m/v e nitrato de magnésio a 0,03% m/v, para as determinações de chumbo e cádmio – Pese cerca de 0,5 g de $NH_4H_2PO_4$ e

0,052 g de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ em béqueres. Dissolva os sais com água destilada e deionizada e transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume.

b) Solução de nitrato de magnésio a 0,15% m/v, para as determinações de antimônio, alumínio e cromo – Pese cerca de 0,259 g de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ em um béquer. Dissolva com água destilada e deionizada e transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume.

Procedimento - Os parâmetros instrumentais devem ser otimizados segundo o manual de instruções do fabricante. Zere o equipamento com solução de ácido nítrico 0,2% v/v. Estabeleça a curva-padrão para cada elemento a ser determinado usando regressão linear. Recalibre após o número de leituras definido pelo laboratório. Caso necessário, dilua a amostra para que a leitura fique inserida na faixa linear da curva-padrão.

Curva-padrão – Prepare as soluções-padrão de trabalho para a curva com seis pontos a partir da uma solução-padrão intermediária, levando em consideração a sensibilidade do equipamento e a faixa linear de trabalho para o elemento. As soluções são preparadas em ácido nítrico a 0,2% v/v, no dia do ensaio.

Nota: é recomendável que a curva-padrão compreenda o limite estabelecido pela legislação

Cálculo

Como o metal é determinado diretamente na água coletada, o valor lido no equipamento é o próprio valor da concentração, a não ser que alguma diluição tenha sido necessária. Neste caso, deve-se multiplicar o valor da leitura obtida pelo fator da diluição.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 19th ed. Washington, DC: APHA, 1995, chapter 3, p. 22-27.

PERKIN ELMER. **The THGA Graphite Furnace: Techniques and Recommended Conditions for Atomic Spectroscopy**. Norwalk, U.S.A., 1991.

213/IV Identificação de cianeto – Prova de Pertusi-Gastaldi

Material

Pipetas graduadas de 1 mL e placa de toque.

Reagentes

Solução de acetato de cobre 30% m/v
Solução saturada de acetato de benzidina em ácido acético a 10% m/v

Procedimento – Em uma placa de toque, coloque uma gota de acetato de cobre a 30% m/v, cinco gotas da solução saturada de acetato de benzidina em ácido acético a 10% e 0,5 mL da amostra. Em presença de íons cianeto, aparecerá uma coloração azul característica.

Nota: os oxidantes e os ânions que complexam com o cobre (I) também reagem nesta prova. São interferentes: iodetos, sulfetos, etc

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 327-328.

214/IV Determinação de sulfatos

Material

Béquer de 400 mL, balões volumétricos de 500 e 1000 mL, pipetas volujmétricas de 1, 2 e 5 mL, proveta de 10 mL, filtro, filtro de papel Whatman nº 40, cápsula de porcelana de 250 mL, bico de Bünsen, banho-maria e mufla.

Reagentes

Solução de ácido clorídrico (1+1)
Indicador metilorange

Solução de cloreto de bário – Dissolva 100 g de cloreto de bário em água bidestilada e deionizada. Complete o volume até 1000 mL com água bidestilada e deionizada. Filtre a solução antes de usar.

Nota: 1 mL desta solução precipita aproximadamente 40 mg de íon sulfato.

Solução de nitrato de prata – Pese 8,5 g de nitrato de prata, transfira para um balão de 500 mL, adicione 0,5 mL de ácido nítrico e complete o volume com água bidestilada e deionizada.

Procedimento

Preparação da amostra – Se a amostra contiver sílica em concentração superior a 25 mg/L, remova-a evaporando a amostra em banho-maria, até próximo da secura. Junte 1 mL de solução de ácido clorídrico (1+1), gire a cápsula para que o ácido entre em contato com o resíduo contido nos lados internos da cápsula e continue a evaporação até a secura. Adicione 20 mL de água bidestilada e deionizada e reserve. Se a amostra contiver matéria orgânica, evapore e leve diretamente ao bico de Bünsen, junte 2 mL de água bidestilada e deionizada e 1 mL de solução de ácido clorídrico (1+1). Evapore novamente até secura, em banho-maria, junte 2 mL de água quente e filtre. Lave a sílica insolubilizada com várias porções de água bidestilada e deionizada quente e reserve. Se a amostra for turva, clarifique-a por decantação ou filtração. Em se tratando de águas contendo íons sulfato em concentração menor que 200 mg/L, o volume da amostra usado para esta determinação não deve exceder 150 mL.

Determinação de íons sulfato – Transfira, 200 mL da amostra para um béquer de 400 mL. Evapore até aproximadamente 20 mL. Ajuste o pH para 4,4, com adição de ácido clorídrico (1+1), usando metilorange como indicador. Adicione mais 1 mL de solução ácido clorídrico (1+1). Aqueça a solução até a ebulição, agitando suavemente. Adicione solução de cloreto de bário, quente, até que a precipitação esteja completa. Junte mais 2 mL da solução de cloreto de bário. Deixe o precipitado digerir em banho-maria a (80–90)°C, preferivelmente durante a noite, porém nunca menos que 2 horas. Junte pedaços de papel de filtro Whatman nº 40 ao precipitado contido no béquer. Filtre em papel Whatman nº 40, lave o precipitado no filtro com porções de água bidestilada e deionizada quente até que as águas de lavagem estejam livres de íon cloreto. Faça o teste com solução de nitrato de prata. Seque o papel de filtro em estufa 105°C e transfira para uma cápsula de porcelana de 250 mL tarada, previamente aquecida em mufla a 550°C, durante uma hora. Esfrie em dessecador e pese.

Cálculo

N x 5 x 1000 = mg de sulfato de bário por 1000 mL da amostra
N = massa, em gramas, do resíduo.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985, p.329-330.

Colaboradores

Maria Anita Scorsafava; Jaim Lichtig; Berenice Mandel Brígido; Cristina Eico Yokosawa; Francisco Lopes Dias Jr.; Isaura Akemi Okada; Joel Batista da Silva; Liliana Brancacio Bacetti; Maria Cristina Duran; Maria de Lourdes Burini Arine; Maria do Rosário Vigeta Lopes; Roberto Carlos Fernandes Barsotti; Rute Dal Col; Tereza Atsuko Kussumi; Valéria Pereira da Silva Freitas; Paulo Tiglea; Alice Momoyo Ata Sakuma; Carmen Silvia Kira; Franca Durante de Maio; Heloísa Helena Barretto de Toledo; Janete Alaburda; Kátia Regina Marton de Freitas Martins; Linda Nishihara; Maria de Fátima Henriques Carvalho; Maria de Lourdes Paixão da Silva; Marina Miyuki Okada; Rosângela Aguilar da Silva; Sônia Otero Bio Rocha; Teresa Marilene Bronharo e Vera Regina Rossi Lemes

CAPÍTULO **IX**

BEBIDAS ALCOÓLICAS

IX

BEBIDAS ALCOÓLICAS

Estão incluídos neste capítulo os métodos de análise para: aguardentes de cana, de melaço, de frutas, arac, bagaceira, conhaque, pisco, rum, tequila, tiquira e uísques. As determinações efetuadas nas bebidas alcoólicas destilo-retificadas são as mesmas que se fazem nas alcoólicas fermento-destiladas. As determinações usuais efetuadas nestes produtos são, entre outras, densidade, grau alcoólico, extrato seco (ou resíduo seco), glicídios totais, cinzas, acidez total, acidez volátil, metanol, componentes secundários: ésteres, aldeídos, furfural e álcoois superiores, além de carbamato de etila ou uretana, cobre e outros contaminantes inorgânicos (**cap. XXIII**).

215/IV Bebidas fermento-destiladas – Densidade relativa a 20°C/20ºC com picnômetro

A densidade em relação à água pura é uma ferramenta utilizada para determinar a % de álcool em soluções hidroalcoólicas, a uma dada temperatura. Pode ser medida por vários aparelhos, sendo os seguintes os mais usados: picnômetro, densímetro de leitura direta e hidrômetro calibrado.

O método com picnômetro consiste na medida da massa de um volume conhecido de líquido num recipiente denominado picnômetro. O mesmo é calibrado em relação à massa da água pura a 20 ºC. Da relação destas massas e volumes resulta a densidade relativa à água.

Material

Balança analítica, termômetro, dessecador e picnômetros de 25, 50 ou 100 mL

Reagentes

Álcool
Éter

Procedimento – Lave o picnômetro, enxágüe com álcool e, posteriormente, com éter. Deixe secar naturalmente e pese. Encha o picnômetro com água a 20°C e pese. Lave e seque o picnômetro e proceda da mesma forma com a amostra.

Cálculo

$$\frac{m_{am} - m_p}{m_{H_2O} - m_p} = \text{densidade relativa } 20°C/20°C$$

m_{am} = massa do picnômetro com a amostra
m_p = massa do picnômetro vazio
m_{H_2O} = massa do picnômetro com a água

Nota: a densidade relativa a 20°C é expressa no mínimo com quatro casas decimais.

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 945.06) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 26. p. 2.

216/IV Bebidas fermento-destiladas – Densidade relativa a 20°C/20°C com densímetro de leitura direta

A densidade a 20°C é determinada pela medida da freqüência da oscilação do tubo em U do densímetro preenchido com a amostra, comparada com as freqüências de oscilação quando preenchido com água pura ou com padrões determinados.

Material

Densímetro automático digital de leitura direta com injetor automático, opcional, e seringas de 10 a 15 mL.

Procedimento – Proceda a calibração do equipamento conforme as instruções do fabricante, utilizando água como referência, fixando a temperatura a (20 ± 0,01)°C. Certifique-se que o tubo em U esteja completamente cheio com água, sem a presença de bolhas. Retire a água, seque o tubo e injete a amostra livre de qualquer partícula no densímetro (filtre, se necessário). Verifique se não há formação de bolhas e faça a leitura direta da densidade.

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 982.10) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 26. p. 4-5.

217/IV Bebidas fermento-destiladas – Álcool em volume a 20°C ou grau alcoólico real

Este método é aplicável para a determinação da porcentagem de álcool em volume a 20°C em bebidas alcoólicas. A graduação alcoólica (% em volume) é obtida pela tabela de conversão da densidade relativa a 20°C/20°C determinada no destilado alcoólico da amostra. Algumas amostras não requerem destilação, como, por exemplo, bebidas destiladas, destilo-retificadas e misturas água-álcool.

Material

Conjunto de destilação (ou equipamento destilador por arraste de vapor), chapa de aquecimento, termômetro, balão volumétrico de 100 ou 250 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada, condensador de serpentina ou de Liebig (maior ou igual a 40 cm de comprimento), conexão com bola de segurança e junta esmerilhada, funil e pérolas de vidro.

Procedimento – Ajuste a temperatura da amostra a 20°C e meça 100 ou 250 mL em um balão volumétrico. Transfira a amostra para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, lave o balão volumétrico com água, aproximadamente 4 vezes e junte ao conteúdo do frasco Erlenmeyer. Conecte o frasco de destilação ao condensador, intercalando uma conexão intermediária com bola de segurança, aqueça e destile. Alternativamente, transfira a amostra para o conjunto de destilação e proceda conforme as instruções de uso do equipamento. Amostras que contenham açúcar, como aguardente de cana adoçada e aguardente composta, precisam ser destiladas. Bebidas fermento-destiladas e retificadas como aguardentes, uísques, vodca e gim não têm necessidade de serem destiladas para a determinação de graduação alcoólica. Recolha o destilado no balão volumétrico de 100 ou 250 mL, anteriormente usado, já contendo 10 mL de água e imerso em banho de água e gelo. Destile cerca de ¾ do volume

inicial. Adicione água até quase completar o volume. Ajuste a temperatura a 20°C, mergulhando o balão volumétrico em banho de água e gelo. Complete o volume com água a 20°C e agite. Determine a densidade relativa do destilado a 20°C, com o uso de picnômetro ou densímetro digital automático ou outro aparelho como hidrômetro ou densímetro calibrado. Obtenha a graduação alcoólica do destilado alcoólico a 20°C utilizando a **Tabela 1**, referente à conversão de densidade em porcentagem de álcool em volume. O resultado será expresso em % de álcool em volume.

TABELA 1 – Porcentagem de álcool em volume a 20°C (% v/v) correspondente à densidade relativa

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
1,00000	0,0	0,99632	2,5	0,99281	5,0	0,98956	7,5
0,99985	0,1	0,99618	2,6	0,99268	5,1	0,98944	7,6
0,99970	0,2	0,99603	2,7	0,99255	5,2	0,98931	7,7
0,99955	0,3	0,99589	2,8	0,99241	5,3	0,98919	7,8
0,99939	0,4	0,99574	2,9	0,99228	5,4	0,98906	7,9
0,99924	0,5	0,99560	3,0	0,99215	5,5	0,98893	8,0
0,99910	0,6	0,99546	3,1	0,99201	5,6	0,98881	8,1
0,99895	0,7	0,99531	3,2	0,99188	5,7	0,98869	8,2
0,99880	0,8	0,99517	3,3	0,99174	5,8	0,98857	8,3
0,99866	0,9	0,99503	3,4	0,99161	5,9	0,98845	8,4
0,99851	1,0	0,99489	3,5	0,99148	6,0	0,98833	8,5
0,99836	1,1	0,99475	3,6	0,99135	6,1	0,98820	8,6
0,99821	1,2	0,99461	3,7	0,99122	6,2	0,98807	8,7
0,99807	1,3	0,99447	3,8	0,99109	6,3	0,98794	8,8
0,99792	1,4	0,99433	3,9	0,99096	6,4	0,98782	8,9
0,99777	1,5	0,99419	4,0	0,99083	6,5	0,98770	9,0
0,99763	1,6	0,99405	4,1	0,99070	6,6	0,98758	9,1
0,99748	1,7	0,99391	4,2	0,99057	6,7	0,98746	9,2
0,99733	1,8	0,99377	4,3	0,99045	6,8	0,98734	9,3
0,99719	1,9	0,99363	4,4	0,99032	6,9	0,98722	9,4
0,99704	2,0	0,99349	4,5	0,99020	7,0	0,98710	9,5
0,99689	2,1	0,99336	4,6	0,99007	7,1	0,98698	9,6
0,99675	2,2	0,99322	4,7	0,98994	7,2	0,98686	9,7
0,99661	2,3	0,99308	4,8	0,98981	7,3	0,98674	9,8
0,99646	2,4	0,99295	4,9	0,98969	7,4	0,98662	9,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,98650	10,0	0,98239	13,5	0,97851	17,0	0,97478	20,5
0,98637	10,1	0,98227	13,6	0,97840	17,1	0,97467	20,6
0,98626	10,2	0,98216	13,7	0,97829	17,2	0,97456	20,7
0,98614	10,3	0,98204	13,8	0,97818	17,3	0,97445	20,8
0,98602	10,4	0,98193	13,9	0,97807	17,4	0,97435	20,9
0,98590	10,5	0,98182	14,0	0,97797	17,5	0,97424	21,0
0,98578	10,6	0,98171	14,1	0,97786	17,6	0,97414	21,1
0,98566	10,7	0,98159	14,2	0,97775	17,7	0,97404	21,2
0,98554	10,8	0,98148	14,3	0,97764	17,8	0,97393	21,3
0,98542	10,9	0,98137	14,4	0,97754	17,9	0,97382	21,4
0,98530	11,0	0,98126	14,5	0,97743	18,0	0,97371	21,5
0,98518	11,1	0,98115	14,6	0,97732	18,1	0,97360	21,6
0,98506	11,2	0,98103	14,7	0,97721	18,2	0,97350	21,7
0,98494	11,3	0,98092	14,8	0,97711	18,3	0,97339	21,8
0,98482	11,4	0,98081	14,9	0,97700	18,4	0,97328	21,9
0,98470	11,5	0,98070	15,0	0,97690	18,5	0,97317	22,0
0,98459	11,6	0,98058	15,1	0,97679	18,6	0,97306	22,1
0,98447	11,7	0,98047	15,2	0,97668	18,7	0,97295	22,2
0,98435	11,8	0,98036	15,3	0,97657	18,8	0,97285	22,3
0,98424	11,9	0,98025	15,4	0,97646	18,9	0,97274	22,4
0,98412	12,0	0,98014	15,5	0,97636	19,0	0,97263	22,5
0,98400	12,1	0,98003	15,6	0,97626	19,1	0,97252	22,6
0,98388	12,2	0,97992	15,7	0,97616	19,2	0,97241	22,7
0,98377	12,3	0,97981	15,8	0,97605	19,3	0,97230	22,8
0,98365	12,4	0,97970	15,9	0,97595	19,4	0,97219	22,9
0,98354	12,5	0,97959	16,0	0,97584	19,5	0,97208	23,0
0,98342	12,6	0,97948	16,1	0,97574	19,6	0,97197	23,1
0,98330	12,7	0,97937	16,2	0,97563	19,7	0,97185	23,2
0,98318	12,8	0,97926	16,3	0,97553	19,8	0,97174	23,3
0,98307	12,9	0,97915	16,4	0,97542	19,9	0,97163	23,4
0,98296	13,0	0,97905	16,5	0,97531	20,0	0,97152	23,5
0,98285	13,1	0,97894	16,6	0,97521	20,1	0,97141	23,6
0,98274	13,2	0,97883	16,7	0,97511	20,2	0,97130	23,7
0,98263	13,3	0,97872	16,8	0,97500	20,3	0,97118	23,8
0,98251	13,4	0,97862	16,9	0,97489	20,4	0,97107	23,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,97096	24,0	0,96695	27,5	0,96270	31,0	0,95802	34,5
0,97084	24,1	0,96683	27,6	0,96257	31,1	0,95788	34,6
0,97073	24,2	0,96671	27,7	0,96244	31,2	0,95774	34,7
0,97062	24,3	0,96660	27,8	0,96231	31,3	0,95759	34,8
0,97051	24,4	0,96648	27,9	0,96218	31,4	0,95745	34,9
0,97040	24,5	0,96636	28,0	0,96206	31,5	0,95731	35,0
0,97028	24,6	0,96624	28,1	0,96193	31,6	0,95717	35,1
0,97017	24,7	0,96612	28,2	0,96180	31,7	0,95702	35,2
0,97006	24,8	0,96601	28,3	0,96167	31,8	0,95688	35,3
0,96994	24,9	0,96588	28,4	0,96154	31,9	0,95673	35,4
0,96984	25,0	0,96576	28,5	0,96141	32,0	0,95659	35,5
0,96974	25,1	0,96565	28,6	0,96128	32,1	0,95645	35,6
0,96961	25,2	0,96553	28,7	0,96115	32,2	0,95630	35,7
0,96950	25,3	0,96541	28,8	0,96101	32,3	0,95616	35,8
0,96938	25,4	0,96529	28,9	0,96088	32,4	0,95601	35,9
0,96927	25,5	0,96517	29,0	0,96075	32,5	0,95587	36,0
0,96916	25,6	0,96505	29,1	0,96062	32,6	0,95572	36,1
0,96904	25,7	0,96493	29,2	0,96049	32,7	0,95558	36,2
0,96893	25,8	0,96480	29,3	0,96035	32,8	0,95543	36,3
0,96881	25,9	0,96468	29,4	0,96022	32,9	0,95528	36,4
0,96870	26,0	0,96456	29,5	0,96009	33,0	0,95513	36,5
0,96858	26,1	0,96444	29,6	0,95995	33,1	0,95499	36,6
0,96847	26,2	0,96432	29,7	0,95982	33,2	0,95484	36,7
0,96835	26,3	0,96419	29,8	0,95968	33,3	0,95469	36,8
0,96824	26,4	0,96407	29,9	0,95955	33,4	0,95455	36,9
0,96812	26,5	0,96395	30,0	0,95941	33,5	0,95440	37,0
0,96800	26,6	0,96383	30,1	0,95927	33,6	0,95425	37,1
0,96789	26,7	0,96370	30,2	0,95914	33,7	0,95410	37,2
0,96777	26,8	0,96357	30,3	0,95900	33,8	0,95394	37,3
0,96766	26,9	0,96345	30,4	0,95887	33,9	0,95379	37,4
0,96754	27,0	0,96333	30,5	0,95873	34,0	0,95364	37,5
0,96742	27,1	0,96320	30,6	0,95859	34,1	0,95349	37,6
0,96730	27,2	0,96308	30,7	0,95845	34,2	0,95334	37,7
0,96719	27,3	0,96295	30,8	0,95830	34,3	0,95318	37,8
0,96707	27,4	0,96283	30,9	0,95816	34,4	0,95303	37,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,95288	38,0	0,94728	41,5	0,94124	45,0	0,93472	48,5
0,95272	38,1	0,94711	41,6	0,94106	45,1	0,93453	48,6
0,95257	38,2	0,94695	41,7	0,94088	45,2	0,93434	48,7
0,95241	38,3	0,94678	41,8	0,94070	45,3	0,93414	48,8
0,95226	38,4	0,94662	41,9	0,94052	45,4	0,93395	48,9
0,95210	38,5	0,94645	42,0	0,94034	45,5	0,93376	49,0
0,95194	38,6	0,94628	42,1	0,94015	45,6	0,93357	49,1
0,95179	38,7	0,94611	42,2	0,93997	45,7	0,93337	49,2
0,95163	38,8	0,94594	42,3	0,93979	45,8	0,93318	49,3
0,95148	38,9	0,94577	42,4	0,93961	45,9	0,93298	49,4
0,95132	39,0	0,94560	42,5	0,93943	46,0	0,93279	49,5
0,95116	39,1	0,94543	42,6	0,93924	46,1	0,93260	49,6
0,95100	39,2	0,94526	42,7	0,93906	46,2	0,93240	49,7
0,95084	39,3	0,94509	42,8	0,93887	46,3	0,93221	49,8
0,95068	39,4	0,94492	42,9	0,93869	46,4	0,93201	49,9
0,95052	39,5	0,94475	43,0	0,93850	46,5	0,93182	50,0
0,95037	39,6	0,94458	43,1	0,93831	46,6	0,93162	50,1
0,95021	39,7	0,94440	43,2	0,93813	46,7	0,93142	50,2
0,95005	39,8	0,94423	43,3	0,93794	46,8	0,93122	50,3
0,94989	39,9	0,94405	43,4	0,93776	46,9	0,93102	50,4
0,94973	40,0	0,94388	43,5	0,93757	47,0	0,93082	50,5
0,94957	40,1	0,94371	43,6	0,93738	47,1	0,93063	50,6
0,94941	40,2	0,94353	43,7	0,93719	47,2	0,93043	50,7
0,94924	40,3	0,94336	43,8	0,93701	47,3	0,93023	50,8
0,94908	40,4	0,94318	43,9	0,93682	47,4	0,93003	50,9
0,94892	40,5	0,94301	44,0	0,93663	47,5	0,92983	51,0
0,94876	40,6	0,94283	44,1	0,93644	47,6	0,92963	51,1
0,94860	40,7	0,94266	44,2	0,93625	47,7	0,92943	51,2
0,94843	40,8	0,94248	44,3	0,93606	47,8	0,92922	51,3
0,94827	40,9	0,94230	44,4	0,93587	47,9	0,92902	51,4
0,94811	41,0	0,94213	44,5	0,93568	48,0	0,92882	51,5
0,94794	41,1	0,94195	44,6	0,93549	48,1	0,92862	51,6
0,94778	41,2	0,94177	44,7	0,93530	48,2	0,92842	51,7
0,94761	41,3	0,94159	44,8	0,93510	48,3	0,92821	51,8
0,94745	41,4	0,94142	44,9	0,93491	48,4	0,92801	51,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,92781	52,0	0,92057	55,5	0,91300	59,0	0,90507	62,5
0,92761	52,1	0,92036	55,6	0,91278	59,1	0,90484	62,6
0,92740	52,2	0,92015	55,7	0,91255	59,2	0,90461	62,7
0,92720	52,3	0,91993	55,8	0,91233	59,3	0,90438	62,8
0,92700	52,4	0,91972	55,9	0,91210	59,4	0,90415	62,9
0,92679	52,5	0,91951	56,0	0,91188	59,5	0,90392	63,0
0,92659	52,6	0,91930	56,1	0,91166	59,6	0,90369	63,1
0,92639	52,7	0,91908	56,2	0,91143	59,7	0,90346	63,2
0,92619	52,8	0,91887	56,3	0,91121	59,8	0,90323	63,3
0,92598	52,9	0,91865	56,4	0,91098	59,9	0,90300	63,4
0,92578	53,0	0,91844	56,5	0,91076	60,0	0,90276	63,5
0,92557	53,1	0,91823	56,6	0,91053	60,1	0,90253	63,6
0,92536	53,2	0,91801	56,7	0,91031	60,2	0,90230	63,7
0,92516	53,3	0,91780	56,8	0,91008	60,3	0,90207	63,8
0,92496	53,4	0,91758	56,9	0,90986	60,4	0,90184	63,9
0,92475	53,5	0,91737	57,0	0,90963	60,5	0,90161	64,0
0,92454	53,6	0,91715	57,1	0,90941	60,6	0,90137	64,1
0,92434	53,7	0,91694	57,2	0,90918	60,7	0,90114	64,2
0,92413	53,8	0,91672	57,3	0,90896	60,8	0,90091	64,3
0,92393	53,9	0,91651	57,4	0,90873	60,9	0,90067	64,4
0,92372	54,0	0,91629	57,5	0,90851	61,0	0,90043	64,5
0,92351	54,1	0,91607	57,6	0,90828	61,1	0,90020	64,6
0,92330	54,2	0,91586	57,7	0,90805	61,2	0,89997	64,7
0,92309	54,3	0,91564	57,8	0,90782	61,3	0,89973	64,8
0,92288	54,4	0,91543	57,9	0,90759	61,4	0,89950	64,9
0,92267	54,5	0,91521	58,0	0,90736	61,5	0,89926	65,0
0,92247	54,6	0,91499	58,1	0,90714	61,6	0,89902	65,1
0,92226	54,7	0,91477	58,2	0,90691	61,7	0,89879	65,2
0,92205	54,8	0,91455	58,3	0,90666	61,8	0,89855	65,3
0,92184	54,9	0,91433	58,4	0,90645	61,9	0,89831	65,4
0,92163	55,0	0,91410	58,5	0,90622	62,0	0,89807	65,5
0,92142	55,1	0,91388	58,6	0,90599	62,1	0,89784	65,6
0,92121	55,2	0,91366	58,7	0,90576	62,2	0,89760	65,7
0,92099	55,3	0,91344	58,8	0,90553	62,3	0,89736	65,8
0,92078	55,4	0,91322	58,9	0,90530	62,4	0,89713	65,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,89689	66,0	0,89401	67,2	0,89109	68,4	0,88814	69,6
0,89665	66,1	0,89376	67,3	0,89085	68,5	0,88789	69,7
0,89641	66,2	0,89352	67,4	0,89061	68,6	0,88765	69,8
0,89617	66,3	0,89328	67,5	0,89036	68,7	0,88740	69,9
0,89593	66,4	0,89304	67,6	0,89012	68,8	0,88715	70,0
0,89569	66,5	0,89280	67,7	0,88987	68,9	0,87437	75,0
0,89545	66,6	0,89255	67,8	0,88963	69,0	0,86082	80,0
0,89521	66,7	0,89231	67,9	0,88938	69,1	0,84639	85,0
0,89497	66,8	0,89207	68,0	0,88913	69,2	0,83071	90,0
0,89473	66,9	0,89183	68,1	0,88889	69,3	0,81288	95,0
0,89449	67,0	0,89158	68,2	0,88864	69,4	0,79074	100,0
0,89425	67,1	0,89134	68,3	0,88839	69,5	-	-

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 942.06) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 26. p. 2-3.

BRASIL, Leis, Decretos, etc - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

218/IV Bebidas fermento-destiladas – Extrato seco ou resíduo seco

Este método é aplicado à amostras de bebidas alcoólicas e baseia-se na pesagem do resíduo após a evaporação da água e álcool por aquecimento.

Material

Banho-maria, estufa, cápsula metálica de fundo chato de 25 ou 50 mL ou cápsula de porcelana, dessecador, pipeta volumétrica de 20 ou 25 mL.

Procedimento – Pipete 20 ou 25 mL da amostra para uma cápsula, previamente seca em estufa, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Evapore lentamente em banho-maria até a secura. Seque em estufa (100 ± 5)°C por 30 min. Resfrie em dessecador por 30 min e pese.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{V} = \text{extrato seco por cento m/v}$$

N = massa de resíduo seco em g (massa da cápsula com o extrato menos a tara da cápsula)
V = volume da amostra em mL

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 920.47) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 26. p. 6.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

219IV Bebidas fermento-destiladas – Glicídios totais, em sacarose

É aplicado em bebidas alcoólicas destiladas que contenham açúcar adicionado, por exemplo, aguardente de cana adoçada.

Material

Chapa de aquecimento, banho-maria, balança analítica, balão volumétrico de 100 mL, cápsula de porcelana de 100 ou 200 mL, funil, pipeta volumétrica de 50 mL, balão de fundo chato de 250 mL e bureta de 25 mL.

Reagentes

Ácido clorídrico
Carbonato de sódio anidro
Soluções de Fehling A e B tituladas (**Apêndice I**)

Procedimento – Transfira com o auxílio de uma pipeta, 50 mL da amostra para uma cápsula de porcelana de 200 mL. Evapore em banho-maria até eliminar todo o álcool. Esfrie. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL, lavando a cápsula com 40 mL de água. Adicione 0,5 mL de HCI. Aqueça em banho-maria por 20 minutos. Esfrie. Neutralize com carbonato de sódio. Complete o volume com água. Nesta solução, determine glicídios totais, conforme a técnica descrita em **040/IV**.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** V. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo. 1985. p. 344.

220/IV Bebidas fermento-destiladas – Componentes secundários

O destilado alcoólico pode ser considerado como uma solução de álcool e água, contendo pequenas quantidades de componentes secundários menores que 1% e que variam conforme a composição de cada tipo de bebida alcoólica. Os componentes secundários não-álcool, ou substâncias voláteis não-álcool ou coeficiente de congêneres, constituem a soma de acidez volátil, aldeídos, ésteres, álcoois superiores expressos pela somatória dos mesmos, e furfural; todos expressos em mg/100 mL de álcool anidro. A análise por cromatografia a gás é empregada para a determinação dos congêneres voláteis não-álcool. Métodos alternativos que utilizam técnicas de espectrofotometria e titulação ainda são citados na literatura.

221/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação de acidez total

Este método baseia-se na titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de álcali, com o uso de indicador fenolftaleína ou com o pHmetro até o ponto de eqüivalência. A acidez total é expressa em g de ácido acético por 100 mL de amostra.

Material

pHmetro, agitador magnético, barra magnética, béquer de 250 ou 500 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL, pipeta volumétrica de 50 ou 100 mL, bureta de 10 mL e pipeta graduada de 1 mL.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M (ou 0,05 M) padronizada
Solução de fenolftaleína

Procedimento – Transfira 50 ou 100 mL da amostra, para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Adicione 0,5 mL do indicador fenolftaleína. Titule com solução de hidróxido de sódio até coloração rósea ou transfira a amostra para um béquer e titule com solução de hidróxido de sódio até ponto de viragem pH 8,2 - 8,4, utilizando o pHmetro.

Cálculo

$$\frac{n \times M \times f \times PM}{10 \times V} = \text{ácidos totais, em g de ácido acético por 100 mL de amostra}$$

n = volume gasto na titulação da solução de hidróxido de sódio, em mL
M = molaridade da solução de hidróxido de sódio
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio
PM = peso molecular do ácido acético (60g)
V = volume tomado da amostra, em mL

Nota: para amostras com baixo valor de acidez (bebidas destilo-retificadas e álcool etílico) utilize solução de hidróxido de sódio em menor concentração (0,01 M).

Referência bibliográfica

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria nº 76, de 27 de nov 86, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 03-12-86. Seção I, p. 18.152-18173.

222/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação de acidez fixa

A acidez fixa é obtida por evaporação da amostra seguida de uma titulação dos ácidos residuais com álcali.

Material

Banho-maria, pHmetro, agitador magnético, barra magnética, cápsula de porcelana de 50 ou 100 mL, pipeta volumétrica de 50 ou 100 mL, béquer de 250 ou 500 mL ou frasco Erlenmeyer de 250 ou 500 mL, bureta de 10 mL e pipeta graduada de 1 mL .

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,05 M padronizada
Solução de fenolftaleína

Procedimento – Pipete 50 mL da amostra para a cápsula de porcelana e evapore em banho-maria. Adicione água cuidadosamente pelas paredes da cápsula, lavando o resíduo e continue a evaporação até quase total secura. Transfira esse resíduo com 100 mL de água para um frasco Erlenmeyer ou béquer e titule com solução de hidróxido de sódio, como descrito na determinação de acidez total **221/IV**.

Cálculo

$$\frac{n \times M \times f \times PM}{10 \times V} = \text{ácidos fixos, em g de ácido acético por 100 mL de amostra}$$

n = volume gasto na titulação da solução de hidróxido de sódio, em mL
M = molaridade da solução de hidróxido de sódio
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio
PM = peso molecular do ácido acético (60 g)
V = volume tomado da amostra, em mL

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP 1985. p. 346.

223/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação de ácidos voláteis por diferença

O cálculo da acidez volátil é feito por diferença entre a acidez total e a acidez fixa. O resultado é expresso em g de ácido acético por 100 mL de amostra, em g ou mg de ácido acético por 100 mL de álcool anidro.

Cálculos

At - Af = ácidos voláteis, em g de ácido acético por 100 mL de amostra
At = ácidos totais
Af = ácidos fixos

$$\frac{Av \times 100}{G} = \text{ácidos voláteis, em g de ácido acético por 100 mL de álcool anidro}$$

Av = ácidos voláteis
G = graduação alcoólica

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP 1985. p. 349-350.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria nº 76, de 27 de nov 86, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 03-12-86. Seção l, p. 18152-18173.

224/IV Bebidas fermento-destiladas – Ésteres totais

Este método é aplicável em bebidas alcoólicas destiladas. Baseia-se na saponificação dos ésteres com hidróxido de sódio.

Material

Chapa elétrica de aquecimento, frasco Erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada, pipeta volumétrica de 100 mL, buretas de 10 ou de 25 mL, condensador de refluxo (de Graham com 60 cm de altura).

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 N
Solução de ácido sulfúrico 0,1 N
Solução de fenolftaleína

Procedimento – Pipete 100 mL do destilado da amostra para um frasco Erlenmeyer de 500 mL e neutralize com solução de hidróxido de sódio usando como indicador a fenolftaleína. Adicione, exatamente, um excesso de 10 mL de solução de hidróxido de sódio. Adapte o frasco a um condensador de refluxo. Deixe em refluxo por 1 hora em banho-maria (ou chapa elétrica) ou substitua o refluxo por vedação do frasco e permaneça em repouso por 12 horas. No caso da coloração rósea desaparecer, esfrie, adicione mais 10 mL de hidróxido de sódio e deixe em refluxo por mais 30 minutos. Resfrie rapidamente e adicione 10 mL ácido sulfúrico ou 20 mL, se houve adição de mais solução de hidróxido de sódio. Titule o excesso de ácido sulfúrico com solução de hidróxido de sódio, até a coloração rósea.

Cálculos

Os ésteres são expressos em mg de acetato de etila por 100 mL da amostra ou em mg de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro.

$$\frac{(B - C) \times N \times PM \times 100}{V} = \text{ésteres, mg por 100 mL da amostra}$$

B = volume de solução de hidróxido de sódio adicionado (10 ou 20 mL) mais volume de hidróxido de sódio gasto na titulação, multiplicado pelo fator da solução.
C = volume em mL de ácido sulfúrico adicionado, multiplicado pelo respectivo fator da solução
N = normalidade das soluções (0,1 N)
V = volume da amostra usado na titulação, em mL
PM = peso molecular do acetato de etila = 88 g

Para expressar o resultado em mg por 100 mL de álcool anidro:

$$\frac{E \times 100}{G} = \text{ésteres, mg por 100 mL de álcool anidro}$$

E = mg de ésteres em acetato de etila por 100 mL de amostra
G = graduação alcoólica da amostra

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP 1985. p. 350.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria nº 76, de 27 de nov de 86, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3-12-86. Seção l, p.18152-18173.

225/IV Bebidas fermento-destiladas – Aldeídos totais

Este método é aplicável para bebidas destiladas e se baseia na reação de bissulfito com aldeídos da amostra, formando compostos bissulfíticos. O excesso de bissulfito é titulado com solução de iodo na presença de amido. A reação é reversível e pode liberar o composto carbonílico, sob a ação de ácidos ou de bases. Após a adição de uma solução alcalina, o bissulfito que estava ligado ao aldeído é liberado e dosado com a solução de iodo.

Material

Balanças analítica e semi-analítica, agitador magnético, pHmetro, buretas de 10 mL e 25 mL, pipetas volumétricas de 5, 10 e 50 mL, balão volumétrico de 1000 mL e frasco Erlenmeyer de 500 mL com tampa.

Reagentes

Solução diluída de ácido clorídrico
Solução de iodo 0,025 M
Solução de amido a 1% m/v
Solução diluída de hidróxido de sódio

Solução A – Pese 15 g de metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) e dissolva em um balão volumétrico de 1000 mL com água e 70 mL de ácido clorídrico. Complete o volume.

Solução B – Pese 200 g de fosfato trissódico ($Na_3PO_4.12H_2O$) e 4,5 g de EDTA (etileno

diaminotetracetato dissódico). Dissolva em balão volumétrico de 1000 mL com água e complete o volume.

Solução C – Meça 250 mL de ácido clorídrico. Dilua em água a 1000 mL em um balão volumétrico.

Solução D – Pese 100 g de ácido bórico e 170 g de hidróxido de sódio. Dissolva os reagentes em água e dilua a 1000 mL em um balão volumétrico.

Procedimento – Coloque 300 mL de água e 10 mL da solução A em um frasco Erlenmeyer de 500 mL com tampa. Pipete 50 mL do destilado da amostra e adicione à solução do frasco. Feche o frasco, agite e deixe em repouso por 15 minutos. Adicione 10 mL da solução B. O pH deve estar entre 7,0 e 7,2. Caso contrário, ajuste adicionando solução de ácido clorídrico ou de hidróxido de sódio diluida à solução A e comece a análise novamente usando nova tomada de amostra. Feche o frasco, agite e deixe em repouso por 15 minutos. Acrescente 10 mL da solução C (quando for feita análise em série, faça a determinação completa da primeira amostra antes de adicionar ácido na próxima) e 4 mL de solução de amido. Agite e adicione, com auxílio de uma bureta, solução de iodo 0,025 M até viragem para azul, sem excesso. Junte 10 mL da solução D e titule imediatamente o SO_2 liberado com solução de iodo 0,025 M até o aparecimento de cor azulada, agitando lentamente. O pH da solução final deve estar entre 8,8 e 9,5. Se necessário ajuste, adicionando solução de ácido clorídrico ou de hidróxido de sódio à solução D e reinicie a análise com nova tomada de amostra.

Cálculos

Os aldeídos são expressos em mg de aldeído acético por 100 mL da amostra ou em mg de aldeído acético por 100 mL de álcool anidro.

$$\frac{n \times M \times PM \times 100}{V} = \text{mg de aldeído acético por 100 mL da amostra}$$

n = volume gasto da solução de iodo, em mL
M = molaridade da solução de iodo
PM = peso molecular do aldeído acético = 44 g
V = volume de amostra, em mL

Para expressar o resultado em mg por 100 mL de álcool anidro:

$$\frac{A \times 100}{G} = \text{mg de aldeído acético por 100 mL de álcool anidro}$$

A = mg de aldeído acético por 100 mL de amostra
G = graduação alcoólica da amostra

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 972.08) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 26. p. 10.

226/IV Bebidas fermento-destiladas – Furfural

O método de Hewitt´s tem sido comumente aplicado para a determinação de furfural em bebidas alcoólicas destiladas e é baseado no desenvolvimento de coloração rósea, pela reação do furfural e anilina em meio ácido. A determinação de furfural é feita com o destilado da amostra corrigido a 50% de álcool em volume.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, balança analítica, cubeta de 10 mm, termômetro, tubos de ensaio 15 x 150 mm, pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL, pipetas graduadas de 1 e 5 mL e balões volumétricos de 100 e 1 000 mL.

Reagentes

Furfural
Anilina pura (redestilada)
Álcool
Solução de álcool a 50%
Ácido acético glacial
Solução de álcool a 90%

Solução-padrão de furfural ($C_4H_3O.CHO$) – Pese exatamente 1 g de furfural redestilado e diluído a 100 mL com álcool em um balão volumétrico de 100 mL. Dilua 1 mL desta solução a 1000 mL com solução de álcool a 50% em um balão volumétrico (0,01 mg/mL).

Curva-padrão – Pipete para tubos de ensaio 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL da solução-padrão de furfural (0,01 mg/mL). Dilua em solução de álcool a 50% até o volume de 10 mL. Faça um branco com 10 mL de solução de álcool a 50%. Adicione em cada tubo 4 gotas de anilina e 1 mL de ácido acético glacial. Agite e coloque em banho de água a 15ºC por 15 minutos. Faça a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro, a 520 nm. Construa a curva-padrão, colocando

nas abscissas mg de furfural por 100 mL e nas ordenadas as leituras obtidas em absorbância.

Procedimento – Corrija a graduação do destilado da amostra de modo a obter uma graduação alcoólica de 50% (v/v), conforme a tabela 2 (volume de álcool etílico a 90% v/v a adicionar para obtenção de uma solução com graduação alcoólica de 50% v/v), ou conforme a **Tabela 3** (volume de água a ser adicionado para obtenção de uma solução com graduação alcoólica de 50% v/v). Pipete 10 mL da solução da amostra cuja graduação alcoólica já tenha sido corrigida a 50% para um tubo de ensaio, como na preparação da curva-padrão. Prepare o branco, utilizando álcool a 50%. Faça a leitura da absorbância da amostra a 520 mm.

Nota: para obtenção da solução de álcool a 90% v/v, utilize a **Tabela 4**.

Cálculo

Furfural é expresso em mg por 100 mL de álcool anidro pela fórmula:

$$\frac{A \times Vf}{G} = \text{furfural, em mg por 100 mL de álcool anidro}$$

A = concentração de furfural obtida pela curva-padrão
Vf = volume final a 20°C da amostra destilada e ajustada a 50%, obtido na **Tabela 2 ou 3**
G = grau alcoólico da amostra

TABELA 2 – Volume de álcool etílico a 90 % v/v a adicionar em 100 mL do destilado para obtenção de uma graduação alcoólica de 50 % (v/v)

Graduação alcoólica	mL de álcool 90º a adicionar	Volume da mistura
30,0	47,7	145,9
30,1	47,5	145,7
30,2	47,3	145,5
30,3	47,1	145,3
30,4	46,8	145,0
30,5	46,6	144,8
30,6	46,4	144,6
30,7	46,2	144,4
30,8	45,9	144,2
30,9	45,6	143,9
31,0	45,4	143,7
31,1	45,2	143,5
31,2	45,0	143,3
31,3	44,7	143,0
31,4	44,5	142,8
31,5	44,3	142,6
31,6	44,0	142,3
31,7	43,8	142,1
31,8	43,6	141,9
31,9	43,4	141,7
32,0	43,1	141,5
32,1	42,9	141,2
32,2	42,7	141,0
32,3	42,5	140,8
32,4	42,2	140,6
32,5	42,0	140,4
32,6	41,7	140,2
32,7	41,5	140,0
32,8	41,2	139,8
32,9	40,9	139,5
33,0	40,7	139,3
33,1	40,5	139,1
33,2	40,2	138,8
33,3	40,0	138,6
33,1	40,5	139,1
33,2	40,2	138,8
33,3	40,0	138,6
33,1	40,5	139,1
33,2	40,2	138,8
33,3	40,0	138,6
33,4	39,8	138,4
33,5	39,6	138,1
33,6	39,3	137,9
33,7	39,1	137,7
33,8	38,9	137,5
33,9	38,7	137,3
34,0	38,4	137,0
34,1	38,1	136,8
34,2	37,9	136,6
34,3	37,7	136,4
34,4	37,5	136,2
34,5	37,2	135,9
34,6	37,0	135,7
34,7	36,7	135,5
34,8	36,5	135,3
34,9	36,3	135,1
35,0	36,0	134,7
35,1	35,7	134,5
35,2	35,5	134,3
35,3	35,3	134,1
35,4	35,0	133,8
35,5	34,8	133,6

Graduação alcoólica	mL de álcool 90º a adicionar	Volume da mistura
35,6	34,6	133,4
35,7	34,3	133,2
35,8	34,0	132,9
35,9	33,8	132,7
36,0	33,6	132,5
36,1	33,4	132,3
36,2	33,1	132,0
36,3	32,9	131,8
36,4	32,7	131,6
36,5	32,4	131,4
36,6	32,2	131,2
36,7	32,0	131,0
36,8	31,7	130,7
36,9	31,5	130,5
37,0	31,3	130,3
37,1	31,0	130,0
37,2	30,7	129,8
37,3	30,5	129,6
37,4	30,3	129,4
37,5	30,0	129,1
37,6	29,8	128,9
37,7	29,5	128,6
37,8	29,3	128,4
37,9	29,1	128,2
38,0	28,9	128,0
38,1	28,7	127,8
38,2	28,5	127,6
38,3	28,3	127,4
38,4	28,0	127,1
38,5	27,8	126,9
38,6	27,5	126,6
38,7	27,2	126,3
38,8	27,0	126,1
38,9	26,8	125,9

Graduação alcoólica	mL de álcool 90º a adicionar	Volume da mistura
39,0	26,5	125,6
39,1	26,3	125,4
39,2	26,1	125,2
39,3	25,8	124,9
39,4	25,6	124,7
39,5	25,3	124,5
39,6	25,1	124,3
39,7	24,8	124,0
39,8	24,6	123,0
39,9	24,3	123,5
40,0	24,1	123,4
40,1	23,9	123,1
40,2	23,7	122,9
40,3	23,5	122,7
40,4	23,3	122,5
40,5	23,0	122,3
40,6	22,8	122,1
40,7	22,5	121,8
40,8	22,2	121,5
40,9	22,0	121,3
41,0	21,8	121,1
41,1	21,5	120,8
41,2	21,3	120,6
41,3	21,0	120,3
41,4	20,7	120,1
41,5	20,5	119,9
41,6	20,3	119,7
41,7	20,0	119,4
41,8	19,8	119,2
41,9	19,5	118,9
42,0	19,3	118,7
42,1	19,0	118,4
42,2	18,7	118,2
42,3	18,5	118,0

Graduação alcoólica	mL de álcool 90º a adicionar	Volume da mistura
42,4	18,3	117,8
42,5	18,1	117,6
42,6	17,9	117,4
42,7	17,7	117,2
42,8	17,4	116,9
42,9	17,2	116,7
43,0	16,9	116,4
43,1	16,7	116,2
43,2	16,5	116,0
43,3	16,2	115,7
43,4	15,9	115,5
43,5	15,7	115,2
43,6	15,5	115,0
43,7	15,2	114,7
43,8	14,9	114,5
43,9	14,7	114,3
44,0	14,5	114,1
44,1	14,2	113,8
44,2	13,9	113,5
44,3	13,7	113,3
44,4	13,5	113,1
44,5	13,3	112,9
44,6	13,1	112,7
44,7	12,8	112,4
44,8	12,6	112,2
44,9	12,4	112,0
45,0	12,1	111,8
45,1	11,9	111,6
45,2	11,7	111,4
45,3	11,4	111,1
45,4	11,1	110,8
45,5	10,9	110,6
45,6	10,7	110,4
45,7	10,4	110,1
45,8	10,1	109,8
45,9	9,9	109,6
46,0	9,7	109,4
46,1	9,4	109,1
46,2	9,1	108,8
46,3	8,9	108,6
46,4	8,7	108,4
46,5	8,5	108,2
46,6	8,2	107,9
46,7	7,9	107,7
46,8	7,7	107,5
46,9	7,5	107,3
47,0	7,3	107,1
47,1	7,1	106,9
47,2	6,8	106,6
47,3	6,6	106,4
47,4	6,4	106,2
47,5	6,1	105,9
47,6	5,9	105,7
47,7	5,7	105,5
47,8	5,4	105,2
47,9	5,1	104,9
48,0	4,9	104,7
48,1	4,6	104,4
48,2	4,4	104,2
48,3	4,1	103,9
48,4	3,9	103,7
48,5	3,6	103,5
48,6	3,3	103,2
48,7	3,1	103,0
48,8	2,8	102,7
48,9	2,6	102,5
49,0	2,4	102,3
49,1	2,1	102,0

Graduação alcoólica	mL de álcool 90º a adicionar	Volume da mistura
49,2	1,9	101,8
49,3	1,7	101,6
49,4	1,5	101,4
49,5	1,2	101,2

Graduação alcoólica	mL de álcool 90º a adicionar	Volume da mistura
49,6	0,9	100,9
49,7	0,7	100,7
49,8	0,4	100,4
49,9	0,2	100,2

TABELA 3 – Volume de água a ser adicionado a 100 mL de uma solução alcoólica para obtenção de uma graduação alcoólica de 50 % v/v

Graduação alcoólica	mL de água a adicionar	Volume da mistura
50,1	0,21	100,2
50,2	0,41	100,4
50,3	0,62	100,6
50,4	0,82	100,8
50,5	1,03	101,0
50,6	1,24	101,1
50,7	1,44	101,3
50,8	1,65	101,5
50,9	1,85	101,7
51,0	2,06	101,9
51,1	2,27	102,1
51,2	2,47	102,3
51,3	2,68	102,5
51,4	2,89	102,7
51,5	3,09	102,9
51,6	3,30	103,1
51,7	3,51	103,3
51,8	3,72	103,5
51,9	3,92	103,7
52,0	4,13	103,9
52,1	4,34	104,1
52,2	4,54	104,3
52,3	4,75	104,5

Graduação alcoólica	mL de água a adicionar	Volume da mistura
52,4	4,96	104,7
52,5	5,16	104,9
52,6	5,37	105,1
52,7	5,58	105,3
52,8	5,79	105,5
52,9	5,99	105,7
53,0	6,20	105,9
53,1	6,41	106,1
53,2	6,62	106,3
53,3	6,82	106,5
53,4	7,03	106,7
53,5	7,24	106,9
53,6	7,45	107,1
53,7	7,66	107,3
53,8	7,86	107,5
53,9	8,07	107,7
54,0	8,28	107,9
54,1	8,49	108,1
54,2	8,70	108,3
54,3	8,90	108,5
54,4	9,11	108,7
54,5	9,32	108,9
54,6	9,53	109,1

Graduação alcoólica	mL de água a adicionar	Volume da mistura
54,7	9,74	109,3
54,8	9,94	109,5
54,9	10,13	109,7
55,0	10,37	109,9
55,1	10,78	110,1
55,2	10,86	110,3
55,3	10,98	110,5
55,4	11,19	110,7
55,5	11,40	110,9
55,6	11,61	111,1
55,7	11,81	111,3
55,8	12,02	111,5
55,9	12,23	111,7
56,0	12,44	111,9
56,1	12,65	112,1
56,2	12,85	112,3
56,3	13,06	112,5
56,4	13,27	112,7
56,5	13,48	112,9
56,6	13,69	113,1
56,7	13,90	113,3
56,8	14,10	113,5
56,9	14,31	113,7
57,0	14,52	113,9
57,1	14,73	114,1
57,2	14,94	114,3
57,3	15,14	114,5
57,4	15,35	114,7
57,5	15,56	114,9
57,6	15,77	115,1
57,7	15,98	115,3
57,8	16,18	115,5
57,9	16,39	115,7
58,0	16,60	115,9

Graduação alcoólica	mL de água a adicionar	Volume da mistura
58,1	16,81	116,1
58,2	17,02	116,3
58,3	17,22	116,5
58,4	17,43	116,7
58,5	17,64	116,9
58,6	17,85	117,1
58,7	18,06	117,3
58,8	18,26	117,5
58,9	18,47	117,7
59,0	18,68	117,9
59,1	18,89	118,1
59,2	19,10	118,3
59,3	19,30	118,5
59,4	19,51	118,7
59,5	19,72	118,9
59,6	19,93	119,1
59,7	20,14	119,3
59,8	20,34	119,5
59,9	20,55	119,7
60,0	20,76	119,9
60,1	20,97	120,1
60,2	21,18	120,3
60,3	21,39	120,5
60,4	21,60	120,7
60,5	21,80	120,9
60,6	22,01	121,1
60,7	22,22	121,3
60,8	22,43	121,5
60,9	22,64	121,7
61,0	22,85	121,9
61,1	23,06	122,1
61,2	23,27	122,3
61,3	23,48	122,5
61,4	23,69	122,7

Graduação alcoólica	mL de água a adicionar	Volume da mistura
61,5	23,90	122,9
61,6	24,11	123,1
61,7	24,32	123,3
61,8	24,53	123,5
61,9	24,74	123,7
62,0	24,95	123,9
62,1	25,16	124,1
62,2	25,37	124,3
62,3	25,58	124,5
62,4	25,79	124,7
62,5	25,99	124,9
62,6	26,20	125,1
62,7	26,41	125,3
62,8	26,62	125,5
62,9	26,83	125,7
63,0	27,04	125,9
63,1	27,25	126,1
63,2	27,46	126,3
63,3	27,67	126,5
63,4	27,88	126,7
63,5	28,09	126,9
63,6	28,30	127,1
63,7	28,51	127,3
63,8	28,72	127,5
63,9	28,93	127,7
64,0	29,14	127,9
64,1	29,35	128,1
64,2	29,56	128,3
64,3	29,77	128,5
64,4	29,98	128,7
64,5	30,18	128,9
64,6	30,39	129,1
64,7	30,60	129,3
64,8	30,81	129,5

Graduação alcoólica	mL de água a adicionar	Volume da mistura
64,9	31,02	129,7
65,0	31,23	129,9
65,1	31,44	130,1
65,2	31,63	130,3
65,3	31,86	130,5
65,4	32,07	130,7
65,5	32,28	130,9
65,6	32,49	131,1
65,7	32,70	131,3
65,8	32,91	131,5
65,9	33,12	131,7
66,0	33,33	131,9
66,1	33,54	132,1
66,2	33,75	132,3
66,3	33,96	132,5
66,4	34,17	132,7
66,5	34,38	132,9
66,6	34,60	133,1
66,7	34,81	133,3
66,8	35,02	133,5
66,9	35,23	133,7
67,0	35,44	133,9
67,1	35,65	134,1
67,2	35,86	134,3
67,3	36,07	134,5
67,4	36,28	134,7
67,5	36,49	134,9
67,6	36,71	135,1
67,7	36,92	135,3
67,8	37,13	135,5
67,9	37,34	135,7
68,0	37,55	135,9
68,1	37,76	136,1
68,2	37,97	136,3

Graduação alcoólica	mL de água a adicionar	Volume da mistura
68,3	38,18	136,5
68,4	38,39	136,7
68,5	38,60	136,9
68,6	38,82	137,1
68,7	39,03	137,3
68,8	39,24	137,5
68,9	39,45	137,7
69,0	39,66	137,9
69,1	39,87	138,1
69,2	40,08	138,3
69,3	40,30	138,5
69,4	40,51	138,7
69,5	40,72	138,9
69,6	40,93	139,1
69,7	41,14	139,3
69,8	41,36	139,5
69,9	41,57	139,7
70,0	41,78	139,9
70,1	41,99	140,1
70,2	42,20	140,3
70,3	42,41	140,5
70,4	42,62	140,7
70,5	42,83	140,9
70,6	43,05	141,1
70,7	43,26	141,3
70,8	43,47	141,5
70,9	43,68	141,7
71,0	43,89	141,9
71,1	44,10	142,1
71,2	44,31	142,3
71,3	44,52	142,5
71,4	44,73	142,7
71,5	44,94	142,9
71,6	45,16	143,1

Graduação alcoólica	mL de água a adicionar	Volume da mistura
71,7	45,37	143,3
71,8	45,58	143,5
71,9	45,79	143,7
72,0	46,00	143,9
72,1	46,21	144,1
72,2	46,43	144,3
72,3	46,64	144,5
72,4	46,85	144,7
72,5	47,06	144,9
72,6	47,28	145,1
72,7	47,49	145,3
72,8	47,70	145,5
72,9	47,92	145,7
73,0	48,13	145,9
73,1	48,34	146,1
73,2	48,55	146,3
73,3	48,77	146,5
73,4	48,98	146,7
73,5	49,19	146,9
73,6	49,40	147,1
73,7	49,61	147,3
73,8	49,83	147,5
73,9	50,04	147,7
74,0	50,25	147,9
74,1	50,46	148,1
74,2	50,68	148,3
74,3	50,89	148,5
74,4	51,10	148,7
74,5	51,31	148,9
74,6	51,53	149,1
74,7	51,74	149,3
74,8	51,95	149,5
74,9	52,17	149,7
75,0	52,38	149,9

TABELA 4 – Volume de água a adicionar a 100 mL de álcool de 90,5 a 100 % em volume para obtenção de álcool a 90 % v/v

Grau Alcoólico Real % em volume	Volume de água a adicionar (mL)
100,0	13,2
99,5	12,5
99,0	11,8
98,5	11,1
98,0	10,4
97,5	9,7
97,0	9,0
96,5	8,3
96,0	7,7
95,5	7,0
95,0	6,4
94,5	5,7
94,0	5,1
93,5	4,4
93,0	3,8
92,5	3,1
92,0	2,5
91,5	1,8
91,0	1,2
90,5	0,5

Referência bibliográfica

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria nº 76, de 27 de nov de 86, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3-12-86. Seção I. p. 18152-18174.

227/IV Bebidas fermento-destiladas – Metanol

Este método é aplicável em bebidas alcoólicas e se baseia numa reação de oxidação do metanol pelo permanganato de potássio, formando formaldeído, que reage com o sal do ácido cromotrópico, conferindo cor.

Material

Banho-maria, espectrofotômetro UV/VIS, termômetro, cubeta de 10 mm, pipetas volumétricas de 1, 2, e 5 mL, pipeta graduada de 10 mL e balões volumétricos de 50 e 100 mL.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Álcool grau espectrofotométrico
Metanol grau espectrofotométrico
Isopropanol grau espectrofotométrico
Sulfito de sódio ou bissulfito de sódio

Solução de permanganato de potássio a 3% em solução de acido fosfórico a 15% – Pipete 15 mL de ácido fosfórico (85%, d = 1,69) e dilua com água, acrescente 3 g de $KMnO_4$ e complete o volume a 100 mL num balão volumétrico.

Solução do sal dissódico dihidratado do ácido cromotrópico ($C_{10}H_6\ Na_2O_8S_2.2H_2O$) a 5% – Dissolva 5 g do sal em 100 mL de água. Se a solução não estiver clara, filtre. A solução deve ser preparada semanalmente. O sal ou o ácido podem ser usados.

Purificação do ácido cromotrópico – Se a leitura da absorbân cia do branco for maior que 0,05, purifique o reagente dissolvendo 10 g de ácido cromotrópico ou seu sal sódico em 25 mL de água. Adicione 2 mL de ácido sulfúrico à solução aquosa de sal para a conversão para ácido livre. Adicione 50 mL de metanol. Aqueça até a ebulição, e filtre. Adicione 100 mL de isopropanol para precipitar o ácido cromotrópico livre (adicione mais isopropanol para aumentar o rendimento do ácido purificado).

Preparação da amostra – Utilize o destilado da amostra, o qual foi obtido para a determinação da graduação alcoólica e dilua para uma concentração de álcool etílico de 5 a 6% em volume. Prepare um branco de álcool etílico a 5,5%. Uma solução padrão contendo 0,025% de metanol em solução de álcool etílico a 5,5% deve ser preparada (v/v). Se a concentração de metanol (em volume) na amostra for maior ou igual a 0,05%, dilua aproximadamente à concentração de 0,025% de metanol com álcool etílico a 5,5% (v/v). Para amostras que contenham concentração de metanol menor ou igual a 0,05% utilize uma quantidade maior de amostra e destile novamente, recolhendo o destilado em um balão de menor volume do que o inicial, de modo a realizar uma concentração da mesma.

Procedimento – Pipete 2 mL da solução de permanganato de potássio para um balão volumétrico de 50 mL. Resfrie em banho de gelo. Adicione 1 mL da solução da amostra diluída e deixe por 30 minutos em banho de gelo. Descore com um pouco de bissulfito de sódio e adicione 1 mL da solução de ácido cromotrópico. Adicione lentamente 15 mL de ácido sulfúrico com agitação e coloque em banho de água quente (60-75°C) por 15 minutos. Resfrie e complete o volume com água à temperatura ambiente. Faça a leitura da absorbância

a 575 nm contra um branco de álcool a 5,5% tratado da mesma forma que a amostra. Trate a solução-padrão de 0,025% de metanol (em álcool a 5,5%) da mesma maneira que a amostra e faça a leitura da absorbância A_p. A diferença entre as temperaturas do padrão e da amostra não deve ser maior que 1°C, pois a temperatura afeta a leitura da absorbância. Se a cor da amostra for muito intensa, dilua com o branco preparado como acima, até no máximo três vezes.

Cálculo

$$\frac{A \times 2,5 \times f}{A_p \times G} = \text{metanol, mL por 100 mL de álcool anidro}$$

A = absorbância da amostra
f = fator de diluição da amostra
A_p = absorbância da solução padrão
G = graduação alcoólica

Referência bibliográfica:

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 958.04) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 26. p. 15.

228/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação de metanol e componentes secundários

Este método é utilizado para determinar as concentrações de metanol e componentes secundários em bebidas alcoólicas por cromatografia em fase gasosa. As bebidas alcoólicas destiladas como aguardente, whisky, conhaque, vodca, rum e tequila, não requerem destilação prévia, entretanto, as que apresentarem resíduo seco superior a 0,4 g/100 mL devem ser destiladas antes de serem analisadas.

Material

Balança analítica, cromatógrafo a gás com controle de programação de temperatura de coluna, provido de detector de ionização de chama (FID). Colunas cromatográficas que podem ser utilizadas nesta análise: coluna empacotada: fase estacionária: 1) Carbowax 20M 5% ou similar; suporte: Carbopack B, 80/120 mesh; comprimento: 2 m; diâmetro interno: 2 mm; coluna capilar de sílica fundida: fase estacionária Carbowax ou similar; comprimento: 60 m; diâmetro interno: 0,25 mm; espessura do filme: 0,25 µm.: 2) Coluna megabore: fase es-

tacionária Carbowax ou similar, comprimento 30 m, diâmetro interno 0,53 mm; ou qualquer outra coluna que permita a separação dos compostos de interesse com satisfatórias eficiência e resolução. Gases de arraste: nitrogênio (pureza 99,999% para coluna empacotada) e hidrogênio (pureza 99,999% para colunas capilar e megabore). Gases auxiliares para FID: hidrogênio (pureza 99,999%), nitrogênio (pureza 99,999%) e ar sintético (pureza 99,999%).Microsseringa de 10 µL, graduada em 0,1 µL, pipetas graduadas de 1 e 10 mL, balões volumétricos de 10 e 100 mL, proveta de 100 mL e funil.

Reagentes

Álcool absoluto
Acetaldeído
Metanol
Acetato de etila
n-Propanol
Isobutanol
n-Butanol
2-Metilbutanol
3-Metilbutanol
3-Pentanol (padrão interno)

Nota: o álcool absoluto e todos os padrões devem ter grau cromatográfico. Acetaldeído deve ser estocado no escuro à temperatura de freezer e os demais devem ser estocados sob refrigeração.

Solução-padrão estoque A – Tare um balão volumétrico de 100 mL e adicione 20 a 40 mL de álcool etílico absoluto. Pese cada padrão individualmente, conforme tabela abaixo. Complete o volume com álcool e pese. Agite a mistura para homogeneizar. Anote as massas de cada padrão adicionado e a massa total da solução.

Padrão	V (mL)
acetaldeído	0,8
metanol	2,0
acetato de etila	2,0
n-propanol	1,5
isobutanol	2,5
n-butanol	0,5
2-metilbutanol	1,0
3-metilbutanol	2,5

Solução-padrão interno estoque B – Pese 2,5 mL de 3-pentanol em um balão volumétrico de 100 mL tarado, contendo 20 a 40 mL de álcool. Complete com álcool e pese. Agite para homogeneizar. Anote as massas do frasco vazio, do padrão interno e da solução total.

Solução de álcool etílico a 40% v/v – Transfira 40 mL de álcool para uma proveta ou balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão de trabalho C – Transfira 1 mL da solução A e 1 mL da solução B para um balão volumétrico de 100 mL tarado, contendo 20 a 40 mL de álcool etílico a 40% v/v. Pese após cada adição. Complete o volume com álcool a 40% e agite para homogeneizar. Anote as massas do frasco vazio, de cada solução adicionada e da solução total.

Solução D – Prepare esta solução utilizando a solução-padrão estoque A. Pipete 1 mL da solução A para um balão volumétrico de 100 mL tarado, contendo 20 a 40 mL de álcool a 40% v/v e pese. Complete o volume com álcool a 40% v/v e pese. Agite. Anote as massas do frasco vazio, da solução A e da solução total.

Solução-padrão interno de trabalho E – Pipete 10 mL da solução-padrão interno estoque - B para um balão volumétrico de 100 mL tarado, contendo 20 a 40 mL de álcool a 40% v/v e pese. Complete o volume com álcool a 40% v/v e pese novamente. Agite vigorosamente para homogeneizar. Anote as massas do frasco vazio, da solução adicionada e da solução total.

Todas as soluções devem ser estocadas à temperatura de 4 a 8°C. As soluções C e E devem ser preparadas mensalmente, as soluções A e B a cada 6 meses, e a solução D deve ser preparada sempre que houver interesse em checar os resultados. Os rótulos dos frascos devem conter informações quanto à identificação das soluções e as datas de preparação.

Procedimento

Preparação da amostra: pese em um balão volumétrico de 10 mL, tarado, 9 mL da amostra; em seguida, adicione 1 mL da solução-padrão interno de trabalho (E) e pese. Agite. Anote as respectivas massas.

Solução D adicionada de padrão interno (de controle de qualidade de trabalho): pese em um balão volumétrico de 10 mL, tarado, 9 mL da solução D; em seguida, adicione 1 mL da solução de padrão interno de trabalho (E) e pese. Agite. Anote as respectivas massas.

Análise cromatográfica

Condições de operação do cromatógrafo a gás:

a) coluna empacotada:

Programação da temperatura do forno: temperatura inicial: 70°C por 4min; 6°C por min

até 118°C (por 1 min); 5°C por min até 160°C (por 10 min).
Temperatura do injetor: 200°C
Temperatura do detector: 250°C
Vazão do Gás de arraste (N_2): 30 mL/ min
Vazão do H_2 (chama): 20 mL/ min
Vazão do Ar: 175 mL/ min

b) coluna capilar:
Programação da temperatura do forno: temperatura inicial: 40°C por 4 min; 15°C por min até 60ºC (por 5 min); 30°C por min até 170°C (por 10 min).
Temperatura do injetor: 200°C
Temperatura do detector: 250°C
Vazão do Gás de arraste (H_2): 1 mL/ min
Vazão do H_2 (chama): 20 mL/ min
Vazão do Ar: 175mL/ min
Vazão do N_2 (make-up): 25 a 30 mL/min
Razão de divisão: 1:100 *split*

Injete 1,0 µL da solução-padrão de trabalho C no cromatógrafo e identifique os picos dos componentes pelos respectivos tempos de retenção. Repita a injeção no mínimo quatro vezes.

Amostra – Injete 1 µL da solução da amostra e identifique os picos dos componentes secundários, seguindo exatamente as mesmas condições. Repita a injeção no mínimo quatro vezes.

Quando houver interesse, injete 1 µL da solução de controle de qualidade de trabalho D (adicionada de padrão interno).

Cálculos

Cálculo utilizando software que acompanha o cromatógrafo: siga as instruções do manual do equipamento para cálculos com padronização interna.

Cálculos manuais: cálculo dos fatores de correção. Os fatores de correção são obtidos a partir dos cromatogramas gerados pela solução-padrão de trabalho - C para cada componente secundário.

$$\frac{C_{comp} \times A_{PI}}{C_{PI} \times A_{comp}} = \text{fator de correção do composto}$$

A_{PI} = área do pico do padrão interno do cromatograma da solução C
A_{comp} = área do pico de cada composto do cromatograma da solução C
C_{PI} = concentração do padrão interno (mg/100 g) na solução C
C_{comp} = concentração do composto (mg/100 g) na solução C

A concentração de cada composto é calculada a partir do cromatograma da amostra e é expressa em mg por 100 g:

$$\frac{A_{compA} \times FC_{comp} \times C_{PIA}}{A_{PIA}} = \text{concentração do composto mg/100 g}$$

A_{compA} = área do pico do composto do cromatograma da amostra
A_{PIA} = área do pico do padrão interno do cromatograma da amostra
FC_{comp} = fator de correção do composto obtido a partir da solução C
C_{PIA} = concentração do padrão interno na solução da amostra (mg por 100 g)

Cálculo da concentração de cada composto, expressa em mg por 100 mL de álcool anidro:

$$\frac{C_{comp} \times dabs \times 100}{G} = C$$

C = concentração do composto (mg/100 mL de álcool anidro)
C_{comp} = concentração do composto, expressa em mg/100 g
dabs = densidade absoluta da amostra
G = graduação alcoólica da amostra, em % v/v

Referências bibliográficas

MARTIN, G.E.; BURGGRAFF, J.M.; DYER, R.H.; BUSCEMI. P.C. Gas-liquid chromatography determination of congeners in alcohol products, **Journal of the A.O.A.C.**, v. 64, p. 186-190, 1981.

NAGATO, L.A.F.; DURAN, M.C.; CARUSO, M.S.F.; BARSOTTI, R.C.F.; BADOLATO, E.S.G. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Rev. Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas, v. 21, n.1, p. 39-42, 2001.

229/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação de carbamato de etila ou uretana por cromatografia a gás e detecção por espectrometria de massa

Este método é utilizado para a determinação de carbamato de etila em bebidas destiladas. A identificação é feita pela comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra e do padrão, injetados nas mesmas condições, além da verificação da presença dos íons de razão massa/carga 74 e 89. A quantificação de carbamato de etila em amostras de bebidas destiladas é feita pelo método de monitoramento seletivo de íons (SIM) para o fragmento de massa m/e 62, calculando-se a concentração de carbamato de etila pelo método de padronização interna, sendo o carbamato de n-propila empregado como padrão interno.

Material

Balança analítica, cromatógrafo a gás acoplado ao detetor de massa (analisador de massa quadrupolo), gás de arraste hélio (pureza 99,999%), nitrogênio comum para secagem, pipetas de 0,1, 0,2 e 0,5 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, e 5 mL, *vials* de 1 ou 2 mL com fundo cônico, balões volumétricos de 50 e 100 mL e frascos de vidro ou balões volumétricos de 25 mL.

Reagentes

Metanol - grau cromatográfico
Carbamato de etila - pureza 99%
Carbamato de n-propila (padrão interno) - pureza 99%
Metanol grau cromatográfico

Soluções-padrão de carbamato de etila e de n-propila – Prepare, em metanol, soluções de carbamato de etila e de n-propila, no mínimo, em três concentrações (100, 300 e 500 µg/kg) de carbamato de etila e concentração ao redor de 300 µg/kg para o carbamato de n-propila (padrão-interno)

Procedimento – Pese aproximadamente 20 g de amostra e adicione solução-padrão interno de carbamato de n-propila na concentração aproximada de 300 µg/kg em relação à massa de amostra e agite. Pipete 0,2 mL desta solução para um frasco de vidro (*vial*) e evapore cuidadosamente com nitrogênio comum em banho de água à temperatura de 35°C, não deixando secar totalmente. Adicione 0,2 mL de metanol ao frasco e homogeneíze. Este mesmo procedimento é aplicado para as soluções-padrão. Injete 1 µL das soluções-padrão no cromatógrafo, modo *splitless,* monitoramento do íon 62/SIM e 1 µL das soluções da amostra, no mínimo, em triplicata.

Condições de operação do cromatógrafo a gás acoplado ao detector de massa – coluna capilar DBwax - 30 m x 0,25 mm (J&W Scientific), espessura do filme 0,25 µm; programação da temperatura da coluna: de 50 a 90°C a 30°C/min, estável por 3 min, de 90 a 147°C a 5°C/min e até 220°C a 20°C/min, ficando nesta temperatura por 5 min. Tempo total da corrida de 25 min; gás de arraste hélio - 50 kPa; temperatura do injetor a 220°C; temperatura da interface a 250ºC; fonte de íons a 250°C; sistema de ionização: impacto de elétrons a 70 eV; analisador de massa quadrupolo; injeção sem divisão da amostra de 1 min (*splitless*); tempo de espera de corrida do cromatograma para ser ligado o detector de massa de 9 min.

Cálculo

A quantificação de carbamato de etila em amostras de bebidas destiladas é feita pelo método de monitoramento seletivo de íons (SIM) para o fragmento de massa m/e 62, calculando-se a concentração de carbamato de etila pelo método de padronização interna, sendo o carbamato de n-propila empregado como padrão interno.

Referência bibliográfica

NAGATO, L. A. F., SILVA, O. A., YONAMINE, M., PENTEADO, M. De V. C. Quantitation of ethyl carbamate (EC) by gas chromatography and mass spectrometric detection in distilled spirits. **Alimentaria**, Madrid, n. 311, p. 31-36, 2000.

230/IV Bebidas fermento-destiladas – Determinação de cobre

Este método aplica-se à determinação de cobre em bebidas fermento-destiladas, utilizando-se a técnica de espectrometria de absorção atômica, pelo método de adição de padrão.

Material

Espectrômetro de absorção atômica, balões volumétricos de 50 e 200 mL e pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL

Reagentes

Solução de álcool a 8%
Solução padrão de cobre a 1000 mg/L

Solução-Padrão de cobre a 5 mg/L – Pipete 1 mL da solução-padrão de cobre 1000 mg/L em um balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com água.

Procedimento – Preparação da curva padrão: em 4 balões volumétricos de 50 mL contendo 10 mL da amostra em cada um, adicione, respectivamente, alíquotas de 2, 5, e 10 mL da solução-padrão de 5 mg/L de cobre, sendo que, em um dos balões não adicione a solução padrão. Complete o volume com água. A concentração final de cobre em cada balão será, respectivamente, 0; 0,2; 0,5; e 1 mg/L. Zere o equipamento com a solução de álcool etílico a 8% em água. Leia a absorbância destas soluções em 324,8 nm, usando chama oxidante ar/acetileno. Construa um gráfico de absorbância x concentração. Prolongue a reta de modo a cortar o eixo das abscissas. O ponto de intersecção na abscissa corresponde à concentração de cobre na amostra diluída (**Figura 1**). Multiplique este valor por 5 para obter a concentração de cobre na amostra (mg de Cu/L). Caso o equipamento apresente recurso de programação para o método de adição de padrão, utilize-o para estabelecer a curva de calibração. Consulte o manual do equipamento para efetuar a programação.

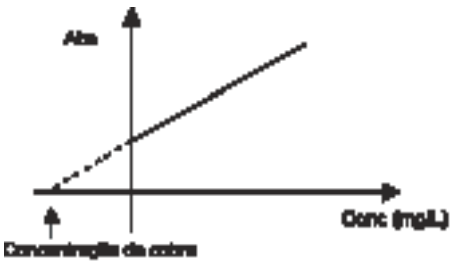


Figura 1 - Cálculo da concentração de cobre.

Referência Bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 967.08) Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 26. p. 6-7.

Bebidas fermentadas

Estão incluídos neste capítulo os vinhos de mesa, vinhos espumantes, licorosos, compostos, fermentado de cana, fermentado de frutas, hidromel, filtrado doce, mistela, jeropiga, saquê, sidra e cerveja. Com exceção desta última, todas as outras bebidas alcoólicas fermentadas são analisadas, em alguns aspectos, da mesma maneira que o vinho. Na análise destes produtos, as determinações usuais são, entre outras, exame preliminar, densidade

relativa, álcool em volume, pH, acidez total, volátil, acidez fixa, extrato seco, açúcares redutores em glicose, açúcares não redutores em sacarose, sulfatos, extrato seco reduzido, relação álcool em peso/extrato seco reduzido, cinzas (**018/IV**), alcalinidade das cinzas, cloretos, dióxido de enxofre, taninos, metanol, corantes artificiais (**051/IV**), minerais e contaminantes inorgânicos (**cap. XXIII**).

Vinhos

231IV Bebidas fermentadas – Exame preliminar de vinhos

O exame físico da amostra, antes e no momento da abertura da embalagem, é importante especialmente no caso dos vinhos e seus derivados, pois estes são susceptíveis à modificações provenientes de causas diversas.

Procedimento – Antes da abertura da embalagem, observe: aparência - se o produto apresenta o aspecto límpido ou turvo, se há presença de depósito ou não; cor - se o produto apresenta tonalidade própria ou imprópria; condições da embalagem - estado da embalagem, vazamentos e sistema de vedação; formação de gás. No momento da abertura da embalagem, verifique: aparência - se apresenta carbonatação conforme a característica do produto ou se há presença de gás devido a alguma anormalidade; odor - se típico (vinoso), estranho ou alterado (acético); sabor - caso seja necessário por degustação, avalie se o produto é seco, doce, próprio, estranho ou alterado (acético).

Referência Bibliográfica

BRASIL, Leis, Decretos, etc - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

232/IV Bebidas fermentadas – Preparação da amostra de vinhos

Determine imediatamente, após a abertura da embalagem, os compostos que são sujeitos à alteração, tais como álcool e ácidos voláteis. Filtre, se necessário. Nos casos de bebidas gaseificadas, elimine o CO_2, utilizando um agitador magnético ou banho de ultrasom.

233/IV Vinhos — Álcool em volume ou grau alcoólico

Este método aplica-se a amostras de bebidas fermentadas. Baseia-se na destilação do álcool da amostra e posterior quantificação pela medida da densidade relativa do destilado a 20°C.

Material

Conjunto de destilação ou equipamento destilador por arraste de vapor, chapa aquecedora, condensador de serpentina 40 cm, conexão com bola de segurança, balão volumétrico de 100 mL, funil, bastão de vidro, pérolas de vidro e termômetro.

Procedimento: Ajuste a temperatura da amostra a 20ºC e meça 100 mL em um balão volumétrico. Transfira para o recipiente do aparelho destilador (adicione pérolas de vidro) ou para o borbulhador do aparelho de arraste a vapor, com auxílio do bastão de vidro. Lave o balão volumétrico 4 vezes com água destilada e destile a amostra. Recolha o destilado no próprio balão volumétrico inicialmente usado, em pelo menos ¾ do volume tomado de amostra. Complete o volume com água destilada. Determine a densidade relativa à 20ºC/20ºC e obtenha a graduação alcoólica a partir da **Tabela 1**. Se necessário, especialmente nos vinhos novos, adicione uma pequena quantidade de material anti-espumante, para prevenir a formação de espuma durante a destilação. No caso de vinhos que contenham uma quantidade elevada de ácido acético, neutralize exatamente com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (volume calculado a partir da determinação de acidez), antes de proceder à destilação. A neutralização é desnecessária em vinhos que apresentam sabor e odor normais.

Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 920.57) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 28. p. 1.

BRASIL, Leis, Decretos, etc - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

234/IV Vinhos – Álcool em peso

Aplicável para se determinar a porcentagem de álcool em peso em bebidas alcoólicas fermentadas. Considera-se como álcool em peso, por 100 mL, o resultado da multiplicação da graduação alcoólica em volume, por 0,79 (densidade aproximada do álcool absoluto a 20ºC).

Cálculo

A x 0,79 = Álcool em peso por cento m/v
A = nº de mL de álcool em volume por cento

Referência Bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP 1985. p. 366.

235/IV Vinhos – Acidez total

Este método basea-se na titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de álcali, com uso de indicador fenoftaleína para soluções claras de vinho e outras bebidas álcoolicas fermentadas ou com o pHmetro para soluções escuras.

Material

pHmetro, agitador magnético, barra magnética, pipeta volumétrica de 10 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL, béquer de 250 mL, bureta de 10 mL e pipeta graduada de 1 mL.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 N ou 0,05 N
Solução de fenolftaleína

Procedimento - Pipete 10 mL da amostra descarbonatada em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de água. Adicione 0,5 mL de fenoftaleína e titule com solução de hidróxido de sódio padronizada, até coloração rósea persistente ou transfira a amostra para um béquer e titule até o ponto de viragem (pH 8,2-8,4), utilizando o pHmetro.

Cálculo

$$\frac{n \times f \times N \times 1000}{V} = \text{acidez em meq/L}$$

n = volume em mL de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio
N = normalidade da solução de hidróxido de sódio
V = volume da amostra

Nota: a unidade de acidez é expressa em meq/L, para atender a legislação brasileira.

Referências bibliográficas

BRASIL, Leis, Decretos, etc - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 03 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP 1985. p.361.

236/IV Vinhos – Acidez volátil

Método utilizado para determinar a acidez volátil titulável de vinhos e outras bebidas fermentadas por volumetria, após a destilação por arraste de vapor.

Material

Chapa elétrica de aquecimento, pipeta volumétrica de 10 mL, aparelho de destilação de Cazenave-Ferré ou conjunto similar, gerador de vapor, frascos Erlenmeyer de 250 e 500 mL, refrigerante de Liebig ou de serpentina, bureta de 10 mL e pipeta de 1 mL.

Reagentes – *Os mesmos indicados no método* ***235/IV*** *– acidez total.*

Procedimento – Transfira, com pipeta volumétrica, 10 mL da amostra no borbulador e 250 mL de água isenta de CO_2 no aparelho gerador de vapor de Cazenave-Ferré ou transfira a amostra para um conjunto similar de destilação por arraste de vapor. Conecte o condensador. Aqueça o aparelho de Cazenave-Ferré em chapa elétrica e leve à ebulição com a torneira de vapor aberta, a fim de eliminar o ar do conjunto e, eventualmente, o gás carbônico da água destilada. Em seguida, feche a torneira, para que o vapor de água borbulhe na amostra arrastando os ácidos voláteis. Recolha no mínimo 100 mL do destilado em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 20 mL de água destilada. Adicione 1 mL de solução de indicador fenolftaleína. Titule rapidamente com solução de hidróxido de sódio padronizada, até coloração rósea persistente por 30 s.

Cálculo – *Usar fórmula do método* ***235/IV***

Nota: faça a correção da acidez volátil para amostras com anidrido sulfuroso.
Referências bibliográficas – indicadas no método **235/IV**

237/IV Vinhos – Acidez fixa

Este método é aplicável a vinhos e outras bebidas fermentadas. A acidez fixa é expressa, em meq/L, pela diferença entre a acidez total e a acidez volátil.

Cálculo

At - Av = acidez fixa, em meq/L
At = acidez total, em meq/L
Av = acidez volátil, em meq/L

Referências Bibliográficas

BRASIL, Leis, Decretos, etc - Portaria nº 76 de 27 de novembro de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 03 de dez. 1986. Seção I, p. 18152-18173.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz .** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP 1985. p. 361.

238/IV Vinhos - Extrato seco

Método A **-** aplicável a vinhos secos e outras bebidas fermentadas com extrato seco menor que 3 g/100 mL. O método avalia o resíduo seco (sólidos totais) da bebida, por evaporação e secagem em estufa.

Material

Cápsula de metal com fundo chato, com aproximadamente 8,5 cm de diâmetro, estufa, banho-maria, balança analítica, pipeta volumétrica de 20 ou 25 mL, dessecador e temômetro.

Procedimento – Transfira, com o auxílio de uma pipeta, 20 ou 25 mL da amostra para uma cápsula metálica de fundo chato, previamente aquecida em estufa a (100 ± 5)ºC, por uma hora, resfriada em dessecador e pesada. Evapore em banho-maria fervente até que o resíduo esteja aparentemente seco, ou até uma consistência xaroposa. Aqueça o resíduo em estufa a (100 ± 5)ºC, por 1 hora. Resfrie em dessecador e pese. Repita as operações em estufa e dessecador até peso constante.

Cálculo

$$\frac{1000 \times N}{v} = \text{extrato seco, em m/v}$$

N = massa, em g de resíduo
v = volume da amostra, em mL

Referências Bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP 1985. p. 361.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 920.62) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 28. p. 4.

Método B – este método é aplicável a vinhos doces e outras bebidas fermentadas cujo conteúdo de extrato seco seja de (3 - 6)g/100 mL. Em amostras doces, o resultado de extrato seco pelo método gravimétrico, por secagem da amostra, pode apresentar erros, devido à alta temperatura utilizada e conseqüentemente queima do resíduo. O método avalia indiretamente o extrato seco pela medida da densidade relativa da amostra e do destilado alcoólico. O extrato seco total por litro é obtido mediante a fórmula de Tabarié.

Material

Balança analítica e picnômetro

Procedimento – determine a densidade relativa a 20°C/20°C diretamente da amostra de vinho. Determine a densidade relativa do destilado da amostra a 20°C/20°C (obtida na análise do grau alcoólico).

Cálculo

$De = dv_C - dd + 1,0000$

De = densidade relativa a 20°C/20°C do vinho sem álcool
dv_C = densidade relativa a 20°C/20°C do vinho corrigida em função da acidez volátil
dd = densidade relativa a 20°C/20°C do destilado alcoólico do vinho

Nota: antes de fazer o cálculo acima, a densidade da amostra deve ser corrigida em função da acidez volátil segundo a fórmula:

$dv_C = dv - (0,0000086 \times A)$

A = acidez volátil, em meq/L
dv = densidade relativa a 20/20°C do vinho

Como resultado de De (até a terceira casa decimal), faça a leitura do extrato seco total (g/L) correspondente na **Tabela 5**. Some a este resultado o valor que corresponde à quarta casa decimal da densidade, descrito na **Tabela de Ajuste**.

TABELA 5 – Teor do extrato seco total (g/L) a partir da densidade relativa a 20ºC da mostra sem álcool (De)

Densidade até a 2ª. casa decimal	3ª casa decimal da densidade									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Gramas de extrato por litro									
1,00	0	2,6	5,1	7,7	10,3	12,9	15,4	18,0	20,6	23,2
1,01	25,8	28,4	31,0	33,6	36,2	38,8	41,3	43,9	46,5	49,1
1,02	51,7	54,3	56,9	59,5	62,1	64,7	67,3	69,9	72,5	75,1
1,03	77,7	80,3	82,9	85,5	88,1	90,7	93,3	95,9	98,5	101,1
1,04	103,7	106,3	109,9	111,6	114,2	116,8	119,4	122,0	124,6	127,2
1,05	129,8	132,4	135,0	137,6	140,3	142,9	145,5	148,1	150,7	153,3
1,06	155,9	158,6	161,2	163,8	166,4	169,0	171,6	174,3	176,9	179,5
1,07	182,1	184,8	187,4	190,0	192,6	195,2	197,8	200,5	203,1	205,8
1,08	208,4	211,0	213,6	216,2	218,9	221,5	224,1	226,8	229,4	232,0
1,09	234,7	237,3	239,9	242,5	245,2	247,8	250,4	253,1	255,7	258,4
1,10	261,0	263,6	266,3	268,9	271,5	274,2	276,8	279,5	282,1	284,8
1,11	287,4	290,0	292,7	295,3	298,0	300,6	303,3	305,9	308,6	311,2
1,12	313,9	316,5	319,2	321,8	324,5	327,1	329,8	332,4	335,1	337,8
1,13	340,4	343,0	345,7	348,3	351,0	353,7	356,3	359,0	361,6	364,3
1,14	366,9	369,6	372,3	375,0	377,6	380,3	382,9	385,6	388,3	390,9
1,15	393,6	396,2	398,9	401,6	404,3	406,9	409,6	412,3	415,0	417,6
1,16	420,3	423,0	425,7	428,3	431,0	433,7	436,4	439,0	441,7	444,4
1,17	447,1	449,8	452,4	455,2	457,8	460,5	463,2	465,9	468,6	471,3
1,18	473,9	476,6	479,3	482,0	484,4	487,4	490,1	492,8	495,5	498,2
1,19	500,9	503,5	506,2	508,9	511,6	514,3	517,0	519,7	522,4	525,1
1,20	527,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA DE AJUSTE

4ª casa decimal da densidade	Gramas de extrato/L	4ª casa decimal da densidade	Gramas de extrato/L	4ª casa decimal da densidade	Gramas de extrato/L
1	0,3	4	1,0	7	1,8
2	0,5	5	1,3	8	2,1
3	0,8	6	1,6	9	2,3

Referência Bibliográfica

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. **Recueil des methodes internationales d'analyse des vins et des môuts**, Paris: O.I.V., 1990. 85-89.

239/IV Bebidas fermentadas – Açúcares redutores em glicose

Este método volumétrico, aplicável a bebidas fermentadas, envolve a redução completa de um volume conhecido da solução de cobre (Solução de Fehling) por um volume de solução clarificada de açúcares redutores.

Material

Banho-maria, pipeta volumétrica de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, béquer de 150 mL, balão de fundo chato de 250 mL, chapa aquecedora, funil, papel de filtro e bureta de 10 ou 25 mL

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M
Solução saturada de acetato neutro de chumbo
Soluções A e B de Fehling tituladas (**Apêndice I**)
Oxalato de potássio ou de sódio, anidros
Carvão ativo

Procedimento –Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 50 mL da amostra para um béquer de 150 mL (para amostras com alto teor de açúcares, tome alíquotas menores). Neutralize exatamente com solução de hidróxido de sódio 0,1 M (o volume para a neutralização é calculado do resultado da acidez total). Evapore em banho-maria até eliminar todo o álcool. Resfrie e transfira com água para um balão volumétrico de 100 mL. Se necessário, adicione 1 mL da solução de acetato neutro de chumbo o suficiente para clarificar. Pode ser usada uma pequena quantidade de carvão ativo, para amostras escuras, suficiente para clarear a amostra. Misture, complete o volume com água e filtre, desprezando os primeiros mL do filtrado. Adicione ao filtrado oxalato de potássio ou de sódio anidros para precipitar o excesso de chumbo. Misture e filtre, descartando os primeiros mL filtrados e proceda conforme o método **038/IV**.

Referência Bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3 ed. São Paulo: IMESP 1985. p. 364.

240/IV Bebidas fermentadas – Açúcares não redutores, em sacarose

Material

Banho-maria, chapa aquecedora, pipeta volumétrica de 25 ou 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, bureta de 10 ou 25 mL, balão de fundo chato de 250 mL, funil e papel de filtro.

Reagentes

Carbonato de sódio anidro
Ácido clorídrico
Solução saturada de acetato neutro de chumbo
Soluções A e B de Fehling tituladas (**Apêndice I**)
Carvão ativo
Oxalato de potássio ou de sódio

Procedimento – Pipete 25 ou 50 mL da amostra em um balão volumétrico de 100 mL. Adicione 1 mL de ácido clorídrico e aqueça em banho-maria por 1 hora aproximadamente, para hidrólise ácida da sacarose. Se necessário, clarifique a amostra e proceda conforme o método **240/IV.** Continue a determinação dos açúcares não redutores, em sacarose, seguindo a técnica indicada em glicídios não redutores em sacarose (**039/IV)**.

Referência Bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 364.

241/IV Bebidas fermentadas – Sulfatos pelo método aproximativo de Marty

Este método semi-quantitativo é aplicável a vinhos e outras bebidas fermentadas. O método estima o conteúdo de sulfatos, por intermédio do tratamento da amostra com quantidades conhecidas de cloreto de bário. O precipitado de sulfato de bário formado é então separado por filtração. No filtrado, os sulfatos ou o cloreto de bário residuais são precipitados com a adição de cloreto de bário e ácido sulfúrico, respectivamente.

Material

Banho-maria, papel de filtro, tubos de ensaio, pipeta volumétrica de 10 mL, pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL e funil.

Reagentes

Ácido clorídrico

Licor de Marty: 2,804 g $BaCl_2.2H_2O$ + 10 mL HCl, diluídos a 1000 mL com água

Solução de cloreto de bário a 10% m/v
Solução de ácido sulfúrico 0,5 M

Procedimento – Pipete 10 mL da amostra em 3 tubos de ensaio (A, B e C) e aqueça em banho-maria fervente durante 30 minutos para eliminação do ácido acético. Adicione no tubo de ensaio A, 3,5 mL, no tubo B, 5 mL e no tubo C, 7,5 mL do Licor de Marty. Agite e leve ao banho-maria em ebulição durante 5 minutos, resfrie e filtre. Divida o líquido filtrado de cada tubo em 2 volumes iguais nos tubos: a e a', b e b', c e c'. Adicione num dos tubos 1mL da solução de cloreto de bário a 10% e, no outro, 1 mL de solução de ácido sulfúrico 0,5 M.

Cálculo

Observe os tubos de ensaio da seguinte forma:

		TUBOS	K_2SO_4 (g/L)
A	a	Turvo com H_2SO_4	Menos de 0,7
		Límpido com $BaCl_2$	
	a'	Límpido com H_2SO_4	Mais de 0,7
		Turvo com $BaCl_2$	
B	b	Turvo com H_2SO_4	Menos de 1,0
		Límpido com$BaCl_2$	
	b'	Límpido com H_2SO_4	Mais de 1,0
		Turvo com $BaCl_2$	
C	c	Turvo com H_2SO_4	Menos de 1,5
		Límpido com $BaCl_2$	
	c'	Límpido com H_2SO_4	Mais de 1,5
		Turvo com $BaCl_2$	

Referências bibliográficas

BRASIL, Leis,Decretos, etc - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 3 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 364-365.

242/IV Bebidas fermentadas – Extrato seco reduzido

Este cálculo é aplicado para vinhos de mesa tintos e brancos. O extrato seco reduzido é obtido pelo valor do extrato seco total diminuído dos açúcares totais que excedem 1 g/L e do sulfato de potássio que exceda 1 g/L.

Cálculo

ES – (A – 1) – (S – 1) = extrato seco reduzido, em g/L

ES = extrato seco total (g/L)
A = açúcares totais, em g/L
S = sulfatos totais em g/L (despreze esse termo, quando o teor de sulfatos for menor que 1 g/L)

Referência Bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria nº 76 de 26 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3 de dez de 1986. Seção I, p. 18152-18173.

243/IV Vinhos – Relação entre álcool em peso e extrato seco reduzido

Este cálculo é aplicado para vinhos de mesa, tintos e brancos. A relação álcool em peso/extrato seco reduzido é obtida pela divisão do valor de álcool em peso pelo teor de extrato seco reduzido.

Cálculo

$$\frac{G \times 8}{ESR} = \text{relação álcool em peso/extrato seco reduzido}$$

G = graduação alcoólica da amostra de vinho de mesa, em % v/v
ESR = extrato seco reduzido em g/L

Referência Bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria nº 76 de 26 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3 de dez de 1986. Seção I, p. 18152-18173.

244/IV Bebidas fermentadas – Metanol

Este método é realizado por cromatografia a gás utilizando padrão interno. É aplicável tanto à amostras de bebidas fermentadas como outros tipos de bebidas alcoólicas.

Procedimento – Destile a amostra volumetricamente ou utilize a amostra destilada obtida

do procedimento de análise de grau alcoólico. Pese e adicione a solução de padrão interno e proceda como na determinação de metanol e componentes secundários, por cromatografia gasosa **(228/IV)**.

Cervejas

A análise de cerveja inclui, entre outras, as determinações da densidade, grau alcoólico, acidez, teor de gás carbônico, extrato real, extrato aparente e extrato primitivo.

245/IV Cervejas – Preparação da amostra

Todas as determinações são realizadas na amostra descarbonatada. Para remover o CO_2 transfira a amostra para um béquer de 500 mL e agite com um bastão ou banho de ultra-som. Mantenha a temperatura da cerveja a (20-25)ºC. Se necessário, remova algum material em suspensão filtrando a cerveja descarbonatda através de um filtro seco.

246/IV Cervejas – Álcool em volume a 20ºC

Este método é utilizado para determinar o teor de álcool em volume em amostras de cerveja. A graduação alcoólica é obtida pela **Tabela 6,** de conversão da densidade relativa da amostra destilada.

Material

Conjunto de destilação, chapa de aquecimento, termômetro, balança analítica, balão volumétrico de 100 mL, funil de vidro e pérolas de vidro.

Procedimento – Transfira 100 mL da amostra para o conjunto de destilação; se necessário, adicione 1 ou 2 gotas de material antiespumante, para prevenir a formação de espuma durante a destilação. Recolha o destilado em um balão volumétrico de 100 mL, contendo 10 mL de água. Destile até aproximadamente ¾ do volume inicial, complete o volume com água e homogeneíze bem. Determine a densidade relativa desta solução a 20ºC pelo picnômetro ou pelo densímetro digital automático. Utilize a **Tabela 1** para a conversão em porcentagem de álcool em volume.

Referência Bibliográfica

BRASIL, Leis, Decretos, etc - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3 de dez 1986. Seção I, p.18152-18173.

247/IV Cervejas – Álcool em peso

Este método é utilizado para determinar o teor de álcool em peso em amostras de cerveja. A graduação alcoólica é obtida a partir da conversão da densidade relativa da amostra destilada em porcentagem de álcool em peso, por meio de tabela.

Procedimento – Converta o valor da densidade relativa obtida em **247/IV**, em peso, utilizando a **Tabela 6**.

TABELA 6 – Conversão da densidade relativa a 20ºC/20ºC em porcentagem de álcool em peso

Densidade Relativa	Álcool %	Densidade Relativa	Álcool %	Densidade Relativa	Álcool %	Densidade Relativa	Álcool %
1,00000	0,00	0,99777	1,20	0,99561	2,40	0,99354	3,60
0,99991	0,05	0,99768	1,25	0,99553	2,45	0,99346	3,65
0,99981	0,10	0,99759	1,30	0,99544	2,50	0,99337	3,70
0,99972	0,15	0,99750	1,35	0,99535	2,55	0,99329	3,75
0,99963	0,20	0,99741	1,40	0,99526	2,60	0,99320	3,80
0,99953	0,25	0,99732	1,45	0,99517	2,65	0,99312	3,85
0,99944	0,30	0,99723	1,50	0,99509	2,70	0,99303	3,90
0,99935	0,35	0,99714	1,55	0,99500	2,75	0,99295	3,95
0,99925	0,40	0,99705	1,60	0,99491	2,80	0,99286	4,00
0,99916	0,45	0,99695	1,65	0,99482	2,85	0,99278	4,05
0,99907	0,50	0,99686	1,70	0,99473	2,90	0,99270	4,10
0,99897	0,55	0,99676	1,75	0,99464	2,95	0,99262	4,15
0,99888	0,60	0,99668	1,80	0,99456	3,00	0,99253	4,20
0,99879	0,65	0,99659	1,85	0,99447	3,05	0,99245	4,25
0,99869	0,70	0,99650	1,90	0,99439	3,10	0,99237	4,30
0,99860	0,75	0,99641	1,95	0,99430	3,15	0,99229	4,35
0,99851	0,80	0,99632	2,00	0,99422	3,20	0,99221	4,40
0,99841	0,85	0,99623	2,05	0,99413	3,25	0,99212	4,45
0,99832	0,90	0,99614	2,10	0,99405	3,30	0,99204	4,50
0,99823	0,95	0,99606	2,15	0,99396	3,35	0,99196	4,55
0,99813	1,00	0,99597	2,20	0,99388	3,40	0,99188	4,60
0,99804	1,05	0,99588	2,25	0,99379	3,45	0,99179	4,65
0,99795	1,10	0,99579	2,30	0,99371	3,50	0,99171	4,70
0,99786	1,15	0,99570	2,35	0,99362	3,55	0,99163	4,75

Densidade Relativa	Álcool %	Densidade Relativa	Álcool %	Densidade Relativa	Álcool %	Densidade Relativa	Álcool %
0,99155	4,80	0,99018	5,65	0,98884	6,50	0,98762	7,30
0,99147	4,85	0,99010	5,70	0,98877	6,55	0,98755	7,35
0,99138	4,90	0,99002	5,75	0,98869	6,60	0,98747	7,40
0,99130	4,95	0,98994	5,80	0,98861	6,65	0,98740	7,45
0,99122	5,00	0,98986	5,85	0,98854	6,70	0,98732	7,50
0,99114	5,05	0,98978	5,90	0,98846	6,75	0,98725	7,55
0,99106	5,10	0,98970	5,95	0,98838	6,80	0,98717	7,60
0,99098	5,15	0,98962	6,00	0,98830	6,85	0,98710	7,65
0,99090	5,20	0,98954	6,05	0,98823	6,90	0,98702	7,70
0,99082	5,25	0,98946	6,10	0,98815	6,95	0,98695	7,75
0,99074	5,30	0,98938	6,15	0,98807	7,00	0,98687	7,80
0,99066	5,35	0,98931	6,20	0,98800	7,05	0,98680	7,85
0,99058	5,40	0,98923	6,25	0,98792	7,10	0,98672	7,90
0,99050	5,45	0,98915	6,30	0,98785	7,15	0,98664	7,95
0,99042	5,50	0,98908	6,35	0,98777	7,20	0,98657	8,00
0,99034	5,55	0,98900	6,40	0,98770	7,25	-	-
0,99026	5,60	0,98892	6,45	-	-	-	-

Referências Bibliográficas

BRASIL, Leis, Decretos, etc. - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 368-370.

248/IV Cervejas – Extrato real pelo método 1

A determinação do extrato real por este método está baseada na pesagem do resíduo seco de um certo volume de amostra submetido à evaporação.

Material

Balança analítica, banho-maria, estufa ou estufa a vácuo, cápsula de níquel de 7 cm de diâmetro e 2 cm de altura e pipeta volumétrica de 20 mL

Procedimento – Transfira, com auxílio de uma pipeta, 20 mL de amostra descarbonatada, para uma cápsula de níquel previamente aquecida em estufa a (100 ± 5)ºC por 1 hora,

resfriada em dessecador e pesada. Aqueça em banho-maria até a secagem. Leve à estufa a (100 ± 5)ºC por 1 hora, resfrie à temperatura ambiente em dessecador e pese.

Cálculo

$$\frac{100 \times P}{V} = \text{extrato real \% m/v}$$

P = massa do resíduo, em g
V = volume da amostra, em mL

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 371-372.

249/IV Cervejas – Extrato real pelo método 2

Nste método, a porcentagem de extrato real é obtida pela conversão do valor da densidade relativa do resíduo de destilação, com auxílio da **Tabela 7**.

Material

Balança analítica, destilador, picnômetro, balão volumétrico de 100 mL, balão de destilação de 500 mL e funil de vidro

Procedimento – Este ensaio pode ser realizado utilizando-se o resíduo da destilação de 100 mL de amostra devidamente pesado. Transfira o resíduo para um balão volumétrico de 100 mL com água e acerte para a mesma massa inicial. Determine a densidade relativa a 20ºC /20ºC utilizando picnômetro ou densímetro automático digital. Converta o valor da densidade relativa para extrato real utilizando a **Tabela 7**.

TABELA 7 – Conversão da densidade relativa a 20ºC/20 ºC em porcentagem de extrato

Densidade Relativa a 20ºC/20ºC	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20/20ºC	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20ºC/20ºC	g Extrato em 100 g de solução
1,00000	0,00	1,00605	1,55	1,01213	3,10
1,00020	0,05	1,00624	1,60	1,01233	3,15
1,00039	0,10	1,00644	1,65	1,01253	3,20
1,00059	0,15	1,00663	1,70	1,01273	3,25
1,00078	0,20	1,00683	1,75	1,01292	3,30
1,00098	0,25	1,00702	1,80	1,01312	3,35
1,00117	0,30	1,00722	1,85	1,01332	3,40
1,00137	0,35	1,00742	1,90	1,01352	3,45
1,00156	0,40	1,00761	1,95	1,01371	3,50
1,00176	0,45	1,00781	2,00	1,01391	3,55
1,00195	0,50	1,00799	2,05	1,01411	3,60
1,00214	0,55	1,00820	2,10	1,01431	3,65
1,00234	0,60	1,00840	2,15	1,00451	3,70
1,00254	0,65	1,00859	2,20	1,01471	3,75
1,00273	0,70	1,00879	2,25	1,01490	3,80
1,00293	0,75	1,00897	2,30	1,01510	3,85
1,00312	0,80	1,00918	2,35	1,01530	3,90
1,00332	0,85	1,00938	2,40	1,01550	3,95
1,00351	0,90	1,00957	2,45	1,01570	4,00
1,00371	0,95	1,00977	2,50	1,01590	4,05
1,00390	1,00	1,00997	2,55	1,01609	4,10
1,00410	1,05	1,01016	2,60	1,01629	4,15
1,00429	1,10	1,01036	2,65	1,01649	4,20
1,00449	1,15	1,01056	2,70	1,01669	4,25
1,00468	1,20	1,01075	2,75	1,01689	4,30
1,00488	1,25	1,01095	2,80	1,01709	4,35
1,00507	1,30	1,01115	2,85	1,01729	4,40
1,00527	1,35	1,01134	2,90	1,01749	4,45
1,00546	1,40	1,01154	2,95	1,01769	4,50
1,00566	1,45	1,01174	3,00	1,01789	4,55
1,00585	1,50	1,01194	3,05	1,01808	4,60

Densidade Relativa a 20ºC/20ºC	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20/20ºC	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20ºC/20ºC	g Extrato em 100 g de solução
1,01828	4,65	1,02511	6,35	1,03201	8,05
1,01848	4,70	1,02531	6,40	1,03221	8,10
1,01868	4,75	1,02551	6,45	1,03242	8,15
1,01888	4,80	1,02571	6,50	1,03262	8,20
1,01908	4,85	1,02592	6,55	1,03263	8,25
1,01928	4,90	1,02612	6,60	1,03283	8,30
1,01948	4,95	1,02632	6,65	1,03324	8,35
1,01969	5,00	1,02652	6,70	1,03344	8,40
1,01988	5,05	1,02672	6,75	1,03365	8,45
1,02008	5,10	1,02693	6,80	1,03385	8,50
1,02028	5,15	1,02713	6,85	1,03406	8,55
1,02048	5,20	1,02733	6,90	1,03426	8,60
1,02068	5,25	1,02753	6,95	1,03447	8,65
1,02088	5,30	1,02774	7,00	1,03467	8,70
1,02108	5,35	1,02794	7,05	1,03488	8,75
1,02128	5,40	1,02814	7,10	1,03503	8,80
1,02148	5,45	1,02835	7,15	1,03529	8,85
1,02169	5,50	1,02855	7,20	1,03549	8,90
1,02189	5,55	1,02875	7,25	1,03570	8,95
1,02209	5,60	1,02896	7,30	1,03591	9,00
1,02229	5,65	1,02916	7,35	1,03611	9,05
1,02249	5,70	1,02936	7,40	1,03632	9,10
1,02269	5,75	1,02956	7,45	1,03652	9,15
1,02289	5,80	1,02977	7,50	1,03673	9,20
1,02309	5,85	1,02997	7,55	1,03693	9,25
1,02329	5,90	1,03018	7,60	1,03714	9,30
1,02349	5,95	1,03038	7,65	1,03735	9,35
1,02370	6,00	1,03058	7,70	1,03755	9,40
1,02390	6,05	1,03079	7,75	1,03776	9,45
1,02410	6,10	1,03099	7,80	1,03796	9,50
1,02430	6,15	1,03119	7,85	1,03817	9,55
1,02450	6,20	1,03140	7,90	1,03838	9,60
1,02470	6,25	1,03160	7,95	1,03858	9,65
1,02490	6,30	1,03181	8,00	1,03879	9,70

Densidade Relativa a 20ºC/20ºC	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20/20ºC	g Extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20ºC/20ºC	g Extrato em 100 g de solução
1,03909	9,75	1,03941	9,85	1,03982	9,95
1,03929	9,80	1,03962	9,90	1,04003	10,00

Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 945.09) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 27. p. 4.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 3 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 372

250/IV Cervejas – Extrato aparente

Este método é utilizado para determinar o extrato aparente em amostras de cerveja. Esta determinação baseia-se na conversão do valor de densidade relativa diretamente da amostra em % de extrato aparente, por intermédio da **Tabela 7**.

Material

Balança analítica, picnômetro, frasco Erlenmeyer de 100 mL e funil de vidro

Procedimento filtre aproximadamente 100 mL de amostra descarbonatada e determine a densidade relativa a 20/20ºC do filtrado. Converta o valor da densidade relativa em extrato aparente utilizando a **Tabela 7**.

Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 945.09) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 27. p. 4.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 03 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 375.

251/IV Cervejas – Extrato primitivo ou original

Este método é utilizado para determinar o extrato primitivo em amostras de cerveja. O extrato primitivo é obtido por meio de cálculo envolvendo os valores de teor alcoólico e extrato real segundo a fórmula de Balling.

Cálculo

Calcule o extrato primitivo segundo a seguinte fórmula e considere o resultado até a primeira casa decimal:

$$\frac{[(P \times 2{,}066) + Er] \times 100}{[100 + (P \times 1{,}066)]} = \text{extrato primitivo, em \% m/m}$$

P =% de álcool em peso
Er =% de extrato real

Referências Bibliográficas

BRASIL, Leis, Decretos, etc. - Portaria nº 76 de 27 de nov de 1986, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 03 de dez 1986. Seção I, p. 18152-18173.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 935.20) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 27. p. 4.

Bebidas alcoólicas por mistura

Estão incluídos neste ítem: licor, bebida alcóolica mista ou coquetel, batida, aperitivos e amargos (bitter, fernet, ferroquina) e aguardente composta.

A análise destes produtos inclui as seguintes determinações: álcool em volume, densidade, resíduo seco, glicídios totais em sacarose, acidez total, cinzas, componentes secundáros, metanol, pesquisa de corantes orgânicos artificiais, cobre e eventualmente contaminantes inorgânicos. Essas determinações já estão descritas nos métodos de análise para bebidas alcóolicas destiladas e de determinações gerais.

Colaboradores
Letícia Araújo Farah Nagato; Miriam Solange Fernandes Caruso; Maria Cristina Duran; Maria de Fátima Henriques Carvalho e Cristiane Bonaldi Cano

CAPÍTULO X

BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS

BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS

Este capítulo descreve os métodos para análise de refrigerantes, refrescos, bebidas dietéticas e de baixa caloria, preparados sólidos para refrescos, xaropes, repositores hidroeletrolíticos e energéticos.

As determinações realizadas para refrigerantes, refrescos e bebidas dietéticas e de baixa caloria são: dióxido de carbono (em refrigerantes), acidez total, pH, densidade (**011/IV**), resíduo seco, glicídios totais em sacarose, cinzas (**018/IV**), corantes orgânicos artificiais, cafeína, tanino, quinina, sacarina, ciclamato e outros edulcorantes, ácido benzóico e outros aditivos. No caso de refrigerantes, dose primeiramente o teor de CO_2 conforme **252//IV** e descarbonate a amostra com agitador magnético ou ultra-som, antes de qualquer determinação.

Os preparados sólidos para refrescos incluem as seguintes determinações: substâncias voláteis a 105ºC (**012/IV**), acidez total, glicídios totais em sacarose, cinzas (**018/IV**), corantes orgânicos artificiais, cafeína, sacarina, ciclamato e outros aditivos.

No caso dos xaropes, devem ser realizadas as seguintes determinações: graus Brix, acidez total, pH, glicídios redutores em glicose, glicídios não redutores em sacarose, cinzas (**018/IV**) e corantes orgânicos artificiais.

Os repositores hidroeletrolíticos e energéticos incluem as seguintes determinações: resíduo seco a 105ºC, acidez titulável, pH, glicídios redutores em glicose, glicídios não redutores em sacarose, cinzas (**018/IV**), corantes orgânicos artificiais e outros aditivos, minerais (**cap. XXIII**) e vitaminas (**cap. XIX**).

252/IV Determinação de dióxido de carbono em refrigerantes

Este método é aplicável à amostras de bebidas gaseificadas e baseia-se na medida da pressão gasosa *versus* a temperatura.

Material

Termômetro, aparelho dosador de volume de CO_2 com adaptador, manômetro com agulha de aço inoxidável ou equipamento dosador de gás carbônico de leitura digital direta.

Procedimento – Calibre o manômetro conforme as instruções do fabricante. Coloque o adaptador na garrafa ajustando-o devidamente sobre a tampa metálica, a fim de evitar vazamento. Regule o anel perfurado pelo qual passará a agulha de aço inoxidável, de modo a permitir sua passagem sem muita resistência ou folga. Golpeie o manômetro fazendo com que a agulha de aço inoxidável perfure e atravesse a tampa metálica. Abra a válvula de fuga ou escape, localizada na parte inferior do manômetro, até que a agulha retorne ao zero, fechando-a imediatamente. Agite vigorosamente com movimentos verticais até que não haja mais variação do valor indicado no manômetro. Normalmente, cerca de 6 a 10 movimentos são suficientes para essa operação. Faça a leitura da pressão. Retire a tampa metálica e determine a temperatura da bebida. Com os valores de pressão e temperatura determinados, use a tabela fornecida pelo fabricante do manômetro e determine o volume do gás na bebida testada. Com o equipamento dosador de gás carbônico, leia diretamente a porcentagem em volume de gás carbônico.

Referência bibliográfica

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria nº 76 de 27-11-86, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3-12-86. Seção I, p. 18152-18173. Métodos analíticos.

253/IV Determinação da acidez total

Material

pHmetro, agitador magnético, barra magnética, balança analítica, béquer de 250 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, bureta de 10 ou 25 mL, proveta de 100 mL.

Reagentes

Soluções-tampão pH = 4,0 e 7,0
Solução de hidróxido de sódio 0,1 M

Procedimento – Calibre o pHmetro usando as duas soluções-tampão, conforme as instruções do fabricante. Para refrigerantes e refrescos, pipete 10 mL da amostra em um béquer e adicione 100 mL de água. Mergulhe o eletrodo na solução e titule com hidróxido de sódio 0,1 M até pH 8,2-8,4. Para amostras sólidas, pese aproximadamente 1 g e para xaropes, cerca de 5 g.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times M \times 100}{A} = \text{acidez em solução molar por 100 mL ou 100 g}$$

V = volume gasto de hidróxido de sódio 0,1 M
f = fator de correção do hidróxido de sódio 0,1 M
M = molaridade da solução de hidróxido de sódio 0,1 M
A = volume da amostra em mL ou massa em g

Nota: para expressar o resultado em % do ácido orgânico correspondente, proceda como descrito no método de determinação de ácidos orgânicos (**312IV**).

Referências Bibliográficas

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria nº 76 de 27-11-86, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 3-12-86. Seção I, p. 18152-18173. Métodos analíticos.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 332. 1985.

254/IV Determinação de cafeína por método espectrofotométrico

Este método é aplicável a refrigerantes e refrescos que contenham cafeína (trimetilxantina), natural ou adicionada, e baseia-se na extração com clorofórmio em meio alcalino e determinação por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, cubeta de quartzo de 10 mm, balança analítica, algodão hidrófilo, funil de separação de 250 mL, béquer de 100 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 20 mL, proveta de 50 mL e balões volumétricos de 50 e 100 mL.

Reagentes

Cafeína com pureza mínima de 99%
Clorofórmio, grau espectrofotométrico

Solução redutora – Pese 5 g de sulfito de sódio e 5 g de tiocianato de potássio, dissolva em água e dilua a 10 mL em balão volumétrico.

Solução de hidróxido de sódio a 25% m/v
Solução de permanganato de potássio a 1,5% m/v

Solução de ácido fosfórico -- Dilua 15 mL de ácido fosfórico (d=1,69g/cm^3) em 85 mL de água

Sulfato de sódio anidro

Solução-padrão de cafeína – Pese 100 mg de cafeína, dissolva e dilua em clorofórmio num balão volumétrico de 100 mL. Pipete 10 mL da solução-estoque de cafeína e dilua a 100 mL com clorofórmio. Esta solução contém 0,1 mg de cafeína por mL de clorofórmio.

Procedimento – Pipete de 20 a 50 mL da amostra descarbonatada para um funil de separação. Junte 10 mL da solução de permanganato de potássio a 1,5 % e agite. Após 5 minutos, junte 20 mL da solução redutora com agitação contínua. Adicione 2 mL da solução de ácido fosfórico e agite. Adicione 2 mL da solução de hidróxido de sódio a 25 % e agite. Extraia a cafeína com três porções de 30 mL de clorofórmio. Após a separação, retire a camada inferior e filtre-a em sulfato de sódio anidro e algodão e recolha os filtrados em um mesmo balão volumétrico de 100 mL. Lave a haste do funil de separação e o filtro com porções de 2 mL de clorofórmio, após cada extração. Complete o volume com clorofórmio. Determine a absorbância a 276 nm, usando clorofórmio como branco. Para amostras com alto teor de cafeína, faça uma diluição pipetando uma alíquota de 10 mL para balão volumétrico de 50 mL, complete o volume com clorofórmio e faça a leitura da absorbância a 276 nm.

Curva-padrão – Pipete 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mL da solução-padrão de cafeína para balões volumétricos de 50 mL e complete o volume com clorofórmio. Estas soluções contêm, respectivamente, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 e 1,2 mg de cafeína por 100 mL de clorofórmio. Determine a absorbância dessas soluções a 276 nm, usando clorofórmio como branco. Trace a curva-padrão, registrando os valores de absorbância nas ordenadas e as concentrações de cafeína em mg/100 mL de clorofórmio nas abcissas.

Cálculo

Calcule a concentração de cafeína na amostra usando a curva-padrão.

$$\frac{C \times 100 \times f}{A} = \text{cafeína, em mg/100 mL}$$

C = concentração de cafeína na amostra correspondente à leitura da curva-padrão
A = volume da amostra, em mL
f = fator de diluição para o caso de amostra com alto teor de cafeína.

Referência Bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 962.13) Arlington: A.O.A.C., 1995. chapter 29. p. 3.

255/IV Determinação de tanino

Este método é aplicável a refrigerantes e refrescos e envolve a redução do reagente Folin-Dennis, em meio básico, pelo tanino presente na amostra, produzindo uma coloração azul intensa que é medida na região do visível. O resultado é expresso em ácido tânico.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, cubeta de 10 mm, balança analítica, lã de vidro, chapa de aquecimento, balões volumétricos de 100, 500 e 1000 mL, balão de 1000 mL com junta esmerilhada, condensador de refluxo, pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 mL e proveta de 50 mL.

Reagentes

Reagente Folin-Dennis – Adicione 100 g de tungstato de sódio hidratado, 20 g de ácido fosfomolíbdico e 50 mL de ácido fosfórico em 750 mL de água. Refluxe por 2 horas, esfrie e dilua para 1000 mL em um balão volumétrico.

Solução saturada de carbonato de sódio – Pese 35 g de carbonato de sódio anidro e dissolva em 100 mL de água a (70-80)ºC, resfrie por uma noite e semeie a solução super-saturada com cristal de carbonato de sódio decahidratado ($Na_2CO_3.10H_2O$). Após a cristalização, filtre através de lã de vidro.

Solução-padrão recém-preparada de ácido tânico – Dissolva 100 mg de ácido tânico em um balão volumétrico de 1000 mL com água. Esta solução tem uma concentração de 0,1 mg de ácido tânico por mL.

Procedimento – Pipete 5 mL da amostra para um balão volumétrico de 100 mL contendo 75 mL de água. Adicione 5 mL do reagente Folin-Dennis,10 mL da solução saturada de carbonato de sódio e complete com água. A solução deve ser filtrada no caso de turvação. Agite bem e faça a leitura a 760 nm após 30 minutos, usando um branco preparado da mesma forma com água em lugar da amostra.

Preparação da curva-padrão – Pipete alíquotas de 1 a 10 mL de solução-padrão de ácido tânico em balões volumétricos de 100 mL, contendo 75 mL de água. Adicione 5 mL do reagente Folin-Dennis, 10 mL da solução saturada de carbonato de sódio e complete com água. Agite bem e faça a leitura após 30 minutos a 760 nm, contra o branco. Trace a curva-padrão, registrando os valores de absorbância nas ordenadas e as concentrações de ácido tânico em mg/100 mL, nas abcissas.

Cálculo

$$\frac{C \times 100}{A} = \text{ácido tânico, em mg/100 mL}$$

C = concentração de ácido tânico na amostra correspondente à leitura da curva-padrão.
A = volume da amostra em mL.

Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 952.03) Arlington: A.O.A.C., 1995. chapter 29. p. 16-17.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria n° 76 de 27-11-1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 03-12-1986. Seção I, p.18152-18173. Métodos Analíticos.

256/IV Determinação de quinina pelo método espetrofotométrico

Baeia-se na determinação espectrofotométrica da quinina, em meio ácido, na região do ultravioleta e é aplicável à análise de água tônica

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, cubeta de quartzo de 10 mm, banho-maria, balão volumétrico de 100 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 e 25 mL.

Reagentes

Solução de ácido clorídrico 0,1 M
Solução de hidróxido de sódio 0,5 M

Solução-padrão de cloridrato de quinina – Dissolva 100 mg de cloridrato de quinina anidro em 10 mL de HCl 0,1 M ou 100 mg de cloridrato de quinina em 20 mL de NaOH a 0,5 M e complete o volume com água a 100 mL (1 mg de cloridrato de quinina equivale a 0,817 mg de quinina anidra).

Procedimento – Pipete 25 mL da amostra descarbonatada em balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com solução de HCI 0,1 M. Determine a absorbância da amostra a 347,5 nm, usando a solução de HCI 0,1 M como branco.

Preparação da curva-padrão – Pipete alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 mL da solução-padrão em balões volumétricos de 100 mL. Complete os volumes com solução de HCl 0,1 M. Leia as absorbâncias dos padrões a 347,5 nm, usando solução de HCl 0,1 M como branco. Construa um gráfico da absorbância versus concentração de cloridrato de quinina em mg/100 mL.

Cálculo

$$\frac{C \times 100 \times 0{,}817}{A} = \text{quinina anidra, em mg/100 mL}$$

C = concentração de cloridrato de quinina na amostra correspondente à leitura na curva-padrão
A = volume da amostra em mL.

Referência Bibliográfica

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria n° 76 de 27-11-1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 03-12-1986.Seção I, p.18152-18173. Métodos Analíticos.

257/IV Determinação de acessulfame-K, sacarina e aspartame, ácidos benzóico e sórbico e cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência

Aplicável às amostras de refrigerante dietético ou de baixa caloria.

Material

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) equipado com detector UV/VIS, coluna ODS em fase reversa (tamanho de 15 x 4,5 cm com 5 µ de partículas), injetor manual com capacidade de 20 µL (ou automático), *software* para controlar o equipamento e efetuar a análise dos dados, equipamento para obtenção de água ultra-pura (tipo Milli-Q), banho de ultra-som, membrana de filtração Hv com diâmetro de 47 cm com porosidade de 0,45 µ, unidade filtrante do tipo Millex com poro de 0,45 µ, potenciômetro com escala graduada em ≤ 0,1 unidades de pH, agitador magnético, barra magnética, balança analítica, balões volumétricos de 10, 25, 50 e 100 mL, funil, bastão de vidro, conjunto de filtração de solventes, seringa de 50 µL, *vials* de 1 e 2 mL, pipetas volumétricas de 5 e 10 mL, frascos de 1000 mL para armazenamento e descarte de fase móvel e béqueres de 100, 500 mL e 1000 mL.

Reagentes

Sacarina com pureza miníma de 95%
Acessulfame-K com pureza miníma de 95%
Cafeína com pureza miníma de 95%
Ácido benzóico com pureza miníma de 95%
Ácido sórbico com pureza miníma de 95%
Aspartame com pureza miníma de 95%
Ácido fosfórico
Fosfato dibásico de potássio
Acetonitrila grau cromatográfico
Metanol grau cromatográfico

Soluções-padrão estoque a 0,1 g/100 mL – Para os padrões de sacarina, acessulfame-K, cafeína e ácido sórbico, pese 0,1 g , dissolva com água ultra-pura e complete o volume de 100 mL com o mesmo solvente. Para o aspartame e o ácido benzóico, pese 0,1 g, dissolva em 40 mL de metanol e complete o volume de 100 mL com água ultra-pura.

Solução-padrão de trabalho – Pipete 5 mL de cada uma das soluções-padrão estoque para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água ultra-pura. Filtre em unidade filtrante (tipo Millex com poros 0,45 µ) em *vials* de 2 mL. Desgaseifique no ultra-som.

Solução-tampão – Dissolva fosfato dibásico de potássio em 1 litro de água ultra-pura (Milli-Q) na concentração de 0,03 M e acerte o pH para 5 com uma solução a 10% de ácido fosfórico. Quando o refrigerante contiver cafeína e ácido benzóico, acerte o pH desta solução para 4,8, para uma melhor separação na coluna cromatográfica.

Fase móvel – Misture 900 mL de solução-tampão de fosfato 0,03 M com 100 mL de acetonitrila. Utilize o agitador magnético para uma melhor homogeinização. Filtre a fase móvel em membrana Hv.

Procedimento – Ajuste o cromatógrafo às condições do método conforme as instruções do fabricante, passando a fase móvel primeiramente. Vazão de fluxo de 1,0 mL/min; temperatura ambiente, volume de injeção 20 µL, comprimento de onda: λ 230 nm (para o aspartame utilize λ 214 nm). Injete a solução-padrão e as soluções diluídas da amostra, no mínimo, em triplicata. Quantifique as áreas dos picos dos analitos.

Notas: Alternativamente à quantificação por padronização externa, pode-se usar também a curva-padrão.

Os padrões podem ser injetados numa única solução, ou separadamente, conforme a melhor conveniência.

Cálculo

$$\frac{A_a \times C_p}{A_p} \times Fd = \text{concentração do analito na amostra em g/100 mL}$$

A_a = área do pico do analito da amostra
C_p = concentração do analito na solução dos padrões
A_p = área do pico do analito na solução dos padrões
Fd = fator de diluição da amostra

Referências bibliográficas

TYLER, T. A. Liquid chromatographic determination of sodium saccharin, caffeine, aspartame and sodium benzoate in cola beverages. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 67, n. 4, p. 745-747, 1984.

LAWRENCE, J. F.; CHARBONNEAU, C. F. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 71, n. 5, p. 934-937, 1988.

NAGATO, L. A. F.; CANO, C. B.; BARSOTTI, R. C. F. Efeito do pH na análise simultânea de edulcorantes, conservadores e cafeína por cromatografia líquida em refrigerantes dietéticos e de baixa caloria. **Anais do IV Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Campinas, p. 56, 2002.

258/IV Determinação de ciclohexilsulfamato (sais de ciclamato) em bebidas dietéticas e de baixa caloria pelo método gravimétrico

O método é aplicável às soluções aquosas e bebidas carbonatadas límpidas e baseia-se na formação de precipitado de sulfato de bário, que é separado, incinerado e quantificado por gravimetria.

Material

Estufa, mufla, bomba de vácuo, banho-maria, cadinho de Gooch, balança analítica, dessecador, fibra de óxido de alumínio ou papel de fibra de vidro, alonga de vidro para conexão do cadinho de Gooch, béquer de 250 mL, kitassato de 500 mL, pipeta volumétrica de 100 mL, vidro de relógio e pipeta graduada de 10 mL e bastão de vidro.

Reagentes

Ácido clorídrico
Solução de cloreto de bário a 10% m/v
Solução de nitrito de sódio a 10% m/v

Procedimento – Pipete 100 mL ou um volume de amostra que contenha de 10 a 300 mg de ciclamato de sódio ou de cálcio. Adicione 10 mL de HCl e 10 mL de solução de $BaCl_2$ a 10%. Agite e deixe em repouso por 30 minutos. Se houver formação de precipitado, filtre e lave com água. Ao filtrado ou à solução límpida, adicione 10 mL de solução de $NaNO_2$ a 10%. Agite, cubra com um vidro de relógio e aqueça em banho-maria por pelo menos duas horas. Agite em intervalos de meia hora. Remova do banho-maria e deixe em repouso por uma noite. Filtre o precipitado em cadinho de Gooch, contendo fibra de óxido de alumínio ou papel de fibra de vidro, previamente tarado em mufla, lave e seque em estufa a 100ºC. Incinere em mufla a 550ºC. Resfrie em dessecador, pese o precipitado de sulfato de bário e determine a quantidade de ciclamato presente na amostra.

Cálculo

$$\frac{N \times 100}{A} = \text{sulfato de bário, g/100 mL}$$

N = massa de sulfato de bário, em g
A = volume da amostra em mL

Calcule o teor de ciclamato conforme os valores a seguir:

Massa do sulfato de bário (%) x 0,8621 = ciclamato de sódio por cento m/v
Massa do sulfato de bário (%) x 0,9266 = ciclamato de cálcio.2 H_2O por cento m/v
Massa do sulfato de bário (%) x 0,7679 = ácido ciclâmico por cento m/v

Referência Bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 957.10) Arlington: A.O.A.C., 1995. chapter 29. p. 44.

259/IV Determinação do resíduo seco pelo método gravimétrico

Procedimento – Pipete 10 mL da amostra homogeneizada e descarbonatada, em cápsula tarada. Leve a cápsula ao banho-maria fervente e evapore até a secura. Coloque em estufa a 105 ºC, por meia hora aproximadamente, e proceda como descrito no método **015/IV.**

Referências bibliográficas

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria n° 76 de 27-11-1986, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial, Brasília, 03-12-1986.Seção I, p.18152-18173. Métodos Analíticos.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1:*Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 333.

260/IV Determinação de glicídios redutores em glicose

Procedimento – Pipete 10 mL da amostra homogeneizada num balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água e proceda conforme **038/IV**.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1:*Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 333.

261/IV Determinação de glicídios não redutores em sacarose

Procedimento – Pipete 10 mL da amostra homogeneizada e descarbonatada em um balão volumétrico de 100 mL. Para amostras de pós para refrescos e xaropes artificiais, pese de 1 a 3 g, conforme a concentração de açúcares na amostra. Coloque o balão com a amostra em banho-maria por 1 hora e proceda conforme **039/IV**.

Referência Bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1:*Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 334.

262/IV Corantes orgânicos artificiais – Análise qualitativa

Material

Banho-maria, capela de segurança para solventes, lã branca pura (20 cm), régua de 20 cm, papel Whatman nº 1 (20 x 20) cm, béqueres de 25 e 100 mL, bastão de vidro, capilar de vidro e cuba de vidro (21 x 21 x 10) cm.

Reagentes

Ácido clorídrico
Hidróxido de amônio
Padrões de corantes orgânicos artificiais a 0,1 % m/v

Procedimento – Pipete 10 mL ou pese 10 g da amostra homogeneizada em um béquer de 100 mL; no caso de amostras em pó, dissolva 10 g em 20 mL de água, adicione o pedaço de lã pura e misture bem. Acrescente 0,5 mL de ácido clorídrico e coloque o béquer em banho-maria fervente. Quando o corante artificial da amostra ficar impregnado na lã, retire e lave-a com água corrente. Coloque-a em um béquer de 25 mL e adicione 0,5 mL de hidróxido de

amônio. Em seguida, adicione 10 mL de água e coloque em banho-maria até que a solução adquira uma coloração igual à da lã. Retire a lã e reduza o líquido à metade por evaporação. Aplique, com capilar, as soluções dos padrões de corantes e a solução da amostra assim obtida, no papel de cromatografia, e coloque-o na cuba com o solvente mais adequado para a separação dos corantes, seguindo o procedimento descrito no método **086/IV**. Compare o aparecimento das manchas da amostra quanto à cor e aos fatores de resolução (R_f) com os respectivos padrões de corantes orgânicos artificiais.

Referência Bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1:*Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 406.

Colaboradores
Cristiane Bonaldi Cano, Leticia Araujo Farah Nagato, Miriam Solange Fernandes Caruso e Maria Cristina Duran

CAPÍTULO **XI**

CACAU E CHOCOLATE

XI CACAU E CHOCOLATE

Cacau

Os principais componentes do cacau são: açúcares, amido, lipídios (manteiga de cacau), protídios, teobromina, cafeína, taninos, corantes naturais (antocianinas) e substâncias inorgânicas (sais de potássio e fósforo). As principais determinações a serem realizadas no cacau são: umidade (**012/IV**), cinzas (**018/IV**), glicidios redutores em glicose (**038/IV**), glicídios não-redutores em sacarose (**039/IV**), lipídios (**032/IV**), protídios (**036/IV**) ou (**037/IV**), fibra alimentar (**045/IV** e **046/IV**) e teobromina (**101/IV**).

Chocolate e produtos à base de chocolate

Chocolates são produtos à base de cacau contendo açúcar, aromatizantes, estabilizantes e conservadores. As determinações mais usuais são: umidade (**012/IV**), cinzas (**018/IV**), glicídios redutores em glicose (**038/IV**), glicídios não-redutores em sacarose (**039/IV**), fibra alimentar (**045/IV** e **046/IV**), lipídios (**032/IV)** e protídios (**036/IV** ou **037/IV**), além da análise cromatográfica em fase gasosa dos lipídios extraídos, para a pesquisa de gorduras estranhas à manteiga de cacau. Nesta classe de produtos estão incluídos os bombons, pós ou misturas achocolatadas e doces variados, cujo principal componente é o cacau. As determinações mais usuais incluem aquelas relacionadas para os chocolates, além da pesquisa de corantes artificiais (**051/IV**) que podem estar presentes.

263/IV Determinação de lipídios com hidrólise prévia

Este método refere-se à determinação dos lipídios em produtos à base de chocolate com alto teor de sacarose, tais como: chocolate em pó, mistura achocolatada e bombons. O princípio do método baseia-se na hidrólise prévia da amostra, extração e

quantificação do resíduo obtido após a remoção do solvente.

Material

Chapa elétrica, balança analítica, estufa, dessecador, frasco Erlenmeyer de 250 mL com boca esmerilhada 24/40, balão de fundo chato de 250 mL com boca esmerilhada 24/40, vidro de relógio, funil, pérolas de vidro ou cacos de porcelana, bastão de vidro, extrator Soxhlet, condensador de refluxo longo com extremidade inferior 24/40, condensador de refluxo de bolas adaptável ao Soxhlet, cartucho de extração, papel de filtro e algodão.

Reagentes

Solução de ácido clorídrico 3 M
Éter de petróleo
Areia diatomácia

Procedimento – Pese 10 g de amostra previamente homogeneizada. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 250 mL com boca esmerilhada 24/40. Adicione 100 mL da solução de ácido clorídrico 3 M e algumas pérolas de vidro ou cacos de porcelana. Leve a refluxo por cerca de uma hora sob aquecimento. Resfrie e adicione (1-2) g de areia diatomácia (auxiliar de filtração). Filtre em papel de filtro duplo, previamente umedecido. Lave o resíduo com água fria até a obtenção de um filtrado neutro. Observe se o filtrado não apresenta vestígios de óleos ou gorduras. Coloque o papel de filtro duplo contendo o resíduo sobre o vidro de relógio e leve à estufa a 50ºC por uma hora. Transfira para um cartucho de extração, cobrindo-o com um chumaço de algodão. Tare um balão de fundo chato de 250 mL e acople ao extrator. Coloque o cartucho no extrator de Soxhlet, adicione éter de petróleo e mantenha sob extração contínua e aquecimento por seis horas. Retire o cartucho e remova o solvente por destilação. Seque o resíduo e mantenha o balão com o extrato em estufa a 105ºC por cerca de duas horas. Esfrie em dessecador e pese. Repita as operações de secagem e pesagem até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{lipídios por cento m/m}$$

N = nº de g de lipídios extraídos
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

U.K. FEEDING STUFFS (SAMPLING AND ANALYSIS) REGULATIONS. The determination of oil in feeding stuffs nº 1119. 1982, appendix I. p. 9-11.

264/IV Pesquisa de gorduras estranhas em chocolate

A composição dos lipídios do chocolate pode indicar a adição de gorduras estranhas à manteiga de cacau. A alteração na composição de ácidos graxos ou a presença de determinados ácidos graxos, ausentes na manteiga de cacau, pode evidenciar uma adulteração. Por exemplo, a presença de ácidos graxos *trans* pode indicar adição de gordura vegetal parcialmente hidrogenada ao chocolate. Por este método, parte dos lipídios da amostra extraídos pelo método de Soxhlet são transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos, preparados conforme os métodos **054/IV**, **055/IV** ou **056/IV**, separados e quantificados por cromatografia em fase gasosa.

Material

Seringa de capacidade máxima de 10 µL, graduada em 0,1 µL, balões volumétricos de 25 e 100 mL, flaconete (*vial*) de 1,5 mL, balança analítica, agitador do tipo vortex, cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama, integrador ou computador, sistema de injeção do tipo *split*, coluna capilar de sílica fundida com fases estacionárias de ciano propil siloxana ou equivalente (por ex: SP2340 com 60 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 µm, CP-Sil 88 com (50-100) m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,20 µm).

Reagentes

Mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos variando de C4 a C24 – Dilua, com n-hexano, o conteúdo da ampola contendo 100 mg da mistura de padrões, em balão volumétrico de 25 mL. Distribua em *vials* de 1,5 mL e armazene em freezer. Esta solução será utilizada para identificar os ésteres metílicos de ácidos graxos. Determine os fatores de correção da resposta de cada componente no detector de ionização de chama.

n-Hexano, grau CLAE
Gás de arraste para DIC: hidrogênio (pureza 99,999%)
Gases auxiliares para DIC: nitrogênio (pureza 99,999%) e ar seco (livre de hidrocarbonetos).

Procedimento – Extraia os lipídios da amostra de chocolate. Prepare os ésteres metílicos de acordo com um dos métodos **054/IV**, **055/IV** ou **056/IV**. Estabeleça as seguintes condições cromatográficas: gás de arraste hidrogênio, velocidade linear entre (15 - 25) mL/min; programação da temperatura da coluna 60ºC (2 minutos), 1ª rampa de 15ºC/min até 135ºC (1 minuto), 2ª rampa de 3ºC/min até 215ºC (5 minutos); temperatura do injetor 220ºC; temperatura do detector 220ºC, razão de divisão da amostra 1:50. Analise uma mistura de padrões de referência de ésteres metílicos de ácidos graxos de composição conhecida nas mesmas condições empregadas na análise da amostra e determine o tempo de retenção (ou distância de retenção) para cada éster metílico. Faça a identificação por comparação dos tempos de retenção da amostra e dos padrões.

Cálculo

Calcule a porcentagem de área de cada componente, em relação à soma das áreas de todos os picos. O resultado será expresso como porcentagem de ésteres metílicos (método de normalização de área ou normalização de área corrigida **343/IV**). Verifique se há gorduras estranhas no chocolate comparando o perfil cromatográfico de ácidos graxos com o da manteiga de cacau.

$$\frac{A_{Agi} \times 100}{\Sigma A} = \text{porcentagem de éster metílico de ácido graxo m/m}$$

A_{Agi} = área do pico correspondente ao componente
ΣA = soma das áreas de todos os picos

Referências bibliográficas

AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists´ Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 2-66: Preparation of methyl esters of long chain fatty acids).

AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists´ Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography).

AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists´ Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S.,

1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 1d-91: Determination of fatty acids in edible oils and fats by capillary GLC).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4thed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1997 (A.O.C.S. Official Method Ce 1f-96 Determination of *cis* and *trans* fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 177-178.

Colaboradores

Deise Aparecida Pinatti Marsiglia, Maria Lima Garbelotti, Cláudio de Flora e Sabria Aued Pimentel

CAPÍTULO **XII**

CAFÉ, CHÁ E DERIVADOS

XII CAFÉ, CHÁ E DERIVADOS

Café é o nome dado às sementes de diferentes variedades de *Coffea* (*C. arábica, C. robusta*). Quando apenas livres do endosperma, os grãos constituem o chamado café verde. Seus constituintes mais importantes são: óleos, celulose, água e açúcares redutores. Quando seus grãos são torrados, os açúcares sofrem caramelização, a umidade diminui e desenvolve-se o odor característico de café.

A análise do café inclui as determinações de umidade por Karl Fisher (**014/IV**), cinzas (**018/IV**), cinzas insolúveis em ácido clorídrico (**024/IV**), extrato etéreo (**032/IV**), extrato aquoso e cafeína. Como avaliação preliminar do teor de umidade, pode-se recorrer à determinação por aquecimento direto a 105°C (**012/IV**).

Eventualmente, para fins de informação nutricional, as determinações de resíduo seco, cinzas, lipídios, protídios, carboidratos por diferença e minerais (**cap. XXIII**), podem ser realizadas na infusão do café, preparada conforme indicações na embalagem.

265/IV Café – Extrato aquoso

A determinação do extrato aquoso indica a quantidade de extrato solúvel do café e representa um dado valioso, principalmente quando temos misturas de outras substâncias no café. O método é aplicável à amostras em pó provenientes de café em grãos torrados e café torrado e moído. O método consiste de uma extração a quente (ebulição) com água.

Material

Balança analítica, chapa de aquecimento com refrigerador de refluxo, estufa, dessecador com sílica gel, espátula, pinça, béqueres de 50 e 100 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada, frasco Erlenmeyer de 500 mL, balão volumétrico de 500 mL, funil de vidro de 10 cm e pipeta volumétrica de 50 mL.

Procedimento – Pese 2 g da amostra em béquer de 50 mL. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada com auxilio de 200 mL de água quente. Adapte o refrigerador de refluxo ao frasco e deixe em ebulição por uma hora. Transfira a solução ainda quente para um balão volumétrico de 500 mL. Lave o frasco com 100 mL de água quente e transfira esta água para o balão. Resfrie o balão e complete o volume com água. Filtre para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Pipete 50 mL do filtrado e transfira para um béquer de 100 mL, previamente tarado em estufa a 105°C. Evapore em banho-maria até a secagem. Aqueça em estufa a 105°C por uma hora, resfrie em dessecador e pese.

Cálculo

$$\frac{100 \times N \times 10}{P} = \text{extrato aquoso por cento m/m}$$

N = nº de g do extrato aquoso
P= nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOFLO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed. 1985. p. 190.

266/IV Café – Determinação de cafeína pelo método espectrofotométrico

A cafeína pode ser determinada por vários métodos, sendo comum a todos eles a necessidade de uma extração e purificação inicial. A partir desta extração, a dosagem poderá ser feita por espectrofotometria na região ultravioleta ou por cromatografia líquida de alta resolução. Os métodos espectrofotométricos baseados na absorção característica da cafeína a 274 nm são os mais recomendáveis para a rotina. A etapa precedente à quantificação é realizada por extração ácida, ou seja, pela carbonização seletiva da matéria orgânica da amostra com ácido sulfúrico para a liberação da cafeína, seguida de sua extração com clorofórmio. A cafeína extraída é quantificada por espectrofotometria na região ultravioleta a 274 nm.

Material

Balança analítica, estufa, banho-maria, rotavapor, espectrofotômetro UV/VIS, dessecador com sílica gel, espátula, pinça, béquer de 100 mL, pipeta graduada de 5 mL, funil de separação de 500 mL, funis de vidro de 7 e 10 cm, balão de fundo chato de 300 mL com junta esmerilhada, balões volumétricos de 100 e 1000 mL e bureta de 10 mL.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Clorofórmio
Cafeína anidra

Procedimento - Pese 1 g de amostra em béquer de 100 mL. Adicione cuidadosamente, evitando a formação de grumos, com auxilio de um bastão de vidro, 4 mL de ácido sulfúrico. Homogeneíze. Aqueça em banho-maria por 15 minutos, agitando ocasionalmente. Adicione, com cuidado, 50 mL de água quente. Aqueça em banho-maria por mais 15 minutos. Filtre a quente para um funil de separação de 500 mL através de papel de filtro umedecido com água. Lave o béquer e o filtro com 3 porções de 10 mL de água quente acidulada com o ácido sulfúrico. Receba o filtrado e as águas de lavagem no funil de separação. Deixe o filtrado esfriar. Adicione 30 mL de clorofórmio e agite por dois minutos. Espere separar as camadas. Decante a camada do clorofórmio (inferior) através de papel de filtro umedecido com clorofórmio, para um balão de fundo chato de 300 mL. Repita a extração com mais três porções de 30 mL de clorofórmio. Evapore o extrato de clorofórmio obtido, em rotavapor. Dissolva o resíduo com água quente, filtrando para um balão volumétrico de 1000 mL. Deixe esfriar. Complete o volume com água e homogeneíze. Meça a absorbância a 274 nm, em espectrofotômetro. Determine a quantidade de cafeína correspondente, usando curva-padrão previamente estabelecida.

Nota: no caso de café torrado e moído descafeinado, a diluição final será para um balão volumétrico de 200 mL.

Curva-padrão – Seque a cafeína em estufa a 105°C durante uma hora. Resfrie em dessecador. Prepare uma solução-estoque de cafeína com 10 mg/100 mL de água. Com auxílio de bureta de 10 mL, transfira alíquotas de 2, 3, 5, 7, 8, 10 e 15 mL para balões volumétricos de 100 mL. Complete o volume com água e homogeneíze. Meça a absorbância a 274 nm, usando um branco de água para calibração do espectrofotômetro. Com os valores obtidos, construa a curva-padrão por regressão linear dos valores de absorbância obtidos (eixo y) e das concentrações de cafeína (eixo x) expressa em mg/100 mL. Utilize nos cálculos os valores dos coeficientes linear e angular da reta (absortividade considerando o caminho óptico da cubeta de 1 cm).

Cálculo

$$\frac{(A-b)\times v}{a\times P\times 1000} = \text{cafeína por cento m/m}$$

A = absorbância da amostra
b = coeficiente linear da reta obtida na curva-padrão
a = absortividade (coeficiente angular da reta obtida na curva-padrão)
v = volume em mL da diluição do resíduo de cafeína
P = massa da amostra em g

Referências Bibliográficas

CORTES, F.F. Nota sobre um novo processo de doseamento de cafeína no café. **Rev. Soc. Bras. Quim**., v. 4, p. 105, 1933 (Nota prévia).

INSTITUTO ADOFLO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1:*Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*. São Paulo: IMESP. 3.ed 1985. p. 190-192.

Infusão do café

A infusão do café consiste na bebida preparada a partir do pó de café torrado e moído em água fervente seguida de filtração, cujas proporções seguem geralmente as instruções de modo de preparo descritas na embalagem.

A análise da infusão do café filtrado inclui as determinações de resíduo seco, cinzas, lipídios, protídios, descritos neste capítulo, carboidratos por diferença e eventualmente minerais (**cap. XXIII**).

Nota: na infusão, o teor de nitrogênio procedente da cafeína não é significativo, podendo não ser descontado do teor de nitrogênio total, para fins do cálculo do teor de proteína.

267/IV Infusão do café – Determinação do resíduo seco

Procedimento – Prepare a infusão aquosa do café conforme modo de preparo descrito na embalagem. Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 20 mL da infusão para uma cápsula de porcelana, previamente tarada em estufa e proceda como em **015/IV**.

268/IV Infusão do café – Determinação de cinzas

Procedimento - Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 20 mL da infusão para uma cápsula de porcelana, previamente tarada em mufla a 550°C e proceda como em **018/IV**.

269IV Infusão do café – Determinação de lipídios

Material

Estufa, rotavapor, dessecador com sílica gel, pinça, pipeta volumétrica de 50 mL, funil de separação de 500 mL, proveta de 100 mL, funis de vidro de 7 e 10 cm e balão de fundo chato de 300 mL com boca esmerilhada.

Reagentes

Clorofórnio
Metanol
Sulfato de sódio anidro

Procedimento – Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 50 mL da infusão para um funil de separação de 500 mL. Adicione 100 mL de clorofórmio e 100 mL de metanol. Agite o funil de separação por cinco minutos. Espere separar as camadas. Decante a camada do clorofórmio (inferior) e filtre através de papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, para um balão de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL tarado a 105°C. Lave o papel de filtro com clorofórmio. Evapore o solvente num rotavapor e proceda como em **353/IV.**

270IV Infusão do café – Determinação de protídios

Procedimento – Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 20 mL da infusão diretamente para o balão de Kjeldahl e proceda como em **036/IV** ou **037/IV**.

Café solúvel

Café solúvel ou extrato de café desidratado é o produto obtido da desidratação ou secagem apropriada do extrato aquoso do café (*Coffea arábica* e outras espécies do gênero *Coffea*) torrado e moído, apresentando-se na forma de pó ou granulado. O produto tende a ser higroscópico, devendo ser mantido em recipiente hermeticamente fechado.

A análise do café solúvel inclui as determinações de umidade por Karl Fischer (**014/IV**) ou como avaliação preliminar, por aquecimento direto a vácuo a 70°C (**013/IV**), cinzas (**018/IV**), pH, cafeína e glicídios redutores e não redutores em glicose, descritos neste capítulo.

Caso seja necessário para fins de informação nutricional, podem ser realizadas as determinações de resíduo seco, cinzas, lipídios, protídios, carboidratos por diferença e eventualmente minerais (**cap. XXIII**), no café solúvel preparado conforme indicações da embalagem.

271/IV Café solúvel – Determinação do pH

Procedimento – Prepare uma solução aquosa a 2% m/v da amostra de café solúvel e proceda como em **017/IV.**

272/IV Café solúvel – Determinação de cafeína

Procedimento – Pese 0,5 g da amostra e proceda como em **266/IV** para cafeína em café torrado e moído. No caso do café solúvel descafeinado, faça a diluição do resíduo do extrato clorofórmico para um balão de 200 mL.

273/IV Café solúvel – Determinação de glicídios redutores e não redutores em glicose

Os métodos de determinação de glicídios estão baseados nas propriedades físicas das suas soluções ou no poder redutor dos glicídios mais simples. O método gravimétrico resume-se em pesar uma quantidade de óxido de cobre I precipitado de uma solução de cobre II por um volume conhecido da solução de glicídios redutores. O peso do precipitado (Cu_2O) é convertido em glicose de acordo com a **Tabela 1**.

Material

Balança analítica, chapa de aquecimento com refrigerador de refluxo, chapa elétrica, estufa, bomba de vácuo, dessecador com sílica gel, espátula, pinça, béquer de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada, frasco Erlenmeyer de 300 mL, balão volumétrico de 250 mL, balão de fundo chato de 250 mL, funil de vidro de 10 cm, bureta de 25 mL, pipeta graduada de 5 mL, pipeta volumétrica de 25 mL, proveta de 100 mL, cadinho de vidro com placa porosa nº 4 e kitassato.

Reagentes

Ácido clorídrico
Hidróxido de sódio a 40% m/v
Ferrocianeto de potássio a 6% m/v
Acetato de zinco a 12% m/v
Soluções de Fehling A e B (**Apêndice I**)

Procedimento - Pese 2 g de amostra em béquer de 100 mL. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada com auxílio de 100 mL de água. Adicione 5 mL de ácido clorídrico. Coloque em chapa de aquecimento e adapte o refrigerador de refluxo ao frasco e deixe em ebulição por três horas. Espere esfriar a solução e adicione hidróxido de sódio a 40%, elevando o pH próximo de 6,5, acompanhando com auxílio de papel indicador. Transfira quantativamente para balão volumétrico de 250 mL com auxilio de água. Adicione 5 mL de ferrocianeto de potássio a 6% e 5 mL de acetato de zinco a 12%. Complete o volume, agite, deixe 15 minutos em repouso e filtre. Verifique o pH e, se necessário, adicione mais algumas gotas de hidróxido de sódio a 40%, até que a solução se torne alcalina, com pH próximo de 9 e filtre novamente a solução. Em um balão de fundo chato de 250 mL, adicione 25 mL da solução de Fehling A e 25 mL da solução de Fehling B e 30 mL de água. Leve para aquecer na chapa elétrica até entrar em ebulição. Adicione 20 mL do filtrado por intermédio de uma bureta. Deixe em ebulição por dois minutos, para formar o precipitado de óxido de cobre I. A solução deve permanecer azul demonstrando que os reagentes estão em excesso em relação à quantidade de glicose presente na amostra. Filtre a solução quente através de cadinho de placa porosa nº 4, tarado em estufa a 105°C acoplado ao kitassato, com auxílio de bomba de vácuo. Lave o balão com água quente, até completa remoção do precipitado. Caso o resíduo de óxido de cobre I (Cu_2O) fique retido nas paredes do balão, coloque algumas pérolas de vidro ou cacos de porcelana e deixe ferver com um pouco de água, agitando vigorosamente em movimento circular. Filtre para o cadinho, tomando cuidado para não verter as pérolas de vidro ou cacos de porcelana no cadinho. Seque o cadinho em estufa a 105°C durante uma hora, esfrie em dessecador e pese.

Cálculo

Verifique, na **Tabela 1** de conversão, a quantidade de glicose em mg correspondente à massa obtida de óxido de cobre I em mg. Caso não encontre o valor exato, faça uma regra de três.

$$\frac{100 \times A \times a}{P \times V} = \text{glicídios redutores e não redutores em glicose, por cento m/m}$$

A = volume em mL da solução de P g da amostra
a = massa de glicose em g obtida na **Tabela 1**
P = massa da amostra em g
V = volume em mL da solução da amostra usado na titulação

Tabela 1 – Conversão de mg de óxido de cobre I em mg de glicose

Cu_2O	11.3	12.4	13.5	14.6	15.8	16.9	18.0	19.1	20.3	21.4	22.5	23.6
Glicose	4.6	5.1	5.6	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	8.9	9.4	9.9
Cu_2O	24.8	25.9	27.0	28.1	29.3	30.4	31.5	32.6	33.8	34.9	36.0	37.2
Glicose	10.4	10.9	11.4	11.9	12.3	12.8	13.3	13.8	14.3	14.8	15.3	15.7
Cu_2O	38.3	39.4	40.5	41.7	42.8	43.9	45.0	46.2	47.3	48.4	49.5	50.7
Glicose	16.2	16.7	17.2	17.7	18.2	18.7	19.2	19.7	20.1	20.6	21.1	21.6
Cu_2O	51.8	52.9	54.0	55.2	56.3	57.4	58.5	59.7	60.8	61.9	63.0	64.2
Glicose	22.1	26.6	23.1	23.6	24.1	24.6	25.1	25.6	26.1	26.5	27.0	27.5
Cu_2O	65.3	66.4	67.6	68.7	69.8	70.9	72.1	73.2	74.3	75.4	76.6	77.7
Glicose	28.0	28.5	29.0	29.5	30.0	30.5	31.0	31.5	32.0	32.5	33.0	33.5
Cu_2O	78.8	79.9	81.1	82.2	83.3	84.4	85.6	86.7	87.8	88.9	90.1	91.2
Glicose	34.0	34.5	35.0	35.5	36.0	36.5	37.0	37.5	38.0	38.5	39.0	39.5
Cu_2O	92.3	93.4	94.6	95.7	96.8	97.9	99.1	100.2	101.3	102.5	103.6	104.7
Glicose	40.0	40.5	41.0	41.5	42.0	42.5	43.0	43.5	44.0	44.5	45.0	45.5
Cu_2O	105.8	107.0	108.1	109.2	110.3	111.5	112.6	113.7	114.8	116.0	117.1	118.2
Glicose	46.0	46.5	47.0	47.5	48.0	48.5	49.0	49.5	50.0	50.6	51.1	51.6
Cu_2O	119.3	120.5	121.6	122.7	123.8	125.0	126.1	127.2	128.3	129.5	130.6	131.7
Glicose	52.1	52.6	53.1	53.6	54.1	54.6	55.1	55.6	56.1	56.7	57.2	57.7
Cu_2O	132.8	134.0	135.1	136.2	137.4	138.5	139.6	140.7	141.9	143.0	144.1	145.2
Glicose	58.2	58.7	59.2	59.7	60.2	60.7	61.3	61.8	62.3	62.8	63.3	63.8
Cu_2O	146.4	147.5	148.6	149.7	150.9	152.0	153.1	154.2	155.4	156.5	157.6	158.7
Glicose	64.3	64.9	65.4	65.9	66.4	66.9	67.4	68.0	68.5	69.0	69.5	70.0
Cu_2O	159.9	161.0	162.1	163.2	164.4	165.5	166.6	167.8	168.9	170.0	171.1	172.3
Glicose	70.5	71.1	71.6	72.1	72.6	73.1	73.7	74.2	74.7	75.2	75.7	76.3
Cu_2O	173.4	174.5	175.6	176.8	177.9	179.0	180.1	181.3	182.4	183.5	184.6	185.8
Glicose	76.8	77.3	77.8	78.3	78.9	79.4	79.9	80.4	81.0	81.5	82.0	82.5
Cu_2O	186.9	188.0	189.1	190.3	191.4	192.5	193.6	194.8	195.9	197.0	198.1	199.3
Glicose	83.1	83.6	84.1	84.6	85.2	85.7	86.2	86.7	87.3	87.8	88.3	88.9
Cu_2O	200.4	201.5	202.7	203.8	204.9	206.0	207.2	208.3	209.4	210.5	211.7	212.8
Glicose	89.4	89.9	90.4	91.0	91.5	92.0	92.6	93.1	93.6	94.2	94.7	95.2
Cu_2O	213.9	215.0	216.2	217.3	218.4	219.5	220.7	221.8	222.9	224.0	225.2	226.3
Glicose	95.7	96.3	96.8	97.3	97.9	98.4	98.9	99.5	100.0	100.5	101.1	101.6

Cu_2O	227.4	228.5	229.7	230.8	231.9	233.0	234.2	235.3	236.4	237.6	238.7	239.8
Glicose	102.2	102.7	103.2	103.8	104.3	1104.8	105.4	105.9	106.5	107.0	107.5	108.1
Cu_2O	240.9	242.1	243.1	244.3	245.4	246.6	247.7	248.8	249.9	251.1	252.2	253.3
Glicose	108.6	109.2	109.7	110.2	110.8	111.3	111.9	112.4	112.9	113.5	114.0	114.6
Cu_2O	254.4	255.6	256.7	257.8	258.9	260.1	261.2	262.3	263.4	264.6	265.7	266.8
Glicose	115.1	115.7	116.2	116.7	117.3	117.8	118.4	118.9	119.5	120.0	120.6	121.1
Cu_2O	268.0	269.1	270.2	271.3	272.5	273.6	274.7	275.8	277.0	278.1	279.2	280.3
Glicose	121.7	122.2	122.7	123.3	123.8	124.4	124.9	125.5	126.0	126.6	127.1	127.7
Cu_2O	281.5	282.6	283.7	284.8	286.0	287.1	288.2	289.3	290.5	291.6	292.7	293.8
Glicose	128.2	128.8	129.3	129.9	130.4	131.0	131.6	132.1	132.7	133.2	133.8	134.3
Cu_2O	295.0	296.1	297.2	298.3	299.5	300.6	301.7	302.9	304.0	305.1	306.2	307.4
Glicose	134.9	135.4	136.0	136.5	137.1	137.7	138.2	138.8	139.3	139.9	140.4	141.0
Cu_2O	308.5	309.6	310.7	311.9	313.0	314.1	315.2	316.4	317.5	318.0	319.7	320.9
Glicose	141.6	142.1	142.7	143.2	143.8	144.4	144.9	145.5	146.0	6146.6	147.2	147.7
Cu_2O	322.0	323.1	324.2	325.4	326.5	327.6	328.7	329.9	331.0	332.1	333.3	334.4
Glicose	148.3	148.8	149.4	150.0	150.5	151.1	151.7	152.2	152.8	153.4	153.9	154.5
Cu_2O	335.5	336.6	337.8	338.9	340.0	341.1	342.3	343.4	344.5	345.6	346.8	347.9
Glicose	155.1	155.6	156.2	156.8	157.3	157.9	158.5	159.0	159.6	160.2	160.7	161.3
Cu_2O	349.0	350.1	351.3	352.4	353.5	354.6	355.8	356.9	358.0	359.1	360.3	361.4
Glicose	161.9	162.5	163.0	163.6	164.2	164.7	165.3	165.9	0166.5	167.0	167.6	168.2
Cu_2O	362.5	363.6	364.8	365.9	367.0	368.2	369.3	370.4	371.5	372.7	373.8	374.9
Glicose	168.8	169.3	169.9	170.5	171.1	171.6	172.2	172.8	173.4	173.9	174.5	175.1
Cu_2O	376.0	377.2	378.3	379.4	380.5	381.7	382.8	383.9	385.0	386.2	387.3	388.4
Glicose	175.7	176.3	176.8	177.4	178.0	178.6	179.2	179.7	180.3	180.9	181.5	182.1
Cu_2O	389.5	390.7	391.8	392.9	394.0	395.2	396.3	397.4	398.5	399.7	400.8	401.9
Glicose	182.7	183.2	183.8	184.4	185.0	185.6	186.2	186.8	187.3	187.9	188.5	189.1
Cu_2O	403.1	404.2	405.3	406.4	407.6	408.7	409.8	410.9	412.0	413.2	414.3	415.4
Glicose	189.7	190.3	190.9	191.5	192.0	192.6	193.2	193.8	1194.4	195.0	195.6	196.2
Cu_2O	416.6	417.7	418.8	419.9	421.1	422.2	423.3	424.4	425.6	426.7	427.8	428.9
Glicose	196.8	197.4	198.0	198.5	199.1	199.7	200.3	200.9	201.5	202.1	202.7	203.3
Cu_2O	430.1	431.2	432.3	433.5	434.6	435.7	436.8	438.0	439.1	440.0	441.0	442.5
Glicose	203.9	204.5	205.1	205.7	206.3	206.9	207.5	208.1	208.7	2209.3	3209.9	210.5
Cu_2O	443.6	444.7	445.8	447.0	448.1	449.2	450.3	451.5	452.6	453.7	454.8	456.0
Glicose	211.1	211.7	212.3	212.9	213.5	214.1	214.7	215.3	215.9	216.5	217.1	217.8
Cu_2O	457.1	458.2	459.3	460.5	461.6	462.7	463.0	465.0	466.1	467.2	468.4	469.5
Glicose	218.4	219.0	219.6	220.2	220.8	221.4	8222.0	222.6	223.3	223.9	224.5	225.1
Cu_2O	470.6	471.7	472.9	474.0	475.1	476.2	477.4	478.5	479.6	480.7	481.9	483.0
Glicose	225.7	226.3	227.0	227.6	228.2	228.8	229.5	230.1	230.7	231.4	232.0	232.7
Cu_2O	484.1	485.2	486.4	487.5	488.6	489.7						
Glicose	233.3	234.0	234.7	235.3	236.1	236.9						

Fonte: A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists – 1995 – Appendix C, p. 57-65

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** (method 44.115) 16 th ed. Arlington: A.O.A.C., 1995. chapter 44. p. 8.

Café solúvel preparado

O café solúvel preparado consiste na bebida preparada a partir do café solúvel (em pó ou granulado) dissolvido em água, cujas proporções seguem geralmente as instruções de modo de preparo descritas na embalagem. A análise do café solúvel preparado inclui as determinações de resíduo seco, cinzas, lipídios, protídios, carboidratos por diferença e eventualmente minerais (**cap. XXIII**). A determinação de resíduo seco deve ser realizada na bebida preparada conforme indicações na embalagem e as demais determinações no produto tal qual se apresenta (pó ou granulado), sendo que os resultados devem ser convertidos para a bebida preparada, considerando a proporção entre água e café solúvel indicados para a porção, na rotulagem.

274/IV Café solúvel preparado – Determinação do resíduo seco

Procedimento – Prepare a solução aquosa de café solúvel, cujas proporções seguem as instruções de modo de preparo descrito na embalagem. Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 20 mL da solução para uma cápsula de porcelana, previamente tarada e proceda como em **015/IV**.

Chá

Chá é o produto constituído de partes de vegetais, inteiras, fragmentadas ou moídas, obtido por processo tecnológico apropriado à cada espécie, utilizado exclusivamente na preparação de bebida alimentícia por infusão ou decocção em água potável, não podendo ter finalidade farmacoterapêutica.

A análise do chá inclui entre as principais determinações, umidade por aquecimento direto a 105°C (**012/IV**), cinzas **(018/IV**), cinzas insolúveis em ácido clorídrico (**024/IV**), extrato aquoso (**265/IV**), cafeína (**266/IV**) e óleos essenciais (**503/IV**).

Caso seja necessário para fins de informação nutricional, podem ser realizadas na infusão do chá as determinações de resíduo seco, cinzas, lipídios, protídios e descritos neste capítulo, carboidratos por diferença e, eventualmete, minerais (**cap. XXIII**).

Infusão do chá

A infusão do chá consiste na bebida preparada a partir da decocção do chá em água fervente, seguida de filtração, conforme as instruções de modo de preparo descritas na embalagem.

As determinações realizadas na infusão do chá, seguem os mesmos procedimentos descritos para infusão de café.

Mate

Erva mate ou simplesmente mate é o produto constituído pelas folhas e ramos das variedades de *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída, obtido por tecnologia apropriada. Quando as folhas são secas e tostadas, constituem o mate queimado ou simplesmente mate e quando não são denominadas mate verde.

As determinações usuais entre outras incluem: umidade por aquecimento direto a 105°C **(012/IV)**, cinzas **(018/IV)**, cinzas insolúveis em ácido clorídrico **(024/IV)**,extrato aquoso (**265/IV**) e cafeína (**266/IV**). Caso seja necessário para fins de informação nutricional, podem ser realizadas na infusão do mate as determinações de resíduo seco, cinzas, lipídios, protídios, carboidratos por diferença e eventualmente minerais (**cap. XXIII**).

275/IV Mate – Determinação de cafeína

Procedimento – Pese 2 g da amostra e proceda como em determinação de cafeína em café torrado e moído (**266/IV**).

Infusão do mate

A infusão do mate consiste na bebida preparada a partir do mate em água fervente seguida de filtração, conforme as instruções de modo de preparo descritas na embalagem. As determinações realizadas na infusão do mate seguem os mesmos procedimentos descritos para infusão do café.

Mate solúvel

CAPÍTULO **XIII**

CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS

XIII

CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS

Carnes

Denominam-se carnes as partes musculares comestíveis das diferentes espécies de animais de açougue, manipuladas em condições higiênicas e provenientes de animais que ao abate se apresentam em boas condições de saúde, certificados por médico veterinário responsável pelo serviço de inspeção. As carnes frescas ou *in natura* deverão ser entregues ao consumo conservadas sob refrigeração, sendo avaliadas quanto à sua segurança higiênico-sanitária, classificação, presença de conservadores, características físico-químicas, microscópicas, microbiológicas e sensoriais.

A composição da carne depende da espécie animal, raça, sexo, maturidade, regime alimentar e localização anatômica do músculo, entre outras características. Em geral, a carne contém aproximadamente 75% de seu peso em água (com variação de 65 a 80%). As proteínas representam 19% (com variação de 16 a 22%) e são um dos componentes mais importantes no aspecto nutricional. As substâncias nitrogenadas não protéicas (ATP, ADP, IMP, NAD, NADP, creatina, aminoácidos livres etc.) totalizam 1,5%. O conteúdo lipídico da carne é muito variável, entre 1,5 e 13%. O teor de carboidratos é baixo, variando de 0,5 a 1,3% do peso. Além disso, as carnes contêm numerosos compostos inorgânicos que, somados, totalizam 1%.

As determinações de umidade (**012/IV**), proteínas (**036/IV** ou **037/IV**), carboidratos (**041/IV**), cinzas (**018/IV**), gorduras (**032/IV**), gorduras saturadas (**053/IV**), sódio (**cap. XXIII**) e colesterol são procedentes em estudos nutricionais, composição para formulações e rotulagem. Eventualmente, pode tornar-se pertinente determinar o valor de pH (**017/IV**), a presença de aditivos como: fosfatos (**031/IV**), corantes artificiais (**051/IV**) e nitritos, bem como a presença de resíduos de pesticidas (**cap. XX**), hormônios e antibióticos, a pesquisa de substâncias anti-oxidantes,

como sulfitos, utilizados para mascarar processos de alteração que a carne sofre durante a estocagem (deterioração) e de contaminantes inorgânicos como arsênio, estanho e chumbo (**cap. XXIII**).

As carnes e seus derivados estão sujeitos a alterações por reações químicas, físicas e microbiológicas. As alterações físicas e químicas decorrem principalmente da modificação e/ou degradação de proteínas e lipídios, que é provocada tanto pela ação de agentes naturais, por exemplo, o oxigênio, como por enzimas hidrolíticas endógenas naturalmente presentes na carne e ainda por outras substâncias (enzimas, peptídios, aminas etc.) produzidas por microrganismos. A decomposição dos aminoácidos sulfurados da carne, com desprendimento de compostos de enxofre, poderá ser avaliada qualitativamente pela reação de Éber para gás sulfídrico (**004/IV**). A reação de Éber para amônia (**005/IV**) poderá ser utilizada para evidenciar o início das alterações deteriorativas das carnes. Além da ação enzimática, a deterioração também pode resultar de reações oxidativas, como, por exemplo, a oxidação lipídica, que é uma alteração dependente da disponibilidade de oxigênio, da temperatura de armazenamento e da composição do músculo, evidenciada qualitativamente pela reação de Kreis (**279/IV**). As condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos processadores, manipuladores, distribuidores e comerciais também são fatores de destaque na determinação da aceitabilidade das carnes, pois estas oferecem condições favoráveis para o crescimento de bactérias, sendo importantes tanto as deteriorativas como as patogênicas, que podem chegar ao produto pela inadequada manipulação. Portanto, todos esses aspectos poderão comprometer as características sensoriais, assim como a qualidade nutricional e microbiológica das carnes.

Preparo da Amostra

Retire porções de várias regiões da peça, sem grandes vasos, ossos, peles, tecidos adiposos e aponevroses, tendo, entretanto, o cuidado de não descaracterizar a amostragem. Homogeneíze passando o material três vezes em moedor de carne, utilizando disco de 3 mm de diâmetro. Misture bem após cada moagem. Alternativamente, utilize um processador de alimentos para o preparo da amostra. Particular atenção deve ser dada a certos tipos e/ou cortes de carne, para assegurar distribuição uniforme de gordura e tecido conjuntivo na moagem, sempre objetivando que a amostragem represente realmente a peça inicial ou amostra recebida. A cada intervalo, reincorpore com auxílio de espátula a gordura aderida à superfície do equipamento e o tecido conjuntivo preso nas facas. Utilize amostra representativa com peso de 200 g. Coloque a amostra em frasco hermeticamente fechado. De preferência, comece imediatamente todas as determinações. Se houver alguma interrupção, mantenha a amostra sob refrigeração para inibir a decomposição. Guarde a 5°C por até 24 h ou congele a amostra a -18°C. No momento da pesagem, ho-

mogeneíze reincorporando a possível separação de líquido, gelatina ou gordura.

Características Sensoriais

O exame sensorial da aparência, textura, odor e sabor é de grande importância, pois são essas características as que mais se alteram no início da deterioração das carnes.

Aparência – Própria de cada espécie, uniforme, sem acúmulo sangüíneo, sem corpos estranhos e sem presença de limo na superfície. A gordura deve ser de uma tonalidade que varia de branca a amarela e não deve apresentar pontos hemorrágicos. A cor das carnes deve ser uniforme, sem manchas escuras ou claras, variando nas espécies bovina e bubalina, do vermelho-escuro ou pardacento ao vermelho-cereja ou claro; na espécie suína, a superfície de corte deverá apresentar-se com uma aparência marmórea (em diferentes níveis ou intensidades), sem flacidez e não exsudativa, apresentando matizes de vermelho-rosado-escuro (carne suína escura, firme e seca – Tipo DFD) ou vermelho-róseo (carne suína fresca) a róseo-pálido ou esbranquiçado (carne suína pálida, mole e exsudativa – Tipo PSE). Nos eqüinos e muares, seu tom é vermelho-escuro, enquanto nas aves varia de amarelo-avermelhado ao amarelo-esbranquiçado. Essas colorações podem também ser relacionadas ao frescor e ao tempo de exposição do corte ao ambiente, pois à medida que o corte envelhece há escurecimento da superfície, que se torna progressivamente escura ou acinzentada, podendo apresentar iridicência ou colorações esverdeada e azulada, pela ação de microrganismos.

Textura – A textura da carne normalmente é firme, compacta, elástica e ligeiramente úmida. A gordura deve mostrar-se firme ao tato. No início da putrefação, a superfície torna-se viscosa ou limosa e a carne perde a firmeza.

Odor – As carnes frescas devem apresentar um odor suave, agradável e característico de cada espécie, tornando-se amoniacal, sulfídrico e depois pútrido, quando em estado de deterioração. A gordura também deve ter odor suave e característico, sendo indicativos de alteração os odores modificados ou o odor a ranço. O odor da carne suína tende a ser mais intenso em animais inteiros (odor espermático), sendo mais perceptível quando a carne é aquecida (**276/IV**), o que facilita o desprendimento e, portanto, a percepção dos odores impróprios ou alterados.

Sabor – Suave e característico, próprio de cada espécie. O sabor varia consideravelmente segundo a espécie, raça, idade e regime alimentar do animal. Um complexo conjunto de substâncias químicas é responsável pelo sabor da carne.

276/IV Prova de cocção

A prova de cocção auxilia na determinação das alterações das características sensoriais de aparência, odor, textura e sabor, sendo utilizada para carne fresca, carne cozida e produtos cárneos. O aquecimento da amostra facilita o desprendimento de vapores e, portanto, a percepção de odores impróprios ou alterados. Fundamenta-se na observação das modificações de textura, odor e sabor ocorridas nos alimentos em início de decomposição, ressaltadas quando a amostra é submetida ao aquecimento.

Material

Bico de Bünsen, chapa aquecedora ou banho-maria, balança semi-analítica, béquer de 250 mL e vidro de relógio.

Procedimento – Utilize amostra moída devidamente homogeneizada. Em um béquer de 250 mL, coloque aproximadamente 20 g de amostra, cubra com água e tampe com vidro de relógio. Aqueça até o início dos primeiros vapores, destampe e perceba o odor dos vapores produzidos. O odor amoniacal ou sulfídrico é facilmente identificado. Ferva por mais 5 minutos e observe as características da carne e do caldo. O sabor deve ser próprio e a textura firme.

Referência bibliográfica

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes*. II – Métodos físicos e químicos. Brasília (DF), 1981. cap. I, p. 2.

277/IV Prova para sulfito com verde de malaquita

Baseia-se na mudança de cor do corante orgânico verde de malaquita na presença de anidrido sulfuroso e de sulfitos.

Material

Balança semi-analítica, espátula, cápsula de porcelana e pipeta graduada de 1 mL.

Reagente

Solução de verde malaquita a 0,02% m/v

Procedimento – Pese 3,5 g da amostra em cápsula de porcelana. Acrescente 0,5 mL da solução de verde malaquita. Misture com o auxílio de espátula por 1 a 2 minutos. A presença de sulfito na amostra descora a solução de verde malaquita. Na ausência de sulfito, a amostra adquire uma coloração verde azulada.

Nota: esta reação também é positiva para outros agentes redutores. No caso de positividade realize teste confirmatório (**049/IV)** ou **(050/IV)**.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 268-269.

278/IV Prova para nitritos

Nitritos de sódio ou de potássio são conservadores usados em produtos cárneos. Estão relacionados com a obtenção de cor e sabor e com as atividades antioxidante e antimicrobiana, contudo, proibidos em carnes frescas e congeladas. Demonstrou-se que os nitritos reagem com certas aminas formando as nitrosaminas, substâncias potencialmente cancerígenas. No organismo infantil, os nitritos interagem com a hemoglobina afetando o transporte de oxigênio, resultando em condição patológica denominada metemoglobinemia. A determinação qualitativa da presença dos nitritos em carnes frescas ou congeladas é feita pela reação de Griess-Ilosvay. Baseia-se na reação de diazotação dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico, de coloração rósea.

Material

Tubos de ensaio de 25 mL, papel de filtro qualitativo e pipetas graduadas de 1 e 10 mL.

Reagentes

Solução de ácido sulfanílico – Pese 0,5 g de ácido sulfanílico e dissolva em 150 mL de solução aquosa de ácido acético (1+4).

Solução de cloridrato de alfa-naftilamina – Dissolva 0,4 g de cloridrato de alfa-naftilamina em 150 mL de ácido acético (1+4). Se não dissolver bem, aqueça, deixe em repouso e decante ou filtre em algodão.

Procedimento – Faça um macerado da amostra com água e filtre. Em um tubo de ensaio, pipete 10 mL do filtrado, adicione 1 mL da solução de ácido sulfanílico e agite. Adicione 1 mL de cloridrato de alfa-naftilamina e agite fortemente. Em presença de nitritos, haverá formação de coloração rósea mais ou menos intensa, dependendo da quantidade de nitrito que foi adicionada.

Nota: amostras que possuem nitrito em excesso produzem com o reativo de Griess-IIosvay uma coloração vermelha fugaz, que passa a amarela-parda como se fosse prova negativa.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.100-101.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes*. II – Métodos físicos e químicos. Brasília (DF),1981. cap. I, p. 5-6.

Produtos cárneos

Os produtos cárneos são preparados com carnes de animais de açougue, sadios e abatidos sob inspeção sanitária, ou outros tecidos animais comestíveis, submetidos a processos tecnológicos adequados, crus ou cozidos. Os produtos são classificados segundo a forma, o tamanho, o sistema de acondicionamento, o processo ou a técnica de fabricação e condimentação. As características sensoriais de aparência devem ser próprias e a superfície deve apresentar-se com características típicas para cada produto. Modificações como superfície úmida, limosa, sebosa, pegajosa ou viscosa indicam alteração. O invólucro não deve estar danificado. O produto deve traduzir a utilização de tecnologia adequada para a sua elaboração. A coloração deve ser uniforme e característica, rósea no produto curado cozido e avermelhada no curado cru, sem manchas ou alterações (esverdeada ou pardacenta) da cor característica. A consistência deve ser própria, com maior ou menor firmeza conforme o tipo de produto. O odor e o sabor devem ser característicos e a parte gordurosa não deve apresentar-se com odor ou sabor a ranço. As determinações usuais são, entre outras, pH (**017/IV**), umidade (**012/IV**), proteínas (**036/IV** ou **037/IV**), carboidratos (**041/IV**), cinzas (**018/IV**), gorduras (**032/IV**), gorduras saturadas **(053/IV)**, colesterol, sódio **(cap. XXIII)**, cloretos em cloreto de sódio (**028/IV** ou **029/IV**), corantes artificiais (**051/IV**), reação de Éber para amônia (**005/IV**), prova de rancidez nas partes gordurosas, amido, hidroxiprolina, prova para formaldeído, conservadores nitritos e nitratos e proteínas de soja.

279/IV Reação de Kreis

A prova para ranço na gordura pela reação de Kreis é válida para produtos cárneos e partes gordurosas de carnes. Rancidez é o nome que se dá às alterações no odor e no sabor dos óleos e gorduras. A floroglucina reage em meio ácido com os produtos de oxidação dos triglicerídios, resultando em composto de condensação de coloração rósea ou vermelha, cuja intensidade é proporcional à oxidação.

Material

Rotavapor, balança semi-analítica, papel de filtro, frasco Erlenmeyer de 500 mL com boca esmerilhada e tampa, balão de fundo chato de 300 mL com boca esmerilhada, proveta de 150 mL, proveta de 50 mL com boca esmerilhada e tampa, pipeta de 5 mL, funil e papel de filtro qualitativo.

Reagentes

Éter
Ácido clorídrico

Solução de floroglucina em éter a 0,1% m/v

Procedimento – Separe cerca de 30 g das partes gordurosas da carne ou 100 g do produto cárneo previamente triturado. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Adicione de 100 a 150 mL de éter e deixe em contato, ao abrigo da luz e calor, por uma noite. Filtre a mistura através de papel de filtro para um balão de fundo chato de 300 mL. Evapore o filtrado em rotavapor sob vácuo à temperatura máxima de 40ºC. Transfira, com auxílio de uma pipeta, 5 mL da gordura fundida (resíduo do balão) para uma proveta de 50 mL. Adicione 5 mL de ácido clorídrico, tampe e agite por 30 segundos. Adicione 5 mL de solução de floroglucina, tampe e agite novamente por 30 segundos. Deixe em repouso por 10 minutos. Na presença de ranço, a camada inferior apresentará uma coloração rósea ou vermelha.

Nota: se a intensidade da coloração for fraca, compare a camada inferior com uma solução de permanganato de potássio a 0,0012% (3,8 mL de uma solução 0,002 M diluída para 100 mL). Se a intensidade for a mesma, ou inferior, pode-se deixar de levar em consideração o resultado, contanto que as características sensoriais do produto sejam satisfatórias.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 260.

280/IV Prova para formaldeído

O formaldeído é considerado uma substância conservante de material biológico. Sua adição é proibida em alimentos. A floroglucina reage com o formaldeído em meio alcalino produzindo o derivado hidroximetilado, de coloração salmão fugaz.

Material

Balança semi-analítica, aquecedor elétrico, condensador de Liebig, balão de Kjeldahl de 600 mL, proveta de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 200 mL, tubos de ensaio, pipetas graduadas de 1, 2 e 5 mL.

Reagentes

Solução de ácido fosfórico a 20% v/v
Solução de floroglucina ($C_6H_6O_3$) a 1% m/v
Solução de hidróxido de sódio a 10% m/v

Procedimento – Pese cerca de 10 g da amostra, previamente triturada e homogeneizada em béquer. Transfira para balão de Kjeldahl com auxílio de 80 mL de solução de ácido fosfórico a 20%. Ligue o balão ao conjunto de destilação de Liebig. Aqueça até ebulição e destile cerca de 40 mL em frasco Erlenmeyer de 200 mL. Coloque em tubo de ensaio 5 mL do destilado, adicione 1 mL da solução de floroglucina a 1% e 2 mL da solução de hidróxido de sódio a 10%. Na presença de formaldeído, aparecerá a coloração salmão fugaz e na sua ausência, a cor violeta. Observe a cor imediatamente após a adição dos reagentes.

Nota: esta metodologia não se aplica a produtos com características de ranço e produtos defumados.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 271-272.

281/IV Determinação espectrofotométrica de amido

A adição de amido é permitida em algumas classes de salsichas, mortadelas e outros produtos cárneos, respeitados os limites estabelecidos pela legislação vigente, específicos para cada classe de produto. Além do amido, que é um extensor utilizado para reduzir custos do produto final e auxiliar na retenção de água, outros ingredientes são empregados na elaboração, tais como: carne, sangue, vísceras comestíveis, gordura, proteínas de soja, aditivos e condimentos. Alguns deles estão presentes em grandes quantidades, podendo acarretar interferência na extração e dosagem do amido; outros contêm teores consideráveis de açúcares simples e de amido em sua composição, superestimando o valor real. O método baseia-se na determinação espectrofotométrica a 500 nm do composto colorido formado pela reação entre os reativos de Somogyi-Nelson e a glicose proveniente da hidrólise do amido. Com o objetivo de minimizar interferências (gorduras, proteínas e açúcares simples) e aumentar a eficiência das determinações, procede-se a uma extração prévia da amostra com éter de petróleo e álcool, para posterior hidrólise ácida e clarificação com reagentes Carrez. Esse método, assim como o de Fehling, baseia-se na redução do cátion Cu^{++} a Cu^{+}, e na oxidação do açúcar a ácido orgânico. O Cu^{+} é complexado com arsenomolibdato (reativo de Nelson), que possui um agente cromóforo, originando um complexo estável de coloração azul. A intensidade dessa coloração é proporcional à quantidade de açúcares redutores.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, centrífuga, balança analítica, estufa, chapa de aquecimento com aparelho de refluxo acoplado, papel indicador de pH, banho-maria, dessecador, papel de filtro, termômetro, béqueres de 500 e 1000 mL, balões volumétricos de 100, 250 e 1000 mL, tubos de centrífuga de 15 mL, pipetas graduadas de 5 e 10 mL, pipeta volumétrica de 1 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL com boca esmerilhada, tubos de Folin-Wu de 25 mL (**Figura 1**), cubeta de vidro com caminho óptico de 10 mm, bureta de 10 mL e proveta de 25 mL.

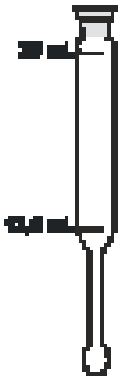


Figura 1 –Tubo de Folin-Wu de 25 mL.

Reagentes

Álcool
Éter de petróleo
Ácido clorídrico
Solução de hidróxido de sódio 40% m/v
Ácido sulfúrico (D = 1,84 g/mL)

Reativo A – Dissolva 25 g de carbonato de sódio, 25 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 20 g de bicarbonato de sódio e 200 g de sulfato de sódio anidro em 800 mL de água. Transfira para balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Reativo B – Dissolva, em água, 15 g de sulfato de cobre penta-hidratado. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL. Adicione duas gotas de ácido sulfúrico (D = 1,84 g/mL) e complete o volume com água.

Reativo de Somogyi ou reativo cúprico – Adicione 1 mL do reativo B a 25 mL do reativo A em proveta no momento da análise.

Reativo de Nelson – Dissolva 25 g de molibdato de amônio em 450 mL de água. Adicione 21 mL de ácido sulfúrico e agite. Adicione 2 g de arseniato de sódio hepta-hidratado, dissolvido em 25 mL de água. Deixe em banho a 37°C, por um período de 24 a 48 h.

Solução de acetato de zinco di-hidratado a 12% m/v – Pese 120 g de $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$, dissolva em 30 mL de ácido acético glacial e 600 mL de água. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 6% m/v – Pese 60 g de $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ e dissolva em 800 mL de água. Transfira para balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão de glicose a 250 µg/mL – Seque uma quantidade arbitrária de glicose anidra em estufa a 80°C, por 2h. Deixe esfriar em dessecador. Pese 250 mg, transfira quantitativamente para balão de 1000 mL com água, complete o volume e homogeneíze. A concentração dessa solução-estoque é 250 mg/L ou 250 µg/mL.

Procedimento – Pese 1 g da amostra homogeneizada, em tubo de centrífuga. Adicione 10 mL de solução álcool-éter de petróleo (1:3), agite com a ajuda de uma fina haste de ferro e centrifugue a 2500 rpm, por 5 minutos. Despreze o sobrenadante e repita o

procedimento anterior. Adicione 10 mL de álcool a 80% v/v a 80ºC ao resíduo, agite com fina haste de ferro e centrifugue a 2500 rpm por 5 minutos. Despreze o sobrenadante e repita a extração alcoólica. Seque o resíduo em estufa a 70ºC, por 20 minutos. Transfira o resíduo obtido no tubo de centrífuga, com auxílio de 100 mL de água, para um frasco Erlenmeyer de 500 mL com boca esmerilhada. Adicione 5 mL de ácido clorídrico. Hidrolise em refluxo por 90 minutos. Esfrie e neutralize o hidrolisado com solução de hidróxido de sódio a 40% até pH ± 7 (volume gasto aproximado 6 mL), verificando com papel indicador de pH. Transfira para um balão volumétrico de 250 mL e clarifique adicionando 5 mL de solução de acetato de zinco e 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio (reagentes Carrez). Complete o volume, tampe e agite com vigor. Deixe em repouso por 15 minutos, agitando vigorosamente varias vezes nesse período. Filtre para um frasco Erlenmeyer e reprecipite com hidróxido de sódio a 40% até pH ± 11 (gasto aproximado 0, 5 mL). Filtre, transfira 1 mL do filtrado para tubo de Folin-Wu e adicione 1 mL de reativo de Somogyi ou reativo cúprico, deixe imerso em banho-maria fervente por 20 minutos. (Verifique se após 20 minutos de fervura a tonalidade azulada permanece nos tubos; caso contrário, dilua a amostra e proceda novamente à reação com reativo cúprico.) Esfrie, adicione 1 mL de reativo de Nelson e complete o volume com água até a primeira marca do tubo de Folin-Wu (12,5 mL) e homogeneíze. Proceda às leituras de absorbância das soluções contra o branco de reagentes, no comprimento de onda 500 nm.

Nota: caso as soluções estejam concentradas, isto é, a absorbância obtida ultrapasse o maior valor da curva-padrão, dilua a amostra e repita a reação colorimétrica com os reativos de Somogyi-Nelson, ou repita a reação completando o volume para a segunda marca do tubo de Folin-Wu (25 mL). Neste caso, o resultado final (% de amido) deverá ser duplicado.

Curva-padrão – Transfira alíquotas de 0 (branco); 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mL da solução-padrão estoque de glicose para tubos de Folin-Wu. Adicione 1 mL de reativo de Somogyi ou reativo cúprico, deixe imerso em banho-maria fervente por 20 minutos. Esfrie, adicione 1 mL de reativo de Nelson, complete o volume com água até a primeira marca do tubo de Folin-Wu (12,5 mL) e homogeneíze. Proceda às leituras de absorbância das soluções contra o branco, no comprimento de onda 500 nm. Proceda à regressão linear dos valores de absorbância obtidos (eixo y) e das concentrações de glicose de 4, 8, 12, 16 e 20 µg/mL (eixo x). Utilize nos cálculos os valores dos coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1 cm).

Cálculos

$$\frac{(A-b)\times 0{,}3125}{a\times p} = \text{glicose, por cento}$$

Glicose (%) x 0,9 = amido por cento m/m

A = absorbância da amostra
b = coeficiente linear da curva-padrão de glicose
a = absortividade (coeficiente angular da curva-padrão de glicose)
p = massa (g) da amostra
0,3125 = fator de diluição
0,9 = fator de conversão de glicose para amido

Referência bibliográfica

AUED, S.; CARVALHO; J. B. de; T AVARES, M.; ZANELATTO, A. M.; BACETTI, L. B. Determinação de amido em salsichas: comparação entre os métodos de Fehling e de Somogyi-Nelson e avaliação de metodologia para extração do amido. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 50, n. 1/2, p. 251-256, 1990.

282/IV Determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina

Método de referência para determinação do aminoácido hidroxiprolina em carnes e produtos cárneos, expresso em % m/m. A hidroxiprolina é quantitativamente determinada como medida das proteínas colágenas de carnes e produtos cárneos. O tecido conjuntivo colagenoso contém 12,5% de hidroxiprolina quando o fator 6,25 (conversão nitrogênio para proteína) é utilizado, ou 14% quando o fator é 5,55. A amostra é hidrolisada com solução de ácido clorídrico em constante ebulição sob refluxo, a solução é filtrada e diluída. A hidroxiprolina é oxidada com cloramina T. A cor vermelha púrpura que se desenvolve após a adição de 4-dimetilaminobenzaldeído é medida espectrofotometricamente a 558 nm.

Material

Processador de alimentos, chapa elétrica equipada com condensador resfriado com água para refluxo, balança analítica, banho-maria com temperatura termostaticamente controlada a (60 ± 0,5)ºC, espectrofotômetro UV/VIS, cubeta de vidro de caminho óptico de 10 mm, papel de filtro qualitativo de diâmetro 12,5 cm, pHmetro, frascos Erlenmeyer com boca esmerilhada de 100, 250 e 500 mL, tubos de ensaio com tampa de 10 mL, balões volumétricos de 50, 100, 500 e 1000 mL e pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10 e 20 mL.

Reagentes

Ácido clorídrico 6 M – Misture volumes iguais de HCl e água.

Solução-padrão estoque de hidroxiprolina a 600 µg/mL – Dissolva 60 mg de hidroxiprolina em água. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. A solução é estável cerca de 2 meses a 4ºC. *Opção*: dissolva 120 mg em balão de 200 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão intermediária de hidroxiprolina a 6 µg/mL – Pipete 5 mL da solução-estoque em balão volumétrico de 500 mL. Complete o volume com água. Prepare a solução no dia de seu uso.

Solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina – Pipete 5, 10, 20 e 30 mL da solução intermediária em balão volumétrico de 50 mL. Complete o volume com água. Essas soluções-padrão de trabalho revelam concentrações de hidroxiprolina de 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 µg/mL, respectivamente. Prepare as soluções no dia de seu uso.

Solução-tampão (pH 6) – Dissolva 30 g de ácido cítrico mono-hidratado ($C_6H_8O_7.H_2O$), 15 g de hidróxido de sódio e 90 g de acetato de sódio tri-hidratado ($CH_3COONa{\cdot}3H_2O$) em cerca de 500 mL de água. Transfira a solução para balão volumétrico de 1000 mL. Adicione 290 mL de 1-propanol. Determine o pH e ajuste, se necessário, com ácido ou base. Complete o volume. A solução é estável por cerca de 2 meses a 4ºC e em frasco escuro.

Solução oxidante – Dissolva 1,41 g do reagente cloramina T em 100 mL da solução tampão pH 6. A solução é estável 1 semana a 4ºC, em frasco escuro.

Reagente de cor – Dissolva 10 g de 4-dimetilaminobenzaldeído em 35 mL de ácido perclórico a 60% m/m. Adicione vagarosamente, com agitação, 65 mL de 2-propanol. Prepare a solução no dia de seu uso.

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 4 g da amostra em duplicata em frascos Erlenmeyer de 250 ou 500 mL. A amostra não deve aderir às paredes laterais. Adicione 30 mL de HCl 6 M e algumas pérolas de vidro (ou cacos de porcelana) a cada frasco. Aqueça à fervura branda por 8 horas sob refluxo. Transfira quantitativamente o hidrolisado para balão volumétrico de 500 mL com água. Complete o volume e agite. Filtre a solução através de papel de filtro, em frasco Erlenmeyer de 500 mL. O filtrado é estável ao menos por 2 semanas a 4ºC. Dilua o filtrado com água em balão volumétrico, de modo

que a concentração de hidroxiprolina da diluição final esteja na faixa de 0,6 a 3,6 µg/mL. A diluição de 5 mL do filtrado para 50 mL é usualmente satisfatória. Pipete 2 mL da diluição final de cada amostra em tubos de ensaio. A cada tubo, adicione 1 mL da solução oxidante. Agite os tubos e deixe por (20 ± 2) minutos à temperatura ambiente. Adicione 1 mL do reagente de cor e misture vigorosamente. Feche cada tubo com tampa ou papel alumínio. Imediatamente, coloque os tubos em banho de água a (60 ± 0,5)ºC por exatamente 15 minutos. Resfrie os tubos em água corrente por 3 minutos. Meça a absorbância das soluções contra o branco de reagentes a (558 ± 2) nm.

Curva-padrão – Prepare a curva-padrão para cada série de medições. Transfira 2 mL de água (branco) e 2 mL de cada solução-padrão de trabalho aos tubos de ensaio e proceda à adição da solução oxidante e do reagente de cor conforme procedimento da amostra. Construa a curva com absorbância no eixo y e concentrações de hidroxiprolina 0,3; 0,6; 1,2 e 1,8 µg/mL no eixo x. Calcule os coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1 cm).

Cálculos

$$\frac{(A-b)}{a \times p} = \text{hidroxiprolina (H) em g/100 g}$$

A = absorbância do filtrado da amostra diluída 10 vezes (5 mL em 50 mL)
b = coeficiente linear da reta obtida na curva-padrão
a = absortividade, coeficiente angular da reta obtida na curva-padrão
p = peso da amostra (g)

H x 8 = tecido colagenoso (B) em g/100 g

Nota: tecido conjuntivo colagenoso contém 12,5% de hidroxiprolina se o fator de conversão de nitrogênio para proteína for de 6,25.

$$\frac{B \times 100}{\%\ \text{proteína total}} = \text{tecido colagenoso relativo (BR), em g/100 g}$$

% proteína total = teor de nitrogênio da amostra em g/100 g x 6,25

Notas
O cálculo é diferente em alguns países, com base nos diferentes fatores de conversão de nitrogênio e de hidroxiprolina.
O limite de quantificação do método é de 0,030 µg/mL de hidroxiprolina na alíquota de análise (com desvio-padrão relativo de 6,5%) e de 0,0075 g/100 g de hidroxiprolina na amostra (Della Torre *et al.* 2004).

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *O***fficial Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, (method 990.26). Arlington: A.O.A.C.,1995. chapter 39. p.13-5.

DELLA TORRE, LICHTIG. J.; BERAQUET, N.J. Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 63(1), 2004 (no prelo).

283/IV Determinação espectrofotométrica de nitritos

Baseia-se nas reações de diazotação de nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante é determinado espectrofotometricamente a 540 nm.

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, banho-maria, balão volumétrico âmbar de 50 mL, balões volumétricos de 100, 200, 250 e 1000 mL, provetas de 25 e 50 mL, béqueres de 100 e 200 mL, frasco Erlenmeyer de 250 ou de 500 mL, funil, papel de filtro qualitativo, pipeta graduada de 5 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 e 20 mL.

Reagentes

Utilize preferencialmente água deionizada isenta de nitritos e/ou nitratos no preparo dos reagentes e na realização da análise.

Solução de tetraborato de sódio deca-hidratado a 5% m/v – Dissolva 50 g de $Na_2B_4O_7.10H_2O$ em água e complete o volume até 1000 mL.

Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 15% m/v – Dissolva 150 g de $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ em água e complete o volume até 1000 mL.

Solução de acetato de zinco diidratado a 30% m/v ou sulfato de zinco hepta-hidratado a 30% m/v – Dissolva 300 g de $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$ em 30 mL de ácido acético glacial e 500 mL de água (aqueça brandamente, se necessário) e complete o volume até 1000 mL. Alternativamente, dissolva 300 g de $ZnSO_4.7H_2O$ em água e complete o volume até 1000 mL.

Reagente sulfanilamida a 0,5% m/v – Dissolva 1,25 g de $C_6H_8N_2O_2$ em 250 mL de solução de ácido clorídrico (1+1). Aqueça brandamente, se necessário. A solução é estável por 1 a 2 meses.

Reagente NED a 0,5% m/v – Dissolva 0,5 g de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$) em 100 mL de água. Aqueça brandamente, se necessário. Estoque em frasco âmbar sob refrigeração. A solução é estável por uma semana e deverá ser desprezada quando apresentar alteração da coloração.

Solução-padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$) a 0,2 g/L – Pese 200 mg de nitrito de sódio, previamente seco por 1 hora a 105°C, dissolva em água e dilua para 1000 mL. Essa solução-padrão estoque é estável por 2 semanas, se mantida a 4°C.

Solução-padrão de trabalho a 8 µg/mL – Pipete 10 mL da solução-padrão estoque de nitrito de sódio em um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com água.

Procedimento – Pese 10 g de amostra triturada e homogeneizada em um béquer de 200 mL. Adicione 5 mL de solução de tetraborato de sódio, misture com bastão de vidro e acrescente cerca de 50 mL de água quente (80°C). Deixe em banho-maria por 15 minutos, agitando freqüentemente com a baqueta. Proceda da mesma forma com um branco de reagentes sem a adição da amostra. Com auxílio do bastão de vidro e de um funil, transfira o conteúdo quantitativamente para balão volumétrico de 200 mL. Lave bem o béquer com aproximadamente 50 mL de água. Deixe esfriar e adicione 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio e 5 mL de solução de acetato de zinco (ou como alternativa, sulfato de zinco). Agite por rotação após a adição de cada reagente e complete o volume com água. Agite com vigor. Deixe em repouso por 15 minutos, agitando vigorosamente várias vezes nesse período. Filtre em papel de filtro qualitativo para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Pipete 10 mL do branco de reagentes e das amostras, respectivamente, para balões volumétricos âmbar de 50 mL. Adicione 5 mL de reagente sulfanilamida, deixe reagir por 5 minutos e adicione 3 mL de reagente NED, agitando após cada adição. Complete o volume com água e homogeneíze. Deixe em repouso por 15 minutos e faça a leitura da absorbância a 540 nm contra o branco de reagentes.

Curva-padrão – Pipete alíquotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mL da solução-padrão de trabalho de nitrito de sódio (8 µg/mL) para balões volumétricos de 50 mL. Adicione, a cada um, 5 mL de reagente sulfanilamida, misture por rotação e após 5 minutos, adicione 3 mL de reagente NED. Complete o volume e homogeneíze. Deixe a cor desenvolver por 15 minutos e determine a absorbância a 540 nm contra branco de reagentes. Construa a curva com os valores de absorbância no eixo y e de concentração de nitrito de sódio 0,16; 0,32; 0,48; 0,64; 0,80; 0,96 e 1,12 µg/mL no eixo x. Calcule os coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1 cm).

Cálculo

$$\frac{(A-b)\times 1000}{p\times a} = \text{nitrito de sódio, em mg/kg}$$

A = absorbância da amostra
b = coeficiente linear da reta obtida na curva-padrão
a = absortividade (coeficiente angular da reta obtida na curva-padrão)
p = massa da amostra em gramas
1000 = fator de diluição

Nota: o limite de quantificação do método é de 0,032 µg/mL de $NaNO_2$ (ou 0,021 µg/mL de NO_2^-) na alíquota de análise, com desvio padrão relativo de 3,7% (TAKEMOTO *et al.*, 1999**).**

Referências bibliográficas

BRASIL. Instrução Normativa n. 20, de 21 jul. 1999. Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Oficializa os Métodos Analíticos Físico-químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes – Sal e Salmoura. *Diário Oficial*, Brasília (DF), n.173, 9 set. 1999. Seção 1, p.30-31.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 97-98.

TAKEMOTO, E.; DELLA TORRE, J. C. de M.; LICHTIG, J. Nitrato em espinafre: validações de métodos colorimétricos. In: III SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS (SLACA), 1999. *Resumos...* Campinas: FEA-UNICAMP, 1999. p. 5.

284/IV Determinação espectrofotométrica de nitratos

O nitrato é reduzido a nitrito em coluna de cádmio metálico em meio alcalino. A reação baseia-se na diazotação dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante é determinado espectrofotometricamente a 540 nm.

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, banho-maria, coluna de cádmio, balões volumétricos âmbar de 50 mL, balões volumétricos de 100, 200, 250 e 1000 mL, provetas

de 25 e 50 mL, béqueres de 100 e 200 mL, frasco Erlenmeyer de 250 ou de 500 mL, funil, papel de filtro qualitativo, pipeta graduada de 5 mL e pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 e 20 mL.

Reagentes

Utilize preferencialmente água deionizada isenta de nitritos e/ou nitratos no preparo dos reagentes e na realização da análise.

Solução de tetraborato de sódio deca-hidratado a 5% m/v – Dissolva 50 g de $Na_2B_4O_7.10H_2O$ em água e complete o volume até 1000 mL.

Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 15% m/v – Dissolva 150 g de $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ em água e complete o volume até 1000 mL.

Solução de acetato de zinco di-hidratado a 30% m/v ou sulfato de zinco hepta-hidratado a 30% m/v – Dissolva 300 g de $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$ em 30 mL de ácido acético glacial e 500 mL de água (aqueça brandamente se necessário), complete o volume até 1000 mL. Alternativamente, dissolva 300 g de $ZnSO_4.7H_2O$ em água e complete o volume até 1000 mL.

Solução de EDTA a 5% m/v – Pese 5 g de $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$, dissolva com água e complete o volume de 100 mL. Guarde em frasco de polietileno.

Reagente sulfanilamida a 0,5% m/v – Dissolva 1,25 g de $C_6H_8N_2O_2$ em 250 mL de solução de ácido clorídrico (1+1). Aqueça brandamente se necessário. A solução é estável por 1 a 2 meses.

Reagente NED a 0,5% m/v – Dissolva 0,5 g de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$) em 100 mL de água. Aqueça brandamente, se necessário. Estoque em frasco âmbar sob refrigeração. A solução deve ser desprezada quando apresentar alteração da coloração (estável por uma semana).
Solução-tampão pH (9,6-9,7) – Dilua 20 mL de ácido clorídrico em 700 mL de água. Adicione 50 mL de hidróxido de amônio. Verifique o pH e ajuste para (9,6-9,7) com HCl ou NH_4OH, se necessário. Complete o volume até 1000 mL e misture.

Solução-tampão pH (9,6-9,7) diluída (1+9) – Dilua 100 mL da solução-tampão pH (9,6-9,7) em balão de 1000 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$) a 200 mg/L – Pese 200 mg de nitrito de

sódio, previamente seco por 1 hora a 105°C, dissolva em água e dilua para 1000 mL. Essa solução-padrão estoque é estável ao menos por 2 semanas, se mantida a 4°C.

Solução-padrão de trabalho a 8 µg/mL – Transfira 10 mL da solução-padrão estoque para um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão de nitrato de sódio ($NaNO_3$) – Desseque o nitrato de sódio por 1 hora a 105°C. Pese, com precisão, 0,1 g e dissolva em água. Adicione 50 mL da solução-tampão pH (9,6-9,7) e complete para balão de 100 mL com água. Essa solução-padrão é estável ao menos por duas semanas, se mantida a 4°C.

Solução-padrão de trabalho de nitrato de sódio a 10 µg/mL – Dilua 1 mL em balão de 100 mL com água. A solução-padrão de nitrato de sódio de trabalho deve ser preparada no momento da análise.

Preparação da coluna de cádmio (**Figura 2**) – Estire um tubo de vidro de 1,5 cm de diâmetro e 15 cm de altura (coluna). Compacte um pequeno chumaço de lã de vidro na extremidade afilada da coluna, acrescente uma camada de 1 cm de areia tratada.

Preparação do cádmio esponjoso: prepare 500 mL de solução de sulfato de cádmio a 20%. Adicione 5 barras de zinco metálico, deixando-as totalmente imersas na solução. À medida que o cádmio esponjoso for se depositando nas barras, retire utilizando bastão de vidro ou material plástico e transfira para um béquer contendo água em quantidade suficiente para cobrir todo o cádmio. Transfira aproximadamente 200 mL de água e o cádmio para um copo de liquidificador (de material plástico ou vidro), homogeneíze e em seguida passe em peneira *mesh* 20 ou 40, recolhendo em outro béquer, mantendo o cádmio sempre coberto com água. O cádmio triturado e peneirado é posto a decantar completamente. Remova a água sobrenadante e inicie o tratamento do resíduo (cádmio esponjoso) da seguinte maneira: cubra todo o cádmio com ácido clorídrico 2 M; deixe em contato (repouso) por 2 minutos, remova o ácido clorídrico sobrenadante; lave o cádmio com água até pH neutro; adicione ácido clorídrico 0,1 M até cobrir todo o cádmio, deixe em repouso por 15 minutos e remova o ácido clorídrico sobrenadante; lave o cádmio com água até pH neutro; decante e remova a água sobrenadante, adicione solução-tampão pH (9,6-9,7) (1+9) deixando em contato por, no mínimo, 15 minutos.

Decorrido esse tempo, o cádmio está pronto para ser compactado na coluna de vidro previamente preparada com lã de vidro e areia na extremidade. Transfira o cádmio em pequenas porções com o auxílio de água, evitando sua exposição ao ar, até atingir uma altura de 10 cm. Adapte ao topo da coluna um funil de separação de 100 mL, com haste de 10 mm de diâmetro e 25 cm de comprimento com uma rolha de silicone, prevenindo a entrada de ar na coluna. Dessa forma, permite-se o controle do fluxo. Mantenha a coluna sempre com água.

Figura 2.– Funil de separação acoplado à coluna de cádmio.

Regeneração ou ativação da coluna – A atividade da coluna de cádmio decresce depois de 24 horas, quando este é mantido em água. Regenere a coluna no começo de cada dia de utilização e após duas (uma duplicata) reduções (passagens) de amostras. Passe as soluções na coluna com fluxo de 10 mL/min respeitando a seguinte ordem: 25 mL de ácido clorídrico 0,1 M, 50 mL de água e 25 mL de solução-tampão diluída (1+9).

Procedimento – Pese 10 g de amostra triturada e homogeneizada em béquer de 200 mL. Adicione 5 mL de solução de tetraborato de sódio, misture com baqueta de vidro e acrescente cerca de 50 mL de água quente (80ºC). Deixe em banho-maria por 15 minutos, agitando freqüentemente com a baqueta. Proceda da mesma forma para o branco de reagentes sem a adição da amostra. Com auxílio da baqueta e de um funil, transfira o conteúdo quantitativamente para balão volumétrico de 200 mL. Lave bem o béquer com aproximadamente 50 mL de água. Deixe esfriar e adicione 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio e 5 mL de solução de acetato de zinco (ou como alternativa, sulfato de zinco). Agite por rotação após a adição de cada reagente e complete o volume com água. Agite com vigor. Deixe em repouso por 15 minutos, agitando vigorosamente várias vezes nesse período. Filtre em papel de filtro qualitativo para frasco Erlenmeyer de 250 mL. Transfira uma alíquota de 20 mL do filtrado (primeiramente do branco de reagentes e na seqüência, as amostras) para béquer de 100 mL. Adicione 5 mL da solução-tampão pH (9,6-9,7). Se turvar, adicione 2 mL de solução de EDTA 5%. Passe pela coluna de cádmio a um fluxo que não exceda 6 mL/minuto, recolhendo diretamente em balão volumétrico de 100 mL. Lave as paredes do béquer no mínimo três vezes consecutivas com aproximadamente 15 mL de água, passando seqüencialmente pela coluna de cádmio. Continue a passagem de água pela coluna até completar o volume de 100 mL no balão volumétrico. Pipete 10 mL (do branco de reagentes e das amostras), respectivamente, para balões volumétricos de 50 mL. Adicione 5 mL de reagente sulfanilamida, agite por rotação, após 5 minutos adicione 3 mL de reagente NED, complete o volume com água, misture e deixe desenvolver a cor por 15 minutos.

Determine a absorbância a 540 nm contra o branco de reagentes (passado pela coluna). O resultado refere-se ao teor de nitrito de sódio total. Desconte o valor de nitrito de sódio presente na amostra (reação colorimétrica do filtrado antes de passá-lo pela coluna de cádmio).

Eficiência ou controle da capacidade redutora da coluna – A eficiência da coluna pode ser testada passando solução-padrão de nitrato de sódio e determinando a quantidade de nitrito formado. Misture, em um béquer de 100 mL, uma alíquota de 20 mL da solução-padrão de trabalho de nitrato de sódio (10 µg/mL) e 5 mL da solução-tampão pH (9,6-9,7). Passe pela coluna de cádmio a um fluxo que não exceda 6 mL/minuto, recolhendo diretamente em balão volumétrico de 100 mL. Lave as paredes do béquer no mínimo três vezes consecutivas com aproximadamente 15 mL de água, passando seqüencialmente pela coluna de cádmio. Continue a passagem de água pela coluna até completar o volume de 100 mL no balão volumétrico. Pipete 10 mL para um balão volumétrico de 50 mL. Adicione 5 mL de reagente sulfamilamida, agite por rotação; após 5 minutos, adicione 3 mL de reagente NED e complete o volume com água. Após 15 minutos faça a leitura a 540 nm contra o branco de reagentes (passado pela coluna). Se a recuperação for inferior a 90%, isto é, a concentração de nitrato calculado menor que 90% do valor teórico esperado, regenere a coluna de cádmio.

Curva-padrão de nitrito de sódio – Pipete alíquotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mL da solução-padrão de trabalho de nitrito de sódio (8 µg/mL) para balões volumétricos de 50 mL. Adicione, a cada um, 5 mL de reagente sulfanilamida, misture por rotação e, após 5 minutos, adicione 3 mL de reagente NED. Complete o volume e homogeneíze. Deixe desenvolver a cor por 15 minutos e determine a absorbância a 540 nm contra o branco de reagentes. Construa a curva com os valores de absorbância no eixo y e de concentração de nitrito de sódio 0,16; 0,32; 0,48; 0,64; 0,80; 0,96 e 1,12 µg/mL no eixo x. Calcule os coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1 cm).

Cálculos

$$\frac{(A-b)\times 5000}{p\times a} = \text{nitrito de sódio total, em mg/kg}$$

$$\frac{(A-b)\times 1000}{p\times a} = \text{nitrito de sódio, em mg/kg}$$

Nitrato de sódio (em $NaNO_2$) = nitrito de sódio total - nitrito de sódio
Nitrato de sódio (em $NaNO_3$) = (nitrito de sódio total - nitrito de sódio) x 1,231
A = absorbância da amostra
b = coeficiente linear da curva padrão de nitrito de sódio

a = absortividade, coeficiente angular da curva-padrão de nitrito de sódio
p = massa da amostra em g
5000 = fator de diluição da amostra para cálculo do nitrito de sódio total
1,231 = fator de conversão de nitritos em nitratos
1000 = fator de diluição da amostra para cálculo do nitrito de sódio

$$\frac{(A-b)\times 30{,}8}{p\times a} = \text{eficiência \%}$$

A = absorbância do padrão nitrato de sódio
b = coeficiente linear da curva-padrão de nitrito de sódio
a = absortividade, coeficiente angular da curva-padrão de nitrito de sódio
p = massa nitrato de sódio padrão em g
30,8 = fator (diluição e conversão $NaNO_3$ / $NaNO_2$)

Nota: o limite de quantificação do método é de 0,032 µg/mL de $NaNO_2$ (ou 0,021 µg/mL de NO_2^-) na alíquota de análise, com desvio padrão relativo de 3,7% (TAKEMOTO et al., 1999).

Referências bibliográficas

BRASIL. Instrução Normativa n. 20, de 21 jul. 1999. Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Oficializa os Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes – Sal e Salmoura. *Diário Oficial*, Brasília (DF), n.173, 9 set. 1999. Seção 1, p.30.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 98-100.

TAKEMOTO, E.; DELLA TORRE, J. C. de M.; LICHTIG, J. Nitrato em espinafre: validações de métodos colorimétricos. In: III SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS (SLACA), 1999. *Resumos...* Campinas: FEA-Unicamp, 1999. p.5.

285IV Determinação de proteínas de soja pelo método ELISA

As proteínas de soja são ingredientes utilizados na elaboração de alimentos como fonte protéica e como extensor em produtos cárneos. As amostras de produtos cárneos

crus ou processados termicamente são maceradas e extraídas com solventes orgânicos. O resíduo desta extração, denominado pó de acetona, é solubilizado a quente em solução aquosa de uréia. Após diluição, as proteínas de soja renaturadas são analisadas pelo método ELISA, utilizando anticorpos comercialmente disponíveis. Na quantificação de proteínas de soja, o método ELISA é um imuno-ensaio competitivo indireto em que o analito proteína de soja (antígeno) reage com volume fixo de anticorpo anti-proteína de soja (antissoro produzido em coelho) em excesso. O anticorpo não reagente é determinado pela ligação em placa de imunoensaio previamente sensibilizada com o antígeno. O anticorpo capturado é determinado pela adição de um segundo anticorpo (produzido em cabra para globulinas de soro de coelho) ligado covalentemente a uma enzima (conjugado). A reação é evidenciada pelo desenvolvimento de cor com a adição de substrato. Etapas de lavagem são incorporadas após cada estágio de interação, para remover material não reagente (**Figura 3**). A amostra é geralmente analisada em diluições seriadas na razão 3. A resposta é comparada a uma curva-padrão de proteína de soja. O ELISA é semi-quantitativo na determinação de proteínas de soja em produtos cárneos crus e processados termicamente, podendo ser quantitativo quando o teor de protídios da proteína de soja adicionado é conhecido e, especialmente, se a proteína de soja (texturizada, concentrada ou isolada) está disponível para calibração.

Material

Lavadora e leitora de placas de ELISA; pipeta digital de 8 ou 12 canais, pipetas monocanais de (5-50) µL, (50 -200) µL e (100 -1000) µL com ponteiras, reservatórios de reagentes para cada solução; triturador de amostras, homogeneizador Ultra-Turrax ou Diax 900 (Heidolph) ou equivalente; papel de filtro Whatman n° 541; tubos de vidro pirex graduados de 10 mL com tampas de plástico; banho-maria; placas de imunoensaio de poliestireno fundo chato de 96 cavidades (equivalente Nunc Maxisorp 442404); microtubos plásticos de 1 mL com tiras de tampas e suporte (8 x 12 fileiras) para diluição serial e pré-incubação; caixas plásticas com tampa para colocar placas de ELISA; balões volumétricos de 10, 25 e 50 mL; funil de vidro de 7 cm; almofariz; balança analítica; pHmetro; estufa; cronômetro e papel gráfico semi-log (linear/4 ciclos log).

Reagentes

Acetona
Uréia
2-Mercaptoetanol
Azida sódica (NaN_3)

Advertência: a azida sódica é material tóxico. Evite contato com a pele e os olhos e impeça a aspiração do pó.

Clorofórmio-metanol – 2:1 (v/v).

Álcool-água (acidificado) – 80+20 (v/v), acidificado com 2 gotas de HCl/L.

Tampão Tris-HCl a 0,25 M – Pese 30,3 g de tris (hidroximetil) amino metano em um litro de água e ajuste ao pH 8,6 com HCl.

Proteina de soja padrão – Utilize como padrão, o concentrado de proteína de soja (Loders CroKlaan B.V., Holanda) ou pó de acetona de soja (equivalente Sigma S7756) ou isolado protéico de soja Supro 500E (Protein Technologies International, USA) na preparação da solução de sensibilização.

Solução de sensibilização (50 vezes concentrada) – Misture, em balão volumétrico de 50 mL, 4,5 mL de Na_2CO_3 0,2 M, 8 mL de $NaHCO_3$ 0,2 M, 625 µL da solução-padrão de proteína de soja preparada no item procedimento (b) e água até completar o volume. Mantenha esta solução-padrão a (2-8)°C por 16 horas.

Nota: o valor 625 µL da solução-padrão foi calculado para corresponder a 2,5 mg de proteína de soja no pó de acetona, uma vez que a solução-padrão descrita no item (b) do procedimento contém 100 mg/25 mL.

Solução de sensibilização de trabalho – Misture, em um balão volumétrico de 50 mL, 4,5 mL Na_2CO_3 0,2 M, 8 mL $NaHCO_3$ 0,2 M e água para completar o volume. Homogeneíze e retire 1 mL desta solução, repondo o volume da solução com 1 mL da solução de sensibilização 50 vezes concentrada.

Solução-tampão salina de fosfato TFS pH 7,1 – Misture, em um balão volumétrico de 1000 mL, 85 g de NaCl, 10,7 g de Na_2HPO_4, 3,9 g de $NaH_2PO_4.2H_2O$, 5 g de NaN_3 e água até completar o volume para 1000 mL.

Solução-tampão de trabalho TFST– Misture 100 mL da solução-tampão TFS, 1,5 mL de Tween 20 e 900 mL de água.

Soluções imunorreagentes

Solução anticorpo-positivo – Dilua, em um balão volumétrico de 50 mL, B µL de antissoro de coelho para proteína de soja (equivalente Sigma-Aldrich S-2519), conservado a -20°C, e complete o volume com solução-tampão TFST.

Solução anticorpo-negativo – Em um balão volumétrico de 50 mL, pipete B µL de soro normal de coelho e complete o volume com solução-tampão TFST.

Solução conjugado – Em um balão volumétrico de 25 mL, pipete C µL de IgG anti-coelho produzido em cabra conjugado à fosfatase alcalina (equivalente Sigma-Aldrich A-7539), conservado a (2 – 8)°C e complete o volume com solução-tampão TFST.

Nota: as quantidades de anticorpo e conjugado que devem ser adicionadas, dependem das propriedades dos imunorreagentes recebidos. Calcule B e C como descrito no item padronização.

Solução-substrato de fosfatase em meio tampão – Misture, em um balão volumétrico de 25 mL, 2,25 mL de Na_2CO_3 0,2 M, 4 mL de $NaHCO_3$ 0,2 M, 25 µL $MgCl_2.6H_2O$ 0,5 M, 25 mg p-nitrofenil fosfato (5 tabletes de 5 mg cada, equivalente Sigma 104-105, guarde no escuro a temperatura menor que 0°C) e complete o volume com água.

Padronização

(A) Anticorpo-positivo e anticorpo-negativo – Teste novos lotes nas placas ELISA sensibilizadas e lavadas (itens (c) e (d) do procedimento). Prepare séries de diluições (no intervalo 100 - 100000) de anticorpo positivo (fileiras A-D) e anticorpo negativo (fileiras E-H) em TFST, pré-incube sem proteína de soja, e então proceda como descrito nos itens (h) e (k) do procedimento. Use a curva de diluição do antissoro para obter o título do anticorpo positivo. Calcule o valor B, isto é, se o título for 1 em 3000, então B = 2 x (1/3000) x 50000 µL = cerca de 30 µL. Teste também o anticorpo em produto cárneo padrão contendo concentração conhecida de proteína de soja e também contra materiais com potencial para reações cruzadas.

(B) Conjugado – Teste novos lotes de conjugado sobre uma placa ELISA (sensibilizada e lavada, itens (c) e (d) do procedimento). Prepare anticorpo positivo como para BP (item (f) do procedimento) e pré-incube essa solução com TFST separadamente (item (g) do procedimento). Incube na placa (item (h) do procedimento) nas fileiras A-D (anticorpo positivo) e fileiras E-H (TFST). Use conjugado a várias diluições (ou seja, no intervalo 500-5000) no item (i) do procedimento e então siga (j) e (k). Calcule o valor de C (ou seja, C=15) de tal forma que o conjugado positivo seja > 1,000 e conjugado negativo < 0,050.

(C) Placa ELISA – Teste lotes de placas para avaliar a variabilidade entre placas. A placa padrão em protocolo utiliza, nas determinações, somente as cavidades (B – G) (2-11) em razão de uma possível variação das cavidades externas.

Procedimentos

(a) Preparação do pó de acetona – Pese, separadamente, 20 g da proteína de soja padrão e 20g da amostra previamente triturada e macere (no Ultra-Turrax ou Diax 900) com solventes orgânicos, filtrando o resíduo a cada estágio para re-extração, na seguinte seqüência: 200 mL clorofórmio-metanol (3 vezes), 200 mL álcool acidificado (3 vezes) e 200 mL acetona (3 vezes). Seque o resíduo ao ar, de um dia para o outro, e homogeneíze em almofariz; o produto final denomina-se pó de acetona. Proceda a análise da proteína total pelo método Kjeldahl (N x 6,25), utilizando o resultado para calcular a massa da amostra de pó de acetona do item (b) do procedimento.

(b) Solubilização de amostras e padrão – Pese, separadamente, em tubos pirex graduados de 10 mL, o pó de acetona da proteína de soja padrão (97-103 mg de proteína) e o pó de acetona de cada amostra de produto cárneo (95-105 mg de proteína). Adicione a cada um dos tubos na ordem: 2 mL de tampão Tris-HCl, 6 g de uréia, 2 mL de água, 200 µL de 2-mercaptoetanol e água para 10 mL. Tampe, misture e aqueça imergindo até o nível de 10 mL em banho de água fervente por (60 ± 1) min. Resfrie por (3 - 5) minutos e transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL com água, assegurando a ressolubilização da uréia cristalizada. Mantenha as soluções de amostras e padrão por 16 h a (2 - 8)°C. A solução-padrão de proteína de soja está pronta para ser utilizada no item reagentes (solução de sensibilização) e no item procedimento (e). As soluções de amostras serão utilizadas no item (e) do procedimento.

(c) Sensibilização das placas ELISA – Utilizando pipeta multicanal, transfira 200 µL de solução de sensibilização de trabalho (item reagente) a cada cavidade na placa de ELISA. Coloque a placa tampada em caixa plástica, feche e incube a 37°C por (16 ± 1) hora.

(d) Lavagem e estocagem das placas ELISA – Lave as placas de ELISA utilizando um procedimento padronizado. Com um sistema automático de lavagem estabeleça um ciclo de 5 vezes, em que cada fileira de cavidades é sucessivamente esvaziada e enchida com TFST por 5 vezes e finalmente as cavidades são esvaziadas. Segundo o procedimento de lavagem manual, a primeira fileira é esvaziada e enchida com TFST por 5 vezes antes de finalmente ser esvaziada; a seqüência é repetida para as fileiras sucessivas. Um ciclo de lavagem de 10 vezes inclui primeiramente uma lavagem de 5 vezes, seguida por um segundo ciclo de mais 5 lavagens. Se a placa ELISA sensibilizada não for utilizada imediatamente, remova a placa da estufa no final das 16 horas e lave 5 vezes. Uma lavagem eficiente é parte essencial do método. A placa lavada pode ser enxugada e estocada. Use tecido absorvente para secar os lados da placa, inverta a placa para remover algum líquido remanescente nas cavidades, e então seque a parte de cima da placa. Idealmente, a superfície interna das cavidades incluindo a base deve permanecer intocada durante o processo de lavagem e secagem. Coloque a placa tampada com a parte de cima voltada para baixo em caixa plástica, feche e estoque em freezer (-20°C).

(e) Diluição serial das soluções de amostras e padrão – Assegure a ambientação da temperatura das soluções de amostras e padrão solubilizadas (procedimento b), retirando da refrigeração com (45 - 60) minutos de antecedência. Transfira alíquotas de 750 µL de cada uma dessas soluções a balões volumétricos de 10 mL, dilua ao volume com TFST e misture por repetidas inversões. Encha com microtubos o suporte (8x12) e pipete 600 µL das soluções de amostras e padrões diluídos, cada um dentro do seu tubo correspondente, como definido na **Tabela 1** (padrão S1 em triplicata e amostras T1-Z1 em duplicata). A **Tabela 1** ilustra o modelo padrão de tubos que corresponde às cavidades na placa de ELISA. Todos os outros tubos devem receber 400 µL de TFST; faça essa transferência utilizando pipeta multicanal (duas porções de 200 µL). Conduza a diluição serial de cada amostra, em duplicata, pelo uso de pipeta multicanal para misturar alíquotas de 600 µL (recolha 200 µL e reponha 3 vezes) e, então, transfira 200 µL ao tubo adjacente que já contém 400 µL de TFST. Misture como descrito e repita a diluição, descartando a alíquota de 200 µL do último tubo. Desta mistura resulta uma diluição serial 1:3; normalmente use soluções de amostra não diluída, 3 vezes diluídas e 9 vezes diluídas para o ensaio quando o teor de proteína de soja na amostra é desconhecido ou baixo (0 - 11 g de proteína/100 g de proteína total). Escolha maiores diluições se os teores são altos (3, 9, 27 vezes se 11- 33 g/100 g; 9, 27, 81 vezes para 33 -100 g/100 g), ou quando o ELISA já tenha demonstrado que as soluções de amostras são muitas concentradas. Dilua as soluções-padrão similarmente, preparando para o ensaio 7 diluições seriais (de solução não diluída a diluição de 729 vezes, cada uma em triplicata).

Tabela 1 – Modelo padrão recomendado para os microtubos (pré-incubação) e cavidades correspondentes na placa de ELISA, no ensaio com 7 amostras*.

Linhas	**Colunas**											
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	BS	S1	S1	S1	00	00	00	00	00	00	00	00
B	BS	S2	S2	S2	T1	U1	V1	W1	X1	Y1	Z1	00
C	BS	S3	S3	S3	T2	U2	V2	W2	X2	Y2	Z2	00
D	BC	S4	S4	S4	T3	U3	V3	W3	X3	Y3	Z3	00
E	BC	S5	S5	S5	T1	U1	V1	W1	X1	Y1	Z1	00
F	BC	S6	S6	S6	T2	U2	V2	W2	X2	Y2	Z2	00
G	BP	S7	S7	S7	T3	U3	V3	W3	X3	Y3	Z3	00
H	BP	BP	BN	BN	BN	00	00	00	00	00	00	00

* As 96 posições estão arranjadas em 12 colunas (1-12) e 8 linhas (A-H). Cada amostra é analisada a 3 diluições (em duplicata); padrão a 7 diluições (em triplicata), e 4 brancos em triplicata. BS, branco substrato; BC, branco conjugado; BP, branco anticorpo positivo; BN, branco anticorpo negativo; 00, não usado; S1-S7, padrão (1-7 indica 7 diluições seriais); T-Z, 7 amostras (1-3 indica 3 diluições seriais).

(f) Brancos – Quatro tipos de brancos são usados, cada um em triplicata: substrato (BS), conjugado (BC), anticorpo positivo (BP) e anticorpo negativo (BN). Adicione 400 µL de TFST a todos eles. Aos tubos BS e BC, acrescente 2 porções de 200 µL de TFST; aos tubos BP, solução de anticorpo positivo (2 x 200 µL); e, aos tubos BN, a solução de anticorpo negativo (2 x 200 µL). Idealmente, as leituras finais de absorbância (k) correspondentes a esses brancos devem apresentar os seguintes valores: BS < 0,010; BC < 0,050; BP > 1,000; BN > 0,200.

(g) Pré-incubação com soro anti-proteína de soja – Utilizando pipeta multicanal, adicione solução de anticorpo positivo (2 x 200 µL) aos tubos de amostras e padrões. Coloque TFST (2 x 200 µL) nos tubos externos restantes (00 na **Tabela 1**). Feche cuidadosamente com as tiras plásticas que vedam os microtubos. Inverta o suporte de microtubos três ou mais vezes para misturar e coloque na estufa a 37ºC por (30 ± 1) minutos.

(h) Etapa anticorpo – Nos últimos 10 min da etapa de pré-incubação (g), lave a placa de ELISA já à temperatura ambiente, cerca de (45 - 60) minutos, utilizando um ciclo de 5 vezes. Remova o suporte de microtubos da estufa no tempo estipulado e inverta 3 vezes para misturar. Retire cuidadosamente as tiras plásticas vedadoras. Utilizando pipeta multicanal, transfira alíquotas de 200 µL de cada solução para as cavidades na placa de ELISA na posição correspondente (**Tabela 1**). Coloque a placa tampada na caixa plástica, feche e incube a (120 ± 2) min a 37ºC.

(i) Etapa conjugado – Remova a placa ELISA da estufa, lave 10 vezes e enxugue como em (d). Adicione 200 µL de TFST na cavidade do branco substrato (BS). Com auxílio da multicanal adicione solução de conjugado a todas as outras cavidades (exceto BS) na mesma ordem de adição utilizada na etapa do anticorpo (h). Coloque a placa tampada na caixa plástica, feche e incube a (120 ± 2) minutos a 37ºC.

(j) Etapa substrato – Remova a placa da estufa, lave 10 vezes e enxugue. Utilizando multicanal, adicione 200 µL da solução de substrato a cada cavidade da placa na mesma ordem da etapa (h). Então, coloque a placa tampada na caixa plástica, feche e incube por (30 ± 0,25) minutos a 37ºC.

(k) Reação enzimática e medição da cor – Remova a placa ELISA da estufa e com ajuda da multicanal adicione alíquotas de 50 µL de solução de 0,2 M de NaOH a todas as cavidades da placa, na mesma ordem da etapa do anticorpo. Proceda à leitura da absorbância a (405 - 410) nm da solução de cada cavidade, usando leitora de ELISA ou equivalente; essa leitura deve ser realizada entre 5 e 60 minutos após a adição da solução de NaOH.

Cálculos

Para cada placa, construa uma curva-padrão (**Figura 4**) do log da concentração de proteína de soja padrão como pó de acetona (N x 6,25) nas 7 diluições seriais *versus* a correspondente absorbância (média de 3 leituras). Calcule a concentração de proteína total (N x 6,25) em cada diluição de cada solução de amostra. De cada média de absorbância, leia na curva a concentração de proteína de soja correspondente em cada diluição da amostra. Calcule a massa de proteína de soja por 100 g de proteína total para as 3 diluições correspondentes a cada amostra de pó de acetona. Se todos os 3 valores corresponderem à porção central da curva de calibração (isto é, S2 a S6), utilize a média como resultado final. As absorbâncias muito baixas implicam que as soluções utilizadas estavam muito concentradas e um maior número de diluições seriais deve ser utilizado para um segundo procedimento de ELISA. Os resultados também podem ser calculados em termos de massa de proteína de soja por 100 g de amostra como recebida ou em termos de peso do ingrediente de soja (proteínas isoladas contêm 88% de proteína, concentradas 68% e texturizadas 50%, base seca, teores mínimos estabelecidos pela legislação vigente) por 100 g de amostra como recebida. Note que as três maneiras de definir os teores de soja na amostra são diferentes e devem ser consideradas com cuidado.

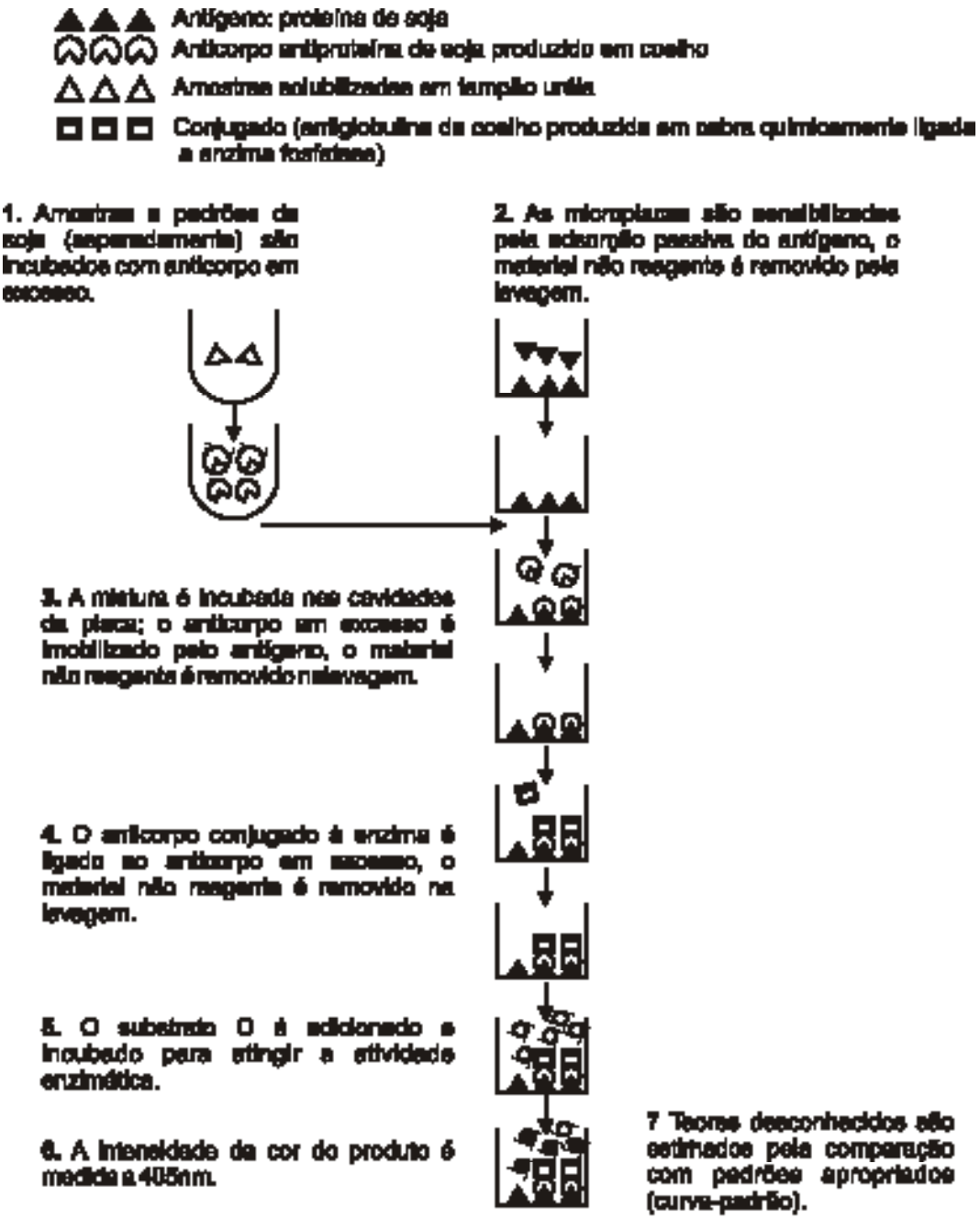
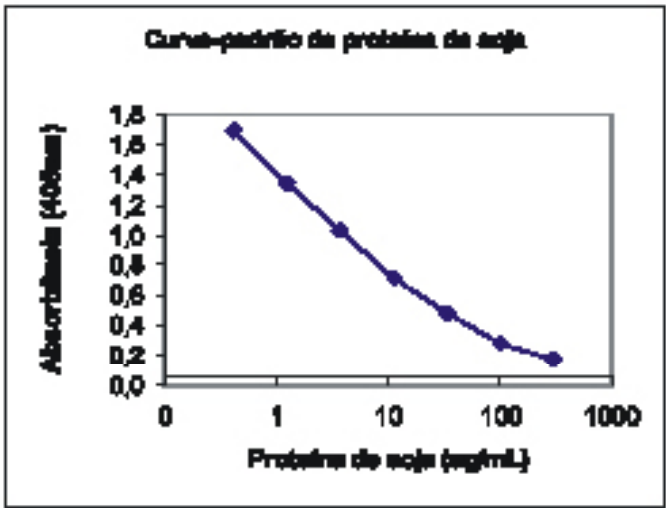


Figura 3 – Procedimento esquemático ilustrando as etapas individuais do método ELISA para determinação de proteína de soja.

Figura 4 – Curva-padrão evidenciando a relação entre absorbância e concentração de proteína de soja da solução padrão pelo método ELISA.



O limite de quantificação do método é de 0,41 µg/mL de proteína de soja na alíquota de análise (com desvio-padrão relativo de 2,4%) e de 0,14 g/100 g de proteína de soja na amostra. A curva-padrão abrange de 0,41 µg/mL a 300 µg/mL de proteína de soja, limite superior com desvio padrão relativo de 5,8% (DELLA TORRE et al., 2003).

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 988.10). Arlington: A.O.A.C., 1995. chapter 39. p. 16-19.

DELLA TORRE; J. C. M.; BARBOSA, S.F.C.; FERRACIOLI, V. R.; ZENEBON, O.; LICHTIG, J.; BERAQUET, N. J. Quantitative determination of comercial soy proteins in emulsion -type meat products by official ELISA procedure. In: 49th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY – ICoMST, 2003. *Proceedings…* Campinas: CTC-ITAL, 2003. p. 405-406.

Colaboradores

Jussara Carvalho de Moura Della Torre, Regina S. Minazzi Rodrigues, Emy Takemoto, Sônia França Correia Barbosa e Jaim Lichtig

CAPÍTULO **XIV**

EMBALAGENS E EQUIPAMENTOS EM CONTATO COM ALIMENTOS

XIV

EMBALAGENS E EQUIPAMENTOS EM CONTATO COM ALIMENTOS

A qualidade dos produtos alimentícios depende diretamente de fatores de natureza química, física e biológica, que atuam sobre o alimento durante o período de tempo entre sua produção e seu consumo, que é denominado vida-de-prateleira do alimento. Neste contexto, a embalagem é de importância fundamental.

Uma das principais funções da embalagem é entregar ao consumidor um alimento com o mesmo nível de qualidade dos produtos frescos ou recém-preparados, devido à sua capacidade de protegê-los contra agentes deteriorantes, infectantes e sujidades. Ela atua como uma barreira física de proteção para o produto contra o contato direto com o meio ambiente, evitando contaminações, manuseio inadequado, falta de higiene e perda das características próprias do produto.

Uma boa embalagem deve também ser resistente ao produto nela contido durante o processamento e/ou armazenamento, não cedendo elementos de sua composição ao alimento, sejam estes nocivos ou não ao homem ou ao próprio alimento.

O critério usado para garantir a segurança de produtos alimentícios embalados está relacionado com as interações embalagem/produto durante o período de tempo anterior ao uso final pelo consumidor.

À medida que os alimentos embalados passaram a ter uma maior importância na dieta de grande parte das populações, a ênfase dada aos problemas toxicológicos advindos da interação da embalagem com o alimento foi aumentada.

Na s quatro últimas décadas, a comunidade científica internacional tem voltado

sua atenção para os aspectos toxicológicos decorrentes da utilização de materiais de síntese química em embalagens de alimentos, surgindo a necessidade de estabelecer uma legislação específica para controlar estes produtos.

A embalagem pode contaminar o alimento por meio da cessão de elementos de sua composição como monômeros, aditivos, corantes, tintas de impressão e vernizes, entre outros.

A migração de componentes da embalagem pode ser tão pequena que não se observará resposta biológica nos organismos expostos a curto prazo. Entretanto, após longos períodos de ingestão de alimentos contaminados, manifestações tóxicas sutis e de difícil detecção poderão ocorrer.

A maioria dos testes efetuados em embalagens para alimentos são denominados provas de cessão ou testes de migração. Provas de cessão ou testes de migração são determinações cuja finalidade é avaliar a quantidade de substâncias passíveis de migrar da embalagem para o alimento. A importância destas determinações prende-se ao fato de que estes migrantes, além de potencialmente tóxicos ao homem, podem alterar as características do alimento.

Na medida do possível, estas provas tentam simular as condições a que tanto a embalagem quanto o alimento serão submetidas, em função do tipo de alimento, tempo de contato e temperatura.

Estes ensaios deveriam ser feitos colocando-se a embalagem em contato com o alimento que se pretende embalar. Entretanto, isto se torna impraticável, uma vez que a concentração de migrantes é normalmente baixa e a complexidade química da maioria dos alimentos iria interferir em sua dosagem.

Devido a esta impossibilidade, recorreu-se ao uso de solventes simulantes de alimentos, que tentam reproduzir o pH, o teor de gordura dos alimentos e sua eventual graduação alcoólica.

Os estudos de migração devem avaliar de forma qualitativa e quantitativa a substância química que migrou da embalagem para o alimento.

As embalagens que têm interesse do ponto de vista de saúde pública são as primárias, isto é, aquelas que tem contato direto com o alimento, podendo interagir com ele.

Terminologia

Embalagem para alimentos – Artigo que está em contato direto com alimentos, destinado a contê-los, desde sua fabricação até sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como de adulterações.

Equipamento para alimentos – Artigo em contato direto com alimentos, que se utiliza durante a elaboração, fracionamento, armazenamento, comercialização e consumo de alimentos. Estão incluídos nesta classificação: recipientes, máquinas, correias transportadoras, tubulações, aparelhagens, acessórios, válvulas, utensílios e similares.

Revestimento – Substância ou produto aplicado sobre a superfície de embalagens ou equipamentos para alimentos com a finalidade de protegê-los e prolongar sua vida útil.

Migração – Transferência de componentes do material em contato com alimentos para estes produtos, devido a fenômenos físico-químicos.

Migração total ou global – Quantidade de componentes transferida dos materiais em contato com alimentos ou seus simulantes, nas condições usuais de emprego, elaboração e armazenamento ou nas condições equivalentes de ensaio.

Migração específica – Quantidade de um componente não polimérico particular de interesse toxicológico transferida dos materiais em contato com alimentos para os alimentos ou seus simulantes, nas condições equivalentes de ensaio.

Limite de migração total ou global – Quantidade máxima admissível de componentes de material em contato com alimentos transferida aos simulantes sob as condições de ensaio.

Limite de migração específica – Quantidade máxima admissível de um componente específico do material em contato com alimentos transferida aos simulantes nas condições de ensaio.

Limite de composição – Quantidade máxima permitida de um componente particular de interesse toxicológico no material em contato com alimentos.

Simulante – Produto que imita o comportamento de um grupo de alimentos que

tem características semelhantes.

Vidros – Materiais sólidos que possuem uma estrutura atômica molecular não cristalina obtidos, de modo geral, pelo resfriamento de uma massa fundida em condições controladas que impeçam sua cristalização. Podem ser incolores ou coloridos. São identificados os seguintes tipos de vidro:

- Vidro borossilicato
- Vidro sódio-cálcico
- Cristal (com teor mínimo de 10% de um ou mais dos seguintes metais: chumbo, bário, potássio, zinco, expressos como óxido).

Esmaltes vitrificados – Materiais vítreos que correspondem à definição anterior e que se utilizam como revestimento de embalagens e equipamentos de cerâmica porosa, vermelha ou branca, de vidro ou de metal (como porcelana, louça e artigos esmaltados ou vitrificados em geral), com a finalidade de impermeabilizar, proteger ou decorar.

Embalagens de vidro retornáveis – Embalagens que podem ser utilizadas várias vezes, somente para conter alimentos, sofrendo um processo industrial de higienização, antes de cada reutilização.

Embalagens de vidro não retornáveis – Embalagens de vidro de uma única utilização.

Embalagens metálicas – Embalagens compostas exclusivamente de materiais metálicos ferrosos ou não ferrosos; de materiais ferrosos ou não ferrosos revestidos exclusivamente com revestimentos metálicos; de materiais ferrosos ou não ferrosos apresentando ou não revestimentos metálicos e revestidos em uma ou em ambas as faces por revestimentos poliméricos ou submetidas a uma operação de lubrificação.

Embalagens celulósicas – São embalagens elaboradas ou revestidas com papel ou cartão, ou compostas por vários tipos de materiais, desde que a face em contato com alimento seja celulósica, inclusive aquelas que são revestidas ou tratadas superficialmente com parafinas, resinas poliméricas e outras.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 91, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 13 de junho de 2001. Seção 1, p.60-61.Critérios gerais para embalagens e equipamentos em contato com alimentos.

286/IV Embalagens e equipamentos – Classificação dos alimentos

Do ponto de vista de interação com as embalagens e equipamentos plásticos, os

alimentos são classificados da seguinte forma:
Tipo I – Alimentos aquosos não ácidos (pH superior a 5)

Exemplos de alimentos enquadrados neste tipo: água, infusões de café e chá; cervejas ; leite desnatado; sucos de frutas não ácidas; bebidas contendo menos de 5% de álcool; mel; sorvetes sem substâncias gordurosas; geléias de frutas não ácidas; ovos sem casca etc.

Tipo II – Alimentos aquosos ácidos (pH inferior ou igual a 5)

Exemplos de alimentos enquadrados neste tipo: sucos de frutas ácidas; geléias de frutas ácidas; doces de frutas cítricas; tomates, extratos e concentrados de tomate; sorvetes de frutas ácidas; leites fermentados, inclusive os que contêm frutas; molhos; vinagre etc.

Tipo III – a. Alimentos aquosos não ácidos contendo óleo ou gordura
b. Alimentos aquosos ácidos contendo óleo ou gordura

Exemplos de alimentos enquadrados neste tipo: carnes frescas de animais e de aves gordurosas; presunto e semelhantes; carnes enlatadas; pastas de carne e outras conservas de carne; embutidos de carnes frescas, curados, defumados, cozidos; peixes gordurosos e derivados; leite integral; maionese; sorvetes ricos em gordura; óleos e gorduras emulsionados; bebidas a base de cacau etc.

Tipo IV – Alimentos oleosos ou gordurosos

Exemplos de alimentos enquadrados neste tipo: óleos; gorduras; manteiga; margarina; chocolates etc.

Tipo V – Alimentos alcoólicos (conteúdo em álcool superior a 5% v/v)

Exemplos de alimentos enquadrados neste tipo: vinhos; licores; aguardentes; cervejas e sidras e outras bebidas contendo mais que 5% de álcool; alimentos conservados em meio alcoólico etc.

Tipo VI – Alimentos sólidos secos ou de ação extrativa pouco significativa.

Exemplos de alimentos enquadrados neste tipo: cereais; cereais inflados; farinhas; massas alimentícias; pães; biscoitos e outros produtos forneados não gordurosos; hortaliças e outros vegetais frescos; frutas secas; leite em pó; café em grão ou em pó, especiarias; caldos para sopas desidratados; sal etc.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 105, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de maio de 1999, Seção I, p. 21-34. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

287/IV Embalagens e equipamentos – Seleção dos simulantes de alimentos

Com a finalidade de realizar os ensaios de migração em embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos, são definidos os seguintes simulantes de alimentos:

- Simulante A – Água
- Simulante B – Solução de ácido acético a 3% (v/v) em água
- Simulante C – Solução de álcool em água a 15% ou na concentração mais próxima da real de uso.
- Simulante D – Óleo de oliva refinado; n-heptano

Nota: o n-heptano é indicado como simulante alternativo. O comportamento do n-heptano como solvente simulante de alimentos oleosos está sendo questionado. A tendência geral é o uso de óleos vegetais (azeite de oliva, óleo de girassol ou soja), pois os mesmos são excelentes simulantes de alimentos oleosos, apesar do método correspondente ser mais complexo que o anterior.

Tabela 1 – Tipos de alimentos e seus respectivos simulantes

Alimento	Simulante
Tipo I	A
Tipo II	B
Tipo III a	A,D
Tipo III b	B,D
Tipo IV	D
Tipo V	C
Tipo VI	Nenhum, ou ocasionalmente A,B,C ou D, dependendo do tipo de alimento

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 105, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de maio de 1999, Seção I, p. 21- 34. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

288/IV Embalagens e equipamentos – Condições dos ensaios de migração

a) Nos ensaios de migração, o contato dos materiais de embalagem com os simulantes, nas condições de tempo e temperatura selecionados de acordo com a **Tabela 2**, será realizado de maneira a reproduzir as condições normais ou previsíveis de elaboração, fracionamento, armazenamento, distribuição, comercialização e consumo do alimento.

b) Se uma embalagem ou equipamento é utilizado sucessivamente em várias condições de contato da **Tabela 2**, os ensaios de migração serão realizados submetendo-se as amostras sucessivamente a estas condições de teste, usando-se o mesmo simulante.

c) Para um determinado tempo de contato, se o material passa nos ensaios de migração a uma determinada temperatura, não é necessário efetuar o teste a uma temperatura mais baixa.

d) Para uma determinada temperatura de contato, se o material passa nos ensaios de migração a um determinado tempo de contato, não é necessário efetuar o teste a um tempo menor.

e) Sempre que as condições de temperatura e tempo de contato não se enquadrem nas condições impostas na **Tabela 2**, deverão ser seguidas as condições que se aproximem das reais de uso.

f) Para manter as amostras às temperaturas selecionadas, podem ser utilizados, dependendo do caso, congelador, refrigerador, banho-maria, estufa, autoclave ou forno de microondas.

g) elaboração – Condições que se verificam em períodos relativamente curtos, tais como: pasteurização, esterilização, acondicionamento a quente etc.

h) armazenamento – Contato prolongado durante o armazenamento à temperatura ambiente ou de refrigeração.

i) consumo – Aquecimento do alimento na própria embalagem antes da ingestão; utilização de utensílios domésticos de plástico em contato com alimentos.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 105, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de maio de 1999, Seção I, p. 21-34. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

289/IV Embalagens plásticas – Preparo das amostras

Procedimento – Sempre que possível, utilize uma área fácil de calcular (retângulo, círculo, cilindro etc.). Prepare um número de amostras tal que a superfície de contato esteja em torno de 600 cm^2. Lave as amostras primeiramente em jato de água corrente e depois com água. Seque as amostras. Devido à grande diversificação de materiais empregados para a fabricação de embalagens, cada um deles deverá ter um tratamento prévio especial, conforme descrito abaixo:

a) Embalagem final (rígida, semi-rígida ou flexível) – Coloque o simulante à temperatura selecionada. Cubra ou lacre o recipiente e deixe à temperatura de teste durante o tempo indicado.

b) Material plástico genérico (filme flexível, corpos rígidos, revestimentos poliméricos etc.) – Prepare amostras com uma superfície de contato de aproximadamente 600 cm^2 (somatória de todas as superfícies postas em contato). Coloque em um béquer com um volume de simulante de tal forma que a relação área de material em contato/volume fique compreendida entre (2 e 0,5) cm^2/mL, na temperatura selecionada; cubra o béquer com um vidro de relógio ou similar e deixe em contato na temperatura de ensaio pelo tempo indicado.

c) Elementos de vedação (tampas, rolhas, guarnições e outros objetos de área pequena (por exemplo: palitos de pirulito, colheres para sorvetes etc., de um único uso) – Coloque um número suficiente (n) de amostras de modo que a área seja em torno de 600 cm^2 em um béquer com um volume simulante de tal forma que a relação área de amostras/volume de simulante esteja compreendida entre (2 e 0,5) cm^2/mL, à temperatura selecionada. Cubra o béquer e deixe à temperatura de ensaio durante o tempo indicado.

d) Filme composto semi-rígido – Corte um retângulo do filme no tamanho de (15 x 20) cm. Construa com ele uma caixa. Lave a caixa com um jato de água corrente e, depois com água. Seque. Coloque o solvente simulante adequado e cubra com placa de vidro. Na impossibilidade de construir uma caixa, corte um quadrado de (8 x 8) cm do material, lave com jato de água corrente e, depois, com água. Seque. Coloque o solvente simulante em um copo de vidro com a borda recoberta por fita vedante. Cubra esse copo com a amostra cortada na forma de um quadrado de (8 x 8) cm e adapte esse conjunto ao dispositivo especial descrito na figura 1. Faça um branco substituindo a

amostra por placa de vidro, para verificar se houve migração dos elementos da fita de vedação para o solvente.

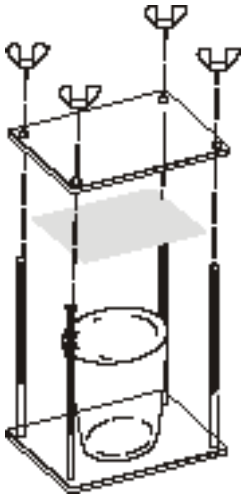


Figura 1 – Dispositivo para análise de uma face da embalagem

e) Materiais e artigos compostos por duas ou mais camadas plásticas – Neste caso o teste é realizado de tal modo que o simulante fique em contato somente com as partes da amostra que durante seu uso real estejam em contato direto com os alimentos. Coloque o solvente simulante em um copo de vidro com a borda recoberta por fita vedante. Cubra esse copo com a amostra cortada na forma de um quadrado de (8 x 8) cm e adapte esse conjunto ao dispositivo especial descrito na **Figura 1**. Faça um branco substituindo a amostra por placa de vidro, para verificar se houve migração dos elementos da fita de vedação para o solvente.

f) Equipamentos destinados a entrar em contato com alimentos (utensílios, partes de maquinaria etc.) – Proceda de acordo com a, b, ou c, dependendo das condições reais de uso.

Nota: quando o material a ser analisado for um verniz ou esmalte sintético, este deve ser aplicado para seu ensaio sobre placas de vidro esmerilhado.

Tabela 2 – Condições de ensaio

CONDIÇÕES DE CONTATO NO USO REAL	CONDIÇÕES DE ENSAIO				
	Simulante A	Simulante B	Simulante C	Simulante D	
	Água	Ácido acético a 3%	Álcool a 15%	Heptano **	Azeite de oliva *
A. Conservação (contato prolongado, t > 24 h)					
T < 5°C	5°C/10 dias	5°C/10 dias	5°C/10 dias	5°C/30 min	5°C/10 dias
5°C < T < 40°C	40°C/10 dias	40°C/10 dias	40°C /10 dias	20°C/30 min	40°C/10 dias
B. Contato breve (2 h < t < 24 h)					
à temperatura ambiente	40°C/24 h	40°C/24 h	40°C/24 h	20°C/15 min	40°C/24 h
C. Contato momentâneo (t < 2 h)					
à temperatura ambiente	40°C/2 h	40°C/2 h	40°C/2 h	20°C/15 min	40°C/2 h
D. Elaboração					
40°C < T ≤ 80°C	80°C/2 h	80°C/2 h	80°C/2h	40°C/15 min	80°C/2 h
80°C < T ≤ 100°C	100°C/30 min	100°C/30 min	–	50°C/15 min	100°C/30 min
T > 100°C	120°C/30 min	120°C/30 min	–	60°C/15 min	120°C/30 min

* Os resultados obtidos com azeite de oliva devem ser divididos pelos fatores de redução especificados de acordo com a **Tabela 2** (Classificação dos alimentos em função dos simulantes), constante no anexo I da Resolução 105 da ANVISA.
** Os resultados obtidos com n-heptano devem ser divididos por 5.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 105, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de maio de 1999, Seção I, p. 21-34. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

290/IV Embalagens plásticas – Determinação da migração total com simulantes aquosos e n-heptano

No Brasil e nos outros Estados-Parte do Mercosul, o limite máximo permitido de

migração total ou global é de 8 mg/dm^2 ou 50 mg/kg.

Material

Béqueres, vidros de relógio, provetas, dessecadores com cloreto de cálcio anidro, cápsulas de porcelana, banho-maria, estufa com temperatura regulável e refrigerador.

Solventes

Conforme o tipo de alimento a ser embalado, utilize o solvente correspondente descrito na **Tabela 1**.

Procedimento – Após preparação das amostras de acordo com o indicado em **289/IV**, acondicione as mesmas conforme **Tabela 2**. Em todos os casos, efetue uma prova em branco, com um volume igual do simulante utilizado na prova original. Transcorrido o tempo dos ensaios de migração, retire as amostras do béquer nos casos (b), (c) e (d), ou verta o simulante em um béquer no caso (a) e (d). Retire as amostras, lave e escorra com o mesmo simulante utilizado, que se incorpora ao simulante do teste. Após os ensaios de migração, o simulante não deve apresentar coloração visível nem odores estranhos. Evapore o simulante até reduzi-lo a um volume menor. Transfira quantitativamente para uma cápsula tarada e prossiga com a evaporação em banho-maria e em seguida em estufa a (100 ± 5)°C até a secura. Resfrie a cápsula em dessecador e repita a operação até peso constante. Proceda da mesma maneira para a prova em branco e subtraia o peso do resíduo obtido anteriormente do da prova em branco, obtendo-se assim o resíduo seco do ensaio de migração, que será usado no cálculo da migração total.

Cálculos

No caso de embalagens e equipamentos com capacidade superior ou igual a 250 mL, calcule a migração total (Q) com a fórmula:

$$\frac{R \times S}{A \times V} = \text{migração total, em mg/kg}$$

R = massa do resíduo seco em mg
A = área total de contato da amostra com simulante, em dm^2
S/V = relação área/massa de água correspondente ao volume de contato real entre o material plástico e o alimento, em dm^2/kg de água

Quando o ensaio de migração é efetuado em material plástico genérico e não na embalagem final, utilize a relação S/V real. Caso não se conheça esta relação, pode ser usada uma relação S/V = 6 dm^2/L.

Quando nos testes se usa a embalagem final, então A = S e a fórmula se reduz a:

$$\frac{R}{V} = \text{migração total em mg/kg}$$

R = massa do resíduo seco, em mg
V = massa de água correspondente ao volume da embalagem em kg

A migração (Q') pode ser expressa também em mg/dm^2, mediante a fórmula:

$$\frac{R}{A} = \text{migração total em mg/dm}^2$$

R = massa do resíduo seco, em mg
A = área total de contato da amostra com o simulante em dm^2

No caso do ensaio de migração das amostras referentes ao item **289/IV** (c), a migração Q é calculada de acordo com a fórmula:

$$\frac{R}{N \times V} = \text{migração total em mg/kg}$$

R = massa do resíduo seco, em mg
N = número de amostras analisadas
V = massa de água correspondente ao volume do recipiente no qual serão usados os elementos de vedação ou outros objetos, em kg.

Notas

No caso de n-heptano, o volume do mesmo deverá ser reduzido em destilador rotatório, com a recuperação deste solvente. As últimas porções são transferidas para uma cápsula tarada e prossegue-se como descrito anteriormente.

As tolerâncias analíticas são as seguintes: 5 mg/kg ou 0,8 mg/dm², nos ensaios de migração total, dependendo da forma de expressão dos resultados.

Quando uma embalagem ou equipamento se destina a entrar em contato repetidas vezes com alimentos, com exceção das embalagens retornáveis que são objeto de uma norma específica, os ensaios de migração deverão ser efetuados três vezes sobre uma mesma amostra, usando-se a cada vez quantidades novas de simulante. A aprovação deste tipo de embalagem ou equipamento dependerá do nível de migração total determinado no terceiro ensaio de migração. O resultado final será o nível obtido na terceira prova, porém nos três ensaios o limite de migração total não poderá ser excedido.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 105, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de maio de 1999, Seção I, p. 21-34. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

291/IV Embalagens plásticas – Determinação da migração total com n-heptano após extração com clorofórmio

No caso do simulante utilizado ser n-heptano, o valor do resíduo seco deve ser dividido por 5. Se o valor da migração global correspondente for superior ao limite estabelecido, submete-se o resíduo seco a uma extração com clorofórmio.

Procedimento – Adicione ao resíduo seco, na mesma cápsula, 50 mL de clorofórmio. Aqueça cuidadosamente e filtre em papel Whatman nº 41. Lave o papel de filtro com o mesmo solvente e recolha o filtrado em uma cápsula tarada. Evapore o solvente e seque em estufa a (100 ± 5)°C. Resfrie em dessecador e pese o novo resíduo seco. Este resultado deve ser dividido por 5 para ser usado no cálculo final.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 105, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de maio de 1999, Seção I, p. 21- 34. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

292/IV Embalagens plásticas – Determinação de metais em corantes e pigmentos

Este método se aplica à determinação de metais em corantes e pigmentos em embalagens e equipamentos plásticos. Nos extratos, são determinados os metais utilizando-se a espectrometria de absorção atômica de acordo com o detalhado a seguir: chumbo, selênio, cádmio e zinco (com chama de ar-acetileno); bário: com chama nitroso-acetileno; mercúrio: com vapor frio; arsênio: com geração de hidretos.

Material

Béqueres, funis, balões volumétricos de 50 mL, provetas, balança analítica e espectrômetro de absorção atômica e mesa agitadora.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 1 M para arsênio
Solução de ácido nítrico 1 M para chumbo
Solução de ácido clorídrico 0,1 M para bário, cádmio, zinco, mercúrio e selênio

Procedimento – Pese 2 g de amostra em um béquer de 150 mL. Adicione 30 mL das soluções de extração descritas em reagentes, dependendo do metal a ser analisado. Agite em mesa agitadora durante duas horas à temperatura ambiente. Deixe decantar por uma hora e filtre utilizando papel de filtro umedecido com 2 mL da solução de mesma concentração utilizada para a extração, recolhendo o filtrado em um balão volumétrico de 50 mL. Complete o volume com as soluções de extração. Nos extratos, determine os metais utilizando a espectrometria de absorção atômica.

*Nota***:** poderão ser usados métodos colorimétricos recomendados pela *Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.)*, quando o laboratório não dispuser de espectrômetro de absorção atômica.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 105, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de maio de 1999, Seção I, p. 21-34. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

293/IV Embalagens plásticas – Determinação da migração de corantes e pigmentos

Procedimento – Compare visualmente, com os brancos respectivos, os extratos obtidos nos ensaios de migração total das embalagens e equipamentos plásticos coloridos, realizados com os simulantes correspondentes, nas temperaturas e tempos de contato detalhados na **Tabela 2**. Nestas condições, não devem existir diferenças verificadas visualmente entre a coloração do extrato e do seu branco.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 105, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de maio de 1999, Seção I, p. 21- 34. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

294/IV Embalagens plásticas – Determinação da migração específica de metais e outros elementos

Sempre que a formulação da embalagem apresentar metais e outros elementos com limites de migração constantes na legislação deve-se realizar este ensaio.

Procedimento – Determine as concentrações de metais e outros elementos em extratos obtidos como os descritos nos ensaios de migração total das embalagens e equipamentos plásticos coloridos, realizados com os simulantes correspondentes nas temperaturas e tempos de contato detalhados na **Tabela 2**. A determinação é efetuada por espectrometria de absorção atômica ou, alternativamente, pelas técnicas colorimétricas recomendadas pela *Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.)*. Os elementos a determinar nos extratos acima mencionados são: antimônio (Sb), arsênio (As), bário (Ba), boro (B), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), estanho (Sn), flúor (F), mercúrio (Hg), prata (Ag) e zinco (Zn). Esses elementos não devem migrar em quantidades superiores aos limites estabelecidos na legislação vigente correspondente a contaminantes em alimentos.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 105, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de maio de 1999, Seção I, p. 21-34. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

295/IV Embalagens de vidro e cerâmica – Determinação da migração global

Este método se aplica a embalagens e equipamentos de vidro ou cerâmica esmaltada ou vitrificada que entram em contato direto com alimentos durante sua produção, elaboração, fracionamento, armazenamento, distribuição, comercialização e consumo. As embalagens e equipamentos a que se refere este método estão destinados a entrar em contato com alimentos por períodos prolongados ou breves e repetidos. Engloba as embalagens assim como os equipamentos de uso industrial e utensílios empregados para uso doméstico. Podem ser utilizadas, para contato com alimentos, as embalagens e equipamentos fabricados somente com os seguintes tipos de vidro: borossilicato, sódio-cálcico e cristal.

Os limites de migração total estabelecido são: 50 mg de resíduo/kg de água ou 8 mg/dm^2. As tolerâncias analíticas são: 5 mg/kg de água ou 0,8 mg/dm$^{2.}$

Material

Proveta, placas de Petri ou vidros de relógio, autoclave, banho-maria, cápsula de platina com capacidade de 100 mL, estufa, balança analítica e dessecador.

Reagente

Detergente comercial

Procedimento

Preparação das amostras – Os objetos submetidos a ensaio devem estar limpos e isentos de gordura. Devem ser lavados com uma solução diluída e morna de um detergente comercial, devendo ser enxaguados a seguir com água corrente e depois pelo menos duas vezes com água, ou imersos em água, em repouso, durante pelo menos 30 minutos. O número de amostras deve ser tal que a quantidade de líquido simulante não seja inferior a 250 mL. Em todos os casos devem ser realizadas provas em branco, com uma quantidade de água igual à empregada no ensaio.

Determinação da migração global – Coloque em cada um dos objetos um volume de água correspondente a 90% de sua capacidade e anote o volume usado. Cubra as amostras com uma placa de Petri ou um vidro de relógio. Estes materiais devem ser submetidos, pelo menos 3 vezes, a uma hora de autoclavagem a (121 ± 1)°C. Coloque as amostras em uma autoclave nas seguintes condições:

- 20 minutos para atingir 100°C
- 10 minutos para que o vapor flua livremente
- 2 minutos para atingir 121°C
- 30 minutos estabilizados em 121°C
- 42 ± 4 minutos para resfriamento
- 15 minutos de esfriamento no ar

Retire as amostras da autoclave e coloque em um banho de água a 80°C, esfriado com água corrente durante (10-20) minutos, até alcançar a temperatura ambiente. Transfira o conteúdo dos recipientes em teste, fração por fração, para uma cápsula de platina com capacidade aproximada de 100 mL, previamente seca em estufa a 150°C e pesada em balança analítica. Evapore o conteúdo das cápsulas em banho-maria até a secura. Depois da evaporação, coloque as cápsulas durante 1 hora em estufa a (150 ± 5)°C. Esfrie as cápsulas em dessecador e pese novamente em balança analítica. O resultado da pesagem menos a correspondente prova em branco é o resíduo seco.

Cálculos

O resultado, denominado migração total, pode ser expresso de acordo com as seguintes equações:

$$\frac{R}{V} = Q \text{ ou } \frac{R}{S} = Q'$$

R = massa do resíduo seco em mg
S = área da amostra de vidro ensaiada em dm^2
V = massa de água correspondente ao volume da embalagem em kg
Q = migração total, em mg/kg de água
Q'= migração total em mg/dm^2

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. – Portaria Nº 27, da Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de março de 1996, Seção I, p. 4691-4692. Embalagens e equipamentos de vidro e cerâmica destinados a entrar em contato com alimentos.

296/IV Embalagens de vidro e cerâmica – Determinação da migração específica de metais pesados

O ensaio de migração específica de metais pesados se aplica também aos objetos de vidro decorados na superfície de contato com os alimentos. Estes ensaios devem ser efetuados com proteção da luz. Os limites de migração específica de metais pesados são estabelecidos de acordo com as seguintes categorias:

Categoria 1: objetos que não possam ser preenchidos e objetos que possam ser preenchidos, cuja profundidade interna entre o ponto mais baixo e o ponto mais horizontal que passa pela borda superior seja inferior ou igual a 25 mm:

- chumbo: 0,8 mg/dm^2
- cádmio: 0,07 mg/dm^2

Categoria 2: todos os demais objetos que possam ser preenchidos:
- chumbo: 4,0 mg/kg
- cádmio: 0,3 mg/kg

Categoria 3: utensílios de cozinha, embalagens e recipientes de armazenamento que tenham capacidade superior a 3 litros:
- chumbo: 1,3 mg/kg
- cádmio: 0,1 mg/kg

Material

Estufa, proveta, vidro de relógio, termômetro e espectrômetro de absorção atômica.

Reagente

Ácido acético a 4% v/v

Procedimento

Preparação das amostras – Limpe e desengordure os objetos submetidos ao ensaio com uma solução diluída e morna de um detergente comercial. Enxágüe a seguir com bastante água corrente e depois com água destilada ou desmineralizada. Despreze as águas de enxaguadura e inverta os recipientes sobre um tecido limpo e não felpudo.

Determinação da migração específica – Coloque os recipientes vazios durante 45 minutos em uma estufa a (80 ± 2)°C. Coloque solução de ácido acético a 4%, previamente aquecido a 80°C, até 90% da capacidade do recipiente. Anote o volume de ácido usado e cubra com vidro de relógio. Deixe os recipientes em estufa, regulada a (80 ± 2)°C durante (120 ± 2) minutos. Retire os recipientes da estufa e leve à temperatura ambiente o mais rápido possível, protegendo-os da luz.

Determinação da migração de chumbo e cádmio – Utilize a espectrofotometria de absorção atômica para determinar as quantidades de metais liberadas pela amostra, expressando os resultados em mg/kg ou em mg/dm² de área de amostra em contato com o líquido de ensaio, efetuando uma prova em branco em paralelo.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 27, da Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 20 de março de 1996, Seção I, p. 4691- 4692. Embalagens e equipamentos de vidro e cerâmica destinados a entrar em contato com alimentos.

297/IV Embalagens metálicas – Determinação da migração global

Este método se aplica às embalagens, tampas e equipamentos elaborados com materiais metálicos, revestidos ou não, que entram em contato com alimentos e suas matérias-primas durante sua produção, elaboração, transporte, distribuição e armazenamento. Os limites de migração total estabelecidos são 50 mg/kg ou 8 mg/dm^2, de acordo com a forma de expressão dos resultados. As tolerâncias analíticas são as seguintes: 5 mg/kg ou 0,8 mg/dm^2, de acordo com a forma de expressão dos resultados.

Material

Provetas de 50 mL, cápsulas de porcelana, banho-maria, funil, papel de filtro quantitativo, estufa, balança analítica e dessecador.

Reagentes

Solventes simulantes como descrito na **Tabela 1**
Clorofórmio

Procedimento – O procedimento de ensaio é o mesmo descrito em **286/IV**, **287/IV**, **288/IV**, **289IV** e **290/IV,** com a ressalva que o verniz ou esmalte deve ser aplicado sobre o substrato metálico para o qual se destina.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 20, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 26 de março de 2007, Seção I, p.55-56. Disposições sobre embalagens e equipamentos metálicos em contato com alimentos.

298/IV Embalagens metálicas – Resíduo solúvel em clorofórmio corrigido

Caso o resultado encontrado no ensaio de migração total seja superior ao limite estabelecido, efetue a extração com clorofórmio para correção por migração de metais.

Procedimento – Adicione 50 mL de clorofórmio ao resíduo proveniente do ensaio de migração total e aqueça em banho-maria até completa dissolução. Esfrie e filtre em papel de filtro quantitativo em uma cápsula tarada, evaporando completamente. Seque em estufa e pese, repetindo o procedimento até massa constante. Paralelamente efetue um ensaio em branco, para obter a massa do resíduo corrigido (R´).

Cálculo

Quando o ensaio de migração for efetuado com material metálico genérico, deve-se uti-

lizar a seguinte fórmula:

$$\frac{R \times S}{A \times V} = \text{migração total em mg/kg}$$

R´ = massa do resíduo corrigido em mg
A = área total da amostra em contato com o simulante em dm^2
S/V = relação área / massa de água correspondente ao volume de contato real do material e o alimento em dm^2/kg de água

Quando o ensaio de migração for efetuado com a embalagem final ou com tampas, então A = S e a fórmula se reduz a:

$$\frac{R'}{V} = \text{migração total em mg/kg}$$

R´= massa do resíduo corrigido em mg
V = massa de água correspondente ao volume de embalagem em kg.

A migração (Q´) pode também ser expressa em mg/dm^2, mediante a seguinte fórmula:

$$\frac{R'}{A} = \text{migração total em mg/dm}^2$$

R´= massa do resíduo corrigido em mg
A = área total de contato entre a amostra e o simulante em dm^2

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 20, da Agência Nacional de de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 26 de março de 2007, Seção I, p.55- 56. Disposições sobre embalagens e equipamentos metálicos em contato com alimentos.

299/IV Embalagens metálicas – Resíduo solúvel em clorofórmio corrigido para zinco

Este método se aplica para vernizes que contenham óxido de zinco, se a migração total excede os limites estabelecidos. O método se baseia na determinação gravimétrica do resíduo solúvel.

Material

Mufla ou maçarico tipo Meker, cápsula de platina, balança analítica e dessecador.

Procedimento – Calcine o resíduo obtido em cápsula de platina por aquecimento em maçarico tipo Meker ou mufla à temperatura equivalente para destruir a matéria orgânica. Deixe ao rubro por aproximadamente 1 minuto. Esfrie ao ar durante 3 minutos, e coloque em dessecador durante 30 minutos e pese com precisão de 0,1 mg. Esta cinza

é analisada para determinação de zinco de acordo com o método da *A.O.A.C.* ou outro equivalente.

Cálculo

Expresse o conteúdo de zinco na cinza como oleato de zinco, e subtraia a quantidade de resíduo solúvel em clorofórmio (R´), para obter o valor de resíduo solúvel em clorofórmio corrigido para zinco (R"). Este R" substitui o R´ nas equações anteriores.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 20, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial,* Brasília, 26 de março de 2007, Seção I, p.55-56. Disposições sobre embalagens e equipamentos metálicos em contato com alimentos.

300/IV Embalagens metálicas – Determinação da migração específica de metais em embalagens de folhas de flandres

Material

Banho-maria termostatizado ou autoclave, espectrômetro de absorção atômica, estufa e béqueres.

Reagentes

Solução aquosa contendo 3% de cloreto de sódio, 10% de sacarose e 1% de ácido tartárico.

Solução aquosa de álcool a 8% contendo 0,5% de ácido tartárico.

Procedimento – Para a realização dos ensaios de migração específica de metais, os alimentos são classificados e fixados os respectivos simulantes da seguinte forma:

Tipo A – Alimentos aquosos ácidos e não ácidos, esterilizados na embalagem por ação do calor, que podem conter sal e/ou açúcar e incluir emulsões óleo/água, ou baixo teor de gordura.

Estes produtos devem ser ensaiados com uma solução aquosa contendo 3% de cloreto de sódio, 10% de sacarose e 1% de ácido tartárico, com a qual se completa o volume da embalagem. Deve-se manter a embalagem fechada, contendo a solução, em banho de água por 2 horas a 100°C ou em autoclave durante 30 minutos a 120°C.

Tipo B – Alimentos de composição similar aos do tipo A, que não sofram tratamento térmico. Estes alimentos devem ser ensaiados com o mesmo simulante que os do tipo A,

mantendo as embalagens durante 24 horas a 80°C.

Tipo C – Alimentos (bebidas) com conteúdo de álcool superior a 4%. Estes produtos devem ser ensaiados com solução aquosa de álcool a 8%, contendo 0,5% de ácido tartárico, mantendo-se a embalagem durante 48 horas a 40°C.

Notas
Em todos os casos, o espaço livre bruto de embalagem no ensaio não deve ser superior a (6-7)% de seu volume total. O fecho hermético deve ser feito depois do acondicionamento, com a solução aquecida a 80°C.

No caso de ensaio de tampas para embalagens de vidro, deve-se adotar o mesmo procedimento, utilizando-se a embalagem correspondente em posição invertida, de modo a permitir o contato do material em ensaio com o simulante. Quando se tratar de alimentos tipo A, as condições de extração devem ser em banho de água por duas horas a 100°C.

Para equipamentos metálicos devem ser empregadas as condições reais de uso.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 20, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 26 de março de 2007, Seção I, p.55- 56. Disposições sobre embalagens e equipamentos metálicos em contato com alimentos.

301/IV Embalagens celulósicas – Determinação da migração global

Esta metodologia se aplica a embalagens e equipamentos celulósicos destinados a entrar em contato com alimentos e matérias-primas para alimentos, inclusive aqueles materiais celulósicos revestidos ou tratados superficialmente com parafinas, resinas poliméricas e outros. Aplica-se também às embalagens e equipamentos de uso doméstico, elaborados ou revestidos com papel e cartão, ou embalagens compostas por vários tipos de materiais, sempre que a face em contato com alimentos seja celulósica. Excluem-se aquelas embalagens e equipamentos celulósicos destinados a entrar em contato com alimentos que necessariamente são descascados para seu consumo (por exemplo: frutas cítricas, nozes com cascas, cocos, abacaxis, melões etc.) sempre e quando se assegure que não modifiquem as características organoléticas do alimento e não cedam substâncias prejudiciais para a saúde. Não se aplica a embalagens secundárias fabricadas com papel,

cartão ou cartolina, sempre que se assegure que não entrem em contato com alimentos.

Este método se baseia na quantificação gravimétrica do resíduo total extraído do material celulósico após contato com simulantes de alimentos, sob condições reais de emprego do material. O limite de migração total para embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos, com as correções indicadas, é de 8 mg/dm^2.

Material

Frascos Erlenmeyer, cápsula de platina ou de vidro borosilicato, estufa, béqueres, chapa de aquecimento, balança analítica, dessecador, congelador, refrigerador, banho-maria e autoclave ou forno de microondas.

Reagentes

Água destilada e desmineralizada
n-Heptano
Solução aquosa de ácido acético a 3% v/v
Solução alcoólica a 15% v/v ou na concentração mais próxima do alimento, preparada a partir de álcool diluído com água destilada e desmineralizada.
Clorofórmio

Notas
Verifique o descrito em **287/IV**.
As análises devem ser efetuadas em quadruplicata, acompanhadas pela análise de um branco.
Para os ensaios de migração devem ser utilizados os simulantes descritos na **Tabela 1**, exceto o simulante D que será o n-heptano.
O contato dos materiais celulósicos com os simulantes, nas condições de tempo e temperatura selecionadas na **Tabela 3**, será realizado de maneira a que reproduza as condições normais e previsíveis de uso na elaboração, fracionamento, armazenamento, distribuição, comercialização e consumo dos alimentos.

Procedimento – Coloque o simulante escolhido em uma relação de 0,3 mL/cm^2 de superfície analisada, na temperatura selecionada segundo a **Tabela 3**, cubra ou feche o recipiente e deixe na temperatura de ensaio pelo tempo indicado. No final do período de contato, deixe atingir a temperatura ambiente, junte o solvente de cada uma das embalagens ou equipamentos utilizados em cada ensaio em um frasco Erlenmeyer ou béquer limpo. Lave as amostras com uma pequena quantidade de solvente limpo e agregue os líquidos de lavagem ao recipiente Evapore o solvente até aproximadamente 100 mL e transfira para uma cápsula tarada de platina ou vidro borossilicato. Lave o frasco Erlenmeyer ou béquer três vezes com pequenas porções do solvente utilizado, agregando os líquidos de lavagem à cápsula. Evapore o conteúdo da cápsula até poucos mL, evitando

perdas, em uma chapa de aquecimento. Os últimos mL devem ser evaporados em estufa a 105°C. Esfrie a cápsula em dessecador por 30 minutos e pese o resíduo com precisão de 0,1 mg.

Cálculo

Calcule a migração total em mg/dm² de superfície da embalagem analisada segundo o cálculo do procedimento **290/IV**.
Quando a migração total exceder o limite estabelecido, prosseguir com a extração do resíduo solúvel em clorofórmio, segundo o procedimento **291/IV** .

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 177, da Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 08 de março de 1999, Seção I, p. 9-14. Disposições gerais para embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos.

302/IV Embalagens celulósicas – Extração em materiais com pigmentos minerais

Sempre que a embalagem, equipamento ou material não permitir a realização da extração segundo **301/IV**, no caso de materiais sem impressão e sem revestimento com pigmentos minerais (sem *coating*), realizar a extração segundo este método.

Material

Banho-maria termostatizado, com temperatura variando de [(20-50)±1]ºC, com capacidade para que um béquer de 800 mL fique parcialmente submerso, balança analítica, pinças, chapas de aquecimento, estufa, mufla, clipes para papel nº 2, béquer de 800 mL com vidro de relógio, cápsula de 250 mL, cinco telas quadradas de pelo menos 40 cm^2 cada uma, de aço inoxidável nº 316, suporte para conter várias amostras e arame capaz de sustentar o sistema de fixação das amostras.

Reagentes

Solventes simulantes como descrito na **Tabela 1**.

Procedimento – Para cada um dos ensaios de extração, corte precisamente oito amostras quadradas, iguais às telas, de 40 cm^2, no mínimo. Monte cuidadosamente as oito amostras e as telas metálicas em forma de sanduíche, de modo a que o lado de contato com o alimento de cada amostra fique sempre em contato com a tela, como descrito: tela, amostra, amostra, tela, amostra, amostra, tela, etc. Prenda o sanduíche cuidadosamente com um clipe de papel nº 2, deixando um espaço suficiente no topo para poder atravessar

o arame. Coloque todo o conjunto em um béquer de 800 mL, contendo 100 mL do solvente simulante apropriado, em um banho-maria com a temperatura desejada, cubra com um vidro de relógio e deixe o tempo necessário. Depois do acondicionamento, usando as pinças, cuidadosamente, retire o sanduíche, prenda no suporte e deixe escorrendo sobre o próprio solvente simulante utilizado no teste. Quando o solvente já tiver escorrido, transfira o mesmo para uma cápsula de 250 mL tarada. Lave o béquer de 800 mL três vezes usando não mais que 50 mL do solvente utilizado no ensaio.

Cálculo

Determine o resíduo não volátil total extraído como descrito no cálculo do procedimento **290/IV**.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 177, da Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 08 de março de 1999, Seção I, p. 9-14. Disposições gerais para embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos.

303/IV Embalagens celulósicas – Extração em materiais revestidos ou tratados superficialmente com parafinas e/ou laminados

Material

Dispositivo que permita a fixação da amostra de forma que o contato com o simulante seja apenas no lado de interesse, como por exemplo a **Figura 1**, ou a cela descrita no *Official Methods of Analysis Official Analytical Chemists, 13th ed. (1980) Sec. 21010 - 21015*, copos de vidro com borda recoberta por uma fita de *teflon*, béqueres.

Reagentes

Solvente simulante como descrito na **Tabela 1**

Procedimento – Corte a amostra nas dimensões compatíveis com os dispositivos empregados. O número de amostras para cada determinação deve ter uma área total de contato de pelo menos 600 cm^2. Coloque os solventes simulantes em um número adequado de copos de vidro com borda recoberta por fita *teflon*, de modo que no total se utilize um volume de 100 mL e se mantenha a relação área/volume em cada um dos copos. Coloque a amostra sobre o copo e adapte o conjunto no dispositivo

de fixação (**Figura 1**). Inverta o dispositivo para que haja contato do solvente com a amostra. Faça um branco substituindo a amostra por placa de vidro para verificar se houve migração dos elementos da fita de vedação para o solvente. Deixe em contato pelo tempo e temperatura estipulados na **Tabela 3**. Inverta o dispositivo para a posição normal e deixe transcorrer o tempo necessário. Retire as amostras e junte as alíquotas de solvente em um béquer tarado. Lave os copos de vidro com não mais de 20 mL por copo com o solvente utilizado no teste. Evapore o solvente em chapa de aquecimento até aproximadamente 5 mL, que devem ser totalmente evaporados em uma estufa a aproximadamente 105°C. Esfrie o béquer em dessecador por 30 minutos e pese o resíduo em uma balança analítica. Subtraia o peso obtido no teste do branco obtendo um resíduo total (R). O peso do branco deve ser < 1,0 mg/100 mL e < 30% do peso do resíduo total.

Cálculo

Calcule a migração total em mg/cm^2 de amostra, de acordo com o descrito no procedimento **290/IV**.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 177, da Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 08 de março de 1999, Seção I, p. 9-14. Disposições gerais para embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos.

304/IV Embalagens celulósicas – Determinação do resíduo solúvel em clorofórmio

Quando a migração total exceder o limite estabelecido no procedimento **290/IV**, prossiga com a extração do resíduo solúvel em clorofórmio.

Material

Provetas, cápsulas de platina ou porcelana, funil de vidro, papel de filtro Whatman nº 41, béqueres, chapa de aquecimento, estufa, balança analítica e dessecador.

Reagente

Clorofórmio

Procedimento – Adicione 50 mL de clorofórmio ao resíduo total (R) obtido no procedimento **301/IV**. Aqueça cuidadosamente e filtre em papel de filtro Whatman nº 41 (ou

equivalente) utilizando um funil de vidro. Colete o filtrado em uma cápsula de porcelana ou platina limpa e tarada. Lave o béquer e o papel de filtro com uma segunda porção de clorofórmio e junte ao filtrado original. Evapore até poucos mL em uma chapa de aquecimento. Os últimos mL devem ser evaporados em uma estufa a 105°C. Esfrie a cápsula em dessecador por 30 minutos e pese com precisão de 0,1 mg para obter o resíduo solúvel em clorofórmio (R'). Este resíduo R' deve substituir o R nas equações descritas em **306/IV**.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 177, da Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 08 de março de 1999, Seção I, p. 9 a 14. Disposições gerais para embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos.

305/IV Embalagens celulósicas – Determinação do resíduo solúvel em clorofórmio corrigido para zinco

Quando a migração total calculada com o resíduo solúvel em clorofórmio (R') exceder o limite estabelecido, proceda a correção para o zinco. O método se baseia na análise gravimétrica para determinação de zinco.

Material

Cápsula de platina, mufla ou bico tipo Meker, dessecador e balança analítica.

Procedimento – Calcine o resíduo solúvel em clorofórmio obtido em cápsula de platina por aquecimento em bico tipo Meker ou em mufla à temperatura equivalente para destruir a matéria orgânica. Deixe ao rubro por aproximadamente um minuto. Esfrie ao ar durante 3 minutos e posteriormente em dessecador por 30 minutos. Pese e determine o teor de zinco na cinza de acordo com o método *A.O.A.C.* ou outro equivalente.

Cálculo

Expresse o conteúdo de zinco na cinza, como oleato de zinco e subtraia esta quantidade do resíduo solúvel em clorofórmio (R'), para obter o valor do resíduo solúvel em clorofórmio corrigido para zinco (R") Este R" substitui o R' nas equações apresentadas em **306/IV**.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 177, da Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 08 de março de 1999, Seção I, p. 9-14. Disposições gerais para embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos.

306/IV Embalagens celulósicas – Determinação do resíduo solúvel em clorofórmio corrigido para ceras, vaselinas e óleos minerais.

A correção para ceras, vaselinas e óleos minerais é necessária no caso em que estas substâncias façam parte da composição da amostra.

Material

Coluna cromatográfica padrão de 100 mm de diâmetro interno por 60 cm ou bureta padrão de 50 mL com diâmetro interno de (10-11) mm com uma válvula reguladora de vidro, resina de perfluorcarbono ou equivalente. A coluna (ou bureta) pode ser opcionalmente equipada com disco de vidro sinterizado e o topo da coluna pode ser opcionalmente ajustado com reserva de 100 mL de solvente, lã de vidro fina, areia fina, proveta, béquer, estufa, chapa de aquecimento, dessecador, balança analítica, pipetas e balões volumétricos.

Reagentes

n-Heptano
Sulfato de sódio anidro
Óxido de alumínio grau cromatográfico de (80-200) *mesh*

Procedimento

Preparação da coluna – Coloque uma pequena porção de lã de vidro fina no fundo da coluna (ou bureta), se esta não estiver equipada com disco de vidro sinterizado. Coloque uma camada de (15-20) mm de areia fina. Meça 15 mm de óxido de alumínio grau cromatográfico de (80-200) *mesh* num cilindro graduado (para medir, bata cuidadosamente o cilindro para acomodar o óxido de alumínio). Transfira o óxido de alumínio para a coluna cromatográfica, batendo levemente durante e depois da transferência. Coloque sobre a camada de óxido de alumínio uma camada de (10-15) mm de sulfato de sódio anidro e no topo coloque uma porção de lã de vidro, de (6-10) mm. Adicione 25 mL de heptano na coluna com a válvula reguladora aberta para permitir que o heptano passe através da coluna até o nível do líquido atingir o topo da coluna e então feche a válvula.

Procedimento para o resíduo solúvel em clorofórmio pesando 0,5 g ou menos – Dissolva o resíduo solúvel em clorofórmio obtido no procedimento **304/IV**, adicionando 20 mL de heptano e agitando se necessário. Aqueça cuidadosamente a té dissolver o resíduo. O heptano pode ser adicionado até 50 mL para auxiliar a dissolução do resíduo. Esfrie até a temperatura ambiente (se a solução se tornar turva, usar o procedimento descrito em **305/IV**). Transfira o heptano para a coluna. Enxágüe o frasco com 10 mL de heptano e adicione à coluna. Deixe o líquido passar pela coluna, gotejando em torno de 2 mL/min e colete a amostra eluída em béquer limpo e tarado. Quando o nível do líquido alcançar o topo da coluna, feche a válvula reguladora temporariamente. Enxágüe o frasco que continha a amostra com (10-15) mL de heptano e adicione à coluna. Elua a coluna com mais heptano, coletando no total aproximadamente 100 mL de solvente. Evapore em chapa de aquecimento o heptano eluído da coluna até aproximadamente 5 mL. Seque o restante

em estufa a 105°C por 30 minutos. Esfrie o frasco em dessecador por 30 minutos e pese o resíduo com precisão de 0,1 mg.

Cálculo

Subtraia o peso obtido do peso do resíduo solúvel em clorofórmio (R') para obter o resíduo corrigido para cera, vaselina e óleos minerais (RR'). Este RR' substitui o R' nas equações apresentadas em **306/IV**.

Procedimento para o resíduo solúvel em clorofórmio pesando mais que 0,5 g – Dissolva o resíduo solúvel em clorofórmio seguindo o mesmo procedimento descrito para o resíduo solúvel em clorofórmio pesando 0,5 g ou menos usando uma maior quantidade de heptano. Transfira a solução de heptano para um balão volumétrico de tamanho apropriado e ajuste o volume com adição de heptano (exemplo: balão volumétrico de 250 mL para 2,5 g de resíduo). Pipete uma alíquota de 50 mL calculada para conter (0,1-0,5) g de resíduo solúvel em clorofórmio e analise cromatograficamente como descrito no procedimento para o resíduo solúvel em clorofórmio pesando 0,5 g ou menos.

Neste caso, o resíduo seco pesado de heptano deve ser multiplicado pelo fator de diluição para obter o peso do resíduo de cera, vaselina e óleo mineral a ser subtraído do peso do resíduo solúvel em clorofórmio (R') para obter a correção de resíduo solúvel em clorofórmio para cera, vaselina e óleo mineral (RR'). Este RR' substitui R' na equação apresentada em **306/IV**. No caso do extrato solúvel em clorofórmio que contenha ceras de alto ponto de fusão (ponto de fusão maior que 77°C), pode ser necessária uma diluição da solução de heptano, em que uma alíquota de 50 mL possa conter somente (0,1-0,2) g de resíduo solúvel em clorofórmio.

Cálculos

No caso do solvente simulante utilizado ser água, soluções de ácido acético ou soluções alcoólicas, a migração total é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{R}{S \times 100} = \text{migração total em mg/dm}^2$$

R = massa do resíduo total em mg
S = superfície de amostra testada em cm^2
No caso do solvente simulante utilizado ser n-heptano, a migração total é calculada da seguinte maneira:

$$\frac{R \times 100}{S \times F} = \text{migração total em mg/dm}^2$$

R = massa do resíduo total, em mg

S = superfície da amostra testada, em cm^2
F = 5, que corresponde ao fator de correção devido à relação de maior extração do n-heptano quando comparada com a extração, nas mesmas condições, de um alimento oleoso ou gorduroso

Nota: R', R" e RR' substituem R na equação quando for necessário.

Tabela 3 – Condições para os ensaios de migração

CONDIÇÕES DE CONTATO REAL DE USO	CONDIÇÕES DE ENSAIO			
	Simulante A	Simulante B	Simulante C	Simulante D
	Água	Ácido Acético a 3% (m/v)	Álcool a 15% (v/v)	n-heptano*
A . Contato prolongado t >24h				
T< 5ºC	20°C/48 h	20°C/48 h	20ºC/48 h	20°C/30 min
5°C<T< 40°C	50°C/24 h	50°C/24 h	50°C/24 h	20°C/30 min
B. Contato breve (2h < t < 24 h)				
à temperatura ambiente	40°C/24 h	40°C/24 h	40°C/24 h	20°C/15 min
C. Contato momentâneo (t < 2 h)				
à temperatura ambiente	40°C/2 h	40°C/2 h	40°C/2 h	20°C/15 min
D. Elaboração				
40°C<T≤80ºC	65ºC/2 h	65°C/2 h	65°C/2h	40°C/30 min
80°C<T≤100°C	100°C/30 min	100°C/30 min	–	50°C/30 min
T>100°C	120°C/2 h	120°C/2 h	–	65°C/2 h
E. Envasado a quente				
T>70ºC	à T de ebulição e esfriar a 38°C	à T de ebulição e esfriar a 38°C	–	50°C/15 min

*No caso de material celulósico revestido com parafina não é necessário o ensaio de migração total com o simulante n-heptano.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Portaria Nº 177, da Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 08 de março de 1999, Seção I, p. 9-14. Disposições gerais para embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos.

307/IV Embalagens elastoméricas – Determinação de ditiocarbamatos, tiouramas e xantogenatos

As embalagens, equipamentos e acessórios elaborados com material elastomérico devem ser analisadas da mesma forma que as embalagens plásticas, atendendo aos ensaios de migração total e específica, utilizando-se os mesmos solventes simulantes e a mesma tabela de temperatura e tempo de contato. Uma análise adicional importante é a determinação específica de agentes de vulcanização (ditiocarbamatos, tiouramas e xantogenatos), devido à sua toxicidade.

Material

Pipeta de 100 mL, béquer de 400 mL, trompa de vácuo, balão volumétrico de 25 mL, manta aquecedora, proveta de 10 mL, espectrofotômetro UV/VIS e aparelhagem montada como segue: balão de 3 gargalos, ligado, em série, a 2 retentores. Num dos gargalos é inserido um tubo de vidro para passagem de ar, no central, um funil de separação para alimentação e, no outro, um refrigerante ligado, com um tubo em U, a um retentor contendo, sobre esferas de vidro, 10 mL de solução de hidróxido de sódio a 6,5% (para retenção de eventual gás sulfídrico formado). O retentor é ligado finalmente a um outro, munido de válvula de recolhimento, contendo, sobre esferas de vidro, 15 mL de reagente colorimétrico. Neste último retentor é aplicado um pequeno vácuo que permite um fluxo constante de ar (**Figura 2**).

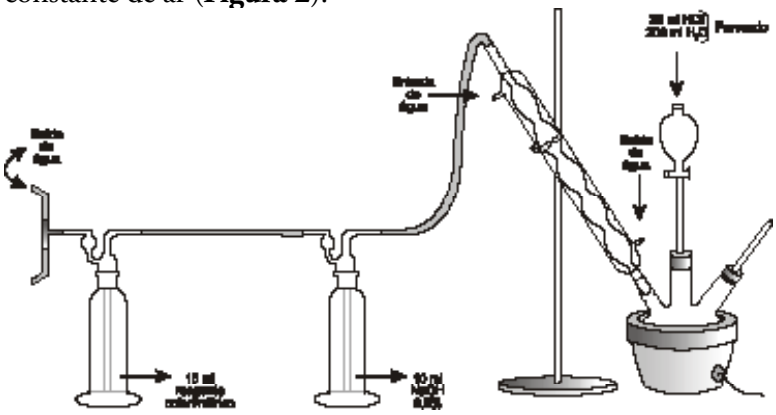


Figura 2 – Aparelho para a determinação de sulfeto de carbono

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio a 6,5%
Cloreto estanoso
Ácido clorídrico a 37%
Sulfeto de carbono

Reagente colorimétrico – Pese 12 mg de acetato de cobre monoidratado e 25 g de dietanolamina, transfira para um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com álcool.

Procedimento – Coloque no balão de três gargalos 100 mL da solução proveniente da prova de cessão. Adicione 2 g de cloreto estanoso e aplique o vácuo. Aqueça o balão por meio de uma manta aquecedora. Paralelamente, leve à ebulição um béquer contendo uma solução de ácido clorídrico diluído (25 mL de ácido clorídrico a 37% em 200 mL de água). Coloque por meio de um funil de separação no balão. Recolha o sulfeto de carbono desenvolvido, após ter passado pelo retentor contendo solução de hidróxido de sódio a 6,5%, no segundo retentor, sobre o reagente colorimétrico. Interrompa o vácuo e o aquecimento após 45 minutos. Recolha o líquido amarelo, através da válvula, em balão volumétrico de 25 mL. Lave o retentor com 5 mL de álcool. Complete o volume com álcool. Faça a leitura em espectrofotômetro a 435 nm, em cela de um cm de caminho ótico. Como branco, utilize uma solução preparada com 25 mL de reagente colorimétrico e 10 mL de álcool. Como referência, use uma curva-padrão de sulfeto de carbono. Expresse os resultados em sulfeto de carbono.

Curva-padrão de sulfeto de carbono – Prepare soluções contendo, em 10 mL, quantidades de sulfeto de carbono compreendidas entre (0-0,5) mg. Adicione a cada uma delas 15 mL de reagente colorimétrico e efetue, após 15 minutos, leitura no espectrofotômetro a 435 nm, em cela de 1 cm de caminho ótico. Faça um branco com 10 mL de álcool e 15 mL de reagente colorimétrico. Construa um gráfico no qual figure, na abcissa, a quantidade de sulfeto de carbono e, na ordenada, os respectivos valores de absorbância.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos etc. - Resolução Nº 123, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial, Brasília, 26 de junho de 2001. Disposições gerais para embalagens e equipamentos elastoméricos em contato com alimentos.

Colaboradores

Lúcia Tieco Fukushima Murata, Maria Cecília Depieri Nunes, Maria Rosa da Silva de Alcântara, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Eduardo Masselli Bernardo.

CAPÍTULO **XV**

CONSERVAS VEGETAIS, FRUTAS E PRODUTOS DE FRUTAS

CONSERVAS VEGETAIS, FRUTAS E PRODUTOS DE FRUTAS

Conservas vegetais

Estão incluídos neste capítulo as conservas de hortaliças (verduras, legumes, raízes, tubérculos e rizomas), de cogumelo, os picles e extratos e purês de tomate. Hortaliça é a planta herbácea, da qual uma ou mais partes são utilizadas como alimento, na sua forma natural. Entende-se por hortaliça, tubérculos, raízes, rizomas, bulbos, talos, brotos, folhas, inflorescências, pecíolos, frutos, sementes e cogumelos comestíveis cultivados. Hortaliça em conserva é o produto preparado com as partes comestíveis das hortaliças, envasadas praticamente cruas, reidratadas ou pré-cozidas, imersas ou não em líquido de cobertura apropriado, submetidas a adequado processamento tecnológico antes ou depois de fechadas hermeticamente nos recipientes utilizados a fim de evitar a sua alteração. Muitas vezes, nestes produtos, é determinado o porcentual de sólidos drenados em relação ao peso total conforme o método **003/IV**. No caso do palmito, pimentão e alcachofra, deve ser determinado o pH (**017/IV**), para atender ao regulamento técnico específico e a pesquisa de ácido cítrico (**059/IV**). Na parte sólida, moída e homogeneizada, são determinadas cinzas (**018/IV**) e cloretos (**028/IV**) ou (**029/IV**).

Verdura é a parte geralmente verde das hortaliças, utilizada como alimento no seu estado natural. Legume é o fruto ou a semente de diferentes espécies de plantas, principalmente das leguminosas, utilizado como alimento.

Raiz, tubérculo e rizoma são partes subterrâneas desenvolvidas de determinadas plantas, utilizadas como alimento, por exemplo: tubérculo (batata), rizoma (araruta), raiz (cenoura).

Extrato de tomate é o produto resultante da concentração da polpa de frutos maduros e sãos do tomateiro (*Solanum lycopersicum)* por processo tecnológico adequado. Será classificado como purê de tomate se apresentar um teor de substância seca menos cloreto de sódio, de no mínimo 9% m/m e como extrato de tomate, de no mínimo 18% m/m. Nesses produtos, são determinados o resíduo seco de acordo com o método **015/IV,** usando preferencialmente estufa a vácuo a 70°C, cinzas conforme **018/IV** e pesquisados os corantes artificiais como em **051/IV.** Eventualmente, determina-se a sacarose conforme o método **039/IV**. Nos cogumelos em conserva é efetuada a determinação de dióxido de enxofre pelo método **050/IV**.

Picles é o produto preparado com as partes comestíveis de frutas e hortaliças, com ou sem casca, submetidos ou não a processo fermentativo natural. No mesmo é determinada a acidez, expressa em ácido acético, eventualmente, o teor de cloretos conforme o método **028/IV** ou **029/IV** e sólidos solúveis como em **015/IV**.

Preparo das amostras de conservas vegetais

Hortaliças em conserva e picles – Os caroços e as sementes devem ser removidos sem partilos. Homogeneíze a amostra com trituradores, com qualquer equipamento mecânico adequado ou em almofariz. As amostras enviadas em embalagens grandes devem ser homogeneizadas e retiradas algumas porções para trituração.

Palmito, pimentão e alcachofra em conserva – Utilize para a determinação do pH e pesquisa do ácido cítrico, o líquido de cobertura do produto separado por drenagem, conforme descrito em **003/IV**.

Extrato, purê e polpa de tomate – Homogeneíze totalmente a amostra por agitação.

Frutas e derivados

Também são abordados neste capítulo os produtos de frutas, tais como: frutas secas, cristalizadas e glaceadas, liofilizadas, doces de frutas em calda e compotas, geléias de frutas, doces em massa, sucos de frutas, polpas, néctares e coco e seus derivados (água de coco, leite de coco). Algumas das definições contidas na legislação específica estão descritas abaixo:

Frutas secas – Produtos obtidos pela perda parcial da água das frutas, inteiras ou em pedaços, por processos tecnológicos adequados.

Frutas liofilizadas - produtos obtidos pela desidratação quase completa das frutas, inteiras ou em pedaços, pelo processo de liofilização.

Frutas cristalizadas e glaceadas – Produtos preparados com frutas, nas quais se substitui parte da água de constituição por açúcar, com tecnologia adequada, recobrindo-as ou não com uma camada de sacarose.

As determinações realizadas em frutas secas, liofilizadas e cristalizadas incluem: umidade, acidez titulável, acidez em ácidos orgânicos, glicídios redutores em glicose (**038/IV**), glicídios não redutores em sacarose (**039/IV**) cinzas (**018/IV**), fibra alimentar (**045/IV** e **046/IV**) dióxido de enxofre (**050/IV**), minerais e metais pesados (**cap. XXIII**).

Geléias de frutas – Produtos preparados a partir de frutas e/ou sucos, misturados com açúcar, com adição de pectina, ácidos e outros ingredientes permitidos, podendo apresentar frutas inteiras, partes e/ou pedaços sob variadas formas. Esta mistura será convenientemente processada até se obter uma concentração e consistência semi-sólida adequadas. As determinações usuais neste produto são: sólidos totais, sólidos solúveis em graus Brix, sólidos insolúveis em água, pH, acidez titulável, acidez em ácidos orgânicos, glicídios redutores em glicose (**038/IV**), glicídios não redutores em sacarose (**039/IV**), cinzas (**018/IV**), protídios (**036/IV** ou **037/IV**), fibra alimentar (**045/IV** e **046/IV**), corantes orgânicos artificiais (**051/IV**), além da pesquisa de outros aditivos e, eventualmente, minerais e metais pesados (**cap. XXIII**).

Doces em massa ou pasta – Produtos resultantes do processamento das partes comestíveis desintegradas de vegetais, com açúcar e outros ingredientes e aditivos permitidos, até se obter uma concentração e consistência adequadas. Na análise destes produtos, as determinações usuais são: sólidos totais, sólidos solúveis em graus Brix, sólidos insolúveis em água , pH (**017/IV**), acidez titulável, acidez em ácidos orgânicos, glicídios redutores em glicose (**038/IV**), glicídios não redutores em sacarose (**039/IV**), cinzas (**018/IV**), protídios (**036/IV** ou **037/IV**), lipídios (para produtos que contenham este nutriente) (**032/IV**, **033/IV** ou **034/IV**), fibra alimentar (**045/IV** e **046/IV**), corantes orgânicos artificiais (**051/IV**) e, eventualmente, minerais e metais pesados (**cap. XXIII**).

Frutas em conserva – Produtos preparados com frutas frescas, congeladas ou previamente preservadas, inteiras ou em pedaços, envasadas praticamente cruas ou pré-cozidas, imersas ou não em líquido de cobertura ou calda, podendo conter opcionalmente outros ingredientes e, finalmente, submetidos a tratamento adequado. Nestes produtos as análises usuais incluem, no líquido de cobertura: sólidos solúveis em graus Brix, pH

(**017/IV**), acidez titulável, acidez em ácidos orgânicos, glicídios redutores em glicose (**038/IV**), glicídios não redutores em sacarose (**039/IV**), cinzas (**018/IV**), fibra alimentar (na parte sólida) (**045/IV** e **046/IV**), corantes orgânicos artificiais (**051/IV**), peso drenado (**003/IV**), e eventualmente, minerais e metais pesados **(cap. XXIII**).

Sucos de frutas – Líquidos límpidos ou turvos, não fermentados, extraídos das frutas sãs e maduras, por processo tecnológico adequado, que garanta sua composição essencial.

Néctares de frutas – Produtos não fermentados, não gaseificados, destinados ao consumo direto, obtidos pela dissolução em água potável de partes comestíveis de frutas sãs e maduras ou de sucos e polpas, adicionados de ácidos e de açúcares.

Polpas congeladas de frutas – Produtos extraídos das frutas sãs e maduras, por processos tecnológicos adequados e conservados à temperatura de congelamento.

Água de coco – Bebida obtida da parte líquida do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) por meio de processo tecnológico adequado.

As determinações usuais na análise de sucos de frutas integrais e concentrados, néctares, polpas e água de coco são: sólidos solúveis em graus Brix, relação Brix/acidez (para sucos integrais), pH (**017/IV**), acidez titulável, acidez em ácidos orgânicos, glicídios redutores em glicose (**038/IV**) glicídios não redutores em sacarose (**039/IV**), cinzas (**018/IV**), dióxido de enxofre (**050/IV**), corantes orgânicos artificiais (**051/IV**), eventualmente, conservadores (**cap. V**), vitamina C (**365/IV** ou **366/IV**), minerais e metais pesados **(cap. XXIII**).

Coco ralado – Produto obtido do endosperma do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), por processo tecnológico adequado, podendo ser parcialmente desengordurado ou não. A análise do coco inclui as determinações de umidade **(012/IV**) lipídios (**032/IV** ou **034/IV**), acidez titulável, glicídios redutores em glicose e glicídios não redutores em sacarose descritos neste capítulo. Podem ser realizadas também as determinações de cinzas (**018/IV**), proteínas (**036/IV** ou **037/IV**), fibra alimentar (**045/IV** e **046/IV**), carboidratos por diferença, gorduras saturadas (**053/IV**) e, eventualmente, minerais (**cap. XXIII**).

Leite de coco – Emulsão aquosa procedente do endosperma de cocos maduros e sãos. As análises do leite de coco incluem as determinações de umidade (**013/IV**), acidez titulável, lipídios, glicídios redutores em glicose e glicídios não redutores em sacarose descritos neste capítulo. Podem ser realizadas também as determinações de cinzas (**018/IV**), proteínas (**036/IV** ou **037/IV**), fibra alimentar (**045/IV** e **046/IV**), carboidratos por diferença, gorduras saturadas (**053/IV**) e, eventualmente, minerais (**cap. XXIII**).

Preparo das amostras de produtos de frutas

Sucos, néctares de frutas e água de coco – Homogeneíze totalmente a amostra por agitação.

Geléias, doce em massa ou pasta e frutas cristalizadas – Homogeneíze totalmente a amostra no multiprocessador.

Frutas secas e liofilizadas – Os caroços e sementes devem ser removidos sem parti-los. Homogeneíze a amostra em multiprocessador ou com qualquer equipamento mecânico adequado ou em almofariz. Complete a operação o mais rápido possível, para evitar ganho de umidade. No caso de frutas secas, processe três vezes em moedor, misturando completamente após cada trituração. As amostras enviadas em embalagens grandes devem ser misturadas e retiradas algumas porções para trituração.

Frutas em conserva – Utilize para a análise o líquido de cobertura do produto separado por drenagem conforme descrito na técnica de sólidos drenados em relação ao peso total.

Polpas de frutas congeladas – Descongele a amostra até à temperatura ambiente. Homogeneíze totalmente as amostras em liqüidificador. O descongelamento deve ser o mais rápido possível, sem alterar ou degradar as características do produto, pois algumas frutas se oxidam rapidamente e suas cores devem ser observadas enquanto ainda congeladas.
Mantenha sempre as amostras em refrigerador depois de abertas.

Coco ralado – Homogeneíze totalmente a amostra, com auxilio de uma espátula.

Leite de coco em emulsão – Cada garrafa antes de ser aberta deve ser colocada em banho-maria termostatizado a 40°C durante 20 minutos. Posteriormente, após agitação manual, transfere-se o conteúdo da garrafa para um béquer de 300 mL, que deve ser mantido a 40°C e sob agitação, com auxilio de um agitador magnético provido de aquecimento por cerca de 10 minutos.

308/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação do peso das frutas drenadas

É aplicável em frutas em conserva que contenham líquido de cobertura. Baseia-se na determinação do peso das frutas em relação ao peso total e é realizada por drenagem.

Material

Tamis nº 8, balança semi-analítica, béquer de 800 mL, espátula metálica e bastão de vidro.

Procedimento – Abra a embalagem do produto e pese. Transfira o conteúdo total da amostra para tamis n° 8. Inverta cuidadosamente as frutas que ficarem com suas cavidades para cima. Produtos de frutas mais macias devem ser drenados através de tamis inclinado, sem outra manipulação. Drene por dois minutos. Pese o recipiente vazio. Coloque no recipíente o produto sólido e pese novamente.

Cálculo

$P_2 - P_1$ = peso das frutas drenadas em g

P_2 = massa do recipiente e da parte sólida em g
P_1 = massa do recipiente vazio em g

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.180.

309/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação da umidade em frutas secas em estufa a vácuo

Este método também é aplicável em frutas desidratadas e cristalizadas. Baseia-se na perda de massa por secagem sob pressão reduzida à temperatura de 70°C.

Material

Balança analítica, estufa a vácuo, espátula de metal, dessecador com sílica gel e cápsula de níquel, platina ou alumínio de aproximadamente 8,5 cm de diâmetro, de fundo chato com tampa.

Procedimento – Espalhe uniformemente de (5-10) g da amostra homogeneizada, em cápsula metálica com tampa, previamente tarada e pese. Seque por 6 horas a (70 ± 2)°C sob pressão reduzida, ≤ 100 mm Hg (13,3 kPa), sem tampa. Recoloque a tampa, res-

frie a cápsula em dessecador e pese. As determinações em duplicata devem concordar dentro de 0,2%.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade por cento m/m}$$

N = perda de peso em g
P = massa da amostra em g

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *O***fficial Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, (method 934.06). Arlington: A.O.A.C.,1995. chapter 37. p. 4.

310/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação da acidez titulável por volumetria com indicador

Este método é aplicável em soluções claras ou levemente coloridas nos diversos tipos de produtos de frutas. O método baseia-se na titulação com hidróxido de sódio até o ponto de viragem com o indicador fenolftaleína.

Material

Balança analítica, espátula metálica, pisseta plástica, frasco Erlenmeyer de 250 mL, bureta de 25 mL, pipetas volumétricas de 10 e 20 mL e pipeta graduada de 1 mL.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M
Solução de fenolftaleína

Procedimento – Pese (5-10) g ou pipete de (10-20) mL da amostra homogeneizada em frasco Erlenmeyer, dilua com aproximadamente 100 mL de água e adicione 0,3 mL de solução de fenolftaleína para cada 100 mL da solução a ser titulada. Titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 M sob agitação constante, até coloração rósea persistente por 30 segundos.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times M \times 100}{P} = \text{acidez em mL de solução M por cento v/m ou v/v}$$

V = nº de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio
P = massa da amostra em g ou volume pipetado em mL
M = molaridade da solução de hidróxido de sódio

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *O***fficial Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, (method 942.15 A). Arlington: A.O.A.C.,1995. chapter 37. p. 10.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.183.

311/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação da acidez titulável por volumetria potenciométrica

Este método é aplicável em soluções escuras ou fortemente coloridas. O método baseia-se na titulação potenciométrica da amostra com solução de hidróxido de sódio onde se determina o ponto de equivalência pela medida do pH da solução.

Material

pHmetro, balança analítica, agitador magnético, espátula metálica, bureta de 25 mL, pipetas volumétricas de 10 e 20 mL e béquer de 300 mL.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M
Soluções-tampão de pH 4, 7 e 10.

Procedimento – Calibre o potenciômetro com as soluções-tampão de 7 e 4 ou 7 e 10 de acordo com as instruções do fabricante. Pese (5-10) g ou pipete de (10 -20) mL da amostra homogeneizada em um béquer de 300 mL, dilua com 100 mL de água, agite moderadamente e mergulhe o eletrodo na solução. Titule com a solução de hidróxido de sódio 0,1 M até uma faixa de pH (8,2-8,4). Calcule conforme **317/IV.**

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *O***fficial Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, (method 942.15 B). Arlington: A.O.A.C.,1995. chapter 37. p. 11.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria nº 76 de 27-11-86, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 03-12-86. Seção I, p. 18152-18173.

312/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação da acidez titulável em ácido orgânico

Este método é aplicável aos diversos produtos de frutas pela determinação da acidez, expressa em g de ácido orgânico por cento, considerando o respectivo ácido predominante na amostra, ou conforme determina o padrão de identidade e qualidade do produto analisado.

Cálculo

$$\frac{V \times F \times M \times PM}{10 \times P \times n} = \text{g de ácido orgânico por cento m/m ou m/v}$$

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação em mL
M = molaridade da solução de hidróxido de sódio
P = massa da amostra em g ou volume pipetado em mL
PM = peso molecular do ácido correspondente em g
n = número de hidrogênios ionizáveis (**Tabela 1**)
F = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

Tabela 1 – Número de H^+ dos ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos	PM (g)	n
ácido cítrico	192	3
ácido tartárico	150	2
ácido málico	134	2
ácido láctico	90	1
ácido acético	60	1

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.183.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. - Portaria nº 76 de 27-11-86, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 03-12-86. Seção I, p. 18152-18173.

313/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação de sólidos totais

Aplicável a diversos tipos de produtos cuja concentração de açúcares é elevada, como geléia, doce em massa, doces cremosos nos quais precise ser evitada a decomposição da amostra. Baseia-se na perda de massa por secagem sob pressão reduzida a 70°C.

Material

Balança analítica, estufa a vácuo, espátula de metal, dessecador com sílica gel, cápsula de níquel, platina ou de alumínio, aproximadamente 8,5 cm de diâmetro e de fundo chato com tampa.

Procedimento – Espalhe uniformemente de (5-10) g da amostra homogeneizada, em cápsula metálica com tampa, previamente tarada e pese. Seque por 6 horas a (70 ± 2)°C, sob pressão reduzida ≤ 100 mm Hg (13,3 kPa) sem tampa. Recoloque a tampa, resfrie a cápsula em dessecador e pese. As determinações em duplicata devem concordar dentro de 0,2%.

Cálculo

$$\frac{N \times 100}{P} = \text{sólidos totais por cento m/m}$$

N = massa de matéria seca em g
P = massa da amostra em g

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, (method 920.151). Arlington: A.O.A.C.,1995. chapter 37. p. 5.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.183.

314/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação de sólidos insolúveis em água

É aplicável aos diversos tipos de produtos de frutas. O método baseia-se na determinação de matérias insolúveis em água, filtradas sob condições específicas. O resultado é expresso em porcentagem de massa em g.

Material

Balança analítica, dessecador, espátula metálica, bomba de vácuo, funil de Büchner, papel de filtro qualitativo de 12,5 cm de diâmetro (Whatman n°4 ou equivalente), estufa, béqueres de 100 e 400 mL, bastão de vidro, Kitassato de 1000 mL e vidro de relógio ou placa de Petri.

Procedimento – Para a filtração em Büchner, prepare o meio filtrante consistindo de papel de filtro. Lave o meio filtrante com água quente e seque por uma hora a (105 ± 2)°C, em placa de Petri aberta ou vidro de relógio. Resfrie o conteúdo, tampado, por uma hora em dessecador e pese. Pese de (25-50) g da amostra homogeneizada em um béquer. Transfira para um béquer de 400 mL e dilua até a marca de 200 mL com água quente, misture e ferva moderadamente por (15-20) minutos, substituindo ocasionalmente a água evaporada. Filtre no papel preparado sob vácuo no funil de Büchner e mantenha com porções de amostra. Lave com cerca de 800 mL de água quente. Remova o excesso de água do meio filtrante por sucção no Büchner. Transfira o meio filtrante com todos os sólidos insolúveis em água para a placa de Petri ou vidro de relógio, seque por uma hora a (105 ± 2)°C e resfrie por uma hora em dessecador e pese.

Cálculo

$$\frac{N \times 100}{P} = \text{sólidos insolúveis por cento m/m}$$

N = n° de gramas do resíduo
P = massa da amostra em g

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.184.

315/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação de sólidos solúveis por refratometria

Aplicável em amostras de produtos de frutas com ou sem a presença de sólidos insolúveis. A determinação de sólidos solúveis pode ser estimada pela medida de seu índice de refração por comparação com tabelas de referência.

Material

Refratômetro de Abbé, com escala graduada de Brix, em pelo menos 0,5%, banho termostatizado com circulação de água (20 ± 0,2)ºC (opcional), algodão, espátula metálica, bastão de vidro e béquer de 25 mL.

Reagente

Álcool

Procedimento – Ajuste o refratômetro para a leitura de *n* em 1,3330 com água a 20°C, de acordo com as instruções do fabricante. Transfira de 3 a 4 gotas da amostra homogeneizada para o prisma do refratômetro. Circule água à temperatura constante pelo equipamento, de preferência a 20°C, no tempo suficiente para equilibrar a temperatura do prisma e da amostra e mantenha a água circulando durante a leitura, observando se a temperatura permanece constante. Após um minuto, leia diretamente na escala os graus Brix. Se a determinação for realizada à temperatura ambiente, diferente de 20°C, corrija a leitura em relação à temperatura segundo a **Tabela 2**. Se as partículas sólidas da amostra prejudicarem a nitidez da leitura, filtre em papel de filtro ou em pedaço de algodão.

Tabela 2 – Correção para obter o valor real do grau Brix em relação à temperatura

Temperatura ºC	Subtraia da leitura obtida	Temperatura ºC	Adicione à leitura obtida
-	-	21	0,08
-	-	22	0,16
13	0,54	23	0,24
14	0,46	24	0,32
15	0,39	25	0,40
16	0,31	26	0,48
17	0,23	27	0,56
18	0,16	28	0,64
19	0,08	29	0,73
20	0,00	30	0,81

Nota: para sucos de frutas cítricas, corrija o Brix obtido, em relação à acidez da amostra calculada em ácido cítrico, a partir da concentração de 1%, conforme a **Tabela 3**.

Tabela 3 – Correção do valor dos graus Brix em relação ao ácido cítrico contido na amostra

Ácido cítrico anidro (porcentagem em massa)	Adicione ao valor da leitura em graus Brix
1,0	0,20
1,2	0,24
1,4	0,28
1,6	0,32
1,8	0,36
2,0	0,39
2,2	0,43
2,4	0,47
2,6	0,51
2,8	0,54
3,0	0,58
3,2	0,62
3,4	0,66
3,6	0,70
3,8	0,74
4,0	0,78
4,2	0,81
4,4	0,85
4,6	0,89
4,8	0,93
5,0	0,97

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.181-182.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. - Portaria nº 76 de 27-11-86, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 03-12-86. Seção I, p. 18152-18173.

316/IV Frutas e produtos de frutas – Relação Brix/acidez total para sucos

É aplicada para sucos de frutas integrais e polpas de frutas. Este método baseia-se no calculo da relação Brix por acidez expressa em ácido orgânico. Esta relação é utilizada como uma indicação do grau de maturação da matéria prima.

Cálculo

$$\frac{\text{Brix}}{\text{Acidez total}} = \text{Relação Brix/acidez total}$$

Referência bibliográfica

BRASIL, Leis, Decretos, etc. - Portaria nº 76 de 27-11-86, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 03-12-86. Seção I, p. 18152-18173.

317/IV Coco ralado – Determinação da acidez titulável

É aplicável para amostras de coco ralado e leite de coco.

Material

Balança analítica, espátula metálica, pisseta plástica, frasco Erlenmeyer de 125 mL, bureta de 10 mL e pipeta graduada de 1 mL.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 N
Solução de fenolftaleína

Procedimento – Pese 5 g de amostra homogeneizada em frasco Erlenmeyer, dilua com aproximadamente 50 mL de água, tampe o frasco e deixe em contato por 30 minutos. Adicione 4 gotas de fenolftaleína. Titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, sob agitação constante, até coloração rósea persistente por 30 segundos.

Cálculo

$$\frac{v \times f \times 10}{P} = \text{acidez em mL de solução normal, por cento, v/m}$$

v = nº de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N
P = nº de g da amostra

Referência Bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25-26.

318/IV Coco ralado – Determinação de glicídios redutores em glicose

Material

Balança analítica, chapa de aquecimento, espátula de metal, béquer de 100 mL, pisseta plástica, funil de vidro de 7 cm, proveta de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 125 mL, balão de fundo chato de 250 mL, pipetador automático de 5 mL ou pipeta graduada de 5 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, bureta de 10 mL e papel indicador de pH.

Reagentes

Solução de acetato de zinco a 12% m/v
Solução de ferrocianeto de potássio a 6% m/v
Solução de hidróxido de sódio a 40% m/v
Soluções de Fehling A e B tituladas **(Apêndice I)**

Procedimento – Pese 2 g da amostra homogeneizada em béquer de 100 mL. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de 50 mL de água. Deixe em contato por 30 minutos. Adicione 5 mL da solução de acetato de zinco e 5 mL de ferrocianeto de potássio, agitando brandamente o balão após cada adição. Complete o volume com água, agite e deixe em repouso por 15 minutos. Filtre em papel de filtro seco para o frasco Erlenmeyer. Verifique o pH da solução. Caso esteja ácido, adicione algumas gotas de hidróxido de sódio até que a solução se torne alcalina, pH próximo

de 9 e filtre novamente para outro frasco Erlenmeyer. Transfira o filtrado para a bureta. Coloque num balão de fundo chato de 250 mL, com auxílio de pipetas de 10 mL, cada uma das soluções de Fehling A e B, adicionando 40 mL de água. Aqueça até ebulição. Adicione, às gotas, a solução da bureta sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho de óxido de cobre I - Cu_2O).

Cálculo

$$\frac{100 \times A \times a}{P \times v} = \text{glicídios redutores em glicose por cento m/m}$$

A = nº de mL da solução de P g da amostra
a = nº de g de glicose correspondente a 10 mL da solução de Fehling
P = massa da amostra em g
v = nº de mL da solução da amostra gasto na titulação

Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *O***fficial Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, (method 958.06). Arlington: A.O.A.C.,1995. chapter 39. p. 21.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 49-50.

319/IV Coco ralado – Determinação de glicídios não redutores em sacarose

Material

Balança analítica, chapa de aquecimento, banho-maria, espátula de metal, béquer de 100 mL, pisseta plástica, funil de vidro de 7 cm, proveta de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 125 mL, balão de fundo chato de 250 mL, pipetador automático de 5 mL ou pipeta graduada de 5 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, bureta de 10 mL e papel indicador de pH.

Reagentes

Ácido clorídrico
Solução de acetato de zinco a 12% m/v

Solução de ferrocianeto de potássio a 6% m/v
Solução de hidróxido de sódio a 40% m/v
Soluções de Fehling A e B tituladas (**Apêndice I**)

Procedimento – Pese 2 g da amostra homogeneizada em béquer de 100 mL. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de 50 mL de água. Adicione 1 mL de ácido clorídrico. Deixe em banho-maria por 30 minutos. Esfrie o balão. Adicione hidróxido de sódio para elevar o pH próximo de 6,5 com auxílio de papel indicador. Adicione 5 mL de acetato de zinco e 5 mL de ferrocianeto de potássio, agitando brandamente o balão após cada adição. Complete o volume com água, agite e deixe em repouso por 15 minutos. Filtre em papel de filtro seco para o frasco Erlenmeyer. Verifique o pH da solução e adicione mais algumas gotas de hidróxido de sódio até que a solução se torne alcalina, com pH próximo de 9 e filtre novamente para outro frasco Erlenmeyer. Transfira o filtrado para a bureta. Coloque num balão de fundo chato de 250 mL, com auxílio de pipetas de 10 mL, cada uma das soluções de Fehling A e B, adicionando 40 mL de água. Aqueça até ebulição. Adicione, às gotas, a solução da bureta sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho de óxido de cobre I - Cu_2O).

Cálculo

$$\left(\frac{100 \times A \times a}{P \times v} - B\right) \times 0{,}95 = \text{glicídios não redutores em sacarose, por cento, m/m}$$

A = nº de mL da solução de P g da amostra
a = nº de g de glicose correspondente a 10 mL da solução de Fehling
P = massa da amostra em g
v = nº de mL da solução da amostra gasto na titulação
B = nº de g de glicose por cento, obtido em glicídios redutores em **323/IV**

Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *O***fficial Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, (method 958.06). Arlington: A.O.A.C.,1995. chapter 39. p. 21.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 50-51.

320/IV Leite de coco – Determinação da acidez titulável

Procedimento – Pipete 5 mL da amostra homogeneizada e proceda conforme **317/IV**.

Nota: no caso do leite de coco, a acidez deve ser expressa em v/v. Se for necessário expressar a acidez em v/m, coloque o nº de g correspondente ao volume pipetado da amostra.

Referência Bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25-26.

321/IV Leite de coco – Determinação de lipídios pelo método de Soxhlet

Material

Pipeta automática ou volumétrica de 5 mL, papel de filtro 12 cm, algodão e estufa.

Procedimento – Pipete 5 mL da amostra e esgote o volume em uma porção de algodão sobre um papel de filtro duplo. Coloque para secar em estufa a 105°C durante uma hora, faça o cartucho e proceda conforme **032/IV**.

322/IV Leite de coco – Determinação de lipídios pelo método de Gerber

Material

Butirômetro especial para creme (escala de 0 a 40%), pipeta automática ou volumétrica de 5 mL, pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL, termômetro de (0-100)°C, termocentrífuga de Gerber ou centrífuga de Gerber e banho-maria.

Reagentes

Ácido sulfúrico
Álcool isoamílico

Procedimento – Em um butirômetro de creme, transfira 2 mL de água e 7 mL de ácido sulfúrico. Adicione, lentamente, 5 mL da amostra, evitando que se queime ao contato com o ácido. Junte 1 mL de álcool isoamílico. Estas adições devem ser feitas

sem molhar internamente o gargalo do butirômetro, se isto acontecer, limpe cuidadosamente com papel absorvente. Complete o volume do butirômetro com água até próximo ao gargalo. Arrolhe o butirômetro, envolva-o em uma flanela e agite até completa dissolução. Centrifugue a (1200 ± 100) rpm durante 15 minutos, quando for usada a termocentrífuga. No caso de usar a centrífuga de Gerber, centrifugue por 5 minutos a 1200 rpm, leve para um banho-maria a (63 ± 2)°C por 2 a 3 minutos com a rolha para baixo, centrifugue novamente a 1200 rpm por mais 15 minutos. Retire o butirômetro da termocentrífuga ou da centrífuga de Gerber na posição vertical (rolha para baixo). Maneje a rolha colocando a camada amarelo-clara transparente (lipídios) dentro da haste graduada do butirômetro. O valor obtido na escala corresponde diretamente a porcentagem de lipídios, sendo realizada a leitura no menisco inferior.

Referência bibliográfica

SILVA, P.H.F.; PEREIRA, D.B.C.; OLIVEIRA, L.L.; COSTA JUNIOR, C.G. **Físico - Química do Leite e Derivados Métodos Analíticos**. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 1997. p. 77-79.

323/IV Leite de coco – Determinação de glicídios redutores em glicose

Procedimento – Pipete 5 mL de amostra homogeneizada e proceda conforme **038/IV**

324/IV Leite de coco – Determinação de glicídios não redutores em sacarose

Procedimento – Pipete 5 mL de amostra homogeneizada e proceda conforme **039/IV**.

Colaboradores

Cristiane Bonaldi Cano, Letícia Araújo Farah Nagato, Márcia Regina Pennacino do Amaral Mello, Maria Cristina Duran e Mário Tavares

CAPÍTULO **XVI**

ÓLEOS E GORDURAS

XVI

ÓLEOS E GORDURAS

As determinações feitas na análise de óleos e gorduras são geralmente as dos chamados índices, que são expressões de suas propriedades físicas ou químicas dos mesmos e não as porcentagens dos seus constituintes. Assim, são determinados os índices de iodo, saponificação, peróxidos e as constantes físicas como o ponto de fusão e o índice de refração. São estes índices que, juntamente com as reações características, servem para identificação e avaliação da maioria dos óleos e gorduras, sendo o resultado da análise baseado neste conjunto de dados.

Os métodos de cromatografia em fase gasosa são, desde há muito tempo, aplicados para o conhecimento da composição dos ácidos graxos destes compostos.

325/IV Determinação da acidez

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicerídios é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Estes são freqüentemente expressos em termos de índice de acidez, podendo sê-lo também em mL de solução normal por cento ou em g do componente ácido principal, geralmente o ácido oléico. Os regulamentos técnicos costumam adotar esta última forma de expressão da acidez. O índice de acidez é definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar um grama da amostra. O método é aplicável a óleos brutos e refinados, vegetais e animais, e gorduras animais. Os métodos que avaliam a acidez titulável resumem-se em titular, com soluções de álcali-padrão, a acidez do produto ou soluções aquosas/alcoólicas do produto, assim como os ácidos graxos obtidos dos lipídios.

Material

Balança analítica, frasco Erlenmeyer de 125 mL, proveta de 50 mL e bureta de 10 mL.

Reagentes

Solução de éter-álcool (2:1) neutra
Solução fenolftaleína
Solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou 0,01 M

Procedimento – As amostras devem estar bem homogêneas e completamente líquidas. Pese 2 g da amostra em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Adicione 25 mL de solução de éter-álcool (2:1) neutra. Adicione duas gotas do indicador fenolftaleína. Titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou 0,01 M até o aparecimento da coloração rósea, a qual deverá persistir por 30 segundos.

Cálculos

$$\frac{v \times f \times 5,61}{P} = \text{índice de acidez}$$

$$\frac{v \times f \times 100}{P} = \text{acidez em solução molar, por cento, v/m}$$

$$\frac{v \times f \times M \times 28,2}{P} = \text{acidez em ácido oléico, por cento, m/m}$$

v = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação
f = fator da solução de hidróxido de sódio
P = nº de g da amostra

Notas
Para converter o índice de acidez em solução molar, divida o resultado por 1,78. Para expressar o índice de acidez como acidez em ácido oléico, divida o resultado por 1,99.
Para transformar a acidez em ácido oléico em acidez em solução normal, divida o resultado por 3,55.
No caso de produtos com baixo teor de ácidos graxos, por exemplo, óleos e gorduras refinados, use solução de NaOH 0,01 M para a titulação.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1**.: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 245-246.

326/IV Determinação do índice de peróxido

Este método determina todas as substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra, que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste. Estas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares resultantes da oxidação da gordura. É aplicável a todos os óleos e gorduras normais, incluindo margarina e creme vegetal, porém é suceptível e portanto qualquer variação no procedimento do teste pode alterar o resultado da análise.

Material

Balança analítica, frasco Erlenmeyer de 125 ou 250 mL com tampa esmerilhada, proveta de 50 mL, pipeta graduada de 1 mL, bureta de 10 mL com sub-divisões de 0,05 mL.

Reagentes

Ácido acético
Clorofórmio
Solução de tiossulfato de sódio 0,1 N ou 0,01 N
Amido solúvel
Iodeto de potássio
Solução de ácido acético-clorofórmio (3:2) v/v

Solução saturada de iodeto de potássio – Pese 30 g de iodeto de potássio e adicione 21 mL de água. Conserve a solução em frasco âmbar e utilize no mesmo dia da sua preparação.

Solução de amido 1% m/v

Procedimentos

Óleos e gorduras normais – Pese (5 ± 0,05) g da amostra em um frasco Erlenmeyer de 250 mL (ou 125 mL) . Adicione 30 mL da solução ácido acético-clorofórmio 3:2 e agi-

te até a dissolução da amostra. Adicione 0,5 mL da solução saturada de KI e deixe em repouso ao abrigo da luz por exatamente um minuto. Acrescente 30 mL de água e titule com solução de tiossulfato de sódio 0,1 N ou 0,01 N, com constante agitação. Continue a titulação até que a coloração amarela tenha quase desaparecida. Adicione 0,5 mL de solução de amido indicadora e continue a titulação até o completo desaparecimento da coloração azul. Prepare uma prova em branco, nas mesmas condições e titule.

Margarina e creme vegetal – Funda a amostra, com constante agitação, em placa aquecedora ou em estufa a (60-70)°C. Evite aquecimento excessivo, particularmente prolongado à temperatura acima de 40ºC. Uma vez completamente fundida, remova a amostra da placa até que a camada aquosa se separe. Decante o óleo e filtre em papel Whatman nº 4 ou equivalente. A amostra deve estar clara e brilhante. Proceda a determinação conforme o descrito para óleos e gorduras normais.

Nota: se o volume gasto na titulação da amostra for menor que 0,5 mL, usando solução de tiossulfato de sódio 0,1 N, repita a determinação com solução 0,01 N. No caso do branco, o volume gasto não deve exceder a 0,1 mL da solução de tiossulfato de sódio 0,1 N.

Cálculo

$$\frac{(A-B)\times N\times f\times 1000}{P} = \text{índice de peróxido em meq por 1000 g da amostra}$$

A = nº de mL da solução de tiossulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação da amostra
B = nº de mL da solução de tiossulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação do branco
N = normalidade da solução de tiossulfato de sódio
f = fator da solução de tiossulfato de sódio.
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY. **Official methods and recommended praticces of the American Oil Chemists` Society**. 4th ed. Champaign, USA, AOCS, 1990. [AOCS Official method Cd 8-53].

327/IV Determinação do índice de refração

O índice de refração é característico para cada tipo de óleo, dentro de certos limites. Está relacionado com o grau de saturação das ligações, mas é afetado por outros fatores tais como: teor de ácidos graxos livres, oxidação e tratamento térmico. Este método é aplicável a todos os óleos normais e gorduras líquidas.

Material

Refratômetro de Abbé equipado com escala-padrão e algodão.

Reagente

Éter de petróleo ou outro solvente.

Procedimento

Ajuste da aparelhagem – Ajuste previamente o refratômetro de Abbé com água. Faça circular uma corrente de água a 40°C pelo aparelho. Deixe estabilizar a temperatura. Ajuste a 40°C para óleos e a 60°C para amostras com ponto de fusão mais alto. A temperatura do refratômetro deve ser controlada a ± 0,1°C e, para isto, é preferível usar banho de água controlado termostaticamente e com circulação de água. O instrumento é calibrado seguindo as instruções do fabricante, com líquido de pureza e índice de refração conhecidos ou, em alguns casos, é satisfatório usar um prisma de vidro de índice de refração teórico de 1,333 à 20 °C. Se o refratômetro for equipado com um compensador, uma lâmpada elétrica como a de vapor de sódio, torna-se necessária.

Tratamento da amostra – Funda a amostra, caso não esteja líquida. Filtre para remover quaisquer impurezas e traços de umidade. A amostra deve estar completamente seca. Certifique-se que os prismas estejam limpos e completamente secos e então coloque no prisma inferior algumas gotas da amostra. Feche os prismas e trave firmemente. Deixe por 1 a 2 minutos até que a amostra atinja a temperatura do aparelho. Ajuste o instrumento e a luz para obter a leitura mais distinta possível e, então, determine o índice de refração. A leitura na escala dará diretamente o índice de refração absoluto a 40°C, com quatro casas decimais. Realize pelo menos três leituras e calcule a média. A variação das leituras deve ser igual a 0,0002. Limpe os prismas entre as leituras com algodão umedecido com solvente e deixe secar.

Cálculo para correção da temperatura

$R' + K (T' - T) = R$

R = leitura à temperatura T (°C)
R'= leitura à temperatura T' (°C)
T = temperatura padrão (°C)
T' = temperatura na qual a leitura de R' foi feita (°C)
K = 0,000365 para gorduras e 0,0003885 para óleos

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 247.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1990. [A.O.C.S. Official method Cc 7-25].

328/IV Determinação do índice de saponificação

O índice de saponificação é a quantidade de álcali necessário para saponificar uma quantidade definida de amostra. Este método é aplicável a todos os óleos e gorduras e expressa o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para saponificar um grama de amostra.

Material

Frascos Erlenmeyer de 250 mL, condensador de água e banho-maria ou chapa aquecedora com controle de temperatura.

Reagentes

Solução de ácido clorídrico 0,5 M
Hidróxido de potássio
Solução de fenolftaleína
Álcool
Solução alcoólica de hidróxido de potássio a 4% m/v

Procedimento – Funda a amostra, se não estiver completamente líquida. Filtre em papel de filtro para remover impurezas e traços de umidade. A amostra deve estar completamente seca. Pese uma quantidade de amostra, de tal modo que sua titulação corresponda de 45 a 55% da titulação do branco. Esta massa normalmente é de (4-5) g. Adicione 50 mL da solução alcoólica de KOH. Prepare um branco e proceda ao andamento analítico, simultaneamente com a amostra. Conecte o condensador e deixe ferver suavemente até a completa saponificação da amostra (aproximadamente uma hora, para amostras normais). Após o resfriamento do frasco, lave a parte interna do condensador com um pouco de água. Desconecte do condensador, adicione 1 mL do indicador e titule com a solução

de ácido clorídrico 0,5 M até o desaparecimento da cor rósea.

Cálculo

$$\frac{28,06 \times f \times (B - A)}{P} = \text{índice de saponificação}$$

A = volume gasto na titulação da amostra
B = volume gasto na titulação do branco
f = fator da solução de HCl 0,5 M
P = nº de g da amostra

Nota: algumas amostras são mais difíceis de serem saponificadas, requerendo mais de 1 hora de saponificação.

Referência bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *O***fficial methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, USA. A.O.C.S., 1990. [A.O.C.S. Official method Cd 3-25].

329/IV Determinação do índice de iodo pelo método de Wijs

O índice de iodo de um óleo ou gordura é a medida do seu grau de insaturação e é expresso em termos do número de centigramas de iodo absorvido por grama da amostra (% iodo absorvido). O método de Wijs é aplicável a todos os óleos e gorduras normais que não contenham ligações duplas conjugadas. Cada óleo possui um intervalo característico do valor do índice de iodo. A fixação do iodo ou de outros halogênios se dá nas ligações etilênicas dos ácidos graxos.

Material

Balança analítica, agitador magnético, estufa, cronômetro, papel de filtro qualitativo, frasco Erlenmeyer de 500 mL com tampa esmerilhada, proveta de 50 mL, pipetas volumétricas de 2, 5, 20 e 25 mL e bureta de 50 mL.

Reagentes

Ácido clorídrico
Iodo
Tetracloreto de carbono

Tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)
Amido solúvel
Iodeto de potássio
Solução de Wijs
Solução de iodeto de potássio a 15% m/v
Solução de indicador de amido a 1% m/v.
Solução de tiossulfato de sódio a 0,1 M

Procedimento – Funda a amostra, caso não esteja no estado líquido (a temperatura da fusão não deverá exceder o ponto de fusão da amostra em 10ºC). Filtre através de papel de filtro para remover algumas impurezas sólidas e traços de umidade. Pese aproximadamente 0,25 g em frasco Erlenmeyer de 500 mL com tampa e adicione 10 mL de tetracloreto de carbono. Transfira com auxílio de bureta, 25 mL de solução de Wijs no frasco Erlenmeyer que contém a amostra. Tampe e agite cuidadosamente com movimento de rotação, assegurando perfeita homogeneização. Deixe em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por 30 minutos. Adicione 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água recentemente fervida e fria. Titule com solução tiossulfato de sódio 0,1 M até o aparecimento de uma fraca coloração amarela. Adicione 1 a 2 mL de solução indicadora de amido 1% e continue a titulação até o completo desaparecimento da cor azul. Prepare uma determinação em branco e proceda da mesma maneira que a amostra.

Cálculo

$$\frac{(V_B - V_A) \times M \times 12{,}69}{P} = \text{índice de iodo}$$

M = molaridade da solução de $Na_2S_2O_3$
V_B = mL gasto na titulação do branco
V_A = mL gasto na titulação da amostra
P = nº g da amostra

Notas
Quando o índice de iodo for determinado em material contendo sistemas de duplas ligações conjugadas, o resultado não é uma medida do total de insaturação, mas um valor empírico indicativo da sua quantidade na molécula.
Por ser de difícil preparação, recomenda-se a aquisição no comércio do reagente de Wijs. Armazene as soluções de Wijs em frasco âmbar, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e da umidade.
Devido à toxicidade, o tetracloreto de carbono está sendo substituído por ciclohexano.
Se o óleo apresentar um índice de iodo superior a 100, como por exemplo, os óleos de origem marinha, o tempo de reação com a solução de Wijs deverá ser maior que 30 minutos.

Referência bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1995 [A.O.C.S. Recommended Practice Cd 1 – 25].

330/IV Determinação do índice de iodo por cálculo

O índice de iodo determinado por cálculo aplica-se à análise de triglicerídios e de ácidos graxos livres e seus produtos hidrogenados. Este método determina o índice de iodo de óleos comestíveis diretamente da composição de ácidos graxos insaturados obtidos a partir da análise por cromatografia em fase gasosa.

Procedimento – Determine a composição de ácidos graxos da amostra a ser analisada por cromatografia em fase gasosa **(344/IV)**.

Cálculos

(% ácido palmitoléico x 0,950) + (% ácido oléico x 0,860) + (% ácido linoléico x 1,732) + (% ácido linolênico x 2,616) + (% ácido gadoléico x 0,785) + (% ácido erúcico x 0,723) = índice de iodo dos triglicerídios

(% ácido palmitoléico x 0,990) + (% ácido oléico x 0,8986) + (% ácido linoléico x 1,810) + (% ácido linolênico x 2,735) + (ácido gadoléico x 0,8175) + (% ácido erúcico x 0,7497) = indice de iodo dos ácidos graxos livres

Nota: para óleos com conteúdo de matéria insaponificável superior a 0,5% (ex.: óleos de peixe), o resultado tende a ser inferior ao determinado pelo método de Wijs.

Referência bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S. 1995. [A.O.C.S. Recommended Practice Cd 1c-85].

331/IV Determinação do índice de Bellier

Na análise dos óleos, a determinação do índice de Bellier é utilizada para a identi-

ficação do azeite de oliva.

Material

Chapa aquecedora, termômetro com divisões de décimos de grau, pipetas de 2, 5 e 50 mL, frasco Erlenmeyer de 125 mL e refrigerante de refluxo.

Reagentes

Solução alcoólica de hidróxido de potássio a 8% m/v
Ácido acético (1+3)
Álcool a 70% v/v

Procedimento – Transfira lentamente, com o auxílio de uma pipeta, 1 mL da amostra para um frasco Erlenmeyer de 125 mL. Adicione 5 mL da solução alcoólica de hidróxido de potássio a 8%. Adapte ao frasco Erlenmeyer um refrigerante de refluxo. Aqueça em chapa aqquecedora por 10 minutos. Esfrie até (25-30)°C. Adicione 50 mL de álcool a 70%. Agite e adicione 1,5 mL de ácido acético (1+3). Agite e adapte ao frasco um termômetro de 50°C, dividido em décimos de grau, de maneira que o bulbo do termômetro mergulhe no líquido. Se houver turvação, aqueça lentamente até cerca de 10°C acima do índice suposto. Resfrie o frasco, gradualmente e agitando sempre em um banho de água da seguinte maneira: mergulhe sucessivamente o frasco durante 10 segundos, retire e agite por 10 a 20 segundos. A temperatura deve baixar lentamente.Tome, como índice de Bellier, a temperatura na qual nota-se o início da turvação.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3ª ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 255.

332/IV Determinação do ponto de fusão

Os óleos e gorduras naturais, de origem vegetal e animal, são misturas de glicerídios e de outras substâncias e consistem de inúmeros componentes. Estas substâncias não exibem um ponto de fusão definido e nem preciso. Portanto, o termo "ponto de fusão" não implica nas mesmas características das substâncias puras de natureza definitivamente cristalina. As gorduras passam por um estágio de amolecimento gradual antes de se tornarem completamente liquefeitas. O ponto de fusão deve ser definido por condições específicas do método pelo qual é determinado e, neste caso, é a temperatura na qual a amostra torna-se perfeitamente clara e líquida. O método do tubo capilar é aplicável para

todas as gorduras animais e vegetais normais.

Material

Aparelho para determinação do ponto de fusão, tubos de ponto de fusão, tubos capilares de vidro, termômetro com a especificação da A.O.C.S. : H 6-40 ou 7-45, béquer de 600 mL, papel de filtro e funil de vidro.

Procedimento – Funda a amostra e filtre em papel de filtro para remover qualquer impureza e resíduo final de mistura. A amostra deve estar absolutamente seca. Mergulhe completamente pelo menos 3 tubos capilares limpos na amostra liquefeita, de maneira que a gordura fique a uma altura de 10 mm. Funda o final do tubo (onde a amostra está localizada) numa chama pequena, mas não queime a gordura. Coloque os tubos num béquer e deixe em refrigerador entre (4 - 10)°C durante 16 horas. Remova os tubos do refrigerador e prenda-os com uma rolha de borracha ou de qualquer outra maneira ao termômetro, de modo que as extremidades inferiores dos tubos de fusão estejam no fundo junto com o bulbo de mercúrio do termômetro. Mergulhe o termômetro num béquer de 600 mL, contendo água até a metade de seu volume. O fundo do termômetro deve estar imerso a 30 mm na água. Ajuste a temperatura inicial do banho de (8 - 10)°C abaixo do ponto de fusão da amostra no início do teste. Agite o banho de água com um pequeno fluxo de ar ou com outros métodos adequados e forneça calor de maneira que aumente a temperatura na faixa de 0,5°C por minuto. As gorduras passam normalmente por um estágio de opalescência antes da completa fusão. O aquecimento é contínuo até que os tubos estejam completamente claros. Observe a temperatura na qual cada tubo se torna claro e calcule a média de todos os tubos. Esta deve estar dentro de 0,5°C. Considere esta média como o ponto de fusão.

Nota: as amostras devem estar completamente liquefeitas quando os tubos forem colocados no refrigerador. É uma boa prática passar o fundo dos tubos que contêm a amostra momentaneamente por uma chama, antes de serem levados ao refrigerador.

Referência bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended praticces of the American Oil Chemists'Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S. 1990. [A.O.C.S. Official method Cc 1-25].

333/IV Reação de Kreis

Chama-se rancidez a alteração no odor e sabor dos óleos e gorduras, provocada pela

ação do ar (rancidez oxidativa) ou de microrganismos (rancidez cetônica). O método é válido para óleos normais e gorduras líquidas. A floroglucina reage em meio ácido com os triglicerídios oxidados, dando uma coloração rósea ou vermelha, cuja intensidade aumenta com a deterioração devido, provavelmente, à presença de aldeído malônico ou de aldeído epidrínico.

Material

Pipeta de 5 mL, provetas de 10 mL e proveta de 50 mL com boca esmerilhada.

Reagentes

Ácido clorídrico
Solução de floroglucina em éter a 0,1% m/v

Procedimento –Transfira, com auxílio de uma pipeta, 5 mL de substância fundida para uma proveta de 50 mL com boca esmerilhada. Adicione 5 mL de ácido clorídrico e agite por 30 segundos. Adicione 5 mL de uma solução de floroglucina a 0,1% em éter. Agite novamente por 30 segundos e deixe em repouso por 10 minutos. Na presença de substâncias rançosas, a camada inferior apresentará uma coloração rósea ou vermelha.

Nota: se a intensidade da coloração for fraca, compare a camada inferior com uma quantidade análoga de solução de permanganato de potássio a 0,0012% (transfira 3,8 mL de uma solução 0,01 M para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água). Se a intensidade for a mesma ou inferior, o resultado pode deixar de ser levado em consideração, caso os caracteres sensoriais do produto forem satisfatórios.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 260.

334/IV Determinação da umidade e matéria volátil

A determinação da umidade e matéria volátil é um dos parâmetros legais para a avaliação da qualidade de óleos e gorduras, sendo realizada por aquecimento direto a 105°C.

Procedimento – Faça a determinação conforme método **012/IV** alterando os intervalos

de tempo de pesagem de três para uma hora, até peso constante.
Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p .22.

335/IV Determinação de impurezas insolúveis em éter

Este método, aplicável para todos os tipos de gorduras e óleos, determina sujidades e/ou outras substâncias estranhas insolúveis em éter de petróleo.

Material

Banho-maria, estufa, dessecador, proveta de 50 mL e cadinho de Gooch.

Reagente

Éter de petróleo

Procedimento – Use o resíduo resultante da determinação da umidade e matéria volátil. Adicione 50 mL de éter de petróleo no resíduo e aqueça em banho-maria para dissolver a gordura. Filtre em cadinho de Gooch com ajuda de vácuo. Lave com cinco porções de 10 mL de éter de petróleo a quente, permitindo que cada porção escoe primeiro para depois adicionar a outra porção. Lave completamente com éter de petróleo. Seque o cadinho e aqueça até peso constante em estufa a (101 ± 1)°C. Esfrie em dessecador até a temperatura ambiente e pese.

Cálculo

$$\frac{p \times 100}{P} = \text{Impurezas insolúveis por cento m/m}$$

p = massa das impurezas insolúveis no éter de petróleo
P = massa da amostra seca

Referências bibliográficas

AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S. 1996. [A.O.C.S. Official method Ca 3a-46].

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 262.

336/IV Determinação de resíduo por incineração (cinzas)

Este método determina o resíduo remanescente depois de incineração sob condições específicas de teste. Aplicável para gorduras animais e óleos vegetais e marinhos. Fundamenta-se na perda de peso que ocorre quando o produto é incinerado a 550°C, com destruição da matéria orgânica sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização.

Material

Cápsula de porcelana de 50 mL ou cápsula de platina de 100 mL, bico de Bünsen, tela de amianto, tripé, balança analítica, mufla, papel de filtro e dessecador.

Procedimento – Coloque o papel de filtro contendo os insolúveis totais em éter obtido conforme **335/IV** em uma cápsula de porcelana de 50 mL ou cápsula de platina de 100 mL, previamente aquecida em mufla a 550°C por 1 hora, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Carbonize em bico de Bünsen com chama baixa. Incinere em mufla a 550°C. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Nota: a combustão da amostra deve ser feita em capela, com exaustão forçada.

Cálculo

$$\frac{p \times 100}{P} = \text{cinzas por cento m/m}$$

p = nº de g de resíduo
P = nº g da amostra

Referências bibliográficas

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended praticces of the American Oil Chemists`Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S.

1990. [A.O.C.S. Official method Ca 11-55]
INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 263.

337/IV Determinação da densidade relativa

Este método determina a razão da massa da amostra em relação à da água por unidade de volume a 25°C e é aplicável a todos os óleos e gorduras líquidas.

Material

Picnômetro com junta esmerilhada de 50 mL, banho-maria mantido à temperatura de (25 ± 0,1)°C e termômetro com subdivisão de 0,1°C.

Procedimento – Funda a amostra, filtre com papel de filtro para remover as impurezas e traços de umidade. Aqueça à temperatura de (20-23)°C. Encha o recipiente do picnômetro, adicionando a amostra cuidadosamente pelas paredes para prevenir a formação de bolhas de ar. Tampe e coloque em banho-maria na temperatura de (25 ± 0,1)°C. Conserve o conjunto imerso na água e espere atingir a temperatura acima especificada por 30 minutos. Remova com cuidado o óleo que tenha escorrido pela lateral do recipiente. Retire do banho e seque, evitando o manuseio excessivo. Pese e calcule a densidade.

Cálculo

$$\frac{A-B}{C} = \text{densidade relativa a (25/25)°C}$$

A = massa do recipiente contendo óleo
B = massa do recipiente vazio
C = massa da água à temperatura de 25ºC

Referência bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY. **Official methods and recommended praticces of the American Oil Chemists` Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S. 1990. [A.O.C.S. Official method Cc 10a-25].

338/IV Teste do frio

Este método mede a resistência da amostra à cristalização e é comumente usado também como índice de "winterização" e verificação da remoção da estearina no processo. É aplicável a todos os óleos vegetais normais, refinados e em gordura animal isenta de umidade.

Material

Banho-maria a 25°C, banho de gelo a 0°C, frasco especial para óleo de 115 mL, funil e papel de filtro.

Procedimento – Filtre uma quantidade suficiente da amostra (200-300) mL diretamente com papel de filtro. Aqueça a porção filtrada. Agite a amostra continuamente durante o aquecimento e remova do calor quando a temperatura atingir 130°C. Abasteça um frasco especial para óleo completamente até o gargalo com a amostra e tampe hermeticamente. Coloque o frasco num banho de água a 25°C e vede o banho com parafina. Mergulhe o frasco contendo a amostra em banho de gelo, de modo que o conjunto fique coberto com água e gelo. Reabasteça com gelo freqüentemente, se necessário, para manter o banho solidamente empacotado, caso contrário, a temperatura poderá subir acima de 0°C. É essencial que a temperatura do banho se mantenha a 0°C. Ao final de cinco horas e meia, remova o frasco do banho e examine rigorosamente os cristais de gordura ou turvação formada. Não confundir cristais com pequenas bolhas de ar. Para o teste ser positivo, a amostra precisa estar completamente clara, límpida e brilhante.

Notas
A finalidade do tratamento a quente é remover traços de impurezas, umidade e destruir algum núcleo de cristais.

Recomenda-se utilizar um fundo preto iluminado para melhor visualização do resultado do teste, devendo a amostra ficar a uma distância de 2 metros.

Referência bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. ***Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.*** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S. 1990. [A.O.C.S. Official method Ce 11-53].

339/IV Determinação de matéria insaponificável

Matéria insaponificável inclui aquelas substâncias que freqüentemente se encontram dissolvidas nas gorduras e óleos e que não podem ser saponificadas por tratamento usual com soda, mas são solúveis em solventes normais para gorduras e óleos. Incluem-se neste grupo de componentes, álcoois alifáticos de alto peso molecular, esteróis, pigmentos e hidrocarbonetos. O método é aplicável para gorduras e óleos animais e vegetais, não sendo adequado para gorduras e óleos contendo quantidade excessiva de matéria insaponificável, como os óleos marinhos. Este método também não é aplicável para alimentos com elevado teor de gordura.

Material

Extrator de gordura de capacidade de 200 mL com tampa de vidro, frascos Erlenmeyer ou Soxhlet de 100 a 200 mL, funil de separação de 500 mL, sifão de vidro e balança analítica.

Reagentes

Álcool a 95% v/v
Álcool a 10% v/v
Solução de hidróxido de potássio a 50% m/v
Éter de petróleo
Solução de hidróxido de sódio 0,02 M
Solução de fenolftaleína

Procedimento – Pese cerca de 5 g de amostra bem misturada em um frasco Erlenmeyer ou Soxhlet. Adicione 30 mL de álcool a 95% e 5 mL de KOH a 50%. Aqueça e deixe em refluxo por 1 hora ou até completa saponificação. Transfira para o funil de separação, ainda quente, usando um total de 40 mL de álcool 95%. Complete a transferência com água quente e depois fria até um volume total de 80 mL. Lave ainda o frasco com um volume de 5 mL de éter de petróleo e transfira para o funil. Esfrie até à temperatura ambiente e adicione 50 mL de éter de petróleo. Insira a tampa e agite vigorosamente por um minuto até o total clareamento das duas camadas. Use sifão de vidro para remover completamente a camada superior sem incluir qualquer porção da camada inferior. Receba as frações de éter de petróleo em um funil de separação de 500 mL. Repita a extração pelo menos seis vezes, usando porções de 50 mL de éter de petróleo, agitando vigorosamente em cada extração. Lave os extratos combinados no funil de separação três vezes, usando 25 mL de álcool a 10%, agitando vigorosamente e retirando a camada alcoólica depois de cada extração. Evite remover qualquer parte da camada de éter de petróleo. Transfira o extrato de éter de petróleo para um béquer tarado e evapore até a secagem em banho de água. Depois de

todo o solvente ter sido evaporado, complete a secagem em estufa a vácuo à temperatura de (75-80)ºC e pressão interna de 200 mm de Hg. Esfrie em dessecador e pese. Depois da pesagem, dissolva o resíduo em 50 mL de álcool a 95% a 50 ºC previamente neutralizado contendo fenolftaleína como indicador. Titule com NaOH 0,02 M até o ponto de viragem. Corrija a massa do resíduo para ácidos graxos livres contidos, usando a seguinte relação: 1 mL de 0,02 M de NaOH é equivalente a 0,0056 g de ácido oléico. Faça um branco sem a presença de óleo ou gordura e proceda da mesma maneira que a amostra.

Cálculo

$$\frac{A-(B+C)\times 100}{P} = \text{matéria insaponificável por cento m/m}$$

A = massa do resíduo obtido após secagem a vácuo
B = massa de ácido graxo determinado por titulação
C = massa do branco.
P = nº de gramas da amostra

Referência bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.** 4th ed. Champaign, USA,. A.O.C.S. 1990. [A.O.C.S. Official method Ca 6a-40].

340/IV Prova de Halphen-Gastaldi

Esta prova é considerada específica para a presença de estruturas ciclopropênicas contidas no ácido estercúlico ou ácidos de estruturas similares. Detecta, qualitativamente, a presença de óleo de semente de algodão em óleos e gorduras animais ou vegetais.

Material

Pipeta de 5 mL, tubo de ensaio, banho-maria e proveta de 10 mL.

Reagentes

Solução de enxofre em sulfeto de carbono a 1% m/v
Piridina.

Procedimento – Transfira 5 mL da amostra para um tubo de ensaio. Adicione 5 mL de

uma solução de enxofre em sulfeto de carbono a 1% e uma gota de piridina. Adapte ao tubo de ensaio um tubo de segurança. Mergulhe o tubo em banho-maria durante 15 minutos. Recolha o sulfeto de carbono destilado em um béquer com água. Na presença de óleo de semente de algodão, aparecerá uma coloração vermelha ou vermelho-cereja. A intensidade de cor depende da quantidade de óleo de semente de algodão presente.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 264-265.

341/IV Prova de Holde

Este método detecta, qualitativamente, a presença de óleo de amendoim em óleos e gorduras animais ou vegetais.

Material

Pipetas de 1 e 5 mL, tubo de ensaio graduado e bico de Bünsen.

Reagentes

Solução alcoólica de hidróxido de potássio a 3,3% (álcool a 90%) m/v
Álcool

Procedimento – Transfira 0,65 mL da amostra para um tubo de ensaio graduado. Adicione 5 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 3,3% (álcool a 90%). Aqueça até a ebulição e saponifique durante dois minutos. Esfrie e adicione uma quantidade de álcool a 90% equivalente ao evaporado. Coloque em banho a 18°C, por 10 minutos. Na presença de óleo de amendoim, aparecerá uma turvação ou um precipitado gelatinoso, dependendo da quantidade de óleo de amendoim presente.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 265

342/IV Prova de Villavecchia-Fabris

Este método detecta, qualitativamente, a presença de óleo de sésamo (gergelim) em óleos e gorduras animais ou vegetais.

Material

Pipetas de 1 e 5 mL, proveta de 10 mL e tubo de ensaio.

Reagentes

Solução alcoólica de furfural purificado a 1% (álcool a 95%) m/v
Ácido clorídrico

Procedimento – Transfira 5 mL da amostra para um tubo de ensaio (se a amostra for muito espessa, adicione 5 mL de éter de petróleo). Adicione 0,2 mL da solução alcoólica de furfural a 1% (álcool a 95%) e 5 mL de ácido clorídrico. Agite o tubo durante 30 segundos. Deixe em repouso até separação das camadas. Na presença de óleo de sésamo (gergelim), a camada ácida apresentará uma coloração vermelha persistente.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3 ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 265.

343/IV Determinação da extinção específica por absorção na região do ultravioleta.

Este método descreve o procedimento para o exame espectrofotométrico de azeite de oliva e outros óleos e gorduras na região do ultravioleta. A análise espectrofotométrica na região do ultravioleta pode fornecer informações sobre a qualidade de um óleo, seu estado de conservação e alterações causadas pelo processamento. A absorção em 232 e 270 nm, comprimentos de onda especificados no método, é devida à presença de sistemas dienos e trienos conjugados, respectivamente. Estes compostos são formados por oxidação e/ou refino do óleo. Azeites de oliva virgem de boa qualidade e armazenados sob condições adequadas contêm poucos produtos de oxidação os quais absorvem próximo a 232 nm. Em alguns casos particulares, azeites de oliva virgem alterados podem exibir características espectrais próximas dos óleos refinados.

Neste método, o óleo ou gordura em questão é dissolvido em solvente apropriado e a extinção da solução é determinada nos comprimentos de onda especificados, usando como referência o solvente puro. Estas absorções são expressas como extinções específicas $E^{1\%}_{1cm}$ (a absorbância de uma solução a 1% do óleo no solvente especificado, numa espessura de 1 cm), convencionalmente indicadas por K.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS com leituras individuais para cada comprimento de onda, cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, balões volumétricos de 25 mL, colunas de vidro cromatográficas com comprimento de 450 mm, diâmetro interno de 35 mm, provida de tubo de descarga com 10 mm de diâmetro aproximadamente e mufla.

Reagentes

Ciclohexano ou isoctano, grau espectrofotométrico
Alumina básica
Hexano, grau cromatográfico
Azeite de oliva virgem
Óleo de amendoim refinado

Preparação da alumina – Coloque alumina, previamente dessecada em mufla a (380 - 400)°C por 3 horas, em um frasco hermeticamente fechado. Adicione água na proporção de 5 mL para 100 g de alumina. Feche o frasco de imediato e agite repetidamente. Deixe em repouso por pelo menos 12 horas antes de usar.

Verificação da atividade da alumina – Prepare a coluna cromatográfica com 30 g de alumina. Passe através da coluna uma mistura consistindo de 95% de azeite de oliva virgem ($k < 0,18$ a 268 nm) e 5% de óleo de amendoim refinado ($k > 4$ a 268 nm). Se após a passagem através da coluna a mistura apresentar uma extinção específica maior que 0,11 a 268 nm, a alumina é aceitável. Caso contrário, o nível de hidratação deve ser aumentado.

Procedimento – A amostra a ser analisada deve estar perfeitamente homogênea e livre de impurezas. Óleos líquidos à temperatura ambiente devem ser filtrados através de papel de filtro à temperatura de aproximadamente 30°C. Gorduras sólidas devem ser homogeneizadas e filtradas à temperatura não superior a 10°C acima do ponto de fusão. Pese aproximadamente 0,25 g da amostra em um balão volumétrico de 25 mL. Dissolva e complete o volume com ciclohexano ou isoctano e homogeneíze (solução A). A solução resultante

deve ser perfeitamente límpida. Se ocorrer opalescência ou turbidez, filtre rapidamente através de papel de filtro. Transfira 5 mL desta solução e dilua a 25 mL com o ciclohexano ou isoctano em balão volumétrico (solução B). Encha uma cubeta com a solução A e meça a absorbância a 270 nm, usando o mesmo solvente como referência, em espectrofotômetro previamente calibrado. Procedendo da mesma maneira, meça a absorbância da solução B a 232 nm. Os valores de absorbância obtidos devem estar compreendidos na faixa de 0,1 a 0,8. Quando o valor obtido da extinção específica a 270 nm for superior ao limite máximo legal estabelecido para a classificação do azeite, torna-se necessária a purificação por coluna cromatográfica com alumina ativada, como segue: transfira 30 g de alumina previamente ativada em suspensão com hexano para coluna cromatográfica. Remova o excesso de hexano deixando o nível do solvente a 1 cm da alumina. Dissolva 10 g de óleo em 100 mL de hexano homogeneizado e livre de impurezas, conforme já descrito neste procedimento e passe esta solução pela coluna. Colete o eluato e evapore todo o solvente sob vácuo e proceda como descrito anteriormente.

Cálculo

$$\frac{A_\lambda}{c \times l} = K_\lambda = E^{1\%}_{1cm}$$

K_λ = extinção específica no comprimento de onda λ
A_λ = absorbância medida no comprimento de onda λ
c =concentração da solução em g/100 mL
l = caminho óptico da cubeta em cm

Nota: a análise espectrofotométrica do azeite de oliva inclui a determinação da variação da extinção específica:

$$K_{270} - \frac{K_{266} + K_{274}}{2} = \Delta K = \Delta E^{1\%}_{1cm} = \text{variação de extinção específica}$$

ΔK = Extinção específica no comprimento de onda para a máxima absorção em torno de 270 nm

Referência bibliográfica

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists 'Society.** 4th ed. Champaign, USA, A.O.C.S. 1990. [A.O.C.S. Official method Ch 5-91].

344/IV Análise por cromatografia em fase gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A determinação da composição de ácidos graxos a partir da análise dos ésteres metílicos auxilia no estudo de fraudes e na avaliação do conteúdo nutricional de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal. Por este método, os ésteres metílicos de ácidos graxos são separados, identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa. O método é aplicável para a determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos contendo de 4 a 24 átomos de carbono, obtidos a partir de ácidos graxos de óleos e gorduras.

Material

Cromatógrafo a gás com sistema de injeção para coluna capilar (com capacidade de divisão da amostra) e coluna empacotada (com o menor volume morto possível), forno com variação máxima de 1ºC para colunas empacotadas, 0,1ºC para colunas capilares e com temperatura programável (fundamental para análise de ésteres metílicos de ácidos graxos com menos de 16 átomos de carbono na molécula); detector de ionização de chama (DIC); seringa de 10 µL graduada em 0,1 µL e registrador ou integrador ou computador.

Coluna empacotada

A coluna deve ser construída com um material inerte às substâncias que serão analisadas, isto é, vidro ou aço inox. Deve possuir comprimento de (1-3) m e diâmetro interno de (2-4) mm.

Suporte de empacotamento – São empregadas, normalmente, terras diatomáceas que sofreram lavagem ácida e silanização. O tamanho das partículas deve estar compreendido na faixa de (60-120) e (125-250) *mesh*, sendo que a variação entre elas não deve ser superior a 25 µm.

Fase estacionária – Pode ser empregado um líquido viscoso polar de poliésteres, isto é, polisuccinato de dietileno glicol (DEGS), polisuccinato de butanediol, poliadipato de etileno glicol. A fase estacionária deve corresponder de (5-20)% do empacotamento da coluna.

Condicionamento de uma coluna nova – Desconecte a coluna do lado do detector e gradativamente aqueça o forno a aproximadamente 10ºC acima da temperatura de operação, sempre passando o gás de arraste. Mantenha esta temperatura, passando pela coluna o gás de arraste com fluxo de (20 - 60) mL/min por aproximadamente 16 horas e por mais 2 horas a 20ºC acima da temperatura de operação. Cuidado para não exceder a

temperatura máxima recomendada pelo fabricante.
Coluna capilar

Tubo – O tubo da coluna é feito de material inerte, normalmente sílica fundida. O diâmetro interno pode variar de (0,2-0,8) mm. A superfície interna do tubo sofre um tratamento apropriado, antes de ser depositada a fase estacionária. O comprimento da coluna varia normalmente de (25 - 100) m.

Fase estacionária – As fases estacionárias são filmes de polietileno glicol, polisuccinato de butanediol, ciano propil siloxanos, entre outras. A espessura do filme pode variar de (0,1 - 0,25) µm.

Instalação e condicionamento da coluna – Tome os devidos cuidados na instalação das colunas nos fornos, ajustando as conecções para evitar vazamento dos gases ou quebra da coluna e reduzindo os espaços mortos. Condicione a coluna sempre passando o gás de arraste e programe o aquecimento da temperatura do forno a 3ºC/min a partir da temperatura ambiente até 10ºC abaixo da temperatura de decomposição da fase estacionária (verifique as recomendações do fabricante). Mantenha esta temperatura por 1 hora até estabilizar a linha de base.

Reagentes

Gás de arraste para DIC: hidrogênio (coluna capilar), nitrogênio, hélio ou argônio (pureza 99,999%).

Gases auxiliares para o DIC: nitrogênio, hidrogênio (pureza 99,999 %) e ar super seco (livre de hidrocarbonetos).

n-Hexano grau cromatográfico.

Padrões de referência: mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos ou padrões individuais de ésteres metílicos (ampolas seladas com mg dos padrões) ou um óleo de composição conhecida, de preferência similar ao óleo ou gordura a ser analisado.

Soluções-padrão de referência – Dissolva o conteúdo da ampola (mg) dos padrões de referência em n-hexano e transfira para um balão volumétrico de 100 mL ou de outro volume apropriado. Complete o volume com o mesmo solvente.

Procedimentos

Condições otimizadas de operação – Para coluna empacotada, considere as seguintes variáveis: tamanho e diâmetro interno da coluna, temperatura da coluna, fluxo do gás de arraste [proporção ideal: nitrogênio, hidrogênio e ar sintético 1:1:10 (exemplo: N_2 (gás de arraste) 30 mL/min, H_2 30 mL/min e ar sintético 300 mL/min)], resolução requerida,

tamanho da amostra para análise. O tamanho da amostra escolhido deve situar-se dentro da faixa linear de resposta do detector.

Para coluna capilar considere as mesmas variáveis citadas para a coluna empacotada. A eficiência (número de pratos teóricos) obtida para cada componente separado por uma coluna capilar deve ser ao redor de 100000 ou no mínimo 3000 pratos por metro de coluna.
Dependendo do tipo de amostra e da coluna disponível deve-se otimizar as condições de análise para se obter a melhor eficiência e resolução dos componentes. Para a análise de ésteres metílicos de ácidos graxos de óleos vegetais, recomenda-se, por exemplo,as condições do método Method Ce 1h-05 ou a descrita abaixo:
Coluna de fase estacionária ciano propil siloxona de 50 a 100 m, com 0,25 µm de espessura do filme e 0,25 mm de diâmetro interno.

Gás de arraste, hidrogênio, velocidade linear entre (15 - 25)mL/min, razão de divisão da amostra 1:50.
Exemplo: coluna de 50 m
Temperatura programada da coluna de 80 a 220ºC, sendo a velocidade de aquecimento de 5ºC por minuto. Mantenha a 220ºC por 10 minutos.
Temperatura do injetor: 230ºC
Temperatura do detector: 240ºC

Determinação da eficiência e resolução – Analise uma mistura de ésteres metílicos dos ácidos esteárico e oléico com proporções equivalentes dos dois compostos. Calcule o número de pratos teóricos n (eficiência) e a resolução pelas fórmulas:

$$16 \times \left(\frac{dR_1}{w_1}\right)^2 = n$$

$$\frac{2\Delta}{(w_1 + w_2)} = R$$

dR_1 = distância de retenção, medida em mm, do início da injeção ao máximo do pico do metil estearato.
w_1 e w_2 = larguras dos picos do metil estearato e oleato, respectivamente
Δ = distância entre os máximos dos picos do metil estearato e metil oleato

As condições de análise que devem ser escolhidas são as que produzirem:
n = 3000 pratos teóricos por metro de coluna (no mínimo) para o estearato de metila
R = 1,25 (no mínimo)

Nota: deve-se trabalhar com temperatura do forno da coluna programável na análise de amostras contendo ácidos graxos com pesos moleculares muito diferentes. Diversos equipamentos possuem softwares que calculam os parâmetros de desempenho da coluna, auxiliando na seleção rápida da melhor condição de análise.

Determinação dos ésteres metílicos – Prepare a amostra como descrito em um dos procedimentos a seguir: **054/IV**, **055/IV** ou **056/IV**. Injete no cromatógrafo de 0,1 a 2 µL da solução de ésteres metílicos de ácidos graxos de padrões puros ou obtidas conforme descrito acima. Analise a mistura de padrões de referência de ésteres metílicos de ácidos graxos de composição conhecida nas mesmas condições empregadas na análise da amostra e determine o tempo de retenção (ou distância de retenção) para cada éster metílico. Construa o gráfico do logaritmo do tempo de retenção em função do número de átomos de carbono dos ácidos graxos. Em condições isotérmicas de análise, o gráfico para ésteres de séries homólogas e cadeia linear, deve ser uma reta. As retas são praticamente paralelas para diferentes séries homólogas. Empregando-se os gráficos obtidos como descrito acima, pode-se identificar um éster de ácido graxo de uma série homóloga por interpolação.

Na prática utiliza-se o cálculo de ECN, isto é, número equivalente de carbono, para identificação de ácidos graxos de uma série homóloga.

Os valores de ECN são calculados a partir dos valores dos tempos de retenção dos compostos.

$$\frac{\log t'_{Agi} - \log t'_{Agn}}{\log t'_{Agn+i} - \log t'_{Agn}} + n = ECN$$

Agi = ácido graxo a ser identificado
n e n+i = número de átomos de carbono de padrões homólogos de cadeia reta, eluídos antes e depois do ácido graxo a ser identificado.
$t'_{Agi} = t_{Agi} - t_0$
t'_{Agi} = tempo de retenção corrigido
t_{Agi} = tempo de retenção da substância a ser identificada
t_0 = tempo de retenção de uma substância não retida. (Ex: butano, pentano em colunas polares).
$t'_{Agn} + t'_{Agn+i}$ = tempos de retenção corrigidos de padrões homólogos de cadeia reta, eluídos antes e depois do ácido graxo a ser identificado.
("i"normalmente é igual a múltiplos de 2)

Com determinada programação de temperatura (aumento linear de temperatura) a equação é simplificada para:

$$\frac{t'_{Agi} - t'_{Agn}}{t'_{Agn+1} - t'_{Agn}} + n = ECN$$

Cálculos

Normalização

Exceto em casos excepcionais, assuma que todos os componentes da amostra estejam representados no cromatograma. Desta forma a soma das áreas de todos os picos representará 100% dos constituintes (eluição total). Se o equipamento incluir um computador ou integrador, utilize seus recursos para o cálculo. Caso contrário, determine a área de cada pico multiplicando a altura pela largura na meia altura. Quando necessário, considere as várias atenuações utilizadas durante o registro dos cromatogramas. De uma maneira geral, quando não estão presentes quantidades significativas de componentes com menos de 12 átomos de carbono, calcule a porcentagem de área do pico correspondente ao constituinte, em relação à soma das áreas de todos os picos. O resultado será expresso como porcentagem de área do componente (éster metílico).

$$\frac{A_{Agi} \times 100}{\Sigma A} = \text{porcentagem do éster metílico m/m}$$

A_{Agi} = área do pico correspondente ao componente "i"

ΣA = soma das áreas de todos os picos.

Normalização com fatores de correção

Os fatores de correção da resposta do detector são determinados quando estão presentes na amostra ácidos graxos com menos de 12 átomos de carbono e/ou ácidos graxos com grupos secundários ou, ainda, quando se utiliza um detector de condutividade térmica. Estes fatores devem ser usados para converter as porcentagens de área dos picos em porcentagem de massa dos componentes. Determine os fatores de correção com a ajuda de um cromatograma obtido da análise da mistura de padrões de ésteres metílicos, de composição conhecida, nas mesmas condições de análise da amostra.

Para a mistura padrão:

$$\frac{M_{Agi} \times 100}{\Sigma M} = \text{porcentagem do éster metílico m/m}$$

M_{Agi} = massa do componente "i" na mistura padrão.

ΣM = massa total dos vários componentes na mistura padrão

Do cromatograma da mistura padrão, calcule:

$$\frac{A_{Agi} \times 100}{\Sigma A} = \text{porcentagem do éster metílico m/m}$$

A_{Agi} = área do pico correspondente ao componente "i"

ΣA = soma da área de todos os picos.

$$\frac{M_{Agi} \times \Sigma A}{A_{Agi} \times \Sigma M} = K_{Agi} = \text{fator de correção}$$

Geralmente os fatores de correção são calculados com relação ao K_{C16} (éster metílico do ácido palmítico). Assim os fatores relativos são:

$$\frac{K_{Agi}}{K_{C16}} = K'_{Agi}$$

Expresse o resultado em % de massa (m/m) do componente (éster metílico):

$$\frac{(K'_{Agi} \times A_{Agi})}{\Sigma(K'A_{gi} \times A_{Agi})} \times 100 = \text{porcentagem do éster metílico m/m}$$

Pode ser feito o cálculo teórico dos fatores de correção do detector de ionização de chama (DIC):

$$\frac{M_{Agi}}{(n_{Agi}-1)\times A_c} = K_{Agi}$$

K_{Agi} = fator de resposta para o ácido graxo "i"
M_{Agi} = massa molecular do éster metílico de ácido graxo "i"
n_{Agi} = número de átomos de carbono do éster metílico do ácidos graxo "i"
A_c = massa atômica do carbono (12,01)

Pesos atômicos utilizados no cálculo:

Carbono = 12,01; Hidrogênio = 1,0079; Oxigênio = 15,994.

Fator relativo de resposta do DIC para cada componente com relação ao $C_{16:0}$:

$$\frac{K_{Agi}}{K_{C16}} = K'_{Agi}$$

K'_{Agi} = fator relativo de correção, para o ácido graxo "i"
K_{C16} = fator de resposta do DIC para o $C_{16:0}$
K_{Agi} = fator de resposta do DIC para o ácido graxo "i"

A determinação dos fatores de correção de resposta do DIC é especialmente importante para os ácidos graxos de baixo peso molecular ($C_{4:0}$; $C_{6:0}$), como por exemplo, para os derivados de gordura de leite e para os de alto peso molecular, como os de óleos de peixe, pois nestes casos os fatores relativos desviam de forma considerável da unidade.

Cálculo com padrão interno (PI)
Empregue o método de padronização interna para determinar o valor absoluto de um ácido graxo na amostra ou na quantificação de ácidos graxos com baixo peso molecular (4 a 6 átomos de carbono) juntamente com ácidos graxos de alto peso molecular (16 a 24 átomos de carbono) na mesma amostra. Ésteres metílicos de ácidos graxos com número ímpar de carbonos são freqüentemente usados como padrão interno (Ex: $C_{5:0}$; $C_{11:0}$; $C_{13:0}$; $C_{19:0}$ ou $C_{23:0}$).

Expresse o resultado em % de massa do componente (éster metílico):

$$\frac{M_{PI}\times K_{Agi}\times 100\times A_{Agi}}{M\times K_{PI}\times A_{PI}} = \text{por cento m/m}$$

M = massa em miligramas da amostra
A_{PI} = área do PI
M_{PI} = massa em miligramas do PI
A_{AGi} = área correspondente ao componente i
K_{Agi} = fator de correção da resposta do DIC para o ácido graxo i (relativo a K_{C16})
K_{PI} = fator de correção da resposta do DIC para o PI (relativo a K_{C16})

Nota: quando o resultado for expresso em gramas de ácidos graxos por 100 g de óleo, deve-se multiplicar pelo fator 0,956.

Referências bibliográficas

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, USA: A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 2-66: Preparation of methyl esters of long chain fatty acids).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, USA: A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign , USA: A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 1d-91 Determination of fatty acids in edible oils and fats by capillary GLC).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign , USA: A.O.C.S., 1997 (A.O.C.S. Official Method Ce 1f-96 Determination of *cis* and *trans* fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC).

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **IS0 5508:** Animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. ISO 5508. 1990E

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1 *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 266.

345/IV Determinação de tocoferóis e tocotrienóis por cromatografia líquida de alta eficiência

Este método quantifica tocoferóis (alfa, beta, gama e delta) e tocotrienóis em óleos vegetais ou gorduras. Baseia-se na dissolução da amostra em solvente orgânico e injeção direta em cromatógrafo a líquido para a separação e quantificação dos tocoferóis e tocotrienóis.

Material

Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) composto de: bomba de alta pressão, dispositivo para injeção da amostra, detector de fluorescência ajustado para os comprimentos de onda de 290 nm de excitação e 330 nm de emissão (na indisponibilidade de detector de fluorescência, utilize o de UV ajustado em 292 nm), coluna analítica de CLAE (250mm x 4mm) empacotada com micropartículas de sílica de 5 µm, pré-coluna de sílica; espectrofotômetro UV/VIS; rotavapor; balões volumétricos âmbar de 25, 50 e 100 mL; pipetas volumétricas de 10 mL e pipetas automáticas (20 a 200 µL e 200 a 1000 µL).

Reagentes

Padrões de α, β, γ, δ - tocoferóis de alta pureza (superior a 95%).
Metanol.
n-Hexano.
Isopropanol

Fase móvel para CLAE – Hexano - isopropanol (99,5:0,5).

Nitrogênio seco

Nota: todos os solventes devem ser grau CLAE

Solução-padrão estoque de α-tocoferol – Pese cerca de 10 mg do padrão em um balão volumétrico âmbar 100 mL e complete o volume com n-hexano. Pipete 10 mL desta solução para um frasco âmbar e remova o solvente num rotavapor. A temperatura não deve exceder a 40ºC. Retire o frasco e remova o solvente residual com nitrogênio. Adicione 10 mL de metanol, com pipeta volumétrica, e agite para dissolver o tocoferol. Meça a absorbância desta solução a 292 nm e calcule a concentração (como µg/mL de α-tocoferol) dividindo-se o valor da absorbância lida por 0,0076.

Soluções-padrão estoque de β, γ, δ-tocoferóis – Prepare a solução-estoque para cada um dos padrões de β, γ, δ-tocoferol e proceda como descrito para a solução-padrão de α-tocoferol. Meça a absorbância de cada uma das soluções nos comprimentos de onda indicados abaixo e utilize os respectivos fatores para o cálculo da concentração e pureza.

296 nm β-tocoferol = 0,0089
298 nm γ-tocoferol = 0,0091
298 nm δ-tocoferol = 0,0087

Notas
Os fatores citados são derivados dos valores da absorção específica dos tocoferóis nos respectivos comprimentos de onda.
Estoque as soluções-padrão em frasco de vidro âmbar, ao abrigo da luz e sob refrigeração pelo período de uma semana.
Solução de trabalho de mistura de tocoferóis – Combine volumes apropriados das soluções-padrão estoque para obter soluções de trabalho com concentrações dos tocoferóis entre 1 e 5 µg/mL. Escolha no mínimo cinco pontos para a curva de calibração. Utilize n-hexano nas diluições.

Nota: Quando utilizar detector UV prepare uma solução mais concentrada dos padrões.

Procedimentos

Otimização dos parâmetros analíticos – Condicione a coluna, se necessário. Ajuste o fluxo da fase móvel [n-hexano/isopropanol (99,5:0,5 v/v)] em 1 mL/min e deixe pelo menos 30 min. Injete cerca de 20 µL da mistura dos padrões de tocoferóis e, se necessário, ajuste a proporção de isopropanol da fase móvel e o fluxo. O fluxo da fase móvel adequado deve estar entre (0,7 - 1,5)mL/min. O tempo de retenção do α-tocoferol não deve ser menor que 5 minutos. O Fator de resolução (R) para o β e γ-tocoferol não deve ser menor que 1,0. Fator de resolução (R) é calculado por:

$$\frac{(Rd_1)-(Rd_2)}{0,5\,x\,(W_1+W_2)}=R$$

Rd_1 = distância de retenção do γ-tocoferol
Rd_2 = distância de retenção do β-tocoferol
W_1 = largura da base do pico do γ-tocoferol
W_2 = largura da base do pico do β-tocoferol

Preparação da amostra – A amostra líquida de óleo deve ser homogeneizada (não filtre). Para amostra sólida, transfira uma certa quantidade representativa (não menos que 10% do peso total da amostra) para um béquer e homogeneíze cuidadosamente. Faça a fusão em um banho-maria onde a temperatura não exceda a 40ºC. O preparo da amostra deve ser feito na ausência de luz. Pese com precisão, entre 0,2 e 0,5 g da amostra de óleo e transfira para um balão volumétrico de 25 mL com n-hexano. Agite para dissolver e complete o volume com o mesmo solvente. Quando utilizar um detector de fluorescência, podem ser necessárias algumas diluições para a obtenção de um cromatograma adequado. A amostra deve estar protegida da luz durante os procedimentos de preparo e deve ser analisada no mesmo dia.

Determinação de tocoferóis na amostra – Injete 20 µL da amostra e identifique os tocoferóis (e tocotrienóis) presentes por comparação com os tempos de retenção dos padrões. Registre as áreas dos picos dos tocoferóis e dos tocotrienóis. Faça duas determinações sucessivas para cada tocoferol, usando alíquotas-teste preparadas recentemente. O resultado final deve ser a média de duas determinações obedecendo a exigência da repetitividade (vide resultados estatísticos do estudo colaborativo do método IUPAC 2432).

Curva de calibração – Injete cerca de 20 µL das soluções de mistura dos padrões de tocoferóis. Repita a injeção e verifique se os cromatogramas obtidos são reprodutíveis. Construa as curvas de calibração pelo método de padronização externa.

Cálculos

A quantificação dos tocoferóis é feita por padronização externa. Os teores dos tocoferóis são calculados a partir de curvas de calibração construídas pelos softwares dos equipamentos ou em planilhas de cálculo (ex: excel). Para a construção da curva utilize no mínimo cinco pontos, isto é, no mínimo cinco níveis de concentração de cada padrão. As curvas obtidas relacionam a concentração dos padrões e a resposta do detector (área).

O teor de α-tocoferol presente em uma amostra, em µg/g, é dado por:

$$\frac{C \times a \times D \times 25}{A \times m} = \text{α-tocoferol µg/g}$$

C = concentração do padrão de α-tocoferol (µg/mL)
A = medida da área do pico obtido pelo padrão de α-tocoferol
a = medida do área do pico obtida pela amostra de α-tocoferol
m = massa da amostra
D = fator da diluição

Os teores de β, γ e δ-tocoferóis da amostra são calculados como o procedimento anterior usando os dados do cromatograma do correspondente padrão de tocoferol.

Nota: os tocotrienóis contidos na amostra podem ser estimados usando os valores de C e A para o correspondente tocoferol. De acordo com a literatura a intensidade da fluorescência para os tocoferóis é a mesma do correspondente tocotrienol e a absorbância no UV é similar.

Referência bibliográfica

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. IUPAC 2432: Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography. **Pure & Appl. Chem.**, v. 60, n. 6. p. 887-892,

346/IV Determinação de tocoferóis e tocotrienóis por cromatografia líquida de alta eficiência em produtos processados contendo ésteres de tocoferóis.

Produtos processados contendo ésteres de tocoferóis, como por exemplo, margarinas, são saponificados e a matéria insaponificável obtida é dissolvida em solvente orgânico e injetada em cromatógrafo a líquido para a separação e quantificação dos tocoferóis e tocotrienóis.

Material

Balança analítica, banho-maria, rotavapor, balões âmbar de fundo chato de 50 e 100 mL com boca esmerilhada, funis de separação âmbar de 250 mL, filtros de vidro, provetas de 10 e 50 mL, papel de filtro e balão volumétrico de 50 mL.

Reagentes

Álcool aproximadamente 95%
Ácool absoluto a 99%
Pirogalol
Solução de KOH a 60% m/v
Éter etílico livre de peróxidos (contendo 0,1% m/m de pirogalol)
HCl 0,01 M
Sulfato de sódio anidro

Procedimento – Pese cerca de 2 g da amostra em balão de fundo chato âmbar de 100 mL. Adicione aproximadamente 8 mL de álcool 95%, para dissolver completamente a amostra. Agite levemente o frasco. Adicione 100 mg de pirogalol e agite para dissolver. Purifique com nitrogênio, adicione 4 mL de solução aquosa de KOH 60%. Passe nitrogênio e

tampe o frasco. Coloque o frasco em um banho-maria à temperatura de 26°C e agite vigorosamente por 10 minutos. Todas as operações devem ser realizadas na ausência de luz direta (use frascos de vidro âmbar ou os envolvam com papel alumínio). Adicione 50 mL de água ao frasco e transfira o conteúdo quantitativamente para um funil de separação de 250 mL. Lave o frasco com 50 mL de éter etílico livre de peróxidos e transfira as "lavagens" para o funil. Agite vigorosamente o funil de separação por 1 minuto, abrindo a tampa ocasionalmente para liberar a pressão formada. Deixe em repouso para que ocorra a separação das camadas. Retire a camada aquosa (camada inferior). Faça mais quatro extrações da camada aquosa com 30 mL de éter etílico isento de peróxidos e combine os extratos etéreos em outro funil de separação. Lave o extrato etéreo combinado com 50 mL de água (agitando cuidadosamente para evitar formação de emulsão) e a seguir com 30 mL de HCl 0,01 M. Separe as fases. Despreze a fase aquosa. Filtre a fração etérea passando por cerca de 3 g de Na_2SO_4 anidro, com a ajuda de um funil e papel de filtro. Colete o filtrado em balão de fundo chato âmbar para adaptar em um rotavapor. Remova o éter sob pressão reduzida, não excedendo a temperatura de 40°C. Se o resíduo líquido permanecer no frasco, adicione álcool absoluto 99% e evapore até à secura. Lave as paredes do frasco com n-hexano e transfira o conteúdo quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL. Complete o volume. Dilua adequadamente a amostra e proceda conforme **345/IV**.

Referência bibliográfica

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. IUPAC 2432: Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography. **Pure & Appl. Chem.**, v. 60, n. 6. p. 887-892, 1988.

Colaboradores

Emy Takemoto, Mário Tavares, Miriam Solange Fernandes Caruso, Regina Sorrentino Minazzi Rodrigues e Sabria Aued Pimentel

CAPÍTULO **XVII**

OVOS E PRODUTOS DE OVOS

XVII

OVOS E PRODUTOS DE OVOS

Ovos, sem outra designação, são ovos de galinha, entregues ao consumo e, como tal, devem ser inspecionados em relação à classificação e às suas características. A composição média em peso consiste de 57 por cento de clara, 32 por cento de gema e 11 por cento de casca. A análise de cada uma das duas partes (clara e gema) abrange as determinações de água, lipídios, nitrogênio, cinzas, fósforo em fosfato de sódio, colesterol, lecitina, pH e densidade, dando idéia da composição das mesmas. Do ponto de vista de controle, é interessante a análise eletroforética das proteínas que diferencia ovos de origem diversa (pata, galinha, etc.)

Ovo desidratado

Na análise deste produto, além das determinações de umidade (**012/IV**), protídios (**036/IV** ou **037/IV**), cinzas (**018/IV**), fosfatos (**031/IV**), colesterol (**421/IV**), é importante examinar a solubilidade, arsênio e chumbo (**cap. XXIII**).

347/IV Prova de solubilidade

Material

Tubo de centrífuga de 25 mL, centrífuga, estufa e dessecador com sílica gel.

Procedimento – Pese 1 g da amostra em um tubo de centrífuga previamente aquecido em estufa a 100ºC, resfriado em dessecador e pesado. Adicione 10 mL de água. Homogeneíze bem. Deixe em repouso por três horas. Aqueça em banho de água a 50ºC por meia hora. Centrifugue e decante. Aqueça o tubo com o resíduo em estufa a 70ºC, resfrie em dessecador e pese.

Cálculo

$$\frac{100xN}{P} = \text{substâncias solúveis por cento m/m}$$

N = diferença entre o nº de g da amostra e o nº de g do resíduo
P = nº de g da amostra

Maionese

A análise de maionese inclui, entre outras, as determinações de umidade (**012/IV**), acidez titulável (**016/IV**), colesterol (**421/IV**), amido (**043/IV**), cinzas (**018/IV**), cloretos em cloreto de sódio (**028/IV** ou **029/IV**), e o exame dos aditivos: corantes, conservadores e emulsificantes (**cap. V**). Uma extração do óleo presente no produto poderá ser feita com éter, de uma alíquota da amostra misturada a um excesso de sulfato de sódio anidro. Uma vez obtido o óleo, por remoção do solvente, pode-se determinar o índice de iodo, índice de saponificação, e fazer a prova de rancidez, seguindo as técnicas usadas na análise de óleos (**cap. XVI**).

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos.* São Paulo: I MESP, 3. ed., 1985. p. 279.

348/IV Determinação dos sólidos da gema do ovo

A dosagem de sólidos da gema do ovo em maionese é difícil; neste caso, determina-se o fósforo orgânico, extraindo-se a amostra com um solvente orgânico.

Material

Balão de fundo chato, condensador de vidro para refluxo, filtro de vidro, papel de filtro, cápsula de porcelana, banho-maria, mufla e balão volumétrico de 100 mL.

Reagente

Metanol
Solução de ácido clorídrico (1+2)

Procedimento – Pese 5 g da amostra em um balão de fundo chato. Refluxe durante seis horas com metanol. Filtre. Lave o filtro com pequenas porções de metanol. Recolha os filtrados em cápsula de porcelana e evapore em banho-maria. Incinere em mufla a 550ºC. Dissolva as cinzas em ácido clorídrico (1+2), transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Determine os fosfatos, em anidrido fosfórico, por espectrofotometria, conforme (**031/IV**).

Cálculo

A x 56 = sólidos da gema do ovo, por cento m/m

A = fosfatos, em anidrido fosfórico, calculados como em **031/IV.**

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos.* São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 278-280.

Colaborador
Odair Zenebon

CAPÍTULO **XVIII**

PESCADO E DERIVADOS

XVIII PESCADO E DERIVADOS

Pescado é todo animal que vive normalmente em água doce ou salgada e que serve para alimentação. Pescado fresco é aquele que não sofreu qualquer processo de conservação, exceto pelo resfriamento, e que mantém seus caracteres sensoriais essenciais inalterados. O pescado será designado pela espécie animal a que pertence ou pelo seu nome comum, por exemplo: sardinha, tainha, camarão, siri, polvo, lula, marisco. Várias são as determinações que podem avaliar o grau de conservação do produto, como a eletrométrica do pH, a de bases voláteis totais e a de histamina por espectrofluorimetria, alem da reação de Éber para gás sulfídrico. Outras determinações relacionam-se à composição química do pescado, como a de lipídios totais.

349/IV Reação de Éber para gás sulfídrico

A decomposição bacteriana dos aminoácidos sulfurados da carne de pescado libera enxofre, o qual em meio ácido transforma-se em gás sulfídrico (H_2S). A reação de Éber é indicada para avaliar o estado de conservação do pescado fresco e de produtos relacionados em geral, como o pescado curado. Fundamenta-se na combinação do gás sulfídrico com solução de acetato de chumbo, produzindo enegrecimento do papel de filtro previamente tratado com a referida solução-reagente. Esta prova não se aplica no caso de produtos condimentados e em conservas de pescado que foram processadas em alta temperatura e baixa pressão.

Para a realização da reação de Éber para gás sulfídrico, proceda como em **004/IV**.

350/IV Determinação do pH

A determinação de acidez pode fornecer um dado valioso na apreciação do estado de conservação de pescados e derivados. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre o pH. A medida do pH em pescado e derivados é um dado indicativo do estado de conservação, entretanto para a avaliação mais segura torna-se também necessária a realização das análises microbiológica, química e sensorial.

Para a determinação eletrométrica do pH de pescados, proceda como em **017/IV**.

351/IV Determinação de bases voláteis totais

A deterioração do pescado estocado sob refrigeração é devida à ação enzimática e bacteriana e resulta na produção de vários compostos, sendo os mais freqüentes: trimetilamina, dimetilamina, amônia e ácidos voláteis. A porcentagem de bases voláteis pode ser uma indicação do grau de conservação do pescado, dependendo da espécie. Normalmente, para espécies como cações, raias, siris, o valor de BVT é elevado sem que, necessariamente, estejam deterioradas.

Neste método, a amônia e as aminas voláteis são destiladas por arraste de vapor, em meio levemente alcalino e quantificadas por volumetria de neutralização.

Material

Vidro de relógio, balão de Kjeldahl de 800 mL, proveta de 300 mL, condensador de Liebig, frasco Erlenmeyer de 500 mL e bureta de 15 mL.

Reagentes

Ácido sulfúrico 0,05 M
Hidróxido de sódio 0,1 M
Óxido de magnésio
Silicone antiespumante
Solução alcoólica de vermelho de metila a 0,2% m/v

Procedimento – Prepare a amostra do peixe, tirando as espinhas e vísceras. Moa a carne e homogeneíze. Pese de 5 a 10 g da amostra (para camarões, siris e cação, pese 5 g e, para outras espécies de pescados pese 10 g), transfira para um balão de destilação de Kjeldahl, junte 300 mL de água, 1 a 2 g de óxido de magnésio e umas gotas de silicone antiespumante. Ligue o balão ao conjunto de destilação. Mergulhe a extremidade afunilada do condensador em 15 mL de ácido sulfúrico 0,05 M contido no frasco Erlenmeyer de 500 mL. Adicione três gotas do indicador vermelho de metila, aqueça até ebulição e destile por 25 minutos. Titule o excesso de ácido sulfúrico 0,05 M com solução de

hidróxido de sódio 0,1 M, até viragem do indicador da cor vermelha para amarela.

Cálculo

$$\frac{V \times 0{,}0014 \times 100}{P} = \text{bases voláteis totais em g de nitrogênio, por cento, m/m}$$

V = diferença entre o nº de mL de ácido sulfúrico 0,05 M adicionado e o nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação.
P = nº de g da amostra.

Nota: o resultado deverá ser expresso em mg por cento.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP. 1985. p. 274-275.

352/IV Determinação de histamina por espectrofluorimetria

Entre as aminas biogênicas encontradas nos alimentos, a histamina destaca-se por poder causar intoxicações alimentares, especialmente veiculadas em peixes da família *Scombridae*, como o atum. O principal meio de sua formação é por atividade bacteriana. A enzima histidina descarboxilase de determinadas bactérias age sobre o aminoácido histidina encontrado em espécies de peixes de carne escura, formando a histamina. O nível de histamina nos alimentos é proporcional à quantidade formada nos tecidos do pescado, a qual está relacionada à concentração de bactérias descarboxiladoras da histidina. O método fluorimétrico baseia-se na reação da histamina com o o-ftalaldeído (OPT), formando um composto fluorescente. A homogeneização e extração da substância no produto são feitas com metanol, a purificação por resina de troca iônica e o acoplamento com OPT é efetuado em meio alcalino, adicionando-se ácido fosfórico. A determinação fluorimétrica é feita com excitação a 350 nm e emissão a 444 nm.

Material

Espectrofotômetro de fluorescência, agitador mecânico, pipetas volumétricas de (1 - 5) mL, frasco Erlenmeyer de polipropileno de 100 mL, balão volumétrico de polipropileno de 100 mL, balão volumétrico de 50 mL, banho-maria, multiprocessador,

papel de filtro, tubo cromatográfico de polipropileno de (200 x 7) mm, com controle de escoamento à razão de 3 mL/minuto, ajustando a altura da coluna ao tubo de saída. Este tubo deverá ser preparado da seguinte forma: coloque lã de vidro no tubo cromatográfico de modo a vedar a base e logo a seguir adicione a resina de troca iônica (pasta semifluída), formando uma camada de 8 cm. Adicione água e conserve-a sempre acima do nível da resina.

Nota: nunca regenere a resina na coluna, quando for necessário melhor usar um béquer; sempre lave a coluna com 10 mL de água antes da aplicação de cada amostra.

Reagentes

Resina de troca iônica (Bio-Rad AG 1-X8, 50-100 *mesh* ou Dowex 1-X8, 50-100 *mesh*) – Essa resina deverá ser convertida para a forma alcalina, adicionando-se em um béquer, 15 mL de hidróxido de sódio 2 M/grama de resina. Agite vagarosamente com uma bastão de vidro e deixe descansar por 30 minutos. Decante a parte líquida. Lave a resina com água, filtre e lave novamente. Preencha o tubo com a resina já convertida. Prepare a resina semanalmente e mantenha em água.

Solução de ácido fosfórico 1,78 M – Dilua 243,6 mL de ácido fosfórico para 1 L de água. Padronize 500 mL do ácido com solução de hidróxido de sódio 1 M, usando fenolftaleína como indicador. Ajuste a concentração, se necessário.

Solução de aldeido dicarboxi-o-ftálico (OPT) a 0,1% em metanol – Dissolva 100 mg de OPT em metanol e complete o volume em balão volumétrico de 100 mL com metanol. A validade desta solução é de uma semana, quando conservada em frasco âmbar sob refrigeração.

Soluções de hidróxido de sódio 1 M e 2 M.

Solução-padrão estoque de histamina 1 mg/mL – Pese, com precisão, 169,1 mg de histamina.2HCl (98% de pureza) e dissolva em 100 mL de ácido clorídrico 0,1 M. A validade desta solução é de uma semana sob refrigeração.

Solução-padrão intermediária de histamina 10 µg/mL – Transfira 1 mL da solução-padrão estoque de histamina para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com ácido clorídrico 0,1 M. A validade desta solução é de uma semana sob refrigeração.
Soluções-padrão de histamina em diferentes concentrações – A partir da solução interme-

diária de histamina a 10 µg/mL, prepare soluções contendo respectivamente 0,5 µg/5 mL, 1 µg/5 mL e 1,5 µg/5 mL , diluindo respectivamente 1, 2 e 3 mL da solução intermediária com 100 mL de ácido clorídrico 0,1 M. A validade destas soluções é de um dia.

Procedimento

Preparação da amostra – Para amostras de peixes congelados, deixe à temperatura ambiente e drene o líquido. Limpe, retirando escamas, espinha, cauda, cabeça, nadadeiras e vísceras. No caso de peixes pequenos (menores de 15 cm), use de cinco a dez unidades e para os grandes, três unidades. Corte os peixes transversalmente, subdividindo-os em partes de aproximadamente 2,5 cm. Moa em processador e homogeneíze a massa obtida da carne do pescado.

Pese 10 g da amostra, adicione 50 mL de metanol e homogeneíze em agitador mecânico por dois minutos. Transfira para um balão volumétrico de polipropileno de 100 mL, lavando com metanol e aqueça a 60ºC, por 15 minutos, em banho-maria. Esfrie à temperatura ambiente, complete o volume com metanol e filtre através de papel de filtro utilizando funil de polipropileno. Esta solução poderá ser conservada na geladeira por várias semanas. Passe (4 – 5)mL de água na coluna e descarte o eluato. Com uma pipeta volumétrica adicione 1 mL do extrato da amostra seguido da adição de (4 - 5)mL de água. Imediatamente ao início do escoamento do líquido pela coluna, colete o filtrado em um balão volumétrico de 50 mL contendo 5 mL de HCl 1 M. Lave a coluna várias vezes com água até perfazer 35 mL do filtrado total coletado, complete o volume para 50 mL e conserve em geladeira. Pipete 5 mL do filtrado em um frasco Erlenmeyer de 50 mL, adicione 10 mL de HCl 0,1 M e agite. Pipete 3 mL de NaOH 1 M, agite, adicione 1 mL do reagente OPT e agite (é importante agitar ao menos uma vez durante a reação com OPT). Após 4 minutos, adicione 3 mL de ácido fosfórico 1,78 M, homogeneíze a solução e meça a fluorescência com excitação a 350 nm e emissão a 444 nm. Zere, previamente, o aparelho com água. Prepare o branco da mesma maneira, usando 5 mL de HCL 0,1 M no lugar da solução da amostra e faça a leitura no prazo de uma hora e meia.

Curva-padrão – Pipete, em duplicata, 5 mL de cada solução-padrão em um frasco Erlenmeyer de polipropileno de 50 mL, adicione 10 mL de HCl 0,1 M, agite, 3 mL de NaOH 1 M, agite e 1 mL do reagente OPT, agite. Acrescente, após 4 minutos, 3 mL de ácido fosfórico 1,78 M, homogeneíze cada solução e faça as leituras das fluorescências obtidas. Prepare o branco usando 5 mL de HCl 0,1 M no lugar da solução-padrão. Zere o aparelho com água. A leitura deve ser feita no prazo de uma hora e meia, com

excitação de 350 nm e emissão de 444 nm. A curva deve ser construída em µg histamina por 5 mL de alíquota, corrigindo os valores do branco.

Cálculo

$$\frac{(Is - b) \times 1000}{P \times a} = \text{histamina mg/kg (ppm)}$$

Is = fluorecência da amostra
b = coeficiente linear da reta obtida na curva-padrão
P = massa da amostra em g
a = coeficiente angular da reta obtida da curva-padrão
1000 = fator de diluição (amostra diluída em balão de 100 mL e alíquota de 1 mL em balão volumétrico de 50 mL)

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association Official of Analytical Chemists International.** 17th ed. Arlington: A.O.A.C. Int., 2000. Chapter 35 (method 977.13).

353/IV Determinação de lipídios totais pelo método de Bligh-Dyer modificado

A fração gordurosa do pescado é constituída de uma mistura complexa de lipídios neutros (triglicerídios), lipídios polares (fosfolipídios) e componentes menores (esteróis, ácidos graxos livres, etc.). Os métodos clássicos para a extração de gordura de alimentos, como o de Soxhlet, que usa hexano, éter etílico ou de petróleo, não são adequados para o pescado. Assim sendo, foram testados outros métodos, como os de Bligh-Dyer e de Folch, que empregam clorofórmio, metanol e água, e têm sido recomendados por serem exatos e reprodutíveis para a determinação de lipídios totais em alimentos com alto teor de água, como os peixes.

Material

Capela química, balança analítica, béquer de 500 mL, agitador mecânico, estufa, rotavapor, dessecador, funil de vidro, funil de separação de 500 mL, balão de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL e papel de filtro.

Reagentes

Clorofórmio
Metanol
Sulfato de sódio anidro

Procedimento – Pese 50 g da amostra homogeneizada e transfira para um béquer de 500 mL. Adicione 50 mL de clorofórmio e 100 mL de metanol. Adicione novamente 50 mL de clorofórmio e 50 mL de água. Agite, com o auxílio de um agitador mecânico, por 15 minutos, em capela química. Filtre o material homogeneizado, utilizando funil de vidro com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, para um funil de separação de 500 mL. Após completa separação e clarificação, recolha a camada de clorofórmio (inferior) em balão de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL, previamente tarado. Evapore num rotavapor até a completa remoção do solvente. Transfira o balão para uma estufa a 105°C por 1 hora. Esfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{lipídios totais por cento m/m}$$

P = massa da amostra em g
N = (massa do balão + massa óleo) - massa do balão

Notas
Teste o funil de separação com clorofórmio, antes de usar, para assegurar que não haja vazamento.
Para a análise dos ácidos graxos na gordura extraída, não utilize a estufa para a secagem. Após a remoção do solvente no rotavapor, complete a secagem com nitrogênio seco.

Referência bibliográfica

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

354/IV Determinação de lipídios totais pelo método de Folch

Material

Balança analítica, *blender*, chapa de aquecimento, estufa, funil de separação de 500 mL, balão volumétrico de 250 mL, funil de vidro, provetas de 100 e 200 mL, béquer de 50 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, dessecador com sílica seca e papel de filtro comum.

Reagentes

Solução de clorofórmio-metanol 2:1 v/v
Solução de cloreto de potássio a 0,74% m/v
Sulfato de sódio anidro
Clorofórmio

Procedimento – Pese (10,0 ± 0,5) g de amostra homogeneizada no copo do *blende*r. Adicione 200 mL de clorofórmio-metanol (2:1) e bata por 3 minutos no *blender*. Filtre, cuidadosamente, para o funil de separação, usando papel de filtro comum. Re-extraia com 100 mL de clorofórmio-metanol (2:1). Filtre novamente. Lave o copo e a tampa com clorofórmio (± 30 mL) e transfira diretamente para o funil. Adicione, ao funil de separação, 66 mL de KCl a 0,74%. Agite por 1 minuto e deixe separar as fases. Filtre a fase de clorofórmio (fase inferior) para um balão volumétrico de 250 mL, usando sulfato de sódio anidro no papel de filtro. Lave o funil de separação e o papel de filtro com clorofórmio. Complete o volume com clorofórmio e transfira uma alíquota de 10 mL para um béquer de 50 mL tarado. Seque em chapa de aquecimento a 60ºC. Seque em estufa a 100ºC por 30 minutos, esfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Nota: teste o funil de separação com clorofórmio, antes de usar, para assegurar que não haja vazamento.

Cálculo

$$\frac{(p_2 - p_1) \times 100}{P} = \text{lipídios totais por cento m/m}$$

P = nº de g da amostra na alíquota
p_1 = massa do béquer
p_2 = massa do béquer mais óleo

Referência bibliográfica

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 497-509,1957.

Conservas de pescado

Conserva de pescado é o produto preparado com pescado limpo, cru, cozido ou curado, adicionado de outras substâncias alimentícias e submetido a processos físicos e químicos apropriados a cada espécie. As conservas de pescado serão designadas pela espécie de pescado a que pertencem e o modo de apresentação. Na análise das conservas de pescado faz-se uso de todas as análises já descritas para pescado, além destas, outras como umidade (**012/IV**), amido (**043/IV**), protídios (**036/IV** ou **037/IV**), cinzas (**018/IV**) e cloretos (**028/IV** ou **029/IV**). Nas conservas de pescado em óleos, podem ainda ser realizadas, a reação de Kreis (**333/IV**), a acidez em ácido oléico (**325/IV**) e a identificação do óleo de cobertura por cromatografia em fase gasosa (**344/IV**).

Colaboradores
Mário Tavares e Rosymaura Baena Moreno

CAPÍTULO **XIX**

VITAMINAS

XIX

VITAMINAS

355/IV Determinação de carotenóides em produtos naturais

Os carotenóides, pró-vitamina A, amplamente distribuídos nos vegetais e animais, representam um grupo de pigmentos naturais lipossolúveis com tonalidades que variam do amarelo ao vermelho. Na sua maioria, estes pigmentos são tetraterpenos constituídos por oito unidades de isopreno (C_5H_8), com duplas ligações conjugadas que compõem o sistema cromóforo. As principais fontes de carotenóides no reino vegetal são: cenouras, frutas e verduras. Nos alimentos, além de contribuírem com a cor, alguns pigmentos carotenóides atuam como pró-vitamina A. Os principais carotenóides (α e β carotenos), precursores da vitamina A em produtos naturais, são determinados por cromatografia em coluna e por espectrofotometria UV/VIS. O método apresentado baseia-se na extração com solventes orgânicos, saponificação e separação dos carotenóides por cromatografia em coluna. Os carotenóides alfa e beta são identificados pela posição relativa dos pigmentos na coluna e pelos espectros de absorção na região UV/VIS.

Material

Balança analítica, rotavapor, cilindro de nitrogênio, trompa d'água, lã de vidro, liqüidificador com copo de vidro (ou agitador mecânico), espectrofotômetro UV/ VIS, papel de alumínio, papel de filtro, coluna cromatográfica de vidro de (2,5 x 50) cm de altura ou 2 x 25 cm, kitassatos de 500 e 250 mL, frascos Erlenmeyer com tampa de 500, 250, 100 e 50 mL, béqueres de 250 e 100 mL, bastão de vidro, funil de vidro, balões volumétricos de 50 e 100 mL, funil de separação com torneira de *teflon* de 500 mL, funil de Büchner e proveta 100 mL.

Reagentes

Óxido de magnésio para cromatografia em coluna
Celite
Éter de petróleo com faixa de destilação (30-60)°C
Hidróxido de potássio
Metanol
Acetona
Sulfato de sódio anidro

Solução de hidróxido de potássio a 10% m/v – Pese 10 g de hidróxido de potássio, dissolva em metanol e complete a 100 mL.

Fase estacionária – Pese o óxido de magnésio e a celite na proporção (1:2). Transfira para um frasco fechado. Agite bem para homogeneizar, antes do empacotamento da coluna cromatográfica.

Procedimento – Adapte a coluna a um kitassato de 500 mL, coloque um pouco de lã de vidro na parte inferior da coluna e adicione aos poucos a mistura preparada com óxido de magnésio-celite (1:1), com auxílio da trompa d'água, até aproximadamente 10 a 15 cm. O empacotamento deve ficar uniforme, sem sulcos ou falhas e não muito compactado. Triture e homogeneíze 500 g da amostra e pese aproximadamente 10 g. Extraia os pigmentos com acetona resfriada com auxílio do liqüidificador ou agitador mecânico. Filtre através de um funil de Büchner. Repita esta operação até o resíduo ficar incolor. Junte todos os extratos de acetona contendo os carotenóides e armazene sob a proteção da luz. Coloque 100 mL de éter de petróleo no funil de separação. Adicione, aos poucos, a solução de acetona contendo os pigmentos extraídos, acrescentando água após cada adição. Agite, e após a separação das duas fases, descarte a camada aquosa com acetona (inferior). Repita esta operação lentamente, evitando emulsões, até a eliminação da acetona. Os pigmentos são transferidos para a fase etérea. Lave mais quatro ou cinco vezes a fase etérea para eliminar totalmente algum resíduo de acetona. Recolha a fase etérea em um frasco Erlenmeyer com tampa de 500 mL e guarde para a saponificação, protegendo da luz. Saponifique os pigmentos com adição de uma solução de KOH a 10% em metanol na proporção de 1:1 em relação ao volume do extrato de éter de petróleo. Agite e deixe esta mistura em repouso por aproximadamente 12 horas à temperatura ambiente. Elimine os resíduos de KOH com sucessivas lavagens com água em funil de separação. Adicione pequena porção de sulfato de sódio anidro para retirar a água residual da amostra.

Cromatografia em coluna – Evapore a solução anterior em rotavapor, até aproximada-

mente 20 mL à temperatura de 35°C ou sob corrente de nitrogênio. Na coluna, previamente compactada e conectada à trompa d'água, adicione éter de petróleo para umedecê-la evitando ressecamento. Junte a amostra e observe as separações das frações de carotenóides. Continue adicionando éter de petróleo até a nítida separação das frações, atingindo assim o fim da coluna. A 1ª fração separada é o α-caroteno, de cor amarela clara, podendo também ser separada com o uso de uma solução de 2% de acetona em éter de petróleo. A 2ª fração separada é o β-caroteno, de cor alaranjada, podendo também ser separada com o uso de uma solução a 5% de acetona em éter de petróleo Essas duas frações são as que possuem maior atividade de vitamina A e de maior interesse. Recolha, separadamente, as frações. Se na separação for utilizada acetona, ela deverá ser retirada com sucessivas lavagens com água no funil de separação. Adicione pequena porção de sulfato de sódio anidro. As fases etéreas são evaporadas, completadas a um determinado volume com solvente e as absorbâncias lidas no espectrofotômetro UV/VIS. Na 1ª fase, o α- caroteno é identificado e quantificado por espectrofotometria na região do visível, cujo espectro característico apresenta três picos máximos de absorção, respectivamente em: 421, 443 e 472 nm. Na 2ª fase etérea, o β-caroteno é identificado e quantificado por espectrofotometria na região do visível, cujo espectro característico apresenta três picos máximos de absorção em: 425, 448 e 475 nm.

Cálculo

$$\frac{A \times V \times 10^4}{E^{1\%}_{1cm} \times P} = \mu g \text{ de carotenóides por g}$$

A = absorbância máxima obtida no espectro de absorção
V = volume do solvente no qual se encontra dissolvido o carotenóide (mL)
$E^{1\%}_{1cm}$ = absortividade
P = massa da amostra integral (g)

Nota: a absortividade do α-caroteno em éter de petróleo no λ = 444 nm corresponde a 2800 e a do β-caroteno no λ = 453 nm corresponde a 2592.

Referências bibliográficas

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. **Chemistry and biochemistry of plants pigments**. 2. ed., v. 2, London: Academic Press, 1976. p. 38-165.

RODRIGUES, R.S.M. Carotenóides com atividade pró-vitamínica A de hortaliças

folhosas e suas alterações com o cozimento. 1988. 140 f. Tese (Mestre em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; RAYMUNDO, L.C.; LEE, T.C.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Ann. Bot.**, London, v. 40, p. 615-624. 1976.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A guide to caratenoid analysis in foods. Washington, D.C.: ILSI Press International Life Sciences Institute, 1999. 64 p.

356/IV Determinação de ß-caroteno em massas alimentícias

Os carotenóides são importantes do ponto de vista nutricional, porque alguns deles, além da função de corante, podem converter-se em vitamina A. O ß-caroteno e o ß-apo-8-carotenal são os que demonstram maior atividade provitamínica A. Nas massas alimentícias brasileiras, tais como, o macarrão, cujo conteúdo natural de carotenóides é insuficiente, tecnicamente é recomendável adicionar ß-caroteno. Há muitos anos, os fabricantes brasileiros de massas alimentícias vêm utilizando esta prática como alternativa para o enriquecimento com ovos. O método analítico apresentado consiste na extração do ß-caroteno com solvente orgânico, remoção dos ácidos graxos e outros interferentes por saponificação, identificação e quantificação por espectrofotometria de absorção na região UV/VIS.

Material

Liqüidificador, balança analítica, chapa elétrica com agitador, cilindro de nitrogênio, espectrofotômetro UV/VIS, papel de filtro, papel de alumínio, balão de fundo chato com junta esmerilhada 24/40 de 250 ou 300 mL, condensador de bola, funis de separação de cor âmbar com torneira de *teflon* de 250 e 500 mL, béqueres de 25, 250, 400 e 500 mL, balões volumétricos de 50 e 100 mL, funil de vidro e bastão de vidro.

Reagentes

Álcool isento de aldeídos e peróxidos
Glicerina
Éter de petróleo com faixa de destilação (30-60)°C
Sulfato de sódio anidro

Solução de hidróxido de potássio a 30% m/v – Pese 30 g de hidróxido de potássio, dissolva em água destilada e complete o volume a 100 mL.

Solução alcoólica de fenolftaleína a 1% m/v - Pese 1 g de fenolftaleína, dissolva em álcool e complete o volume a 100 mL.

Procedimento – Pese 5 g de amostra, previamente triturada e homogeneizada, em um balão de fundo chato com junta esmerilhada 24/40 de 250 mL ou de 300 mL. Coloque 10 mL de glicerina e agite. Adicione 50 mL de álcool isento de aldeídos e peróxidos, 10 mL de hidróxido de potássio a 30% e aqueça em refluxo, mais ou menos a 40°C, por 30 minutos. Esfrie e transfira a solução para um funil de separação de 250 mL e extraia o ß-caroteno com duas porções consecutivas de 25 mL de éter de petróleo. Reúna os extratos etéreos em um segundo funil de separação de 500 mL e lave com porções de 50 mL de água, agitando suavemente até que a fase aquosa não dê coloração rósea, pela adição de algumas gotas da solução indicadora de fenolftaleína. Filtre em funil de vidro contendo sulfato de sódio anidro para um balão volumétrico de 50 mL e complete o volume com éter de petróleo. Determine a absorbância em espectrofotômetro a 450 nm, usando éter de petróleo como branco.

Nota: se outras substâncias estiverem presentes na amostra, passíveis de extração com o ß-caroteno, há necessidade de separá-las por cromatografia em papel, utilizando uma alíquota do extrato etéreo e uma solução de acetona a 2% em éter de petróleo como fase móvel. O ß-caroteno migra com o solvente apresentando um R_f maior que as demais substâncias interferentes.

Cálculo

$$\frac{A}{24,4 \times C} = \beta \text{ caroteno por cento m/m}$$

A = absorbância a 450 nm obtida no espectro de absorção
C = quantidade da amostra em 100 mL de éter de petróleo.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz,** v.1, *Métodos químicos e físicos de alimentos*. 3. ed., São Paulo: IMESP, p. 382-383. 1985.

LA ASSOCIACIÓN DE QUÍMICOS DE VITAMINAS, INC. **Métodos de Análisis de Vitaminas**. Tradução de M.ª Soledad G. Chamarro y Cláudio Fernández Heredia. 3. ed. Leon, Esp.: Editorial Academia, 1969. p. 91-114. Titulo original: Methods of Vitamin Assay.

PEREIRA,M.R. Beta-caroteno em macarrão fortificado e avaliação da metodologia analítica. 1997. 95 f. Tese (Mestre em Ciência da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

357/IV Determinação de vitamina A em alimentos

A vitamina A, além de ser essencial na manutenção do crescimento normal das células e na diferenciação dos tecidos epitelial e ósseo, também está relacionada com a fisiologia da visão. Sua deficiência pode causar xeroftalmia (cegueira noturna). Há indicação de que esta vitamina influencie elementos específicos do sistema imune. Por outro lado, convém salientar que quantidades excessivas têm efeito tóxico no organismo. No estado natural, esta vitamina é encontrada somente nos animais, sendo isolada da fração insaponificável de lipídios. A fonte mais rica de vitamina A é o fígado de peixes, sendo que determinados tecidos podem conter quantidades significativas. Basicamente, a molécula de vitamina A é um álcool, o retinol, que está presente nos alimentos e tecidos como ésteres combinados com ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido palmítico.

Este método baseia-se na medida da coloração azul instável, resultante da reação da vitamina A com o tricloreto de antimônio (reagente Carr Price) e é válido para a determinação de vitamina A em alimentos, enriquecidos ou não, rações e misturas vitamínicas (*premix*). Não é aplicável para produtos contendo pró-vitamina A (carotenos). A análise compreende as seguintes etapas: conversão dos ésteres de vitamina A à forma alcoólica correspondente por saponificação, extração e determinação colorimétrica.

Material

Colorímetro com faixa de leitura de 500 a 700 nm, cilindro de nitrogênio, placa aquecedora com agitador, tubos de colorímetro, balança analítica, balão com boca esmerilhada de 250 mL, condensador de refluxo, balões volumétricos de cor âmbar de 50 e de 100 mL, funis de separação de cor âmbar de 250 e de 500 mL, pipetas graduadas de 5 e 10 mL, pipetas volumétricas de 5 e 10 mL, funis de vidro de 5 cm de diâmetro e bastão de vidro.

Reagentes

Álcool isento de aldeídos e peróxidos
Álcool
Glicerina
Éter de petróleo (30-60)°C
Anidrido acético
Sulfato de sódio anidro
Clorofórmio
Solução de hidróxido de potássio 30% m/v.
Solução de fenolftaleína

Ácido clorídrico, álcool comercial ou clorofórmio comercial – Para descontaminação da vidraria que entrou em contato com reagente Carr-Price.

Solução-padrão de vitamina A – Pese certa quantidade do padrão retinol necessária para preparar uma solução que contenha de 8 a 15 unidades internacionais (UI) de vitamina A, em álcool isopropílico. Na disponibilidade do padrão de acetato de vitamina A, pese com precisão 0,1 g e saponifique de acordo com o procedimento abaixo descrito. Extraia o saponificado com três alíquotas de éter de petróleo, respectivamente de 40, 30 e 30 mL e lave com água para eliminar o excesso de hidróxido de potássio, verificando pela reação negativa com fenolftaleína. Colete as fases em balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com éter de petróleo. Pipete uma alíquota de volume conhecido e evapore sob corrente de nitrogênio. Dissolva o resíduo em quantidade suficiente de álcool isopropílico para se obter concentração final entre 8 e 15 UI de vitamina A por mL.

Nota: prepare esta solução sempre no dia da análise.

Reagente de Carr-Price – Dissolva 25 g de tricloreto de antimônio com clorofórmio e transfira para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com o mesmo solvente. Deixe esta solução em repouso de um dia para outro, em frasco de cor âmbar, bem fechado e sob refrigeração. Este reagente é estável por dois meses.

Procedimento

Preparação da amostra – Para alimentos secos e misturas vitamínicas (*premix*), colete de 600 a 800 g do total da amostra. Armazene em frasco bem fechado, em local seco e escuro e no período máximo de uma semana. As amostras líquidas devem ser conservadas sob refrigeração à temperatura até 8°C. Antes de iniciar a análise, deixe a amostra à temperatura ambiente e homogeneíze bem. Margarina, manteiga e creme vegetal devem ser armazenadas em refrigerador. Não exponha a amostra à luz e ao calor. Antes de iniciar a análise amoleça a amostra, corte-a e tome pequenas partes ao acaso. Não misture e nem agite a amostra, pois isto causará a separação da água, que é um processo irreversível. Para guardá-la, embrulhe sem homogeneizar e refrigere.

Saponificação da amostra – Adicione, diretamente em um balão de boca esmerilhada de 250 mL, uma quantidade de amostra que contenha até 50 UI de vitamina A. Adicione 10 mL de glicerina e agite. Adicione 50 mL de álcool e 10 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio a 30%. Aqueça em placa aquecedora, sob refluxo e com agitação por 30 minutos. Esfrie e transfira a solução para o funil de separação âmbar de 250 mL. Extraia a vitamina A com duas porções de éter de petróleo, respectivamente, 30 e 20 mL ou, se necessário, com três porções, respectivamente, 40, 30 e 20 mL. Transfira os extratos

etéreos para um segundo funil de separação âmbar de 500 mL e lave com porções de 50 mL de água, agitando suavemente, até que a fase aquosa não apresente mais reação alcalina pela adição de 2-3 gotas de fenolftaleína. Filtre com sulfato de sódio anidro para um balão volumétrico de 50 ou 100 mL e complete o volume com éter de petróleo (solução A). Ajuste o colorímetro ou o espectrofotômetro para 100% de transmitância ou zero de absorbância a 620 nm, usando água na cubeta ou no tubo do colorímetro. Transfira uma alíquota da solução A correspondente a 10-50 UI de vitamina A para um tubo do colorímetro e evapore sob nitrogênio até secagem. Dissolva o resíduo da evaporação com 3 mL de clorofórmio, adicione 4 gotas de anidrido acético e 7 mL do reagente de Carr-Price. No período de até 15 segundos após a adição do reagente Carr-Price, meça a 620 nm a absorbância da coloração desenvolvida, usando a água como referência.

Curva-padrão – Transfira, individualmente, cinco alíquotas da solução-padrão, contendo concentrações de 10 a 50 UI de vitamina A com incrementos de 10 UI para um tubo do colorímetro e siga como em procedimento da amostra. Com os dados obtidos construa uma curva-padrão.

Cálculo

Determine a quantidade de vitamina A correspondente, utilizando a curva-padrão previamente estabelecida. Use a tabela abaixo para a conversão de UI em µg de vitamina A e derivados e de beta-caroteno.

1 UI de vitamina A	0,3 µg de acetato de vitamina A
1 UI de vitamina A	0,54 µg de palmitato de vitamina A
1 UI de vitamina A	1,8 µg de beta-caroteno
1 µg de palmitato de vitamina A	0,55 µg de acetato de vitamina A
1 UI de vitamina A	0,3 µg de equivalente em retinol (ER)*

*1 equivalente em retinol (ER) = 1 µg de retinol

358/IV Determinação de vitamina A em matéria-prima

Este método baseia-se na determinação da vitamina A por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, cubetas de quartzo, placa aquecedora com agitador magnético, cilindro de nitrogênio, balões volumétricos cor âmbar de 100 mL, balão redondo de 250 mL com fundo chato e boca esmerilhada adaptável a um refrigerante para refluxo, condensador de refluxo, pipetas graduadas e volumétricas de vários

volumes, funis de vidro de 5 cm de diâmetro e bastão de vidro.

Reagentes

Glicerina
Solução de hidróxido de potássio 30% m/v
Álcool isento de aldeídos e peróxidos
Éter de petróleo (30-60)°C
Solução de fenolftaleína
Sulfato de sódio anidro
Álcool isopropílico

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 0,1 g da amostra e saponifique como descrito no procedimento **357/IV**. Extraia com três porções, respectivamente, 40, 30 e 30 mL de éter de petróleo e lave os extratos etéreos com água até que a água da lavagem não apresente reação alcalina com 2-3 gotas de fenolftaleína. Filtre em filtro com sulfato de sódio anidro e transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com éter de petróleo. Retire uma alíquota de volume conhecido desta solução e evapore sob nitrogênio. Dissolva o resíduo em quantidade suficiente de álcool isopropílico para se obter uma solução com concentração de 8 a 15 UI de vitamina A por mL. Determine a absorbância a 325 nm, que é o comprimento de onda de máxima absorção da vitamina A e também a 310 e 334 nm, para efetuar a correção de outras substâncias que possam interferir na determinação. Utilize álcool isopropílico como branco.

Cálculos

$$7\,A_{325} - 2{,}625\,A_{310} - 4{,}375\,A_{334} = A_{corrigida}$$

$$\frac{A_{corrigida} \times 5700}{L \times C \times 0{,}3} = \text{vitamina A, em UI/g}$$

A = Absorbância
L = espessura da cubeta em cm
C = quantidade da amostra em gramas contida em 1000 mL da solução em isopropanol
5700 = fator de conversão de unidades espectrofotométricas em gravimétricas
0,3 = fator de conversão de g em UI

Referências bibliográficas

CARR, F.H.; PRICE, E.A. Colour reactions attributed to vitamin A. **Biochem. J.**, v. 20, p. 497-501. 1926.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 381-382, 1985.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990. p. 1045-1047 (method 924.29).

BALL, G.M.F. **Fat-soluble vitamin assays in food analysis A Comprehensive Review**. London: Elsevier Applied Science, 1988. 326 p.

359/IV Determinação de vitamina B_1 em alimentos

A vitamina B_1, também conhecida como tiamina, é encontrada em alimentos naturais e em outros materiais biológicos. As leveduras, os germes de cereais e as nozes são ricos em vitamina B_1. Este método fundamenta-se na quantificação da fluorescência produzida em condições padronizadas, do composto tiocromo que é originário da oxidação da tiamina com solução alcalina de ferricianeto de potássio. Nos produtos naturais, a extração da vitamina B_1 somente é possível após a hidrólise ácida e enzimática, que transforma a forma combinada da vitamina em tiamina livre.

Material

Espectrofotômetro de fluorescência, estufa, banho-maria, liqüidificador, papel de filtro qualitativo, papel indicador de pH, funil de separação tipo pêra de 125 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL, pipetas graduadas de 1, 2, 5 e 10 mL, frascos Erlenmeyer de 125 e 250 mL, tubos de ensaio de 20 cm, balões volumétricos de 25, 100, 200 e 1000 mL, provetas de 100 e 200 mL, béqueres de 25, 50, 100 e 200 mL, funil de vidro, pesa-filtro de 25 mL com tampa e dessecador com sílica gel.

Reagentes

Vitamina B_1 padrão
Álcool metílico
Álcool isobutílico
Sulfato de sódio anidro

Álcool (isento de aldeídos e peróxidos) – Trate o álcool com zinco e hidróxido de sódio e destile.

Solução de ferricianeto de potássio a 1% m/v
Solução de hidróxido de sódio a 30% m/v
Solução de ácido sulfúrico 0,05 M

Solução de acetato de sódio – Em um béquer de 100 mL, pese 34,5 g de acetato de sódio e dissolva em aproximadamente 50 mL de água. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução de diastase – Pese, com precisão, 0,3 g de diastase e complete o volume de 5 mL com solução de acetato de sódio.

Solução-padrão de vitamina B_1 (5 µg/mL) – Pese, com precisão, cerca de 50 mg de vitamina B_1, previamente seca em estufa a 110°C, durante 2 horas até peso constante. Faça diluições sucessivas de modo que a última solução contenha cerca de 5 µg de vitamina B_1 por mL. Conserve em geladeira.

Procedimentos

Produtos enriquecidos – Prepare as soluções dos produtos a analisar de modo que a solução final contenha (2,5-5) µg de vitamina B_1 por mL. Adicione 10 mL de solução de ácido sulfúrico 0,05 M para melhor dissolução. Complete o volume com água. Selecione dois funis de separação: A, para análise e P, para o padrão. Adicione, seqüencialmente: 10 mL de água aos funis A e P, 2 mL de álcool metílico aos funis A e P, 1 mL da solução da amostra ao funil A, 1 mL da solução-padrão ao funil P, 1 mL da solução de ferricianeto de potássio a 1% aos funis A e P e 1 ml da solução de hidróxido de sódio a 30% aos funis A e P. Agite levemente e espere dois minutos. Extraia o tiocromo formado, adicionando 10 mL de álcool isobutílico em cada funil. Agite fortemente cerca de um minuto e meio e deixe em repouso durante um a dois minutos. Elimine a camada aquosa. Passe a camada alcoólica para tubos de ensaio limpos, secos e marcados A e P. Coloque cerca de 200 mg de sulfato de sódio anidro em cada tubo de ensaio. Pipete 5 mL para balões volumétricos de 25 mL, limpos e secos (A e P). Pipete 5 mL de álcool isobutílico para balão volumétrico de 25 mL, limpo e seco e marcado B (branco). Complete o volume e homogeneíze com álcool destilado, livre de aldeídos e substâncias fluorescentes. Leia em espectrofotômetro de fluorescência, ajustando o 100% da escala com a solução-padrão de 5 µg/mL de vitamina B_1 ou conforme especificações do fabricante do aparelho e o zero com o branco. Use luz de excitação de 365 nm e de emissão de 435 nm.

Produtos naturais – Pese uma quantidade suficiente da amostra ou meça um volume, tal que a solução final contenha até 5 µg de vitamina B_1 por mL. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 150 mL de solução de ácido sulfúrico 0,05 M (para amostra de levedura, adicione água), misture, deixe em banho-maria em ebulição durante 30 minutos e agite de vez em quando. Retire do banho-maria e deixe esfriar à temperatura ambiente. Adicione 5 mL da suspensão de diastase preparada recentemente, ajuste o pH na faixa de 4,5 a 5,0, com a solução de acetato de sódio. Incube a amostra a (45-50)°C em banho-maria, durante duas horas. Esfrie à temperatura ambiente e transfira para um balão volumétrico de 100 ou 200 mL e complete o volume com ácido sulfúrico 0,05 M (para amostra de levedura, complete com água). Agite, filtre e recolha em um frasco Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, proceda com em produtos enriquecidos.

Nota: a vitamina B_1 é sensível à luz, portanto evite a claridade durante a análise. Determine, periodicamente, o teor da vitamina B_1 padrão.

Cálculo

$$\frac{L_a}{100} \times P \times A \times \frac{M}{1000} = \text{vitamina } B_1 \text{ em mg/M}$$

L_a = leitura da amostra
P = n°de µ/mL do padrão
A = n° de mL da solução de M g ou mL da amostra
M = massa ou volume da amostra

ou, simplificando:

$$\frac{L_a}{100} \times 5 = \mu g/mL \text{ da diluição}$$

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 383-385.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990. p. 1045-1047 (method 924.29).

STROHECKER, R.; HENNING, H. **Vitamin Assay. Tested Methods**. Tradução de D.D. Libman. 1 ed. Germany: Verlag Chemie GMBH, 1966. p. 65-90. Titulo Original: Vitamin-Bestimmungen, Er probte Methoden.

LA ASSOCIACIÓN DE QUÍMICOS DE VITAMINAS, INC. **Métodos de Análisis de Vitaminas**. Tradução de M.ª Soledad G. Chamarro y Cláudio Fernández Heredia. 3. ed. Leon, Esp.: Editorial Academia, 1969. p. 115-135. Titulo original: Methods of Vitamin Assay.

360/IV Determinação da vitamina B_{12} em matéria-prima

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS com registrador, termômetro, béqueres de 10, 25 e 50 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 mL, balões volumétricos de 25, 50, 100, 200 e 1000 mL, dessecador com sílica gel e pesa-filtro com tampa de 25 mL.

Reagentes

Vitamina B_{12} padrão
Sílica gel com indicador de umidade

Procedimento – Dilua, em água, uma quantidade da amostra de maneira que a concentração de vitamina B_{12} esteja na faixa de concentração de (20-40) µg/mL. Faça a leitura da absorbância no espectrofotômetro UV/VIS nos comprimentos de onda: 361 nm (se o princípio ativo for cianocobalamina), 351 nm (hidroxicobalamina) e 550 nm (mistura das vitaminas: B_1, B_6 e B_{12}).

Notas
A vitamina B_{12} (cianocobalamina) deverá conter, no mínimo, 96% de pureza e no máximo 100,5%, calculado em relação à matéria seca.
O método não é aplicável para mistura de vitamina B_{12} com vitamina B_2, pois há interferência da cor amarela da vitamina B_2.

Cálculos

Mistura de vitaminas (leitura em 550 nm):

$$\frac{A}{0,0063} = \text{vitamina } B_{12} \text{ (cianocobalamina) µg/mL da diluição}$$

$$\frac{A}{0,0066} = \text{vitamina } B_{12} \text{ (hidroxicobalamina) µg/mL da diluição}$$

Apenas cianocobalamina (leitura em 361 nm):

$$\frac{A}{0,0207} = \text{µg } B_{12}\text{/mL da diluição}$$

Apenas hidroxicobalamina (leitura em 351 nm):

$$\frac{A}{0,015} = \text{µg } B_{12}\text{/mL da diluição}$$

Referências bibliográficas

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei Editoria S.A., 1997. p. 198-200.

STROHECKER, R.; HENNING, H.M. **Vitamin Assay. Tested Methods**. Tradução de D.D.Libman. 1. ed. Germany: Verlag Chemie. GMBH, 1966. p.151-172. Título Original: Vitamin-Bestmmungen, Er probte Methoden.

THE MERCK INDEX. 8. ed. Rahway, U.S.A.: MERCK & CO., 1968. p. 97, 547, 1112-1113.

KUTSKY R.J. Handbook of Vitamins e Hormones. Paris: Van Nostrand Reinhold Company.1973. p. 62-70.

361/IV Doseamento microbiológico de vitamina B_{12}

Material

Balança analítica, espectrofotômetro UV/VIS, placas de Petri estéreis, pipetas de 1, 5, 10 e 25 mL, pipetas micrométricas, bastões de vidro, béqueres de 10, 20, 30, 50, 100, 200, 250 e 500 mL, termômetro, tubos de ensaio para meios de cultura, frascos Erlenmeyer de 30, 50, 100, 250 e 500 mL, pinça anatômica reta, discos de papel para dosagem de antibiótico, papel de pH, almofariz com pistilo e papel de filtro.

Reagentes

Solução salina – Pese 20 g de cloreto de amônio, 4 g de nitrato de amônio, 8 g de sulfato de sódio, 4 g de fosfato de potássio monobásico, 12 g de fosfato de potássio dibásico e 0,823 g de sulfato de magnésio. Adicione 1000 mL de água. Aqueça até a dissolução dos sais. Distribua em frasco Erlenmeyer de 500 mL e esterilize a 121°C, durante 20 minutos.

Solução-tampão de fosfato (pH=3) – Pese 9,7 g de fosfato de potássio monobásico e transfira para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicione 50 mL de solução de ácido fosfórico a 1% e complete o volume com água.

Solução-padrão estoque de vitamina B_{12} – Pese 100 mg de vitamina B_{12}, previamente dessecada. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL. Ajuste o volume com a solução-tampão de fosfato. Dilua esta solução adequadamente de tal modo que a concentração da vitamina seja aproximadamente 50 µg/mL. Determine a concentração de vitamina B_{12} por meio da leitura da absorbância a 361 nm, utilizando a relação: 1 µg/mL de vitamina B_{12} = Absorbância 0,0207

Microorganismos: *Escherichia coli* 313-3, *Mutantie* ou 113 ATCC

Meio para manutenção do germe – Pese 5 g de agar, 1,5 g de peptona, 0,375 g de extrato de carne, 0,75 g de extrato de levedura, 1 g de hidrolizado de caseína, 0,25 g de glicose e adicione 250 mL de água. Aqueça a mistura até a dissolução e filtre. Distribua em tubos de ensaio e autoclave a 121°C, por 15 minutos. Deixe solidificar com os tubos inclinados.

Meio para doseamento – Pese 6 g de glicose, 15 g de agar e adicione 1000 mL de água. Aqueça a mistura até dissolução. Distribua em frasco Erlenmeyer de 500 mL e esterilize a 121ºC, durante 15 minutos.

Procedimento – Prepare duas soluções da amostra de tal modo que a mais concentrada tenha no máximo 1 µg/mL e a menos concentrada, no mínimo, 0,5 µg/mL de vitamina B_{12}. Utilize a solução-tampão de fosfato como diluente. Repique o microrganismo assepticamente nos tubos contendo o meio de manutenção do germe. Incube por 24 horas a 37°C. Lave o tubo onde houve crescimento intenso de microrganismos com 5 mL de água estéril para obter uma suspensão do germe que apresente leitura espectrofotométrica de 10% de transmitância no comprimento de onda 650 nm. Auxilie a retirada do germe com alça de níquel-cromo até descolamento total das colônias. Funda o meio de doseamento e adicione a solução salina na proporção de 1:3 de meio. Esfrie este meio até a temperatura de (48-50)°C e inocule com a suspensão do germe. Para cada 100 mL de meio preparado, inocule 2 mL de suspensão. Homogeneíze bem e distribua em placas de Petri estéreis (10 a 15 mL por placa). Deixe solidificar. Prepare duas soluções-padrão de vitamina B_{12} a partir da solução-padrão estoque de vitamina B_{12} de concentrações rigorosamente determinadas, semelhantes às concentrações das amostras. Com o auxílio de uma pinça anatômica reta, coloque quatro discos de papel para dosagem de antibiótico na placa preparada e marcada, sendo o primeiro disco na posição do eixo inferior, outro no eixo superior, um à direita e outro à esquerda. Com uma pinça anatômica reta, molhe o disco de papel na solução-padrão de concentração baixa (aproximadamente, 0,5 µg/mL), eliminando o excesso de líquido com duas batidas rápidas sobre a borda do béquer com a solução. Coloque os discos em todas as placas, na posição inferior do eixo. Em seguida, faça o mesmo procedimento com a solução-padrão de concentração mais alta (aproximadamente 1 µg/mL) na posição superior do eixo. Em seguida, proceda de forma semelhante com a amostra de concentração mais baixa (aproximadamente 0,5 µg/mL). Repita o processo com as soluções das amostras nos discos à direita e à esquerda. Deixe em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente antes de incubar a 37°C, por 24 horas. Após o período de incubação, faça a leitura no aparelho medidor de halos.

Cálculo

Os cálculos devem ser efetuados, relacionando-se o tamanho dos halos formados nos discos para análise de antibióticos dos padrões com os halos dos discos das amostras e suas respectivas concentrações.

$$\frac{A_a \times 100}{P_a} = \%\ \text{de vitamina } B_{12} \text{ em relação ao padrão de maior concentração (A)}$$

$$\frac{A_b \times 100}{P_b} = \%\ \text{de vitamina } B_{12} \text{ em relação ao padrão de menor concentração (B)}$$

$$\frac{A+B}{2} = \%\ \text{de vitamina } B_{12}$$

A_a = média das leituras da amostra de maior concentração
P_a = média das leituras do padrão de maior concentração
A_b = média das leituras da amostra de menor concentração
P_b = média das leituras do padrão de menor concentração

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1:*Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed. 1985. p. 401-404.

362/IV Determinação de vitamina B_2 em alimentos

A Riboflavina ou vitamina B_2 é um pigmento amarelo-esverdeado amplamente distribuído nas células vegetais e animais. Este método é aplicado para cereais e alimentos enriquecidos. A riboflavina apresenta fluorescência amarelo-esverdeada sob luz ultravioleta. Num intervalo de pH 3-5, a fluorescência depende exclusivamente da concentração de riboflavina. Esta vitamina, por ser de decomposição muito fácil à luz, não é usada como padrão. Usa-se uma solução de fluoresceína que apresente maior estabilidade à luz e, dependendo da diluição, sua fluorescência é semelhante à da vitamina B_2, com um fator de correção.

Material

Espectrofotômetro de fluorescência, banho-maria, balança analítica, papel de filtro qualitativo, liqüidificador ou *blender*, papel indicador de pH, pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL, pipetas graduadas de 1, 2, 5 e 10 mL, balões volumétricos de 25, 50, 100, 200, 250, 500 e 1000 mL, frascos Erlenmeyer de 125 e 250 mL, béqueres de 25, 100, 200, 250 e 500 mL, provetas de 50, 100 e 200 mL, funil de vidro e pesa-filtro de 25 mL com tampa.

Reagentes

Riboflavina padrão
Fluoresceína
Ditionito de sódio
Sílica gel com indicador de umidade
Ácido acético glacial
Solução de hidróxido de sódio a 30% m/v
Solução de ácido sulfúrico 0,05 M
Solução de ácido acético a 5% v/v

Solução de acetato de sódio – Pese 34,5 g de acetato de sódio e dissolva em água. Transfira para balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução de diastase – Para a análise de cada amostra, pese 0,3 g de diastase e complete com 5 mL da solução aquosa de acetato de sódio.

Solução de Riboflavina (A) – Pese 25 mg de Vitamina $B_{2,}$ previamente seca em estufa 110°C durante 2 horas. Transfira para um balão volumétrico de 1000 mL com ajuda de 750 mL de água, adicione 1,4 mL de ácido acético glacial, agite e coloque em banho-maria a 50°C até dissolução completa. Complete o volume com água. Guarde em geladeira. (1 mL desta solução contém 25 µg de vitamina B_2).

Solução-estoque de fluoresceína (B) – Pese 50 mg de fluoresceína, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL com ajuda de 250 mL de água. Adicione 2 mL de solução de hidróxido de sódio a 30%, caso a fluoresceína não seja solúvel. Complete o volume com água. Guarde em geladeira. (1 mL dessa solução contém 50 µg de fluoresceína).

Solução de trabalho de fluoresceína (C) – Faça diluições da solução (B) em um balão volumétrico e complete o volume com água, de modo a obter uma solução aproximadamente 0,15 µg de fluoresceína por mL.

Fator de correção da solução de trabalho de fluoresceína – Determine o fator de correção da fluoresceína, fazendo algumas diluições de vitamina B_2 (solução A), da seguinte ma-

neira: pipete 4 mL da solução A e dilua até 100 mL com água. Pipete 10 mL desta nova solução para um balão volumétrico de 100 mL e complete com água (solução D). Um mL desta solução contém 0,1 µg de vitamina B_2. Ajuste o zero do espectrofotômetro de fluorescência usando água e o 100 do aparelho com solução de fluoresceína de trabalho (C). Faça a leitura da solução da vitamina B_2 (solução D), usando a luz de excitação de 440 nm e de emissão de 530 nm.

Calcule o fator de correção usando a fórmula:

$$\frac{100}{L} = \text{fator de correção}$$

L = leitura da riboflavina.

Procedimento

Produtos enriquecidos – Pese uma quantidade suficiente da amostra para obter, na solução final, no máximo 0,1 µg de vitamina B_2 por mL. Adicione 10 mL de solução de ácido acético a 5%, aqueça em banho-maria entre (40-50)°C durante 15 minutos. Esfrie e complete o volume com a solução de ácido acético a 5%. Determine a fluorescência desta solução em espectrofotômetro de fluorescência, usando luz de excitação de 430 nm e de emissão de 530 nm. Acerte o 100 da escala do aparelho com a solução de trabalho de fluoresceína e o zero com água. Após a leitura, adicione aproximadamente 20 mg de ditionito de sódio para a destruição da vitamina B_2. Leia novamente no espectrofotômetro de fluorescência. Considere como leitura da amostra (La), a diferença entre estas duas leituras.

Alimentos naturais – Pese uma quantidade suficiente da amostra, tal que a solução final tenha 0,1 µg de vitamina B_2 por mL. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, adicione 150 mL de ácido sulfúrico 0,05 M (para amostra de levedura, use água). Misture e deixe em banho-maria à temperatura de ebulição, durante 30 minutos, agitando de vez em quando. Deixe esfriar à temperatura ambiente e adicione 5 mL de suspensão de diastase preparada recentemente. Ajuste o pH na faixa de 4,5 a 5,0, com solução de acetato de sódio e incube a (40–50)°C em banho-maria, durante duas horas. Retire e esfrie à temperatura ambiente, transfira para balão de 100 ou 200 mL e complete o volume com ácido sulfúrico 0,05 M (para levedura, complete com água). Filtre em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Faça diluição com solução aquosa de ácido acético a 5% de tal modo que a solução final tenha no máximo 0,1 µg de vitamina B_2 por mL. Determine a fluorescência desta solução em espectrofotômetro usando a luz de excitação 440 nm e emissão de 530 nm. Acerte o 100 da escala do aparelho com a solução de trabalho de fluoresceína e o zero com água. Após a leitura, adicione aproximadamente 20 mg de ditionito de sódio,

para a destruição da vitamina B_2. Leia novamente no espectrofotômetro de fluorescência. Considere como leitura da amostra (La), a diferença entre estas duas leituras.

Nota: a vitamina B_2 é sensível à luz, evite claridade durante a análise.

Cálculo

$$\frac{L_a}{100} \times F \times 0{,}1 \times A \times \frac{M}{1000} = \text{vitamina } B_2 \text{, em mg/M}$$

L_a = leitura da amostra
F = fator da fluoresceína
A = diluição da amostra
M = massa ou volume da mostra

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** v1, *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo., 1985. p. 357-385.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990. p. 1053-1054 (method 924.29).

LA ASSOCIACIÓN DE QUÍMICOS DE VITAMINAS, INC. **Métodos de Análisis de Vitaminas**. Tradução de M.ª Soledad G. Chamarro y Cláudio Fernández Heredia. 3. ed. Leon, Esp.: Editorial Academia, 1969. p. 137-157. Titulo original: Methods of Vitamin Assay.

STROHECKER, R; HENNING, H.M. **Vitamin Assay. Tested Methods**. Tradução de D.D.Libman. 1. ed. Germany: Verlag Chemie. GMBH, 1966. p. 68-122. Título Original: Vitamin-Bestmmungen, Er probte Methoden.

363/IV Determinação de vitamina B_6 em matéria-prima

A Vitamina B_6 é encontrada em grande número de alimentos de origem animal e vegetal. Na maioria das vezes, está associada às proteínas e ao amido; raras vezes na forma livre. A vitamina B_6 pode ser encontrada em três formas: piridoxina, piridoxal e piridoxamina. Os métodos de análise não são específicos para nenhuma das formas e o resultado em conjunto é expresso como Vitamina B_6.

Material

Balança analítica, pesa-filtro, frasco Erlenmeyer de 250 mL, funil de vidro, proveta graduada de 50 mL, pipeta volumétrica de 5 mL, banho-maria, bureta de 25 mL, dessecador e bastão de vidro.

Reagentes

Ácido perclórico 0,1 M
Solução de acetato de mercúrio 6% m/v
Ácido acético glacial
Violeta cristal
Sílica gel com indicador de umidade

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 0,4 g da amostra da matéria prima e transfira quantitativamente para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Dissolva com 40 mL de ácido acético e 5 mL de acetato de mercúrio a 6% em ácido acético. Se necessário, aqueça em banho-maria até completar a dissolução. Resfrie e titule com ácido perclórico 0,1 M, usando como indicador violeta cristal. Faça um branco com procedimento idêntico ao exposto, mas sem a amostra.

Cálculo

Calcule o teor em porcentagem de vitamina B_6 na matéria prima analisada, considerando que cada mL de $HClO_4$ gasto na titulação equivale a 20,56 mg de vitamina B_6 ($C_8H_{11}NO_3$. HCl).

Nota: nas matérias primas, o teor de vitamina B_6 deverá ser no mínimo 98% e no máximo 100,5%, após dessecação em estufa a vácuo com sílica gel indicadora de umidade.

Referência bibliográfica

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei Editora S.A., 1977. p. 323.

364/IV Determinação de vitamina C com iodato de potássio

Este método é aplicado para a determinação de vitamina C ou ácido L-ascórbico, em alimentos *in natura* ou enriquecidos, quando a quantidade da referida vitamina for maior que 5 mg e baseia-se na oxidação do ácido ascórbico pelo iodato de potássio.

Tabela de Conversão

1,0 g de ácido ascórbico	1,214 g de ascorbato de sódio
1,0 g de ascorbato de sódio	0,889 g de ácido ascórbico
1,0 UI (Unidade Internacional)	0,05 mg de ácido ascórbico

Material

Papel de filtro qualitativo, dessecador, estufa, balança analítica, béqueres de 50 e 250 mL, frasco Erlenmeyer de 300 mL, pipetas graduadas de 1 e 10 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, buretas de 10 e 25 mL, balões volumétricos de 100 e 1000 mL, funil de vidro, bastão de vidro e proveta de 50 mL.

Reagentes

Solução de ácido sulfúrico a 20% v/v
Solução de iodeto de potássio a 10%, m/v
Solução de amido a 1%, m/v

Solução de iodato de potássio 0,02 M – Seque 5 g de iodato de potássio em estufa a 110°C e esfrie. Pese 3,5668 g, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete com água (1 mL iodato de potássio 0,02 M = 8,806 mg de ácido ascórbico).

Solução-padrão de iodato de potássio 0,002 M – Pipete 10 mL da solução de iodato de potássio 0,02 M e dilua até 100 mL com água em balão volumétrico (1 mL de iodato de potássio 0,002 M equivale a 0,8806 mg de ácido ascórbico).

Procedimento – Homogeneíze a amostra e pese uma quantidade que contenha ao redor de 5 mg de ácido ascórbico. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 300 mL com auxilio de aproximadamente 50 mL de água. Adicione 10 mL de solução de ácido sulfúrico a 20%. Homogeneíze e, se necessário, filtre para outro frasco Erlenmeyer, lavando o filtro com água e logo após com 10 mL da solução de ácido sulfúrico a 20%. Adicione 1 mL da solução de iodeto de potássio a 10% e 1 mL da solução de amido a 1%. Titule com solução de iodato de potássio até coloração azul. Dependendo da quantidade de vitamina C contida na amostra, utilize solução de iodato de potássio 0,02 M ou 0,002 M. Analise sempre a amostra em duplicata e faça uma prova em branco.

Cálculo

$$\frac{100 \times V \times F}{P} = \text{vitamina C mg por cento m/m}$$

V = volume de iodato gasto na titulação

F = 8,806 ou 0,8806, respectivamente para KIO_3 0,02 M ou 0,002 M
P = nº de g ou mL da amostra

Referências bibliográficas

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei Editora S.A., 1977. p. 82-83.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: v. 1 *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 393.

365/IV Determinação de vitamina C pelo método de Tillmans

Este método é usado para amostras com baixo teor de vitamina C, por exemplo, sucos de frutas. Baseia-se na redução do corante sal sódico de 2,6-diclorofenol indofenol por uma solução ácida de vitamina C.

Material

Microbureta, dessecador, balança analítica, papel de filtro, pipetas volumétricas de 1, 4 e 10 mL, pipetas graduadas de 5 e 10 mL, provetas de 50,100, 200 e 500 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL, balões volumétricos de 100 e 200 mL, funil de vidro e bastão de vidro.

Reagentes

Ácido ascórbico
Sal sódico do 2,6-diclorofenol indofenol
Solução índigo carmim a 0,5%

Solução ácida – Dissolva 15 g de ácido metafosfórico em 40 mL de ácido acético. Adicione 450 mL de água, agite e filtre.

Solução-padrão de vitamina C – Pese 100 mg de vitamina C, previamente dessecada, dissolva em 100 mL de solução ácida em balão volumétrico. Dilua 10 vezes com a mesma solução ácida.

Solução de Tillmans – Dissolva 42 mg de bicarbonato de sódio em 50 mL de água. Adicione 50 mg de 2,6-diclorofenol indofenol. Agite até a dissolução do corante. Dilua até 200 mL com água em balão volumétrico e filtre.

Padronização da solução de Tillmans – Em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, pipete 4 mL da solução diluída da vitamina C e 6 mL da solução ácida. Adicione 50 mL de água e

titule com solução de Tillmans até obter uma coloração ligeiramente rosada e estável por 15 segundos. Faça um branco, substituindo a solução de vitamina C por solução ácida e desconte no cálculo do fator. Calcule o fator (F) da solução de Tillmans conforme a relação:

$$\frac{\text{mg de vitamina C usados na titulação}}{\text{mL de solução de Tillmans gastos}} = F$$

Nota: armazene a solução de Tillmans em frasco escuro e na geladeira. Toda vez que usar, padronize com solução recém-preparada de vitamina C.

Procedimento

Polpas e Sucos de Frutas – Esprema a polpa da fruta e filtre através de tecido fino, limpo e seco ou em papel de filtro. Utilize, no mínimo, 10 mL do filtrado e adicione igual volume de solução ácida. Agite, filtre e titule uma alíquota de 10 mL do filtrado conforme descrito na padronização da solução de Tillmans. Faça um branco constituído de 10 mL da solução ácida e com volume de água igual ao da solução do corante gasto na titulação da amostra e titule.

Os íons Fe^{2+}, Sn^{2+} e Cu^{2+} presentes na amostra a ser analisada, interferem neste método. Nestes casos, previamente à determinação da vitamina C verifique a presença dos interferentes, procedendo como descrito: adicione duas gotas da solução de azul de metileno 0,05% a 10 mL da mistura 1:1 constituída da amostra de suco e do reagente ácido. O desaparecimento da cor do azul de metileno em 5 a 10 segundos indica a presença das substâncias interferentes. Pode-se também verificar a presença dos íons interferentes, adicionando-se a 10 mL da amostra o mesmo volume da solução de HCl (1+3) e cinco gotas de índigo carmim a 0,05%. O desaparecimento da cor em 5-10 segundos indica a presença de substâncias redutoras.

Cálculo

$$\frac{V \times F \times 100}{A} = \text{ácido ascórbico mg/100 mL}$$

V = volume da solução de Tillmans gasto na titulação
F = fator da solução de Tillmans
A = mL da amostra utilizada

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: v. 1, *Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos.* 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 394-395.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990. p. 1058-1059 (method 967.21).

366/IV Determinação espectrofotométrica de vitamina C por redução de íons cúpricos

Este método é aplicável para a quantificação de ácido ascórbico (vitamina C), em baixas concentrações em alimentos pigmentados, naturais e industrializados.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS com cubetas de 1 cm de espessura, liqüidificador, agitador mecânico, balança analítica, béqueres de 50 e 100 mL, pipetas graduadas de 1, 2, 5 e 10 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL, provetas de 50 e 100 mL, balões volumétricos de 50 e 100 mL, funil de vidro, provetas de 25 e 50 mL com tampa, frasco Erlenmeyer de 250 mL com tampa e frasco Erlenmeyer de 25 mL.

Reagentes

Acetato de sódio
2,2'-Biquinoleína (cuproína)
Tolueno
Álcool isoamílico
Ácido sulfúrico
Ácido ascórbico padrão
Uréia
Clorofórmio
Álcool
Acetato de cobre (II) mono-hidratado
Solução de ácido metafosfórico a 5% m/v

Solução A (Branco) – Pipete 2 mL da solução de ácido metafosfórico a 5%, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução-tampão de acetato de sódio e ácido acético 1 M, pH = 4,6 com 1,5% de uréia – Pese 13,6 g de acetato de sódio (no caso de se usar o acetato de sódio anidro, pese 8,2 g) e dissolva em 100 mL de água (solução I). Meça 6 mL de ácido acético, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água (solução II). Misture as soluções I e II, adicione 3 g de uréia e meça o pH.

Solução 2,2'-biquinoleína (cuproína) a 0,4% em tolueno m/v.

Solução de acetato de cobre (II) a 0,075% em álcool isoamílico m/v

Reagente de complexação (Solução C) – Transfira 95 mL da solução de acetato de cobre II 0,075% em álcool isoamílico para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com 5 mL de solução de cuproína 0,4% em tolueno. Esta solução deverá ser recém-preparada.

Solução de ácido sulfúrico 0,05 M.

Solução-padrão I de ácido ascórbico a 1 mg/mL – Pese 0,1 g de ácido ascórbico padrão e dissolva em um balão de 100 mL com água.

Solução-padrão II a 20 µg/mL – Transfira 2 mL da solução de ácido ascórbico de concentração de 1 mg/mL (Padrão I) para um balão volumétrico de 100 mL e adicione 2 mL da solução de ácido metafosfórico a 5% e complete o volume com água.

Nota: proteja as soluções de ácido ascórbico da luz.

Procedimentos

Amostras líquidas – Pese 50 g da amostra, transfira para um liqüidificador e adicione 100 mL da solução de ácido metafosfórico a 5%. Agite, na velocidade máxima durante 1 a 3 minutos. Dependendo da concentração de vitamina C na amostra, transfira 5 a 20 g do extrato para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Agite e retire uma alíquota de 30 mL da solução e descarte. Adicione ao balão 5 mL de clorofórmio e agite durante 1 minuto. Deixe em repouso para que as camadas se separem.

Amostras sólidas – Pese de uma a quatro gramas da amostra e transfira para um frasco Erlenmeyer juntamente com 10 mL da solução de ácido metafosfórico a 5% e 10 mL de ácido sulfúrico 0,05 M. Agite, em agitador mecânico, por 30 minutos. Transfira 10 g do homogeneizado para um balão volumétrico de 50 mL e complete o volume com água. Agite e retire 10 mL da solução e descarte. Adicione 5 mL de clorofórmio ao balão e agite durante 1 minuto. Deixe em repouso para que as camadas se separem. Pipete 5 mL da camada aquosa límpida para os tubos de reação (provetas de 25 mL com tampa). Adicione 1 mL da solução-tampão e 5 mL da solução complexante. Agite fortemente durante 90

segundos e deixe as camadas se separarem. Retire 3 mL da parte superior (álcool isoamílico) e transfira para um frasco Erlenmeyer de 25 mL. Adicione 0,5 mL de álcool e agite levemente. Prepare um branco, pipetando 5 mL da solução A diretamente no tubo de reação e prossiga como o tratamento da amostra. Leia as absorbâncias das amostras a 545 nm, usando o branco como referência.

Nota: todos os solventes utilizados na preparação das soluções devem ser de alto grau de pureza, pois os contaminantes de caráter redutor interferem na reação.

Curva-padrão – Pipete, diretamente, nos tubos de reação (ou provetas de 25 mL com tampa), alíquotas de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mL da solução-padrão II correspondente, respectivamente, a 10, 20, 30, 40 e 50 µg de ácido ascórbico e complete até 5 mL com a solução A. Adicione 1 mL da solução-tampão e 5 mL da solução complexante. Agite fortemente durante 90 segundos. Deixe as camadas se separarem. Retire 3 mL da parte superior (álcool isoamílico) e transfira para um frasco Erlenmeyer de 25 mL. Adicione 0,5 mL de álcool. Agite suavemente. Repita o mesmo procedimento com o branco constituído de 5 mL da solução A e sem a adição dos padrões. Faça a leitura das absorbâncias a 545 nm, usando o branco como referência. Construa a curva-padrão.

Cálculo

$$\frac{A \times 100}{B} = \text{ácido ascórbico, em } \mu g/100\ g$$

A = µg de vitamina C determinada na curva-padrão
B = gramas de amostra contida nos 5 mL do tubo de reação

Referências bibliográficas

BADOLATO, M.I.C.B.; SABINO, M; LAMARDO, L.C.A.; ANTUNES, J.L.F. Estudo comparativo de métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas naturais e industrializados.Ciênc.Tecnol. Aliment.,Campinas,
v. 16. n. 3, p. 206-210, 1996.

CONTRERAS-GUZMÁN, E.; STRONG III,F.C.; GUERNELLI, O. Determinação de ácido ascórbico (vitamina C), por redução de ions cúpricos. **Química Nova**, v. 7, n. 2, p. 60-64, 1984.

367/IV Determinação de vitamina E (tocoferóis totais)

A vitamina E é essencialmente uma vitamina lipossolúvel e age como antioxidante na estabilização de lipídios insaturados. Esta vitamina inclui oito compostos que ocorrem naturalmente e estão distribuídos em duas classes designadas como tocoferóis e tocotrienóis com diferentes atividades biológicas. O d-α-tocoferol (5,7,8-trimetiltocol) apresenta a maior atividade biológica e é a forma mais disponível de vitamina E em alimentos. As melhores fontes de vitamina E são os óleos de sementes vegetais, tais como: soja, milho, girassol, nozes, grãos integrais e o gérmen de trigo. Muitos alimentos são adicionados de vitamina E, por exemplo, margarinas, molhos para salada, entre outros.

Nos alimentos naturais, este método determina tocoferóis totais e nos enriquecidos, o α-tocoferol. Baseia-se na redução de íons ferro (III) e posterior quelação do ferro (II) com α-α′-dipiridila para determinação de tocoferóis e tocotrienóis. Alguns cuidados devem ser tomados nesta análise, tais como: usar solventes puros e sem contaminação com oxidantes e redutores, observar rigorosamente o tempo de reação e evitar a exposição à luz. Previamente à reação colorimétrica, a amostra deve ser saponificada para eliminar os lipídios presentes, liberar os tocoferóis e hidrolisar os ésteres de tocoferóis.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS ou colorímetro (400 a 600 nm) e respectivos tubos, cubetas de vidro (se usar espectrofotômetro), placa aquecedora com agitadores magnéticos, balança analítica, cronômetro, cilindro de nitrogênio, balão de 250 mL com boca esmerilhada adaptável a um refrigerante de refluxo, condensador de refluxo, funis de separação âmbar de 250 e 500 mL, funis de vidro com 5 cm de diâmetro, balões volumétricos âmbar de 25, 50 ou 100 mL, provetas de 50 mL, pipetas graduadas de 5 e 10 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL, bastões de vidro e papel de filtro Whatman nº 4.

Reagentes

Álcool, isento de substâncias oxidantes
Éter de petróleo (30-60)°C
Solução alcoólica de cloreto de ferro III a 0,25% m/v (recém-preparada)
Solução alcoólica de α-α‘-dipiridila a 0,6% m/v
Solução de EDTA a 0,35% m/v
Solução de fenolftaleína
Ácido pirogálico
Hidróxido de potássio em lentilhas
Sulfato de sódio anidro
dl-α-Tocoferol
Álcool absoluto

Solução-padrão de dl-α-tocoferol – Pese 100 mg de dl-α-tocoferol, transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com álcool absoluto. Retire uma alíquota e dilua em álcool absoluto para se obter uma concentração de 80 µg/mL. Conserve esta solução sob refrigeração a 5°C. Determine a absorbância a 292 nm (máxima absorção) e calcule a concentração de vitamina E com a fórmula:

$$\frac{0,01 \times A}{0,76 \times P} = \text{vitamina E, em m/m}$$

A = Absorbância
P = massa em gramas da amostra em 100 mL de etanol

Solução alcoólica de cloreto de ferro III 0,25% m/v

Solução alcoólica de α-α′dipiridila 0,6% m/v. Armazene esta solução em frasco âmbar ou opaco, a 5°C.

Procedimentos

Alimentos sólidos, rações e *premix* devem ser homogeneizados e armazenados em local com baixa umidade e sob a proteção da luz. A amostras líquidas devem ser conservadas sob refrigeração à temperatura menor que 8°C, em frasco hermético. Antes de iniciar a análise, deixe estabilizar à temperatura ambiente. As gorduras necessitam de aquecimento prévio e homogeneização, antes da retirada da amostra para análise.

Saponificação da amostra – Pese diretamente em um balão de 250 mL com boca esmerilhada, uma quantidade de amostra que contenha de 1 a 10 mg de vitamina E. Adicione 50 mL de álcool e 100 mg de ácido pirogálico. Aqueça com refluxo em placa aquecedora, sob agitação, por 20 minutos. Após 1 minuto de aquecimento, adicione, pelo condensador, 1 g de pastilhas de hidróxido de potássio (uma pastilha por vez). Depois de 20 minutos de refluxo, esfrie em banho de gelo e lave o aparelho de refluxo com pequenas quantidades de água. Transfira a amostra saponificada quantitativamente para um funil de separação âmbar de 250 mL e extraia a vitamina E com duas porções consecutivas de 30 e 20 mL ou três de 40, 30 e 20 mL. Transfira quantitativamente com água, os extratos etéreos para um funil de separação de cor âmbar de 500 mL. Lave os extratos etéreos com alíquotas de 50 mL de água, agitando suavemente, até que a fase aquosa não apresente mais coloração rósea pela adição de algumas gotas de solução alcoólica de fenolftaleína. Filtre, em funil contendo sulfato de sódio anidro, para balão volumétrico de 50 ou 100 mL e complete o volume com éter de petróleo. Evapore até a secura, sob nitrogênio, o solvente

de um volume do extrato etéreo que contenha entre 10 e 100 µg de vitamina E. Dissolva o resíduo em 7 mL de álcool, ao abrigo da luz. Adicione 1 mL de α-α′-dipiridila e 1 mL de solução de cloreto de ferro III. Cronometre 2 minutos e 30 segundos e adicione 1 mL da solução de EDTA. Espere mais 2 minutos e 30 segundos e determine a absorbância a 520 nm. Acerte previamente o 100% de transmitância do aparelho com um branco preparado com os referidos reagentes e nas mesmas proporções. Determine a quantidade de vitamina E correspondente, usando a curva-padrão.

Curva-padrão – Pipete, em tubos do colorímetro, volumes da solução-padrão de α-tocoferol que contenham em cada tubo, aproximadamente de 20-100 µg de α-tocoferol, em incrementos crescentes de 20 µg. Adicione a cada tubo 1 mL da solução alcoólica de α-α′dipiridila e uma quantidade de álcool tal que atinja o volume total da mistura de 7 mL. Proteja os tubos da luz e adicione em cada um deles 1 mL da solução de cloreto de ferro III. Espere 2 minutos e 30 segundos e leia a absorbância no colorímetro ou no espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda 520 nm. Acerte o 100% da transmitância do aparelho com o branco.

Cálculo

Determine a quantidade de vitamina E correspondente usando a curva-padrão estabelecida.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: v. 1, *Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 395-396.

368/IV Determinação de vitamina E em matéria-prima

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, placa aquecedora com agitação, balança analítica, cilindro de nitrogênio, balão de 250 mL com boca esmerilhada adaptável a um refrigerante de refluxo, condensador de refluxo, funis de separação âmbar de 250 e 500 mL, funis de vidro com 5 cm de diâmetro, balões volumétricos âmbar de 25, 50 ou 100 mL, provetas de 50 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL e papel de filtro Whatman n° 1.

Reagentes

Álcool isento de substâncias oxidantes
Éter de petróleo (30-60)°C

Hidróxido de potássio em lentilhas
Sulfato de sódio anidro

Procedimento – Pese 0,1 g da amostra e saponifique conforme descrito no método **367/IV.** Extraia a vitamina com três porções consecutivas de 40, 30 e 30 mL de éter de petróleo. Lave os extratos com água até reação incolor pela adição de algumas gotas do indicador fenolftaleína. Filtre, em funil com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com éter de petróleo. Tome uma alíquota e evapore o éter de petróleo sob nitrogênio. Dissolva o resíduo em álcool e transfira quantitativamente para um balão volumétrico e complete o volume com o mesmo solvente. Determine a absorbância da amostra no comprimento de onda 292 ou 289 nm, conforme o máximo de absorção no espectro obtido.

Cálculos

Para absorbância máxima a 292 nm:

$$\frac{0,01 \times L}{0,76 \times P} = \text{vitamina E m/m}$$

Para absorbância máxima a 289 nm:

$$\frac{0,01 \times L}{0,71 \times P} = \text{vitamina E m/m}$$

L = leitura da absorbância
P = massa em gramas da amostra

Referências bibliográficas

BALL, G.M.F. **Fat-soluble assays in food analysis. A Comprehensive Review**. London: Elsevier Applied Science. 1988. 326 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990. p. 1071-1074 (method 971.30).

369/IV Determinação de niacina e nicotinamida

A niacina, também denominada de ácido nicotínico, vitamina PP ou vitamina B_3, é uma das vitaminas importantes do complexo B para a nutrição humana e animal. A

niacina faz parte de duas coenzimas conhecidas, a coenzima I e a coenzima II, que são essenciais para um grande número de sistemas enzimáticos. A nicotinamida, amida do ácido nicotínico, também é biologicamente ativa. Essas vitaminas são encontradas em carnes, pescados, leveduras e cereais. Nos produtos naturais, a niacina está ligada a outros compostos químicos, havendo a necessidade de ser liberada por hidrólise química ou enzimática, antes da determinação analítica. Este método baseia-se na reação entre a niacina e o bromocianogênio (CNBr) , resultando um composto pirinídio que em contato com o ácido sulfanílico, forma um complexo amarelo com máximo de absorção em 450 ou 470 nm.

Material

Autoclave, chapa elétrica, espectrofotômetro ou colorímetro, balança analítica, frascos Erlenmeyer de 50 e 250 mL com tampa, pipetas de 1, 2, 5, 10 e 20 mL, balões volumétricos de 50, 100 e 200 mL, béqueres de 250 e 400 mL, bastão de vidro e almofariz com pistilo.

Reagentes

Ácido nicotínico padrão
Hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4. 7 H_2O)
Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
Cianeto de potássio
Solução saturada de bromo
Ácido sulfanílico
Hidróxido de amônio
Ácido clorídrico
Ácido sulfúrico
Álcool
Hidróxido de sódio
Hidróxido de cálcio
Sulfato de amônio
Solução de ácido sulfúrico 0,05 M
Solução de cianeto de potássio a 5% m/v

Solução-estoque de ácido nicotínico – Dissolva 50 mg de ácido nicotínico, padrão de referência, previamente seco e guardado no escuro em dessecador sobre pentóxido de fósforo, em álcool a 25% e dilua até 500 mL. Guarde em geladeira. 1 mL desta solução contém 100 µg de ácido nicotínico.

Solução-padrão I de ácido nicotínico a 10 µg /mL – Separe uma pequena porção da solução-estoque e deixe atingir a temperatura ambiente. Dilua 10 mL desta solução até 100 mL com água.

Solução-padrão II de ácido nicotínico a 4 µg /mL – Transfira uma pequena porção da solução-estoque e deixe atingir a temperatura ambiente. Dilua 2 mL desta solução até 50 mL com água.

Solução de hidróxido de amônio diluída – Dilua 5 mL de NH_4OH a 250 mL com água.

Solução de ácido clorídrico diluído – Dilua 1 mL de ácido clorídrico em 5 mL de água.

Solução-tampão de fosfato (pH = 8) – Dissolva 60 g de hidrogenofosfato de sódio e 10 g de diidrogenofosfato de potássio em água morna e dilua até 200 mL.

Solução saturada de bromo – Misture, em capela química, 25 g de bromo com 284 mL de água fria. Agite e use no dia seguinte. Guarde a solução na geladeira.

Solução de bromocianogênio a 10% – Coloque aproximadamente 30 mL da solução saturada de bromo em um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Junte, gota a gota, com uma bureta, solução de cianeto de potássio a 5% até desaparecimento da cor amarela. Prepare esta solução em capela química.

Notas
Alternativamente, aqueça 370 mL de água a 40°C e adicione 40 g de bromocianogênio (disponível comercialmente). Agite até dissolver, esfrie e dilua a 400 mL. Guarde em refrigerador com a informação sobre a toxicidade deste reagente.
O cianeto de potássio e o bromocianogênio são reagentes extremamente tóxicos; trabalhe na capela, com luvas e máscara.

Solução de ácido sulfanílico a 10% – Adicione hidróxido de amônio em porções de 1 mL a uma mistura de 20 g de ácido sulfanílico e 170 mL de água, até que o ácido sulfanílico se dissolva. Ajuste o pH a 4,5 com ácido clorídrico 1+5, usando papel indicador universal de pH. Dilua a 200 mL com água. A solução deverá ficar quase incolor. Use esta solução em preparações farmacêuticas, rações e alimentos não cereais.

Solução de ácido sulfanílico a 55% – Adicione 27 mL de água e 27 mL de amônia a 55 g de ácido sulfanílico. Agite até dissolução, amornando se necessário. Ajuste o pH a 7 com

algumas gotas de amônia ou de ácido clorídrico 5 M, usando papel indicador universal e dilua até 100 mL. Guarde no escuro. Use esta solução em produtos cereais (trigo, milho, arroz, aveia).

Procedimento – Ajuste o colorímetro/espectrofotômetro para 100% de transmitância e/ou zero de absorbância a 450 nm para preparados farmacêuticos, rações e alimentos não cereais ou 470 nm para produtos cereais, usando um branco preparado simultaneamente com os reagentes nas mesmas proporções das amostras.

Rações e alimentos não cereais – Pese ao redor de 28,35 g da amostra em frasco Erlenmeyer, adicione 200 mL de ácido sulfúrico 0,05 M. Misture e aqueça durante 30 minutos, em autoclave a 15 libras de pressão. Esfrie, ajuste o pH a 4,5 com hidróxido de sódio 10 M, usando como indicador verde de bromocresol, dilua até 250 mL com água e filtre. Pese 17 g de sulfato de amônio e transfira para um balão volumétrico de 50 mL, pipete uma alíquota de 40 mL da solução da amostra, dilua até a marca com água e agite vigorosamente. Filtre, misture bem e use uma alíquota de 1 mL para desenvolvimento da cor. Em caso de amostras contendo 16 mg de ácido nicotínico por 454 g, a solução final contém 3,2 µg de ácido nicotínico por mL. Pipete uma alíquota de 40 mL da solução-padrão II de ácido nicotínico (4 µg/mL) sobre 17 g de sulfato de amônio em um balão volumétrico de 50 mL e dilua com água. Este padrão contém 3,2 µg/mL. Proceda a reação como para alimentos não cereais e rações.

Produtos cereais (aveia, milho, trigo, arroz) – Faça um branco dos reagentes e cinco diluições da solução-padrão I como descrito a seguir: coloque 1,5 g de hidróxido de cálcio em seis frascos Erlenmeyer de 250 mL, pipete respectivamente, 0, 5, 10, 15, 20 e 25 mL da solução padrão I (10 µg/mL). Pese, cuidadosamente cerca de 2,5 g da amostra contendo aproximadamente 100 µg de ácido nicotínico e transfira para outro frasco contendo 1,5 g de hidróxido de cálcio. Adicione água em todos os frascos em torno de 90 mL, autoclave durante 2 horas sob pressão de 15 libras. Misture bem enquanto ainda quente. Esfrie, transfira para balões volumétricos de 100 mL e dilua. Se necessário, guarde em geladeira por alguns dias. Transfira aproximadamente 50 mL do sobrenadante de cada balão para tubos de centrífuga, coloque em banho de gelo por 15 minutos ou em geladeira por 2 horas. Centrifugue durante 15 minutos e pipete 20 mL do sobrenadante de cada tubo para tubos de centrífuga contendo 8 g de sulfato de amônio e 2 mL de solução-tampão de fosfato. Agite para dissolver e aqueça a (55-60)°C. Centrifugue por mais cinco minutos. Filtre em papel de filtro qualitativo, refiltrando, se necessário, até obter solução incolor. Proceda a reação como o descrito para produtos cereais.

Procedimento analítico para alimentos não cereais e rações – Adicione à solução de ácido sulfanílico, solução de bromocianogênio, em capela, com buretas ou pipetas automáticas. O cianeto de potássio e o bromocianogênio são reagentes extremamente tóxicos. Trabalhe na capela, com luvas e máscara. Use a solução-padrão II de ácido nicotínico (4 µg/mL) e prepare os tubos como segue:

Branco do padrão	Solução-padrão
1,0 mL da solução-padrão	1,0 mL da solução-padrão
5,0 mL de água	5,0 mL de bromocianogênio
0,5 mL de hidr. de amônio diluído	0,5 mL de hidr. de amônio diluído
2,0 mL de ácido sulfanílico a 10%	2,0 mL de ácido sulfanílico a 10%
0,5 mL de ac. clorídrico diluído	0,5 mL de água
Branco da amostra	**Solução da amostra**
1,0 mL da solução da amostra	1,0 mL da solução da amostra
5,0 mL de água	5,0 mL de bromocianogênio
0,5 mL de hidr. de amônio diluído	0,5 mL de hidr. de amônio diluído
2,0 mL de ácido sulfanílico a 10%	2,0 mL de ácido sulfanílico a 10%
0,5 mL de ac. clorídrico diluído	0,5 mL água

Prepare, separadamente, um branco para cada amostra. Pipete a solução-padrão e a solução da amostra para os respectivos tubos (no caso do branco do padrão ou do branco da amostra, adicione água). Adicione todas as soluções subseqüentes num só tubo e faça a leitura da cor antes de passar para o outro tubo, começando com o branco padrão e a solução-padrão; agite o tubo no vortex para homogeneizar o líquido, adicione ácido sulfanílico e agite novamente. Imediatamente adicione 0,5 mL de ácido clorídrico diluído e misture. Coloque no colorímetro e, com o branco, ajuste o zero de absorção do aparelho, usando o comprimento de onda 450 nm, dentro de aproximadamente 30 segundos após a adição da solução de ácido sulfanílico. Leia imediatamente a absorbância da solução-padrão no comprimento de onda de 450 nm (a cor alcança o máximo de intensidade em 1 minuto e, após a adição do ácido sulfanílico, permanece no máximo por 2 minutos). A seguir, leia a absorbância de cada amostra com o respectivo branco, usando este para fixar o zero de absorção do aparelho. A concentração de ácido nicotínico é proporcional à absorção, se o padrão e a solução da amostra tiverem aproximadamente a mesma concentração.

Procedimento analítico para cereais – Selecione um tubo adicional para o branco do padrão, para cada série de determinações, mas não adicione bromocianogênio. Prepare os tubos da seguinte maneira:

Branco dos reagentes
5 mL de água (em tubos em pé no banho de gelo) 10 mL de bromocianogênio e vedando o tubo Aguarde 30 min. em banho de gelo 1 mL de ácido sulfanílico a 55%

Branco do padrão
5 mL de solução-padrão 10 mL de água Aguarde 30 min. em banho de gelo 1 mL de ácido sulfanílico a 55%

Branco da amostra
5 mL de solução da amostra 10 mL de água Aguarde 30 min. em banho de gelo 1 mL de ácido sulfanílico a 55%

Solução-padrão
5 mL de padrão 10 mL de bromocianogênio e vedando tubo Aguarde 30 min. em banho de gelo 1 mL de ácido sulfanílico a 55%

Solução da amostra
5 mL de solução da amostra 10 mL de bromocianogênio e vedando tubo Aguarde 30 min. em banho de gelo 1 mL de ácido sulfanílico a 55%

Com o comprimento de onda a 470 nm, fixe a 100% de transmitância, com o branco dos padrões e leia a transmitância dos outros tubos, de 12 a 15 minutos após a adição do ácido sulfanílico. Lance em gráfico a absorção dos padrões, menos a do branco dos reagentes, contra a concentração do ácido nicotínico, em µg/mL. Neste gráfico, determine a concentração correspondente à absorbância da amostra, tendo esta leitura sido feita após a fixação dos 100% de transmitância do aparelho com o branco da amostra.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** v. 1, *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 397-401.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990. p. 1054-1057 (method 961.14).

STROHECKER, R.; HENNING, H.M. **Vitamin Assay. Tested Methods**. Tradução de D.D.Libman. 1. ed. Germany: Verlag Chemie. GMBH, 1966.
p. 189-201. Título Original: Vitamin-Bestmmungen, Er probte Methoden.

Colaboradores

Myrna Sabino, Leda C. A. Lamardo, Everaldo de Cerqueira, Sandra A. Navas e Emiko I. Inomata

CAPÍTULO **XX**

RESÍDUOS DE PESTICIDAS

RESÍDUOS DE PESTICIDAS

Pesticidas ou agrotóxicos e afins são definidos no Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, do Ministério da Agricultura como: produtos e agentes de processos físicos, químicos e biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. Podem ser classificados quanto à sua ação como inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, acaricidas e outros e quanto ao grupo químico a que pertencem como organoclorados, organofosforados, carbamatos, ditiocarbamatos, piretróides e outros.

Cronologicamente, segundo seu aparecimento e desenvolvimento, os pesticidas podem ser classificados de acordo com uma sucessão de gerações, sendo que na primeira geração temos os inorgânicos, orgânicos vegetais, minerais e na segunda geração, os orgânicos sintéticos: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Na terceira geração, temos os microbianos e os feromônios sexuais, na quarta, temos os hormônios juvenis e na quinta, os anti-hormônios vegetais e microrganismos.

Do ponto de vista toxicológico, os pesticidas podem ser classificados em extremamente, altamente, moderadamente ou pouco tóxicos, de acordo com a dose letal (DL_{50}) oral e dérmica para ratos e outros indicadores relacionados a danos na córnea, lesões na pele e concentração letal inalatória (CL_{50}) para ratos, segundo a Portaria nº 3 do Ministério da Saúde, de 16 de janeiro de 1992.

Durante o registro de pesticidas, são estabelecidos os limites máximos de resíduos, conhecidos como LMR. A resolução nº 165, de 29 de agosto de 2003, do Ministério da Saúde, contém os índices das monografias dos ingredientes ativos dos agrotóxicos com emprego autorizado, com os respectivos LMR para cada binômio pesticida/cultura. As atualizações são publicadas pela ANVISA/MS.

O uso de pesticidas em lavouras cujos produtos são destinados ao consumo humano ou animal pode conduzir a resíduos após a colheita. Os alimentos ainda podem conter resíduos remanescentes de utilização durante o armazenamento e transporte. Por outro lado, os pesticidas podem se mover do local de aplicação e se transportar para outro lugar no meio ambiente e podem ser transferidos para a cadeia alimentar.

A capacidade de um pesticida persistir por um certo período de tempo pode ser desejável e tem sido reconhecido como importante em algumas situações para o controle bem sucedido de pestes e doenças. Todavia, a presença de resíduos de pesticidas nos alimentos e no meio ambiente preocupa o consumidor e as autoridades competentes, já que pode oferecer riscos para a saúde humana e ambiental. A população rural corre risco de exposição aguda, se não forem tomados os devidos cuidados na aplicação dos produtos e o consumidor pode estar sob risco de exposição crônica a pesticidas se estiver ingerindo alimentos contendo resíduos de pesticidas acima dos LMR. Devido à possibilidade da presença de vários pesticidas ou seus metabólitos, ou outros componentes contaminantes sejam de origem sintética ou natural, torna-se impossível especificar um único procedimento analítico que determine satisfatoriamente o resíduo de um pesticida particular em qualquer substrato. É necessário usar um procedimento validado para a situação ou adaptar e validar um procedimento aceitável para circunstâncias particulares envolvidas, tais como a natureza da amostra e do resíduo e as interferências a serem encontradas. Além disso, algum método de confirmação da identificação do resíduo do pesticida é necessário como, a utilização de fase estacionária de diferente polaridade ou detector seletivo de massa.

Os sistemas de análise de multi-detecção, baseados no uso da cromatografia a gás, cromatografia a líquido de alta eficiência com detectores específicos, têm a grande vantagem de proporcionarem evidências de identidade e meios de medir um ou mais pesticidas de uma ampla gama de resíduos.

O controle de resíduos de pesticidas em alimentos é necessário, tanto para a proteção direta do consumidor como em relação à aceitabilidade da mercadoria no comércio. Seus resultados podem ser usados para introduzir medidas corretivas de prevenção de risco à saúde.

Devido ao grande número de métodos, apresentamos nesse capítulo os principais, incluindo os multi-resíduos.

370/IV Método multi-resíduo para determinação de pesticidas em frutas e vegetais

As amostras são trituradas em *blender* e homogeneizadas e os pesticidas são extraídos com acetona e uma mistura de diclorometano e n-hexano. A determinação é feita por cromatografia a gás com detectores de captura de elétrons, fotométrico de chama ou de nitrogênio e fósforo e cromatografia a líquido de alta eficiência com detector ultravioleta ou fluorescência ou CG/MS.

A determinação de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais está distribuída conforme a **Tabela 1.**

Tabela 1 -- Distribuição de pesticidas para finalidade analítica

(a)	(b)	(c)
Aldrin	Acefato	Aldicarbe
Aletrina	Azinfós-etílico	Carbaril
Azoxistrobina	Azinfós-metílico	Carbendazim
Bifentrina	Carbofenotiona	Carbofurano
Bioaletrina	Clorfenvinfós	Tiabendazol
Captana	Clorpirifós	
Clorotalonil	Clorpirifós-metilico	
Ciflutrina	Diazinona	
Lambda-cialotrina	Diclorvos	
Cipermetrina	Dimetoato	
DDT total (op'DDT, pp'DDT, op' DDE pp'DDE, op'DDD, pp'DDD)	Disulfotona	
Deltametrina	Etiona	
Dicofol	Etoprofós	
Dieldrin	Etrinfós	
Dodecacloro	Fenamifós	
Endosulfam (alfa, beta e sulfato)	Fenitrotiona	
Endrin	Fentiona	
Esfenvalerato	Fentoato	
Fenpropatrina	Folpete	
Fenvalerato	Forato	
HCH total (alfa, beta, gama)	Fosfamidona	

(a)	(b)	(c)
Heptacloro	Malationa	
Heptacloro epóxido	Metamidofós	
Hexaclorobenzeno	Metidationa	
Imazalil	Mevinfós	
Iprodiona	Ometoato	
Permetrina	Paration-etílica	
Procimidona	Paration-metílica	
Procloraz	Pirimifós-etílico	
Propargito	Pirimifós-metílico	
Tetradifona	Profenofós	
Trifluralina	Pirazofós	
Vinclozolina	Terbufós	
	Triazofós	
	Triclorfom	

a) Cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (ECD).
b) Cromatografia a gás com detector fotométrico de chama (FPD) ou de nitrogênio e fósforo (NPD).
c) Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector UV ou fluorescência.

Material

Cromatógrafo a gás com detectores: ECD, FPD ou NPD, cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detector UV ou fluorescência, capela de exaustão para solventes, centrífuga, rotavapor, *blender,* balança analítica, balança semi-analítica, estufa, refrigerador, *freezer,* bomba de vácuo, ultra-turrax, sistema de purificação de água para CLAE, balões volumétricos de diferentes capacidades, balões de fundo chato de 125 e 300 mL com boca esmerilhada 24/40, frascos de nalgene, pipetas volumétricas de diferentes capacidades, pipetas graduadas de diferentes capacidades, pipetas Pasteur, funis de Büchner, kitassatos, funis analíticos, béqueres, provetas, tubos graduados com tampa de 10 mL, seringas hipodérmicas de vidro de 5 mL, frascos de vidro com tampa de 100 mL com tampa e batoque de *teflon,* tubos graduados com tampa e septo de *teflon* para injetor automático, coluna de extração em fase sólida (SPE-diol de 500 mg, 3 mL) e coluna de extração em fase sólida (SPE-silica amino propil de 500 mg, 3 mL).

Reagentes

Acetona grau resíduo
Acetonitrila para CLAE

Água purificada para CLAE
Diclorometano grau resíduo
Dihidrogenofosfato de Potássio
Ácido fosfórico
Algodão tratado
n-Hexano grau resíduo
Álcool metílico para CLAE
Hidróxido de sódio
Isooctano
Padrões analíticos de pesticidas de alta pureza com certificado
Tolueno grau resíduo

Nota: faça, previamente, brancos de cada reagente para certificar-se de que não possuem interferentes para a análise.

Soluções-padrão estoque – Pese, com precisão, 0,01 g (ou conforme requerido pelo método), do padrão de pesticida em pesa-filtro ou béquer de 10 mL. Dissolva com uma pequena quantidade de isooctano (padrões de pesticidas item a e b da **Tabela 1**), acetonitrila (aldicarbe, carbofurano e carbaril) ou álcool metílico (carbendazim e tiabendazol). Transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com isooctano, acetonitrila ou álcool metílico, conforme a classe do princípio ativo preparado. Transfira para frasco de vidro com tampa e batoque de teflon. Todo frasco deve conter uma etiqueta com dados de procedência, identidade, concentração, estabilidade, data de preparação, prazo de validade, temperatura de armazenamento. Armazene em *freezer*. Esta é a solução a partir da qual serão preparadas as soluções-padrão intermediárias.

Soluções-padrão intermediárias – A partir da solução-padrão estoque, prepare misturas de padrões de pesticidas e pipete 0,1 mL, 0,2 mL ou a quantidade necessária para obter a concentração desejada de cada princípio ativo, para um balão volumétrico de 10 mL. Complete o volume com n-hexano (pesticidas do item a e b da **Tabela 1**) ou acetonitrila (aldicarbe, carbaril, carbofurano) ou álcool metílico (carbendazim e tiabendazol). Transfira para um frasco, cole etiqueta e armazene em refrigerador.

Soluções-padrão de trabalho – A partir das soluções intermediárias, pipete 0,1 mL e/ou a quantidade necessária para obter a concentração desejada, para um balão volumétrico de 10 mL. Adicione solvente apropriado e complete o volume. Transfira para um frasco de armazenamento, cole etiqueta e guarde em congelador.

Para os pesticidas dos itens a e b da **Tabela 1**, as diluições são feitas com n-hexano. Para aldicarbe, carbofurano, carbaril, carbendazim e tiabendazol, as diluições são feitas na fase móvel. A concentração deve ser adequada à faixa de linearidade do detector do cromatógrafo e metodologia utilizada. Prepare as soluções de trabalho em cinco níveis de concentração (1/2 LQ, 1 LQ, 2 LQ, 5 LQ, 10 LQ) para a construção da curva-padrão.

Nota: Limite de quantificação (LQ) – Menor concentração do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, sob determinadas condições experimentais adotadas.

Diclorometano-n-hexano 1:1 (v:v) – Transfira 500 mL de diclorometano para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com n-hexano.

Fase móvel para análise de resíduos de aldicarbe, carbofurano e carbaril – Água purificada para CLAE e acetonitrila 65:35 (v:v) – Transfira 350 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água purificada para CLAE.

Fase móvel para análise de resíduos de carbendazim e tiabendazol (solução de KH_2PO_4 a 0,1% e álcool metílico 30:70) – Transfira 300 mL da solução KH_2PO_4 a 0,1% para balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com álcool metílico. Misture bem, homogeneíze em ultra-som e filtre em membrana de 0,45 µm

Isoctano-tolueno 9:1(v/v) – Transfira 90 mL de isoctano para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com tolueno.

Solução KH_2PO_4 0,1% – Pese 1 g de KH_2PO_4 em béquer de 10 mL e dissolva com água purificada para CLAE. Transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL, lavando o béquer com pequenas quantidades de água purificada para CLAE.

Tratamento do algodão – Coloque, em frasco de Soxhlet, o algodão e extraia com 200 mL de n-hexano por pelo menos cinco horas. Coloque em béquer e seque em estufa. Armazene em frasco de vidro com tampa.

Procedimentos

A seleção das partes de um material vegetal que devem ser analisadas depende do objetivo da análise e da natureza de amostra. Deve-se amostrar o produto de acordo com as normas do Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission.

Preparação da amostra

Materiais moídos, grãos e pequenas frutas – Simples mistura.

Frutas, legumes e outros produtos vegetais – A redução das amostras deve ser realizada por corte manual. Quarteie antes de misturar. Pique, triture, moa em liqüidificador com copo de vidro ou aço inox.

Verduras – Retire as folhas aleatoriamente.

Porções selecionadas – Quarteie e misture a quantidade total das porções selecionadas a fim de obter um material homogêneo. Coloque aproximadamente 1 kg em frasco de vidro com tampa de vidro ou com batoque de teflon. Armazene em geladeira para análise imediata ou em *freezer* caso não seja realizada imediatamente.

Extração – Pese 30 g da amostra em frasco de nalgene. Adicione 30 mL de acetona e agite no ultra-turrax por 30 segundos. Adicione 60 mL de uma mistura de diclorometano-n-hexano 1:1 (v/v) e agite novamente em ultra-turrax por 30 segundos. Centrifugue por 20 minutos ou filtre em funil de vidro com algodão tratado para uma proveta de 100 mL. Para analisar resíduos de pesticidas do item a da **Tabela 1**, prossiga a partir do extrato orgânico como indicado no item 1. Para analisar os resíduos de pesticidas do item b da **Tabela 1** prosiga como indicado no item 2. Para analisar resíduos de aldicarbe, carbofurano e carbaril prossiga como indicado no item 3. Para analisar resíduos de carbendazim e tiabendazol prossiga como indicado no item 4.

1. Resíduos dos pesticidas do item a – Pipete 0,2 mL do extrato orgânico para vial. Concentre até quase à secura, ressuspendendo em n-hexano, completando o volume a 1 mL. Injete 2 µL em cromatógrafo a gás.

2. Resíduos dos pesticidas do item b – Pipete 5 mL do extrato orgânico para um tubo graduado. Concentre até quase à secura e ressuspenda em isoctano-tolueno 9:1 (v/v), a 1 mL. Injete 2 µL em cromatógrafo a gás.

3. Resíduos de aldicarbe, carbofurano e carbaril – Do extrato, transfira uma alíquota de 10 mL para um balão de 25 mL, concentre em rotavapor até quase à secura e ressuspenda em diclometano, completando o volume a 2 mL. Condicione uma coluna de extração em fase sólida (SPE– sílica aminopropil de 500 mg, 3 mL).Transfira a amostra. Elua com 4 mL de diclorometano com 1% de álcool metílico em tubo de vidro. Concentre à secura e ressuspenda na fase móvel. Filtre em membrana de 0,45 µm através de uma seringa de vidro de 5 mL. Recolha em tubo de vidro com tampa. Transfira para o *vial* e injete 40 µL em cromatógrafo a líquido de alta eficiência.

4. Resíduos de carbendazim e tiabendazol – Do extrato, transfira uma alíquota de 10 mL para um balão de 25 mL e concentre em rotavapor até quase a secura e ressuspenda em álcool metílico, completando o volume a 2 mL. Condicione uma coluna de extração em fase sólida (SPE – diol de 500 mg, 3 mL) com 5 mL de álcool metílico. Transfira a amostra. Lave com 2 mL de álcool metílico e descarte o eluato. Elua com 4 mL da solução de H_3PO_4 0,1 M/L e recolha em tubo de vidro. Adicione 100 µL de NaOH 1 M/L. Filtre em membrana de 0,45 µm através de uma seringa de vidro de 5 mL. Recolha em tubo de vidro com tampa. Transfira para o vial e injete 40 µL em cromatógrafo a líquido de alta eficiência.

Análise da testemunha e estudos de recuperação – Para cada matriz a ser analisada, realize a análise em triplicata da testemunha e estudos de recuperações com 5 repetições em pelo menos dois níveis: 1 LQ e 10 LQ.

Condições cromatográficas

Pesticidas do item a: cromatógrafo a gás, com ECD, equipado com workstation, coluna capilar, fase estacionária: 5% de fenil metil siloxano (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm de filme), temperatura do detector: 320°C, temperatura do forno: 60°C (1 min), (60 - 220)°C (10°C/min), (220 - 280)°C (3°C/min.), 280°C (17 min) – tempo total: 60 min, fluxo do gás de arraste: nitrogênio: 1 mL/min, temperatura do injetor: 240°C, modo de injeção: *splitless.*

Pesticidas do item b: cromatógrafo a gás, com FPD, coluna megabore: fase estacionária: 5% de fenil metil siloxano (30 m x 0,53 mm x 2,65 µm de filme), temperatura do detector: 280°C, temperatura do forno: (50 - 150)°C (30°C/min), (150 - 240)°C (10°C/min), fluxo do gás de arraste: nitrogênio: 18 mL/min, fluxo de hidrogênio: 75 mL/min, fluxo de ar sintético: 100 mL/min, temperatura do injetor: 240°C, modo de injeção: *splitless.*

Aldicarbe, carbofurano e carbaril: cromatógrafo a líquido de alta eficiência, detector de UV (λ : 195 nm-aldicarbe e carbofurano e 210 nm - carbaril), coluna: aço inox, 125 mm x 4 mm, fase estacionária; Spherisorb ODS-2,5 µm, fase móvel: água purificada para CLAE-acetonitrila 65:35 v:v, fluxo da fase móvel: 0,75 mL/min, temperatura: 30°C.

Carbendazim e tiabendazol: cromatógrafo a líquido de alta eficiência, detector de UV (λ : 285 nm), coluna: aço inox, 125 mm x 4 mm, fase estacionária: Spherisorb ODS-2,5 µm, fase móvel: solução de KH_2PO_4 a 0,1% álcool metílico 30:70 v:v, fluxo da fase móvel: 0,60 mL/min, temperatura: 25°C.

Curva-padrão – Injete as soluções de trabalho com no mínimo cinco diferentes concentrações por duas ou três vezes ou até que haja repetitibilidade dos cromatogramas. Construa a curva–padrão dentro da faixa de linearidade do detector.

Quantificação – A quantificação dos pesticidas do item a é feita por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons e a dos pesticidas do item b por cromatografia a gás com detector fotométrico de chama (FPD) ou detector de nitrogênio e fósforo. Aldicarbe, carbofurano, carbaril, carbendazim e tiabendazol são quantificados por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector ultravioleta ou de fluorescência. A análise qualitativa é feita por padronização externa, por meio da comparação do tempo de retenção dos respectivos princípios ativos e a confirmação em coluna de diferente polaridade ou por detector seletivo de massa.

Cálculo

A análise quantitativa é feita por meio da curva-padrão, por comparação de área, levando em consideração o fator de diluição e a quantidade de amostra. O resultado deve ser expresso em miligrama do princípio ativo por quilograma da amostra (mg/Kg).

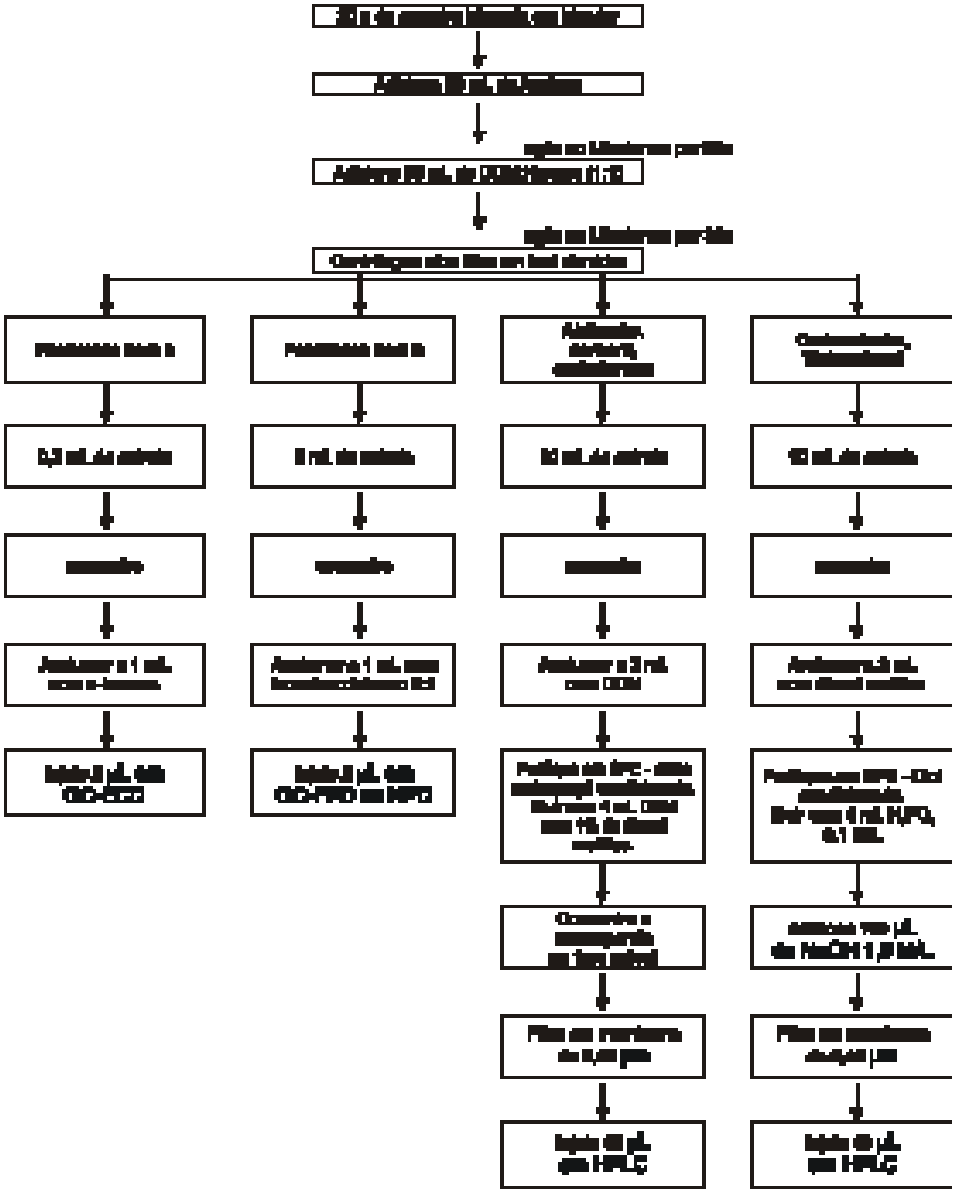


Figura1 - Esquema do método multi-resíduo para determinação de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais

Referências bibliográficas

ANALYTICAL METHODS FOR PESTICIDE RESIDUES IN FOODSTUFFS, 6th ed. Inspectorate for Health Protection, **Ministry of Public Health, Welfare and Sports**, The Hague/Rijswijk, The Netherlands, 1996 (Part 1 – Multiresidue methods)

HIEMSTRA, M.; JOOSTEN J.A.; KOK, A. Fully automated Automated solid-phase extraction clean-up and on-line liquid chromatographic determination of benzimidazole fungicides in fruit and vegetables. **J. A.O.A.C. Int**., p. 78, 1267-1274,1995.

KOK, A. AND ; HIEMSTRA, M. Optimization, automation, and validation of the solid-phase extraction clean-up and on-line liquid chromatographic determination of N-methylcarbamate pesticides in fruits and vegetables. **J. A.O.A.C. Int.**, 75, 1063-1074, 1992.

JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Portion of commodities to wich **Codex Maximum Residue Limits apply and which is analyzed**, v .2, Section 4, p. 391-404,1993.

371/IV Método multirresíduo para determinação de pesticidas e bifenilas policloradas em produtos gordurosos

Este método aplica-se à determinação de resíduos dos pesticidas: lambdacialotrina, cipermetrina, DDT total (op'DDT, pp'DDT, pp'DDE, pp'DDD), dieldrin, deltametrina, endosulfam total (alfa, beta e sulfato de endosulfan), endrin, HCH total (alfa, beta e gama HCH), heptacloro, heptacloro epóxido, hexaclorobenzeno, mirex, bifenilas policloradas policloradas (PCBs congêneres: 28, 52, 101, 138, 153, 180) em produtos gordurosos como: leite, ovo, manteiga, carnes (frango, peixe), etc. Os pesticidas são extraídos com uma mistura de solventes, a purificação é feita em uma única etapa em coluna de sílica gel e a determinação qualitativa e quantitativa é feita por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons.

Material

Cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons, rotavapor, estufa, mufla, aparelho de Soxhlet, balões volumétricos de diferentes capacidades, pipetas volumétricas, pipetas Pasteur, coluna cromatográfica de vidro de 15 mm de diâmetro por 30 cm de altura, com reservatório de 300 mL e torneira de *teflon*, provetas de diferentes capacidades, balões de fundo chato de 300 mL com boca esmerilhada, tubos graduados de 10 mL, dessecador, frasco Erlenmeyer com tampa, almofariz com pistilo, *vials* de vidro com tampa e septos de teflon para injetor automático.

Reagentes

n-Hexano grau resíduo
Diclorometano grau residuo
Sulfato de sódio anidro granulado grau resíduo
Sílica Gel 60, 70-230 *mesh*

Nota: faça previamente um branco de cada reagente para certificar-se de que não possuem interferentes para a análise.

Solução-padrão – Pese, com precisão, 0,010 g de cada padrão analítico em béquer, transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com isoctano. Transfira para frasco de vidro com tampa e batoque de *teflon*. Todo frasco deve conter uma etiqueta com dados de procedência, identidade, concentração, estabilidade, data de preparação, prazo de validade e temperatura de armazenamento. Prepare soluções intermediárias com n-hexano. Faça diluições necessárias com n-hexano em cinco níveis (1/2 LQ, 1 LQ, 2 LQ, 5 LQ e 10 LQ) para construção da curva-padrão dentro da faixa de linearidade do detector.

Nota: Limite de quantificação (LQ) – Menor concentração do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, sob determinadas condições experimentais adotadas.

Diclorometano-n-hexano 1:4 (v/v) – Transfira 200 mL de diclorometano para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicione n-hexano. Misture bem e complete o volume com n-hexano.

Diclorometano-n-hexano 1:1 (v/v) – Transfira 500 mL de diclorometano para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicione n-hexano. Misture bem e complete o volume com n-hexano.

Sílica gel ativada – Calcine quantidade suficiente de sílica gel a 450°C durante 4 horas. Deixe em dessecador até temperatura ambiente. Armazene em frasco de vidro com tampa e batoque de *teflon*. Ative a sílica gel calcinada por 5 horas a 135°C de dois em dois dias. Armazene em dessecador.

Sílica gel desativada a 10% – Pese 13,5 g de sílica gel ativada em frasco Erlenmeyer com tampa. Adicione 1,5 g de água tratada e homogeneíze.

Água tratada – Transfira água para um funil de separação de 1000 mL e extraia três vezes com 60 mL da mistura diclorometano-n-hexano 1:1 v/v. Despreze a fase orgânica e armazene a água.

Algodão tratado – Coloque, em frasco de Soxhlet, o algodão e extraia com 200 mL de n-hexano por pelo menos cinco horas. Coloque em béquer e seque em estufa. Armazene em frasco de vidro com tampa.

Preparação da Amostra

Leite – Homogeneíze a amostra, pese 10 g, transfira para um almofariz contendo 15 g de sílica gel calcinada e macere até resultar em pó.

Ovos – Homogeneíze a amostra (claras e gemas). Pese 5 g desta mistura e 5 g de água tratada, transfira para um almofariz contendo 15 g de sílica gel calcinada e macere até resultar em pó.

Manteiga, carnes e outros produtos gordurosos – Homogeneíze a amostra, extraia a gordura por refluxo em Soxhlet com 200 mL de n-hexano. Pese 2 g de gordura e dilua com n-hexano em balão volumétrico de 25 mL.

Procedimento – Transfira para uma coluna cromatográfica 15 g de sílica gel desativada a 10%. Adicione aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro e posteriormente a mistura com a sílica de leite ou ovo ou uma alíquota de 5 mL da solução de gordura diluída, equivalente a 0,4 g. Empacote muito bem. Elua com 200 mL da mistura de n-hexano-diclorometano na proporção de 4:1 (v/v) e em seguida, com 200 mL da mistura de n-hexano-diclorometano na proporção de 1:1 (v/v). Recolha os dois eluatos em balões de fundo chato de 350 mL e concentre em rotavapor à 40ºC, até quase a secura. Adicione aproximadamente 5 mL de n-hexano e concentre novamente até que todo o diclorometano seja evaporado. Transfira quantitativamente para um tubo graduado, completando o volume para 5 mL com n-hexano. Identifique e quantifique em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons.

Condições cromatográficas – Cromatógrafo a gás com ECD equipado com workstation, coluna capilar (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm de filme) : fase estacionária: 5% de fenil metil siloxano, temperatura do detector: 320°C, temperatura do forno: 60°C (1min); (60-220)°C (10°C/min.), 220-280°C (3°C/min), 280°C (17 min) – tempo total: 60 min.; fluxo do gás de arraste: nitrogênio: 1 mL/min, temperatura do injetor: 240°C, modo de injeção: splitless.

Curva-padrão – Injete as soluções de trabalho com diferentes concentrações por duas ou três vezes ou até que haja repetitibilidade dos cromatogramas. Construa a curva-padrão dentro da faixa de linearidade do detector.

Análise da testemunha e estudos de recuperação – Para cada matriz a ser analisada, realize análise da testemunha e estudos de recuperações com 5 repetições em pelo menos dois níveis: 1 LQ e 10 LQ.

Cálculo

A análise quantitativa é feita por meio da curva-padrão com padronização externa, por comparação de área, levando em consideração o fator de diluição e quantidade de amostra. A análise qualitativa é feita por padronização externa, por meio da comparação do tempo de retenção dos princípios ativos e a confirmação em coluna de diferente polaridade ou por detector seletivo de massa. O resultado deve ser expresso em miligramas do princípio ativo por quilograma da amostra (mg/Kg).

Referência bibliográfica

STEIWANDTER, H. – Contributions to sílica gel application in pesticide residue analysis. III. An on-line method for extracting and isolating chlorinated hidrocarbon pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) from milk and dairy products. **Fresenius Z. Anal. Chem.**, 312: 342-345, 1982.

372/IV Método para determinação de ditiocarbamatos em frutas e vegetais

Este método aplica-se à determinação de resíduos de ditiocarbamatos em frutas e vegetais. Consiste na decomposição de ditiocarbamatos em meio de solução de cloreto estanoso e ácido clorídrico, gerando o CS_2, que, após purificação, é coletado em uma solução de acetato de cobre e dietanolamina. Dois complexos cúpricos [cúprico-N-N-bis(2-hidroxietil)] são formados e medidos em conjunto por espectrofotometria na região de absorção no visível, no comprimento de onda de 435 nm, usando como referência um branco dos reagentes.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS com cubetas de 1 cm; balança analítica; balança semi-analítica; manta de aquecimento para balão de 1000 mL com 3 bocas; sistema de purificação de água; aparelho de destilação e decomposição constituído de: um balão de 1000 mL com 3 bocas, um destilador, um funil de separação, condensador, tubos lavadores de gases e conexões apropriadas (**Figura 1**); pipetas volumétricas de diferentes capacidades, balões volumétricos de diferentes capacidades, béqueres e provetas.

Reagentes

Álcool
Dissulfeto de carbono com alto teor de pureza (D = 1,266 g/mL)
Hidróxido de sódio
Ácido clorídrico
Acetato de chumbo
Acetato de cobre
Dietanolamina

Cloreto estanoso di-hidratado
Lactose
Mancozebe - padrão analítico certificado
Nitrogênio comum
Água destilada e desmineralizada

Nota: faça previamente brancos de cada reagente para certificar-se de que não possuem interferentes na análise.

Solução R_1 - acetato de chumbo – Dissolva 30 g de acetato de chumbo em água com aquecimento. Esfrie e transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução R_2 - acetato de cobre – Dissolva 0,4 g de acetato de cobre mono-hidratado [$Cu(CH_3COO)_2.H_2O$] em 200 mL de álcool etílico com leve aquecimento. Esfrie e transfira para um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com álcool.

Solução R_3 – Dilua 25 mL da solução R_2 em um balão volumétrico de 100 mL com álcool.

Solução R_4 - reagente de cor – Adicione 100 mL de álcool, 30 mL da solução R_3 e 25 g de dietanolamina em balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com álcool.

Solução R_5 - cloreto estanoso – Dissolva 40 g de cloreto estanoso dihidratado ($SnCl_2$. $2H_2O$) em ácido clorídrico e transfira para um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com ácido clorídrico.

Solução R_6 – Transfira cuidadosamente 20 mL da solução R_5 e 20 mL de ácido clorídrico concentrado para um balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com água.

Solução R_7 - Hidróxido de sódio – Pese 10 g de hidróxido de sódio e dissolva em água. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão em lactose para estudos de recuperação – Pese, em balão de rotavapor, quantidade suficiente de padrão para a realização das recuperações, adicione lactose, de maneira a obter a concentração desejada. Misture com cuidado até perfeita homogeneização, girando o balão durante 4 horas em rotavapor.

Solução-padrão mãe CL_1 – Em um balão de 50 mL contendo 40 mL de álcool, pese 1 mL de dissulfeto de carbono (D = 1,266 g/mL) e complete o volume com álcool.

Solução-padrão intermediária CL_2 – Dilua 5 mL da solução CL_1 em um balão volumétrico de 50 mL e complete o volume com álcool

.

Solução-padrão intermediária CL_3 – Transfira 5 mL da solução CL_2 para um balão volumétrico de 250 mL e complete o volume com álcool, obtendo-se assim uma concentração de 50,64 µg/mL de dissulfeto de carbono.

Soluções-padrão de trabalho – Em um balão volumétrico de 25 mL, contendo 15 mL da solução R_4 (reagente de cor), pipete 0,2; 0,4; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 mL da solução-padrão intermediária CL_3 e complete o volume com álcool etílico, resultando, respectivamente, nas concentrações de 0,4; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0 e 16,0 µg, CS_2 por mL.

Solução-branco de reagentes – Transfira 15 mL da solução R_4 para um balão volumétrico de 25 mL e complete o volume com álcool.

Procedimento – Quarteie e corte a amostra em pedaços pequenos. Homogeneíze e armazene em frasco de vidro com tampa, no *freezer*. Monte o aparelho de destilação e decomposição, conforme **Figura 1**. Transfira 300 g da amostra para o frasco com três bocas do conjunto de destilação. Conecte o condensador na boca central e nas laterais, o tubo de nitrogênio e o funil de separação contendo 240 mL da solução R_6. No condensador (boca central do balão de 3 bocas) conecte, em seqüência, três tubos lavadores de gases, adicionando a cada tubo respectivamente: 10 mL da solução R_1, 10 mL da solução R_7 e 15 mL da solução R_3. Abra o fluxo de nitrogênio brandamente. Aqueça o frasco rapidamente até a ebulição por 60 minutos. Após o término, desligue o fluxo de nitrogênio e desconecte o terceiro tubo. Transfira para um balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com álcool. Meça a absorbância a 435 nm em espectrofotômetro, contra o branco de reagentes.

Análise da testemunha e estudos de recuperação – Para cada matriz a ser analisada, realize análise da testemunha e estudos de recuperação com 5 repetições em pelo menos dois níveis: 1 LQ e 10 LQ.

Nota: Limite de quantificação (LQ) – Menor concentração do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, sob determinadas condições experimentais adotadas.

Curva-padrão – Meça a absorbância de todas as soluções de trabalho em espectrofotômetro, a 435 nm contra o branco de reagentes. Trace a curva absorbância *versus* concentração de CS_2.

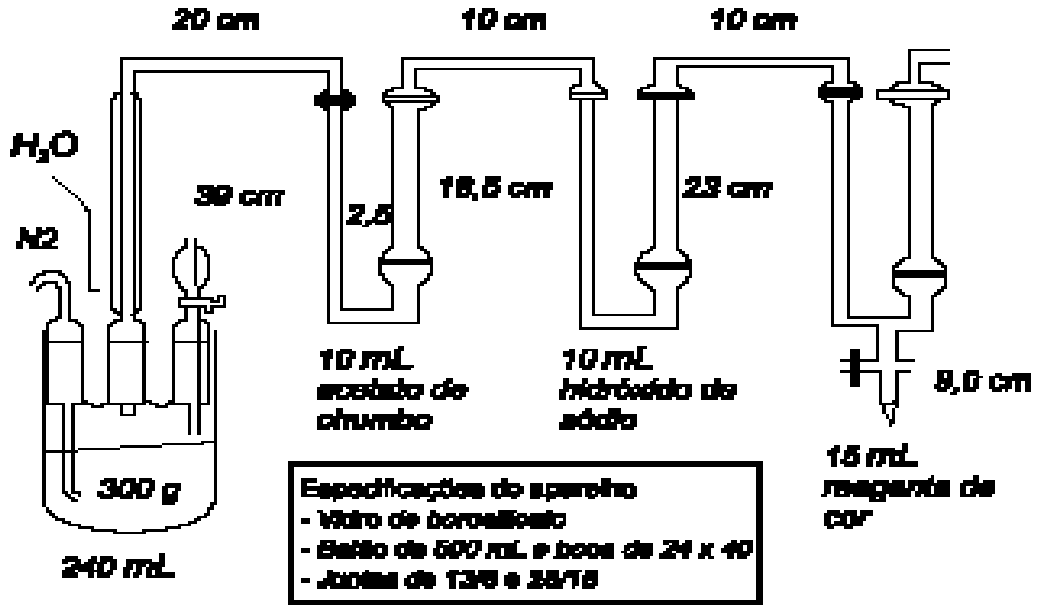


Figura 1 – Aparelho de destilação e decomposição para determinação de ditiocarbamatos em frutas e vegetais.

Cálculo

O resíduo, em mg/kg, de CS_2 é calculado por padronização externa com a curva de calibração, levando em consideração o fator de diluição e a quantidade de amostra.

Fatores de conversão do CS_2 para alguns ditiocarbamatos:

Ditiocarbamatos	Fator de conversão
Mancozebe	1,776
Manebe	1,742
Zinebe	1,810
Tiram	1,578

O resultado deve ser expresso em miligramas do princípio ativo ou de CS_2 por quilograma da amostra (mg/Kg).

Referências bibliográficas

KEPPEL, G.E. Modification of the carbon dissulfide evolution method for dithiocarbamate residues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. v. 52, p. 162-169, 1969.

KEPPEL, G.E. Collaborative study of the determination of dithiocarbamate residues by a modified carbon dissulfide evolution method. J. Assoc. Off. Anal. Chem. v. 54, p. 528-532, 1971.

THEIR H.; ZEUMER, H. editors. Multiresidue method SIS. Ditiocarbamate and thiuram disulfide fungicides photometric determination. In: **Manual of Pesticide Residue Analysis**. Deutsche. Forschungsgemeinschaft, Pesticides Comm. Weinhein; Verlag, 1987. v. 1 p. 353-360.

Colaboradores

Heloísa Helena Barretto de Toledo, Sônia Bio Rocha, Tereza Atsuko Kussumi e Vera Regina Rossi Lemes

CAPÍTULO **XXI**

FERMENTOS

XXI FERMENTOS

Fermentos biológicos

Os fermentos biológicos são preparações à base de leveduras de uso tecnológico, capazes de produzir fermentação em massas. Do ponto de vista analítico, são de interesse as determinações de umidade (**012/IV**), protídios (**036/IV** ou **037/IV**), cinzas ou resíduo mineral fixo (**018/IV**), amido e poder fermentativo.

373/IV Fermentos biológicos – Determinação de amido

Material

Béquer de 100 mL, proveta de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 300 mL, autoclave, balão volumétrico de 200 mL e bastão de vidro.

Reagentes

Ácido clorídrico
Solução de hidróxido de sódio a 10% m/v
Soluções de Fehling tituladas (**Apêndice I**)

Procedimento – Pese 5 g da amostra em um béquer de 100 mL. Adicione 50 mL de água. Homogeneíze com um bastão de vidro e filtre. Lave o béquer e o bastão. Lave bem o resíduo a fim de retirar todos os solúveis em água. Transfira o papel de filtro com o resíduo para um frasco Erlenmeyer de 300 mL com auxílio de 150 mL de água.

Adicione 5 mL de ácido clorídrico. A solução deverá ficar fortemente ácida. Aqueça em autoclave a 1 atm por uma hora. Neutralize com solução de hidróxido de sódio a 10%. Transfira para um balão volumétrico de 200 mL. Complete o volume com água e titule com soluções de Fehling, seguindo a técnica descrita em **043/IV**.

Cálculo

$$\frac{100 \times A \times a \times 0{,}9}{P \times V} = \text{amido por cento m/m}$$

A = n° de mL da solução P da amostra
a = n° de g de glicose correspondente a 10 mL das soluções de Fehling
P = n° de g da amostra
V = n° de mL gasto da solução

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v 1:Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 139-140.

374/IV Fermentos biológicos – Poder fermentativo

Este método destina-se a medir a capacidade de produção de CO_2 de fermentos biológicos nas CNTP e baseia-se na liberação do CO_2 pela *Saccharomyces cerevisae* na presença de sacarose (substrato), num sistema fechado.

Material

Banho-maria, balança analítica, aparelho de Hayduck-Nagel adaptado (**Figura 1**), frasco Erlenmeyer de 1000 mL, béqueres de 10 e 50 mL e proveta de 500 mL.

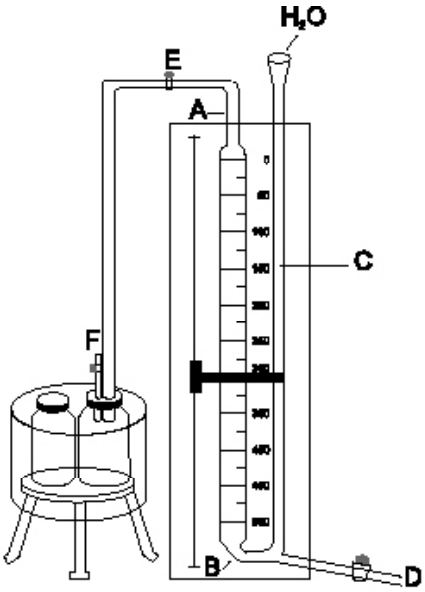


Figura 1 - Aparelho de Hayduck-Nagel adaptado

Reagentes

Solução de sacarose a 10% m/v
Fosfato ácido de potássio - K_2HPO_4
Fosfato ácido de amônio - $(NH_4)_2HPO_4$
Sulfato de magnésio - $MgSO_4$
Sulfato de cálcio - $CaSO_4$
Gasolina

Procedimento – No aparelho de Hayduck-Nagel, coloque 2 mL de gasolina no tubo de segurança C, acrescente água até nivelar a escala, utilizando a torneira F. Feche as torneiras E e F. Pese 10 g da amostra, 2 g de fosfato ácido de potássio, 1 g de fosfato ácido de amônio, 0,25 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de sulfato de cálcio. Transfira para o frasco Erlenmeyer de 1000 mL a amostra e os reagentes. Adicione 400 mL da solução de sacarose a 10%. Adapte o frasco Erlenmeyer imediatamente ao aparelho de Hayduck-Nagel, mergulhando-o em banho-maria a 30°C. A partir deste momento, marque duas horas de reação. Anote a temperatura e a pressão atmosférica ambiente. Inicie as leituras assim que houver a formação de CO_2, indicado pela presença de espuma. Efetue a medida do volume de gás produzido abrindo a torneira E e mantendo fechada a torneira F. Leia o deslocamento da coluna de água no tubo C. Feche a torneira A, abra a torneira B e acrescente água até nivelar a escala. Repita a operação de leitura até completar duas horas.

Cálculo

$$\frac{P_2 \times V_2 \times T_1}{T_2 \times P_1} = \text{mL de } CO_2 \text{ nas CNTP produzidos por 10 g em 2 h}$$

P_1= pressão atmosférica nas CNTP (760 mm Hg)
T_1= temperatura absoluta (273°K)
P_2= pressão atmosférica ambiente
T_2= temperatura ambiente (°K)
V_2= volume medido no experimento

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 139-141.

Fermentos Químicos

Fermento químico é o produto constituído de uma substância ou mistura de substâncias químicas que, pela influência do calor e/ou umidade, produz desprendimento gasoso capaz de expandir massas elaboradas com farinhas ou féculas, aumentando o volume e a porosidade. O parâmetro mais importante a ser avaliado nos fermentos químicos é o dióxido de carbono total, que pode ser determinado por método gasométrico ou gravimétrico.

375/IV Fermentos químicos – Determinação de CO_2 total pelo método gasométrico 1

O método baseia-se na medida do volume de dióxido de carbono total produzido pela amostra devido à adição de ácido.

Material

Aparelho de Chittick composto de: balão de 250 mL, com fundo redondo e boca larga, munido de rolha de borracha com 2 orifícios (A); tubo em U (B) munido com uma torneira (C); tubo medidor de gás, graduado em mL, com traço zero colocado a 25 cm abaixo da extremidade superior; o intervalo graduado abrange 25 divisões acima de zero, até 200 abaixo de zero (D); bulbo nivelador de 300 mL de capacidade (E) e bureta de 25 mL com ponta curva e alongada (F).

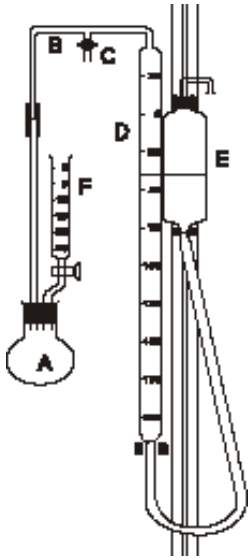


Figura 2 – Aparelho de Chittick

Reagentes

Ácido sulfúrico (1+5) ou ácido clorídrico (1+2)

Solução de deslocamento – Pese 100 g de cloreto de sódio e dissolva em 350 mL de água. Adicione 1 g de bicarbonato de sódio e 2 mL de indicador alaranjado de metila a 0,5%. Agite e adicione, às gotas, ácido sulfúrico (1+5) ou ácido clorídrico (1+2) até coloração rósea. Agite até que todo o dióxido de carbono tenha sido desprendido.

Procedimento – No aparelho de Chittick, ligue a bureta F ao balão A por um dos orifícios da rolha de borracha. Ligue o tubo em U ao balão A por meio de um tubo de vidro, tendo como intermediário um tubo de borracha, a fim de permitir que o balão A possa ser agitado. Ligue o bulbo nivelador ao medidor de gás por meio de um tubo longo de borracha. Pese de (1 - 2) g da amostra de fermento químico ou 10 g da farinha de trigo com fermento no balão A seco. Adapte o balão ao aparelho, abra a torneira C e feche a torneira F. Coloque a solução de deslocamento no bulbo E e ajuste o nível do tubo D a 10 mL acima do traço zero, manejando o bulbo nivelador. Estes 10 mL são praticamente iguais ao volume de ácido a ser usado na decomposição. Deixe o aparelho em repouso por cerca de 5 minutos, para igualar a pressão e a temperatura interna do aparelho às

condições ambientais. Feche a torneira C. Abaixe um pouco o bulbo E para que reduza a pressão dentro do aparelho e o nível no tubo D esteja a 10 mL acima do zero. Verifique se não há vazamento pelas conexões. Adicione, lentamente ao balão A, 10 mL de ácido sulfúrico (1+5) contido na bureta F. Deixe cerca de 2 min em repouso e agite o balão A vigorosamente. Deixe o aparelho em repouso por 5 minutos. Leia o volume de CO_2 produzido no tubo D. Anote a temperatura e a pressão ambiente.

Cálculo

$$\frac{44 \times 100 \times P \times V \times 273}{22400 \times T \times 760 \times A} = \text{dióxido de carbono total/100 g, nas CNPT}$$

P = pressão ambiente em mm de mercúrio
V = nº de mL de dióxido de carbono desprendido
T = temperatura ambiente em graus Kelvin
A = massa da amostra, em gramas

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1:Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 147-149.

376/IV Fermentos químicos – Determinação de CO_2 total pelo método gasométrico 2

Material

Aparelho de Schroedter, balança analítica e proveta de 50 mL.

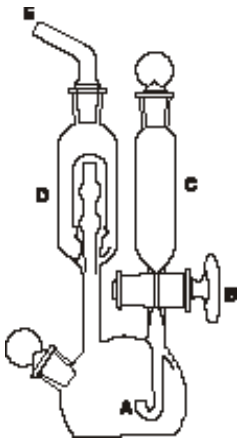


Figura 3 - Aparelho de Schroedter

CAPÍTULO **XXII**

SAL

XXII

SAL

O sal para o consumo humano pode ser avaliado por meio do exame físico-químico que além de determinar seu principal componente, o cloreto de sódio, inclui a determinação de umidade, substâncias insolúveis em água, sulfatos, cálcio e magnésio. A concentração de íons cálcio, magnésio e sulfatos é indicativa da qualidade do sal; quanto menor seus teores, mais puro será o sal. Um sal refinado deve conter no máximo 0,07% de cálcio, 0,5% de magnésio e 0,21% de sulfatos. O cloreto de sódio puro não é higroscópico. O que torna o sal úmido é a presença do cloreto de magnésio, cloreto de cálcio e sulfatos de magnésio e cálcio.

No exame microscópico é tolerada a presença de areia e fragmentos de conchas até o limite dos insolúveis estabelecidos em seu padrão de identidade e qualidade.

O exame microbiológico não é significativo, uma vez que o sal é por excelência um conservador natural.

Assim, na análise de sal, as determinações usuais são: granulometria, a perda por dessecação (umidade), substâncias insolúveis em água, cloretos, turbidez, cálcio, magnésio e sulfatos.

Há muitos anos o sal é utilizado como veículo para garantir o suprimento adequado de iodo à população, que deve ser obrigatoriamente adicionado na proporção estabelecida pelo Ministério da Saúde. No Brasil, essa adição é normalmente realizada utilizando-se o iodato de potássio. Essa prática visa minimizar a ocorrência de distúrbios causados pela deficiência de iodo, entre eles, o bócio. Desta forma, a determinação do iodo no sal destinado ao consumo humano é prática rotineira.

As determinações analíticas necessárias para comprovação do padrão de identidade e qualidade do sal podem, eventualmente, incluir pesquisa de outros contaminantes, orgânicos ou minerais, estranhos à sua composição normal.

377/IV Determinação da granulometria

Este é um paradigma importante no que se refere à classificação do sal. O sal grosso não tem especificações granulométricas, enquanto que os demais tipos de sal (peneirado, triturado, moído, refinado) são classificados conforme especificações estabelecidas por legislação.

Material

Tamis n° 4 (4,76 mm de abertura), para sal peneirado; tamis n° 7 (2,83 mm de abertura), para sal triturado; tamis n° 18 (1,00 mm de abertura), para sal moído; tamis n° 20 (0,84 mm de abertura) e tamis n°140 (0,105 mm de abertura), para sal refinado e balança semi-analítica.

Procedimento – Pese 1000 g da amostra e passe pelo tamis próprio para cada tipo de sal. Pese os cristais retidos no tamis.

Cálculo

$$\frac{N \times 100}{P} = \text{retenção no tamis por cento m/m}$$

N = n° de g da amostra retida no tamis
P = n° de g da amostra

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 284.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5734**: peneiras para ensaio com telas de tecido metálico. Rio de Janeiro, 1989.

Preparo da amostra

Para as determinações analíticas do sal faz-se necessária a homogeneização da amostra, passando-a por tamis nº 4. Se necessário, triture os cristais retidos pelo tamis e misture novamente à amostra. Homogeneíze e transfira para um frasco com rolha esmerilhada.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 285.

378/IV Determinação da umidade

É um indicador da pureza do sal, já que este produto tem, em sua composição, sais higroscópicos de magnésio e de cálcio. Um sal refinado deve ser submetido a um processo adequado de secagem para a sua avaliação.

Procedimento – Deverá ser seguida a técnica indicada em **012/IV**, usando 5 g da amostra e estufa a 150°C.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 284.

AMERICAN SOCIETY for TESTING and MATERIALS. **E 534-86**: standard test methods for chemical analysis of sodium chloride. Philadelphia: A.S.T.M., 1986.

RAFOLS, J.M. Development of Analytical Methods for Commercial Sodium Chloride. In: THIRD SYMPOSIUM ON SALT. NORTHERN OHIO GEOLOGICAL SOC., 1970. p. 186-194.

379/IV Determinação de insolúveis totais em água

Esta determinação avalia o teor de impurezas totais, como partículas de carvão, areia, fragmentos de conchas e outras, que não tenham sido eliminadas totalmente pela refinação. Quanto menor o seu teor, melhor a qualidade do sal.

Material

Béqueres de 150 e 600 mL, proveta de 500 mL, cadinho de Gooch de 30 mL previamente preparado com camada de fibra de óxido de alumínio, bomba de vácuo, frasco Kitassato com alonga e anel de borracha, estufa, dessecador contendo sílica gel, mufla e balança analítica.

Procedimento – Pese 50 g da amostra em um béquer de 150 mL e transfira para um outro de 600 mL, com auxílio de 300 mL de água. Agite até dissolver. Filtre em cadinho de Gooch com camada de fibra de óxido de alumínio (previamente aquecido em mufla a 550°C, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado). Lave o béquer e o cadinho com água, com porções de 20 mL, até que o filtrado não mostre mais opalescência ao adicionar-se uma gota de solução de nitrato de prata 0,1 M. Aqueça o cadinho de Gooch com o resíduo em estufa a 105°C por 2 horas. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese. Repita as operações de aquecimento por 30 minutos na estufa e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{Insolúveis totais em água por cento m/m}$$

N = n° de g de insolúveis totais em água
P = n° de g da amostra

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 284.

AMERICAN SOCIETY for TESTING and MATERIALS. **E 534-86**: standard test methods for chemical analysis of sodium chloride. Philadelphia: A.S.T.M., 1986.

RAFOLS, J.M. Development of Analytical Methods for Commercial Sodium Chloride. In: THIRD SYMPOSIUM ON SALT. NORTHERN OHIO GEOLOGICAL SOC., 1970. p.186-194.

380/IV Determinação de insolúveis inorgânicos em água

Esta determinação avalia o teor das impurezas inorgânicas do sal, para verificação de sua qualidade.

Material

Balança analítica, mufla, cadinho de Gooch e dessecador com sílica gel

Procedimento – Coloque o cadinho de Gooch com os insolúveis totais em água, obtidos em **379IV,** na mufla a 550ºC, por 30 minutos. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{Insolúveis inorgânicos em água por cento m/m}$$

N = nº de g de insolúveis inorgânicos em água
P = nº de g da amostra

381/IV Determinação de cloretos em cloreto de sódio

Este é um parâmetro físico-químico muito importante numa análise de sal, pois o teor encontrado é classificatório para o produto. Quando a análise é rotineira, o cloreto de sódio pode ser dosado diretamente pelo método argentométrico de Mohr, conhecido por sua exatidão e rapidez.

Material

Balão volumétrico de 500 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, proveta de 50 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL, bureta de 25 mL e balança analítica.

Reagentes

Solução de cromato de potássio a 10% m/v
Solução de nitrato de prata 0,1 M

Procedimento – Pese 5 g da amostra, transfira para um balão volumétrico de 500 mL, com auxílio de 200 mL de água, deixe em repouso no mínimo 2 horas, complete o volume e agite. Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL dessa solução para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 50 mL de água e 2 gotas de solução de cromato de potássio a 10%. Titule com solução de nitrato de prata 0,1 M.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0{,}585}{P} = \text{cloretos, em cloreto de sódio, por cento m/m}$$

V = nº de mL de solução de nitrato de prata 0,1 M gasto na titulação
f = fator da solução de nitrato de prata 0,1 M
P = nº de g da amostra usado na titulação

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 286.

RAFOLS, J.M. Development of Analytical Methods for Commercial Sodium Chloride. In: THIRD SYMPOSIUM ON SALT. NORTHERN OHIO GEOLOGICAL SOC., 1970. p. 186-194.

382/IV Determinação de iodo adicionado na forma de iodeto

O sal, para consumo humano, deverá conter uma pequena quantidade de iodo, em forma de iodeto ou iodato, para a prevenção do bócio. O método para dosagem de iodo no sal fundamenta-se na titulação volumétrica do iodo liberado, após a acidificação da amostra adicionada de iodeto de potássio, com solução de tiossulfato de sódio 0,005 M e usando solução de amido como indicador. O amido reage com o iodo liberado nas reações de óxido-redução envolvidas, formando um complexo de cor azul que é descolorido pela adição de solução de tiossulfato de sódio. Deve-se dosar o iodo no sal, no mínimo, em duplicata; a diferença de leitura nas duas titulações não deve ser maior que 0,1 mL.

Material

Béquer de 600 mL, pipeta de 1 mL e bureta de 10 mL.

Reagentes

Ácido fosfórico a 85%
Ácido salicílico
Iodeto de potássio
Solução de alaranjado de metila em água fria a 0,01% m/v

Solução de tiossulfato de sódio 0,005 M
Água de bromo – Junte 25 g (ampola) de bromo a 700 mL de água fria, preparado em capela. Conserve em geladeira e em frasco escuro.

Solução de amido a 1%, recém-preparada – Pese 1 g de amido, dissolva em 100 mL de água, ferva e esfrie à temperatura ambiente.

Procedimento – Pese 10 g da amostra e transfira para um béquer de 600 mL, com auxílio de 400 mL de água bidestilada. Agite até dissolver. Neutralize com ácido fosfórico a 85%, usando como indicador solução de alaranjado de metila. Acrescente mais 1 mL de ácido fosfórico a 85%. Adicione 1 mL de água de bromo. Aqueça até ebulição reduzindo o volume da solução à metade. Adicione, enquanto quente, alguns cristais de ácido salicílico. Esfrie. Adicione 1 mL de ácido fosfórico a 85% e cerca de 0,1 g de iodeto de potássio. Titule com solução de tiossulfato de sódio 0,005 M, usando solução de amido a 1%, como indicador.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 10{,}68}{P} = \text{mg de iodo por cento m/m}$$

V = mL da solução de tiossulfato de sódio 0,005 M gasto na titulação
f = fator da solução de tiossulfato de sódio 0,005 M
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 287.

383/IV Determinação de iodo adicionado na forma de iodato

Material

Béquer de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL, proveta de 250 mL, pipeta de 5 mL, bureta de 10 mL e balança analítica.

Reagentes

Solução de ácido sulfúrico 0,5 M

Iodeto de potássio
Solução de tiossulfato de sódio 0,005 M
Solução de amido a 1%, recém-preparada – Dissolva 1 g de amido em 100 mL de água, ferva e esfrie à temperatura ambiente.

Procedimento – Pese 10 g da amostra e transfira para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, com auxílio de 200 mL de água bidestilada. Agite até a dissolução. Adicione 5 mL de solução de ácido sulfúrico 0,5 M. Adicione cerca de 0,1 g de iodeto de potássio, 2 mL de solução de amido a 1%, como indicador, e titule o iodo liberado com solução de tiossulfato de sódio 0,005 M, usando uma bureta de 10 mL.

Notas

A quantidade de ácido sulfúrico indicada é necessária para reduzir o pH da solução a 1,5 - 2,0, para que ocorra a reação. Dependendo da composição do sal, alguns aditivos podem interferir nessa redução de pH, sendo que, nesses casos é necessária a adição de maior quantidade do ácido sulfúrico para se atingir a faixa de pH desejada.
A presença do amido, logo no início da titulação, pode interferir no ponto final, principalmente se o sal contiver muito iodo; nesse caso, recomenda-se iniciar a titulação com tiossulfato de sódio sem a adição do indicador. Assim que a solução torna-se amarelo-clara, adicione o amido como indicador.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 10{,}69}{P} = \text{mg de iodo por cento m/m}$$

V = mL da solução de tiossulfato de sódio 0,005 M gasto na titulação
f = fator da solução de tiossulfato de sódio 0,005 M
P = n° de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 288.

384/IV Determinação da turbidez

Trata-se de uma medida indicativa da qualidade do sal e de sua classificação. Avalia o teor de sólidos em suspensão. Se o sal, moído ou refinado, tiver um conteúdo considerável de impurezas, orgânicas e inorgânicas, indica que não foi beneficiado adequadamente. Esta

determinação não se aplica no caso do sal que contiver antiumectantes insolúveis em água.

Material

Béquer de 100 mL, balão volumétrico de 100 mL, espectrofotômetro UV/VIS e balança analítica.

Procedimento – Pese 25 g do sal em béquer de 100 mL e transfira para um balão volumétrico de 100 mL, com água. Agite para facilitar a dissolução e complete o volume. Agite. Deixe em repouso por 12 horas. Agite e, em seguida, faça a leitura do grau de turbidez usando medida espectrofotométrica a 610 nm. Interprete os resultados conforme tabela abaixo:

Porcentagem de transmitância	Turbidez	Característica do sal correspondente
96 - 100	25°	refinado
91 - 95	50°	grosso ou moído
85 - 90	100°	sal muito sujo

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 289.

385/IV Determinação de cálcio por permanganometria

Material

Béquer de 400 mL, proveta de 50 mL, funil de 5 cm de diâmetro, papel de filtro, bureta de 25 mL, pipeta de 1 mL, balança semi-analítica e balança analítica.

Reagentes

Ácido acético glacial
Solução de oxalato de amônio a 5% m/v
Ácido sulfúrico (1+4)
Solução de permanganato de potássio 0,02 M

Procedimento – Pese 5 g da amostra e transfira para um béquer de 400 mL, com auxílio de 50 mL de água. Adicione 1 mL de ácido acético glacial. Aqueça até a ebulição. Adicione lentamente, agitando sempre, 25 mL de solução de oxalato de amônio a 5%. Deixe em repouso por 2 horas. Filtre. Receba o filtrado em um béquer de 400 mL. Lave até que o filtrado não contenha íon oxalato. Transfira o papel de filtro com o precipitado para o béquer onde foi feita a precipitação, reservando as águas de lavagem para a dosagem de magnésio.

Dissolva o precipitado com 20 mL de ácido sulfúrico (1+4). Adicione 50 mL de água. Titule a quente com solução de permanganato de potássio 0,02 M até coloração rósea.

Cálculos

Em cálcio:

$$\frac{V \times f \times 0{,}2004}{P} = \text{cálcio por cento m/m}$$

Em óxido de cálcio:

$$\frac{V \times f \times 0{,}2803}{P} = \text{cálcio, em óxido de cálcio, por cento m/m}$$

V = nº de mL da solução de permanganato de potássio 0,02 M gasto na titulação
f = fator da solução de permanganato de potássio 0,02 M
P = nº de g da amostra usado na precipitação

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 289.

AMERICAN SOCIETY for TESTING and MATERIALS. **E 534-86**: standard test methods for chemical analysis of sodium chloride. Philadelphia: A.S.T.M., 1986.

RAFOLS, J.M. Development of Analytical Methods for Commercial Sodium Chloride. In: THIRD SYMPOSIUM ON SALT. NORTHERN OHIO GEOLOGICAL SOC., 1970. p.186-194.

386/IV Determinação de cálcio por titulação com EDTA

Material

Balão volumétrico de 500 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL, proveta de 50 mL, pipeta de 5 mL e bureta de 10 mL.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio a 20% m/v
Calcon a 1% com sulfato de sódio m/m
Propionato de cálcio
Solução alcoólica de negro de eriocromo T a 0,4% m/v

Solução-tampão de pH =10 – Em um balão volumétrico de 1000 mL, dissolva 67,5 g de cloreto de amônio em água destilada, adicione 570 mL de hidróxido de amônio (D = 0,88) e complete o volume com água.

Solução de sal dissódico de EDTA 0,1 M – Pese 37,21 g de $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Solução-padrão de propionato de cálcio – Seque o propionato de cálcio em estufa a 105°C por 6 horas. Pese exatamente 1 g, transfira para um balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de água e complete o volume. Transfira com uma bureta, 10 mL desta solução para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Junte 50 mL de água, 1 mL de solução-tampão pH 10 e 0,5 mL de solução alcoólica de negro de eriocromo T a 0,4%. Titule a solução de EDTA até coloração azul.

Cálculo do fator da solução de EDTA:

$$\frac{0,1}{v \times 0,0186} = f$$

f = fator da solução de EDTA
v= n° de mL de solução de EDTA gasto na titulação

Notas
Conserve a solução em frasco plástico e não use sem verificar o título, se a solução tiver sido preparada há mais de um mês.
Como alternativa, pode-se usar o carbonato de cálcio como solução-padrão (**Apêndice I**).

Solução de sal dissódico de EDTA 0,01 M – Transfira 100 mL da solução padronizada de EDTA 0,1 M para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Procedimento – Pese 50 g da amostra em um béquer e transfira para um balão volumétrico de 500 mL, com o auxílio de 300 mL de água. Deixe em repouso por 12 horas e complete

o volume (solução-estoque A). Transfira 10 mL desta solução para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Junte 50 mL de água e 5 mL de solução de hidróxido de sódio a 20%. Adicione, aos poucos para não formar grumos, calcon a 1% com sulfato de sódio até coloração rósea nítida (aproximadamente 0,1 g) e titule com solução de sal dissódico de EDTA 0,01 M até coloração azul nítida.

Cálculo

v x f x 0,04008 = cálcio por cento m/m

v = nº de mL de solução de EDTA 0,01 M gasto na titulação
f = fator da solução de EDTA

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 290-291.

AMERICAN SOCIETY for TESTING and MATERIALS. **E 534-86**: standard test methods for chemical analysis of sodium chloride. Philadelphia: A.S.T.M., 1986.

RAFOLS, J.M. Development of Analytical Methods for Commercial Sodium Chloride. In: THIRD SYMPOSIUM ON SALT. NORTHERN OHIO GEOLOGICAL SOC., 1970. p. 186-194.

387/IV Determinação de magnésio por precipitação

Material

Proveta de 50 mL, cadinho de Gooch com camada de fibra de óxido de alumínio, bomba de vácuo, frasco Kitassato, bastão de vidro e béquer de 50 mL.

Reagentes

Hidróxido de amônio (1+1)
Solução de fosfato de sódio a 3% m/v
Hidróxido de amônio (1+3)

Procedimento – Concentre, em banho-maria, o filtrado reservado na dosagem de cálcio obtido conforme **386/IV**, até o volume de 200 mL. Alcalinize com hidróxido de amônio (1+1). Adicione 10 mL de uma solução de fosfato de sódio a 3%. Friccione as paredes do béquer com um bastão de vidro. Deixe em repouso por 24 horas. Decante o sobrenadante.

Lave o precipitado e o béquer com 50 mL de hidróxido de amônio (1+3) e filtre em cadinho de Gooch com camada de fibra de óxido de alumínio, previamente aquecido em mufla a 550°C por uma hora, resfriado em dessecador e pesado. Seque em estufa a 105°C. Aqueça em mufla a 550°C, por uma hora. Resfrie em dessecador. Pese. Repita as operações de aquecimento (meia hora em mufla) e resfriamento em dessecador até peso constante.

Cálculos

Em magnésio:

$$\frac{N \times 0{,}21842}{P} = \text{magnésio por cento m/m}$$

Em sulfato de magnésio anidro:

$$\frac{N \times 1{,}08}{P} = \text{sulfato de magnésio anidro por cento m/m}$$

N = n° de g do resíduo calcinado a 550°C (pirofosfato de magnésio)
P = n° de g de amostra usado na precipitação

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 292.

AMERICAN SOCIETY for TESTING and MATERIALS. **E 534-86**: standard test methods for chemical analysis of sodium chloride. Philadelphia: A.S.T.M., 1986.

RAFOLS, J.M. Development of Analytical Methods for Commercial Sodium Chloride. In: THIRD SYMPOSIUM ON SALT. NORTHERN OHIO GEOLOGICAL SOC., 1970. p.186-194.

388/IV Determinação de magnésio por titulação com EDTA

Material

Frasco Erlenmeyer de 250 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, pipeta graduada de 10 mL, proveta de 25 mL, pipeta graduada de 1 mL e bureta de 10 mL.

Reagentes

Solução de EDTA 0,01 M conforme **386/IV**
Solução alcoólica de negro de eriocromo T a 0,4% m/v
Solução tampão pH 10, conforme **386/IV**

Procedimento – Transfira 10 mL da solução estoque A obtida conforme **386/IV** para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Junte 25 mL de água e 10 mL de solução-tampão de pH=10. Adicione 0,5 mL de solução alcoólica de negro de eriocromo T a 0,4%. Titule com EDTA 0,01 M até viragem do indicador, de vermelho para azul nítido.

Cálculo

(v´ - v) x f x 0,02431 = magnésio por cento m/m

v´ = nº de mL de solução de EDTA 0,01 M gasto na titulação correspondente ao Ca^{2+} + Mg^{2+}
f = fator da solução de EDTA
v = nº de mL de solução de EDTA 0,01 M gasto na titulação do cálcio, determinado conforme **386/IV**.

Referências bibliográficas

AMERICAN SOCIETY for TESTING and MATERIALS. **E 534-86**: standard test methods for chemical analysis of sodium chloride. Philadelphia: A.S.T.M., 1986.

RAFOLS, J.M. Development of Analytical Methods for Commercial Sodium Chloride. In: THIRD SYMPOSIUM ON SALT. NORTHERN OHIO GEOLOGICAL SOC., 1970. p. 186-194.

389/IV Determinação de sulfatos por precipitação

Material

Béquer de 250 mL, proveta de 50 mL, funil de 5 cm de diâmetro, cadinho de Gooch com camada de fibra de óxido de alumínio, bomba de vácuo e frasco Kitassato com alonga e anel de borracha.

Reagentes

Ácido clorídrico (D = 1,19)
Solução de cloreto de bário a 10% m/v

Procedimento – Pese 10 g da amostra e transfira para um béquer de 250mL, com auxílio de 100 mL de água. Aqueça até a ebulição e adicione, lentamente, 1 mL de ácido clorídrico. Ferva. Adicione, gota a gota, 10 mL da solução de cloreto de bário a 10%. Aqueça em banho-maria por 1 hora. Deixe em repouso por 12 horas. Decante. Lave o precipitado, filtrando em cadinho de Gooch com camada de fibra de óxido de alumínio, previamente aquecido em estufa a 120°C, por uma hora, resfriado em dessecador e pesado. Lave até que todo íon cloreto tenha sido eliminado (teste adicionando-se no filtrado uma gota de nitrato de prata 0,1 M até não apresentar opalescência). Aqueça em estufa a 120°C, por 1 hora, resfrie no dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

Em íon sulfato:

$$\frac{N \times 0{,}411 \times 100}{P} = \text{sulfato por cento m/m}$$

Em sulfato de sódio

$$\frac{0{,}609 \times N \times 100}{P} - A \times 1{,}18 = \text{sulfatos, em sulfato de sódio, por cento m/m}$$

N = n° de g de sulfato de bário
P = n° de g da amostra usado na precipitação
A = n° de g de sulfato de magnésio anidro por cento

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 293.

AMERICAN SOCIETY for TESTING and MATERIALS. **E 534-86**: standard test methods for chemical analysis of sodium chloride. Philadelphia: A.S.T.M., 1986.

RAFOLS, J.M. Development of Analytical Methods for Commercia Sodium Chloride. In: THIRD SYMPOSIUM ON SALT. NORTHERN OHIO GEOLOGICAL SOC., 1970. p. 186-194.

390/IV Determinação de sulfatos por titulação com EDTA

Material

Pipetas de 1, 5, 10 e 25 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL, bureta de 25 mL e balança analítica.

Reagentes

Ácido clorídrico a 10% v/v
Solução-tampão, pH = 10, descrito conforme em **386/IV**
Solução alcoólica de negro de eriocromo T a 0,4%

Solução de cloreto de magnésio 0,1 M – Dissolva 20,33 g de cloreto de magnésio $MgCl_2.6H_2O$ em água, num balão volumétrico de 1000 mL. Complete o volume. Determine o fator com EDTA 0,1 M, usando 25 mL dessa solução medidos com bureta e proceda como em **388/IV** na dosagem de magnésio, substituindo o EDTA 0,01 M por EDTA 0,1 M.

Solução de cloreto de bário 0,01 M – Dissolva 1,225 g de cloreto de bário com água, em balão volumétrico de 500 mL e complete o volume. Determine o fator com EDTA 0,1 M, transferindo 25 mL de solução de cloreto de bário com auxílio de uma bureta para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, adicione 25 mL de água, 20 mL de EDTA 0,1 M, 10 mL de solução-tampão pH = 10 e 0,5 mL da solução alcoólica de negro de eriocromo T. Titule com a solução de cloreto de magnésio 0,1 M até a viragem de azul para violeta.

Cálculo do fator da solução de cloreto de bário:

$$\frac{(A \times f_1) - (B \times f_2)}{C} = \text{fator da solução de cloreto de bário}$$

A = n° de mL de EDTA 0,1 M usado
B = n° de mL de cloreto de magnésio 0,1 M gasto na titulação
C = n° de mL de cloreto de bário usado, dividido por 10
f_1 = fator da solução de EDTA 0,1 M
f_2 = fator da solução de cloreto de magnésio 0,1 M

Procedimento – Transfira, exatamente, 10 mL da solução-estoque A obtida conforme em **386/IV**, com auxílio de pipeta volumétrica, para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 25 mL de água e 5 gotas de ácido clorídrico a 10%. Aqueça até ebulição e adicione, exatamente, com auxílio de uma bureta, 10 mL da solução de cloreto de bário 0,01 M. Mantenha em ebulição por 1 ou 2 minutos, ou até verificar a formação de precipitado, resfrie e adicione 10 mL de solução-tampão pH =10 e 0,5 mL da solução alcoólica de negro de eriocromo T a 0,4%. Titule com EDTA 0,1 M até a viragem do indicador para coloração azul nítida.

Nota: próximo ao ponto de viragem, após adicionar cada gota da solução da bureta, agite bem antes de prosseguir a titulação, pois a viragem do indicador pode demorar um pouco.

Cálculo

$$\left[\frac{v' \times f}{10} + b - T \times f\right] \times 0{,}96 = \text{sulfatos, em } SO_4^{2-}\text{, por cento m/m}$$

v´ = nº de mL da solução de EDTA 0,01 M gasto na titulação de Ca e do Mg
f = fator da solução de EDTA 0,01 M
b = fator da solução de cloreto de bário 0,01 M
T = nº total de mL da solução de EDTA 0,1 M gasto na titulação

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 294.

AMERICAN SOCIETY for TESTING and MATERIALS. **E 534-86**: standard test methods for chemical analysis of sodium chloride. Philadelphia: A.S.T.M., 1986.

391/IV Determinação da composição provável

Para a determinação da composição provável, o teor de cloreto de sódio é determinado subtraindo-se as porcentagens de umidade, insolúveis e outros sais de 100%.

Procedimento

Calcule os demais sais presentes, da seguinte maneira:
• converta todo íon sulfato em sulfato de cálcio; se houver excesso de íon cálcio, calcule como cloreto de cálcio;

• se houver excesso de íon sulfato, calcule todo íon cálcio como sulfato de cálcio e o excesso de íon sulfato, como sulfato de magnésio; se ainda restar íon sulfato, converta-o em sulfato de sódio;
• se houver excesso de íon magnésio, calcule como cloreto de magnésio;
• o teor de cloreto de sódio é obtido por diferença.

Como resultado, podemos ter sais com pelo menos três composições diferentes:

1°caso – sal com excesso de magnésio ($CaSO_4$, $MgSO_4$ e $MgCl_2$)

2°caso – sal com excesso de cálcio ($CaSO_4$, $CaCl_2$ e $MgCl_2$)

3° caso – sal com excesso de sulfato ($CaSO_4$, $MgSO_4$, e Na_2SO_4)

1º caso – com excesso de magnésio

I – Umidade
II – Insolúveis
III – Ca^{2+}
IV – Mg^{2+}
V – SO_4^{2-}
VI – SO_4^{2-} combinado ao Ca^{2+} = III x 2,3967
VII – Teor de $CaSO_4$ = III + VI
VIII – SO_4^{2-} restante = V - VI
IX – Mg^{2+} combinado com o SO_4^{2-} = VIII x 0,2531
X – teor de $MgSO_4$ = VIII x 1,2531
XI – Mg^{2+} restante = IV - IX
XII – Teor de $MgCl_2$ = XI x 3,9206

2° caso – excesso de cálcio

I – Umidade
II – Insolúveis
III – Ca^{2+}
IV – Mg^{2+}
V – SO_4^{2-}
VI – Ca^{2+} combinado com o SO_4^{2-} = V x 0,4172
VII – Teor de $CaSO_4$ = V + VI
VIII – Ca^{2+} restante = III - VI

IX – Teor de $CaCl_2$ = VIII x 2,7689
X – Teor de $MgCl_2$ = IV x 3,9206

3° caso – excesso de sulfato

I – Umidade
II – Insolúveis
III – Ca^{2+}
IV – Mg^{2+}
V – SO_4^{2-}
VI – SO_4^{2-} combinado ao Ca^{2+} = III x 2,3967
VII – Teor de $CaSO_4$ = III + VI
VIII – SO_4^{2-} restante = V – VI
IX – SO_4^{2-} combinado ao Mg^{2+} = IV x 3,9515
X – Teor de $MgSO_4$ = IV x 4,9514
XI – SO_4^{2-} restante = VIII - IX
XII – Teor de Na_2SO_4 = XI x 1,4786

Nota: os fatores numéricos apresentados nos cálculos foram obtidos pela relação entre os pesos moleculares das espécies químicas envolvidas.

Cálculos

Aplique o cálculo "a", "b" ou "c", dependendo da composição encontrada.

a) 100 – (I + II + VII + X + XII) = cloreto de sódio por cento m/m

I – umidade por cento m/m
II – substâncias insolúveis em água por cento m/m
VII – sulfato de cálcio por cento m/m
X – sulfato de magnésio por cento m/m
XII – cloreto de magnésio por cento m/m

b) 100 – (I + II + VII + IX + X) = cloreto de sódio por cento m/m

I – umidade por cento m/m
II – substâncias insolúveis em água por cento m/m
VII – $CaSO_4$ por cento m/m
IX – $CaCl_2$ por cento m/m
X – $MgCl_2$ por cento m/m

c)100 – (I + II + VII + X + XII) = cloreto de sódio por cento m/m

I = Umidade por cento m/m
II = Substâncias insolúveis em água por cento m/m
VII = $CaSO_4$ por cento m/m
X = $MgSO_4$ por cento m/m
XII = Na_2SO_4 por cento m/m

Nota: Calcule o teor de cloreto de sódio na substância seca.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. *v.1: Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. 3*. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 295.

AMERICAN SOCIETY for TESTING and MATERIALS. **E 534-86**: standard test methods for chemical analysis of sodium chloride. Philadelphia: A.S.T.M., 1986.

0387/IV Sal hipossódico

O sal hipossódico é o produto elaborado a partir da mistura de cloreto de sódio com outros sais, geralmente cloreto de potássio, de modo que a mistura final mantenha as características sensoriais semelhantes as do sal, fornecendo no máximo 50% do teor de sódio contido na mesma quantidade de cloreto de sódio. Estes sais destinam-se a dietas com restrição de sódio.

Nesse tipo de sal são importantes as determinações dos teores de sódio e potássio conforme **394/IV** e **395/IV**, bem como a determinação de iodo conforme **382/IV** ou **383/IV**.

Colaboradores
Neusa Vitória Valério Silveira e Regina Sorrentino Minazzi Rodrigues

CAPÍTULO **XXIII**

MINERAIS E CONTAMINANTES INORGÂNICOS

XXIII

MINERAIS E CONTAMINANTES INORGÂNICOS

A determinação de minerais e contaminantes inorgânicos em alimentos pode ser realizada por diferentes técnicas analíticas. Pode-se citar, entre elas, volumetria com indicadores visuais ou potenciométricos, voltametria de redissolução anódica e técnicas espectrométricas como: espectrofotometria ultravioleta-visível, espectrometria de absorção atômica com chama, com forno de grafite, com vapor frio e com gerador de hidretos e espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado com detecção óptica ou acoplado a espectrômetro de massa. A escolha da técnica analítica depende principalmente do elemento a ser analisado e do nível de sua concentração na amostra, além do número de amostras a serem analisadas, da quantidade de amostra disponível, do tipo de preparo da amostra, do custo envolvido, do tempo disponível para emissão do resultado e também, além da exatidão e precisão requeridas, da disponibilidade do equipamento e de pessoal treinado. Para a determinação de contaminantes e minerais em alimentos, é necessário tornar os analitos disponíveis em solução por meio da mineralização prévia da amostra e posterior dissolução dos resíduos com ácidos minerais. A destruição da matéria orgânica (mineralização e digestão) é geralmente considerada como a etapa crítica da análise, podendo levar a erros no resultado final, devido principalmente à contaminação da amostra ou à perda do analito por adsorção ou volatilização.

Tratamento da amostra

A digestão da amostra pode ser realizada por via seca (carbonização em bico de Bünsen), seguida de calcinação em mufla com temperatura variando de (400-550)°C (dependendo do elemento), ou por via úmida, utilizando-se misturas oxidantes como ácido nítrico, sulfúrico, perclórico, peridrol, entre outros. O tratamento da amostra por via úmida é geralmente realizado empregando-se como fonte de aquecimento uma chapa

aquecedora (método tradicional), mas pode-se também utilizar, entre outras, um sistema de microondas aberto ou fechado. A principal vantagem da via seca, em relação à úmida, é que permite digerir maior quantidade de amostra, o que possibilita a sua utilização na análise de contaminantes inorgânicos em alimentos por técnicas menos sensíveis como espectrometria de absorção atômica com chama - FAAS e espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado - ICP OES. Suas principais desvantagens devem-se ao fato de que o aquecimento excessivo pode levar à perda do analito por volatilização e/ou tornar certos compostos metálicos insolúveis. Já a via úmida não apresenta essas desvantagens, porém há limitação com relação à quantidade de amostra, por utilizar grandes quantidades de oxidantes, acarretando maior custo além do alto risco de contaminação da amostra pelos reagentes e de exigir maiores cuidados por parte do analista. Quanto à utilização de microondas, sua principal vantagem deve-se ao fato de ser um método rápido, porém permite somente o tratamento de pequenas quantidades de amostra sendo, por esse motivo, mais utilizado na análise de contaminantes inorgânicos em alimentos por técnicas mais sensíveis, como espectrometria de absorção atômica com forno de grafite ET-AAS ou espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado a espectrômetro de massa ICP-MS. Os critérios utilizados para a escolha do método de digestão da amostra são: tipo e quantidade de amostra, natureza e concentração do analito na amostra, volatilidade do analito e tipo de técnica analítica para detecção.

393/IV Digestão da amostra

Via Seca

Material

Balança analítica, cápsula de porcelana, mufla, estufa, bico de Bünsen, tela de amianto, pipeta volumétrica, chapa aquecedora e balões volumétricos de 10 ou 25 mL.

Reagentes

Ácido nítrico para análise de traços de metais.

Procedimento – Em cápsula de porcelana, pese ou pipete uma quantidade adequada da amostra previamente homogeneizada, de tal maneira que a leitura do elemento na solução da amostra digerida esteja compreendida na faixa linear da curva-padrão. Caso o alimento seja líquido, coloque a cápsula em estufa a 105°C até secar completamente. Queime a amostra em bico de Bünsen com tela de amianto até cessar o desprendimento

de fumaça, tomando cuidado para evitar respingos e que a amostra se incendeie. Coloque a cápsula na mufla e aqueça gradualmente até (400-450)ºC. Para as determinações de Fe, Ca, Mg, Na, K, Mn, Cr e Cu, a temperatura da mufla poderá ser até 550ºC, deixando nessa temperatura por um período de quatro horas. Retire da mufla e deixe esfriar. Umedeça as cinzas com água desmineralizada e adicione 1 mL de HNO_3. Aqueça até a secura em chapa aquecedora. Retorne para a mufla (400-450)ºC quantas vezes forem necessárias, repetindo a adição de ácido, até a completa mineralização da amostra, ou seja, até a obtenção de cinzas claras, isentas de carvão. Dissolva as cinzas utilizando o ácido indicado de acordo com a técnica analítica usada para a determinação, de tal maneira que a concentração final de ácido seja a mesma que a das soluções-padrão. Aqueça, se necessário, e transfira quantitativamente com água destilada e deionizada para balão volumétrico de 10 ou 25 mL ou um outro volume de acordo com a sensibilidade da técnica analítica a ser usada para a determinação dos elementos. Prepare as amostras em triplicata e um branco dos reagentes em paralelo.

Via úmida (hidrólise com HCl)

Esta técnica de digestão é aplicável em amostras de leite e produtos lácteos, arroz, feijão, pães e biscoitos, para a posterior determinação de analitos por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado.

Material

Balança analítica, frasco Erlenmeyer de 125 mL, chapa aquecedora, pipeta volumétrica, funis, balão volumétrico de 25 mL, papel de filtro e vidro de relógio ou filme de PVC.

Reagentes

Ácido clorídrico para análise de traços e metais
Água destilada e deionizada

Procedimento - Em frasco de Erlenmeyer de 125 mL, pese ou pipete uma quantidade adequada de amostra previamente homogeneizada, de tal maneira que a leitura do elemento na solução de amostra digerida esteja compreendida na faixa linear da curva-padrão. Caso a amostra seja sólida, adicione um pouco de água para dissolver o pó. Adicione 5 mL de ácido clorídrico 1:1 (v/v). Coloque o frasco Erlenmeyer sobre chapa aquecedora a (100-150)ºC, cobrindo com vidro de relógio ou filme PVC, agitando ocasionalmente e mantendo o refluxo por 2 horas. Filtre a solução, ainda quente, diretamente para um balão volumétrico de 25 mL. Complete o volume com água após a solução ter atingido

a temperatura ambiente. Caso a solução não seja lida no dia, transfira-a para um frasco de polietileno. Prepare as amostras em triplicata e um branco dos reagentes em paralelo.

Nota: para amostras de arroz e de feijão é recomendável que o contato da amostra com o ácido seja mantido em repouso durante a noite. Aqueça em chapa aquecedora por 3 horas.

Referências bibliográficas

KIRA, C.S. **Estudo da composição mineral e dos elementos-traço essenciais em amostras de leite e produtos lácteos por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido e análise por ativação com nêutrons**. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2002.

OKADA, I.A. **Determinação simultânea de nutrientes inorgânicos em alimentos: desenvolvimento de metodologia analítica e avaliação de seus níveis em amostras de arroz e feijão** *in natura*. Dissertação (mestrado) – Coordenação dos Instituto de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2003.

394/IV Determinação de minerais por espectrometria de absorção atômica com chama

O método apresentado refere-se à quantificação dos minerais: ferro, cobre, cálcio, magnésio, zinco, manganês, sódio e potássio em alimentos. Baseia-se na determinação por espectrometria de absorção atômica com chama dos referidos minerais em uma amostra representativa do alimento, previamente digerida.

Material

Espectrômetro de absorção atômica com chama equipado com corretor de *background*, lâmpada do elemento a ser determinado, mufla, chapa aquecedora, balança analítica, estufa, balões volumétricos, cápsulas de porcelana e pipetador automático com volume ajustável.

Reagentes

Ácido nítrico para análise de traços de metais
Ácido clorídrico para análise de traços de metais

Soluções-padrão estoque, de 1000 mg/L dos seguintes elementos: Fe, Ca, Mg, Zn, Cu,

Mn, Na e K para absorção atômica, com certificado de análise e incerteza associada. Solução-padrão estoque intermediária de 100 mg/L do elemento a ser analisado – Pipete 10 mL da solução-padrão de 1000 mg/L do elemento a ser analisado em balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com solução ácida. Mantenha as soluções-padrão em frascos de polietileno.

Solução de lantânio 1% (m/v) – Pese 11,7 g de La_2O_3 e adicione água destilada e deionizada suficiente para umedecer o óxido. Acrescente lentamente, 50 mL de HCl (cuidado: reação exotérmica) para dissolver o óxido. Transfira para balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Esta solução é estável por seis meses.

Solução de césio 10% (m/v) – Pese 12,7 g de CsCl e dissolva em água destilada e deionizada. Transfira, com água, para um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume e agite. Esta solução é estável por seis meses.

Procedimentos

Ajuste do equipamento – Opere o equipamento de acordo com o manual de instruções do fabricante. Ajuste o queimador, a chama e a nebulização para obtenção de máxima absorbância, utilizando uma solução-padrão utilizada na curva-padrão.

Curva-padrão – Pipete, em balões volumétricos, alíquotas adequadas da solução-padrão estoque intermediária do elemento a ser analisado. As concentrações, para cada elemento, variam de acordo com a sensibilidade e a faixa linear de trabalho do equipamento. As soluções-padrão devem ser preparadas de tal forma que contenham os reagentes em concentrações similares às adicionadas nas amostras. Transfira as soluções para frascos de polietileno.

Preparação da amostra – O pré-tratamento e a digestão da amostra seguem os procedimentos de tratamento da amostra e do método **393/IV,** respectivamente, e a temperatura da mufla deverá ser, no máximo, 550ºC. Dissolva as cinzas com uma alíquota adequada de ácido clorídrico concentrado, de modo que a concentração final do ácido no balão volumétrico seja 10%. Aqueça, se necessário, para melhor dissolução. Transfira com água destilada e deionizada para um balão volumétrico e complete o volume. No caso de digestão por via úmida, filtre, se necessário, recolhendo o filtrado no balão volumétrico e o volume completado com água destilada e deionizada. Prepare a amostra em triplicata e um branco dos reagentes, em paralelo.

Determinação de Ca e Mg – Pipete, em balões volumétricos, alíquotas da amostra, do branco dos reagentes e dos padrões e adicione solução de $LaCl_3$, de tal forma que a concentração final seja 0,1% em La m/v. Zere o equipamento com o branco e faça a leitura das absorbâncias das soluções-padrão. Construa a curva-padrão para cada elemento a ser determinado usando regressão linear e utilize o coeficiente angular da reta (absortividade)

para os cálculos. Alternativamente, o equipamento poderá ser programado para estabelecer a curva-padrão e fornecer leitura das amostras diretamente em concentração. Faça a leitura das amostras. Se necessário, dilua uma nova alíquota da amostra para que a leitura de absorbância fique compreendida na faixa linear da curva-padrão e adicione solução de cloreto de lantânio de tal forma que a concentração final seja 0,1% em lantânio m/v.

Determinação de Na e K – O sódio interfere na análise de potássio e vice-versa. Para evitar esse tipo de interferência, deve-se adicionar um supressor de ionização que, no caso da análise de sódio, é o potássio e vice-versa para o potássio.

Para a determinação de Na e K na mesma solução, adicione em cada solução-padrão, branco e amostra, solução de césio a 10% m/v, como supressor de ionização, de tal forma que a concentração de Cs na amostra e nas soluções-padrão seja de 0,5% m/v. Zere o equipamento com o branco e faça a leitura das absorbâncias das soluções-padrão. Estabeleça a curva-padrão para cada elemento a ser determinado usando regressão linear e utilize o coeficiente angular da reta (absortividade) para os cálculos. Alternativamente, o equipamento poderá ser programado para estabelecer a curva-padrão e fornecer leituras das amostras diretamente em concentração. Em seguida, faça a leitura das amostras. Se necessário, dilua uma nova alíquota da solução da amostra com adição do supressor de ionização para que a leitura de absorbância fique compreendida na faixa linear da curva-padrão e calcule a concentração de acordo com a equação a seguir:

Cálculo

$$\frac{(A_a - A_b) \times d \times V_1}{a \times m \text{ (ou } v)} = \text{concentração do elemento na amostra, em mg/kg ou mg/L}$$

A_a = absorbância da amostra
A_b = absorbância do branco da amostra
a = absortividade, calculada a partir da curva de calibração
V_1 = volume do balão no qual a amostra foi transferida após dissolução
d = fator de diluição da amostra
v = volume da amostra, em mL
m = massa da amostra, em g

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Anaytical Chemists**. 16th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1995, Chapter 50, p. 14. (method 985.35).

395/IV Determinação de minerais por espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio indutivamente acoplado

Este método é aplicado para a determinação de cálcio, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo e zinco em alimentos por espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES), nas amostras previamente mineralizadas por via úmida conforme **393/IV**.

Material

Espectrômetro de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES), mufla, balança analítica, estufa, chapa aquecedora, pipetadores automáticos com volumes ajustáveis, frascos de polietileno, cápsulas de porcelana e balões volumétricos.

Reagentes

Ácido nítrico para análise de traços de metais
Ácido clorídrico para análise de traços de metais

Solução-padrão estoque de 1000 mg/L ou 10000 mg/L dos elementos a serem analisados, com certificado análise e incerteza associada.

Procedimentos

Ajuste do equipamento – Os parâmetros instrumentais devem ser otimizados segundo o manual de instruções do fabricante.

Preparação da amostra – A digestão da amostra segue o procedimento **393/IV**. Dissolva as cinzas resultantes da digestão da amostra com ácido clorídrico concentrado, de tal modo que a concentração final de HCl seja 10% v/v. Aqueça, se necessário, para melhor dissolução. Transfira quantitativamente com água destilada e deionizada para balão volumétrico. Alternativamente para alguns alimentos pode-se proceder a digestão da amostra por via úmida.

Curva-padrão – Prepare as soluções-padrão de trabalho multi-elementar, a partir da solução-padrão estoque, com no mínimo seis pontos, levando em consideração a sensibilidade do equipamento e a faixa linear de trabalho para cada elemento. As soluções são preparadas em meio de ácido clorídrico a 10% v/v.

Determinação – Zere o equipamento com solução de HCl 10%. Estabeleça a curva-

padrão para cada elemento a ser determinado usando regressão linear. Faça a leitura das amostras e verifique a calibração após analisar 20 amostras, utilizando uma das soluções da curva-padrão. Caso a leitura apresente uma variação maior que a estabelecida pelo laboratório, recalibre. Se necessário, dilua a solução da amostra para que a leitura fique compreendida na faixa linear da curva-padrão.

Cálculo

$\frac{L \times b \times d}{m \text{ (ou } v)}$ = concentração do elemento na amostra, em mg/kg ou mg/L

L = leitura da amostra, em mg/L
b = volume do balão para o qual a cinza da amostra foi transferida, em mL
d = fator de diluição da amostra (caso necessário)
m = massa da amostra, em g
v = volume da amostra, em mL

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed., v. 1, Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 3. p. 4. (method 985.01).

396/IV Determinação de cálcio por volumetria com EDTA

O método refere-se à determinação de cálcio em presença de magnésio. Baseia-se na mineralização da amostra e determinação de cálcio por titulação complexométrica com EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético), usando uma mistura de ácido calconcarboxílico, alaranjado de metila e cloreto de sódio, como indicador.

Material

Mufla, estufa, balança analítica, chapa aquecedora, cápsula de porcelana, balões volumétrios, frascos Erlenmeyer de 125 mL, bureta e almofariz com pistilo.

Reagentes

Solução-padrão de EDTA 0,01 M – Pese exatamente 3,722 g de EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$). Dissolva e transfira quantitativamente para balão volumétrico

de 1000 mL, com água destilada e deionizada. Complete o volume com água e agite. Transfira para um frasco de polietileno. Determine a molaridade da solução seguindo a técnica descrita no **apêndice I**.

Indicador – Pese 0,5 g de indicador ácido calcon carboxílico, 0,25 g de alaranjado de metila e 49,25 g de cloreto de sódio. Triture os três reagentes em almofariz e guarde em frasco âmbar.

Hidróxido de sódio ou de potássio
Ácido clorídrico para análise de traços de metais
Ácido nítrico para análise de traços de metais

Procedimento

Preparação da amostra – O pré-tratamento e a digestão da amostra seguem os procedimentos de tratamento da amostra e do método **393/IV,** respectivamente. Dissolva as cinzas com uma alíquota adequada de ácido clorídrico concentrado, de modo que a concentração final de ácido no balão seja 10% v/v. Aqueça, se necessário, para melhor dissolução. Transfira com água destilada e deionizada para balão volumétrico e complete o volume.

Determinação - Pipete, em um frasco Erlenmeyer de 125 mL, uma alíquota da solução da amostra previamente mineralizada que contenha cerca de 5 mg de cálcio e adicione 50 mL de água. Ajuste o pH da solução para a faixa de pH de (12-14), adicionando pastilhas de hidróxido de sódio ou de potássio. Adicione a mistura do indicador até que a solução adquira a coloração vinho. Titule com a solução de EDTA 0,01 M, agitando vigorosamente ou utilizando agitador magnético, até que a coloração da solução da amostra mude para cor verde persistente. Titule um branco preparado da mesma forma, com todos os reagentes utilizados na amostra. Calcule a concentração de cálcio, usando a fórmula a seguir.

Cálculo

$$\frac{40 \times (V_A - V_B) \times V_b \times M \times 100}{V_a \times m} = \text{mg de cálcio, por cento, m/m ou m/v}$$

V_A = volume de EDTA gasto na tilulação da amostra, em mL
V_B = volume de EDTA gasto na titulação do branco, em mL
V_b = volume do balão volumétrico para o qual a amostra foi transferida, em mL
V_a = alíquota da amostra usada na titulação, em mL

m = massa da amostra, em g
M = molaridade do EDTA

Referência bibliográfica

E. MERCK AG. **Métodos complexométricos de valoración con Titriplex**. 3 ed. Darmstadt, Alemanha. p. 25.

397/IV Determinação espectrofotométrica de ferro com α-α'-dipiridila

O método é aplicável a alimentos naturais e enriquecidos, e baseia-se na complexação do ferro (II) com α-α'-dipiridila e determinação por espectrofotometria na região do visível.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, balança analítica, mufla, estufa, chapa aquecedora, balões volumétricos, cápsulas de porcelana, pipetas volumétricas e béqueres.

Reagentes

Ácido clorídrico para análise de traços de metais
Ácido nítrico para análise de traços de metais

Solução de α-α'-dipiridila 0,1% – Dissolva 0,1 g de α-α'-dipiridila em água destilada e deionizada e dilua a 100 mL. Este reagente é estável por várias semanas, se for mantido em local fresco e escuro.

Solução-tampão acetato/ácido acético – Dissolva em água destilada e deionizada 8,3 g de acetato de sódio com baixo teor de ferro, previamente seco a 100ºC em estufa. Adicione 12 mL de ácido acético e dilua a 100 mL.

Solução-padrão estoque de ferro (1000 mg/L) – Dissolva 3,512 g de sulfato de ferro II e amônio hexahidratado [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$] em água destilada e deionizada. Adicione 2 gotas de HCl concentrado. Transfira para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume.

Nota: alternativamente, poderá ser utilizada solução-padrão de 1000 mg/L de Fe para espectrofotometria de absorção atômica.
Solução-padrão intermediária de ferro (0,01 mg/mL) – Pipete 1 mL da solução- estoque

de ferro para um balão volumétrico de 100 mL. Adicione 2 mL de HCl e complete o volume com água destilada e deionizada.

Solução de cloridrato de hidroxilamina a 10% (m/v) – Dissolva 10 g de $H_2NOH.HCl$ em água destilada e deionizada e dilua a 100 mL.

Procedimentos

Ajuste do equipamento – Ajuste o espectrofotômetro UV/VIS conforme as instruções do fabricante, para leitura em 510 nm.

Preparação da amostra – A quantidade de amostra a ser digerida deve ser proporcional à quantidade de ferro presente no alimento. O pré-tratamento e digestão da amostra seguem os procedimentos de tratamento da amostra e do método **393/IV,** respectivamente. Dissolva as cinzas em 0,5 mL de ácido clorídrico. Aqueça, se necessário, para melhor dissolução. Transfira com água destilada e deionizada para balão volumétrico de 25 mL e complete o volume. Prepare um branco da amostra.

Curva-padrão – Em uma série de béqueres de 150 mL, pipete alíquotas de 1, 2, 5 e 10 mL da solução-padrão intermediária de Fe de 0,01 mg/mL, correspondentes às concentrações de 0,01, 0,02, 0,05 e 0,1 mg de ferro. Adicione 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina a 10% m/v . Aqueça até a ebulição, durante 10 minutos. Esfrie e transfira esta solução para um balão volumétrico de 50 mL. Adicione 5 mL de solução-tampão de acetato/ácido acético e 2 mL de α-α'-dipiridila, a 0,1%. Complete o volume com água destilada e deionizada. Homogeneíze a solução. Prepare um branco da mesma forma, usando uma alíquota da solução de ácido clorídrico a 2% (essa alíquota deve ser igual à maior alíquota do padrão usado). Zere o equipamento com o branco e faça a leitura de absorbância das soluções-padrão em espectrofotômetro a 510 nm. Construa a curva-padrão, usando a regressão linear e calcule o coeficiente angular.

Determinação – Pipete volume adequado da solução de amostra (de acordo com a quantidade de ferro na amostra) para um béquer de 150 mL. Continue como em curva-padrão a partir de "...1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina a 10 % ...". Prepare um branco da mesma forma com todos os reagentes usados na amostra. Espere 10 minutos para completar o desenvolvimento da cor vermelha. Leia a absorbância do branco e da amostra. Determine a quantidade de ferro, usando a fórmula a seguir.

Cálculo

$$\frac{(A - A_0) \times V \times 100}{a \times m \times V_1} = \text{mg de ferro, por cento, m/m}$$

A = absorbância da amostra
A_0 = absorbância do branco da amostra
V = volume do balão onde foram transferidas as cinzas, em mL
m = massa da amostra, em g
a = coeficiente angular da curva-padrão
V_1 = volume da alíquota da amostra usada na reação, em mL

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1995, Chapter 32. p. 3-4. (method 944.02).

398/IV Determinação de fósforo por espectrofotometria na região do visível

O método é aplicável à determinação de fósforo em alimentos. Baseia-se na complexação do fósforo com vanado-molibdato de amônio e determinação por espectrofotometria na região do visível.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, balança analítica, mufla, estufa, chapa aquecedora, balões volumétricos, cápsulas de porcelana, pipetas volumétricas, provetas e béqueres.

Reagentes

Ácido clorídrico para análise de traços de metais
Ácido nítrico para análise de traços de metais

Solução-padrão estoque de fósforo (2,0 mg de P por mL) – Pese exatamente 4,3937 g de fosfato ácido de potássio (KH_2PO_4), seco a 105ºC em estufa por aproximadamente 2 horas. Transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Estoque sob refrigeração.

Solução-padrão de trabalho de fósforo (0,1 mg de P por mL) – Pipete 5 mL da solução-

padrão estoque de fósforo em um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água destilada e deionizada. Prepare esta solução no dia do ensaio.

Solução de vanado-molibdato de amônio – Pese, separadamente, 20 g de molibdato de amônio [$(NH_4)_6$ $Mo_7O_{24}.4H_2O$] e 1 g de vanadato de amônio (NH_4VO_3). Dissolva cada sal em cerca de 300 mL de água quente e filtre, se necessário. Misture as duas soluções. Adicione 140 mL de HNO_3 concentrado e complete o volume a 1000 mL com água destilada e deionizada.

Nota: o reagente é estável, se acondiconado em frasco de polietileno. Quando estocado em frasco de vidro pode formar precipitado; neste caso, descarte o reagente.

Procedimento

Ajuste do equipamento – O espectrofotômetro UV/VIS deve ser ajustado conforme o manual de instruções do fabricante para leitura em 420 nm.

Preparação da amostra - A quantidade de amostra a ser digerida deve ser proporcional à quantidade de fosfato presente no alimento. O pré-tratamento e a digestão da amostra seguem os procedimentos de tratamento da amostra e do método **393/IV**, respectivamente. Dissolva as cinzas em 10 mL de ácido clorídrico e 1 a 2 mL de HNO_3 concentrado. Leve à ebulição, por cerca de cinco minutos, em chapa quente para hidrolisar os polifosfatos. Resfrie e transfira com água destilada e deionizada para balão volumétrico de 100 mL e complete o volume. Prepare um branco da amostra.

Curva-padrão – Em uma série de balões volumétricos de 50 mL, pipete volumes da solução-padrão de trabalho contendo de 0,2 a 1,5 mg de fósforo (essas alíquotas podem variar de acordo com a sensibilidade e a faixa linear de trabalho do equipamento). Adicione 10 mL do reagente vanado-molibdato de amônio em cada balão. Complete o volume com água destilada e deionizada. Homogeneíze e espere 10 minutos para fazer a leitura. Prepare um branco dos reagentes da mesma forma. Zere o equipamento com o branco dos reagentes e leia a absorbância dos padrões. Faça a regressão linear e calcule coeficiente angular da curva.

Determinação – Em um balão volumétrico de 50 mL, pipete uma alíquota adequada da amostra, de tal forma que a leitura da absorbância esteja compreendida na faixa linear da curva-padrão. Adicione 10 mL do reagente vanado-molibdato de amônio e complete o volume com água destilada e deionizada. Homogeneíze e espere 10 minutos para fazer a leitura. Calcule a quantidade de fósforo usando a fórmula a seguir.

Cálculo

$$\frac{(A - A_0) \times V \times 100}{a \times m\ (ou\ v) \times V_1} = mg\ de\ fósforo,\ por\ cento,\ m/m\ ou\ m/v$$

A = absorbância da amostra
A_0 = absorbância do branco da amostra
V = volume do balão onde foram transferidas as cinzas, em mL
m = massa da amostra, em g
v = volume da amostra em mL
a = coeficiente angular da curva-padrão
V_1 = volume da alíquota da amostra usada na reação em mL

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 39. p. 4. (method 969.31).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 50. p. 12. (method 986.24).

399/IV Determinação de chumbo por espectrometria de absorção atômica com chama

Após a mineralização da amostra por via seca, o chumbo é concentrado por complexação com pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC), extraído com metilisobutilcetona e quantificado por espectrometria de absorção atômica com chama.

Material

Espectrômetro de absorção atômica com chama equipado com corretor de *background*, utilizando nebulizador de pérola de impacto e lâmpada de chumbo, mufla, chapa aquecedora, balança analítica, estufa, balões volumétricos de 10, 50 e 100 mL, cápsulas de porcelana, pipetas automáticas com volume ajustável de 0,5 a 5 mL e pipetas automáticas com volume ajustável de 100 a 1000 µL.

Reagentes

Ácido nítrico para análise de traços de metais
Ácido clorídrico para análise de traços de metais
MIBC (metilisobutilcetona) saturada com água – Abra o frasco contendo 1000 mL do solvente, adicione água destilada e deionizada até preencher o seu volume total. Agite.

Solução aquosa de APDC (pirrolidina ditiocarbamato de amônio) a 2% m/v – Dissolva 2 g de APDC em 100 mL de água destilada e deionizada. Esta solução deve ser preparada no dia do ensaio.

Solução aquosa de ácido cítrico a 10% m/v – Dissolva 10 g de ácido cítrico em 100 mL de água destilada e deionizada. Esta solução deve ser preparada no dia do ensaio.

Solução alcoólica de verde de bromocresol a 0,1% m/v – Dissolva 0,1 g de verde de bromocresol em 100 mL de álcool.

Solução de hidróxido de amônio (1:1) v/v
Solução de ácido nitríco 10% v/v
Solução-padrão estoque de chumbo de 1000 mg/L

Solução-padrão estoque intermediária de chumbo de 40 mg/L – Pipete 4 mL da solução-padrão de 1000 mg/L em balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com solução de HNO_3 a 2% v/v.

Solução-padrão de trabalho de chumbo de 0,8 mg/L – Pipete 2 mL da solução intermediária de chumbo, em balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com água destilada e deionizada. Esta solução deve ser preparada no dia do ensaio.

Procedimento

Preparação da amostra – O pré-tratamento e a digestão da amostra seguem os procedimentos de tratamento da amostra e do método **393/IV**, respectivamente. Dissolva as cinzas com alíquota adequada de ácido clorídrico concentrado de modo que a concentração final de ácido no balão seja 10%. Aqueça, se necessário, para melhor dissolução. Transfira com água destilada e deionizada para balão volumétrico e complete o volume.

Complexação e extração do chumbo – Em um balão volumétrico de 50 mL, pipete 5 mL da amostra dissolvida. Se necessário, utilize outra alíquota de modo que a leitura da absorbância fique dentro da faixa linear da curva-padrão. Adicione 1 mL da solução de ácido cítrico a 10% m/v e 3 gotas da solução do indicador verde de bromocresol. Neutralize com solução aquosa de NH_4OH (1:1), até que a coloração da solução mude para azul (pH=5,4). Se ocorrer a formação de um precipitado devido ao excesso de NH_4OH, dissolva com a adição de algumas gotas de HNO_3 a 10% v/v. Adicione 2 mL de solução de APDC a 2% m/v e agite. Acrescente 2 mL de MIBC, agite o balão por cerca de 2 min e 30 s e adicione água destilada e deionizada até que a fase orgânica atinja a parte superior do gargalo do balão. Prepare o branco com todos os reagentes usados.

Curva-padrão – Pipete em balões volumétricos de 50 mL, em triplicata, 0,25, 0,5, 1,0;

1,5; 2,0 e 2,5 mL da solução-padrão de trabalho de chumbo de 0,8 mg/L, correspondentes às concentrações finais de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mg/L.

Ajuste do equipamento – Ajuste o espectrômetro de absorção atômica de acordo com o manual de instruções do fabricante, usando o comprimento de onda 283,3 nm e chama oxidante de ar/acetileno. Ajuste a chama e a nebulização para obtenção de máxima absorbância, utilizando a solução-padrão de chumbo de 0,8 mg/L.

Complexação e extração dos padrões (curva-padrão) – Complexe e extraia as soluções-padrão seguindo o procedimento da amostra. Prepare e extraia também um padrão de 0,8 mg/L, pipetando em balão de 50 mL, 400 µL do padrão de chumbo de 40 mg/L e extraia em 20 mL de MIBC. Esse padrão servirá para o ajuste do equipamento.

Determinação – Zere o equipamento com o MIBC e faça a leitura das absorbâncias do branco e dos padrões. Estabeleça a curva-padrão usando regressão linear e calcule o coeficiente angular. Faça a leitura das amostras e calcule a concentração de chumbo usando a fórmula a seguir.

Cálculo

$$\frac{(A_a - A_b) \times V \times V_1}{a \times V_2 \times m} = \text{concentração de chumbo na amostra, em mg/kg ou mg/L}$$

A_a = absorbância da amostra
A_b = absorbância do branco da calibração
a = absortividade, obtida a partir da curva-padrão
V = volume do solvente orgânico, em mL
V_1 = volume do balão para o qual foi transferida a amostra, em mL
V_2 = volume da alíquota da amostra utilizada para a extração, em mL
m = massa da amostra, em g

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed., v. 1: Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 9. p. 16. (method 973.35).

400/IV Determinação de cádmio por espectrometria de absorção atômica com chama

O método é aplicável na determinação de cádmio em alimentos. A matéria orgânica é destruída por via seca, a cinza obtida é dissolvida em ácido clorídrico e o cádmio é determinado utilizando a técnica da espectrometria de absorção atômica com chama.
Material

Espectrômetro de absorção atômica com chama equipado com corretor de *background* e lâmpada de catodo oco de cádmio, mufla, chapa aquecedora, balança analítica, balões volumétricos de 10 e 100 mL, cápsulas de porcelana, pipeta automática com volume ajustável de 0,5 a 5,0 mL e pipeta automática com volume ajustável de 100 a 1000 µL.

Reagentes

Ácido nítrico para análise de traços de metais
Ácido clorídrico para análise de traços de metais
Solução-padrão estoque de cádmio de 1000 mg/L

Solução-padrão estoque intermediária de cádmio de 100 mg/L - Pipete 10 mL da solução-padrão de 1000 mg/L em um balão volumétrico de 100 mL. Complete o volume com solução de HNO_3 a 2%.

Procedimento

Preparação da amostra – O pré-tratamento e digestão da amostra seguem os procedimentos de tratamento da amostra e do método **393/IV**, respectivamente. Dissolva as cinzas em ácido clorídrico, de modo que, no volume final do balão, a concentração final de ácido seja 10 %. Aqueça se necessário e transfira com água destilada e deionizada para balão volumétrico. Complete o volume.

Curva-padrão – Em balões volumétricos de 100 mL, pipete (0,2; 0,5; 1 e 2) mL da solução-padrão intermediária de cádmio (que correspondem às concentrações finais de (0,2; 0,5; 1 e 2) mg/L e complete o balão com HCl 10%.

Ajuste do equipamento – Ajuste o equipamento de acordo com o manual de instruções do fabricante usando como comprimento de onda 228,8 nm e chama oxidante de ar/acetlileno. Ajuste a nebulização para obtenção de máxima absorbância, utilizando um dos padrões da curva-padrão.

Determinação – Zere o equipamento com o branco, faça as leituras dos padrões, construa a curva-padrão e calcule o coeficiente angular. Faça a leitura das amostra e calcule a concentração usando a fórmula a seguir:

Cálculo

$$\frac{(A_a - A_b) \times V}{a \times m} = \text{concentração de cádmio na amostra, em mg/kg}$$

A_a = absorbância da amostra

A_b = absorbância do branco da amostra
a = absortividade
V = volume do balão no qual foi transferida a amostra, em mL
m = massa da amostra, em g

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed., v. 1: Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 9. p. 16. (method 973.35).

Colaboradores
Alice Momoyo Sakuma, Carmen Silvia Kira, Franca Durante de Maio, Isaura Akemi Okada, Márcia Liane Buzzo, Maria Cristina Duran e Maria de Fátima Henriques Carvalho

CAPÍTULO **XXIV**

MICOTOXINAS

XXIV

MICOTOXINAS

Devido aos graves problemas que as micotoxinas acarretam, muitos países têm estabelecido medidas para o seu controle nos alimentos destinados ao consumo humano e animal.

Cada vez maior é o número de países que importam e exportam grandes quantidades de alimentos, e isto leva a novos desafios para a indústria alimentícia e para os órgãos reguladores responsáveis pelo cumprimento das normas relativas à inocuidade dos alimentos comercializados e à proteção dos consumidores.

Micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por alguns fungos denominados de fungos toxigênicos, sendo os principais representantes os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium.* Entre as principais micotoxinas de interesse na área de alimentos citamos: aflatoxinas, patulina, ocratoxina, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas entre outras. As aflatoxinas são as que apresentam maior importância sob o ponto de vista toxicológico.

As micotoxinas são produzidas somente quando certas condições ambientais, tais como temperatura e umidade, além das características bioquímicas dos produtos que servem como substrato, são propícias para a sua produção.

Outro fator muito importante na produção das micotoxinas é a integridade física do cereal. A contaminação poderá ocorrer mesmo em material armazenado, porque lesões mecânicas ou provocadas por insetos ou durante o processamento, tornam os cereais muito susceptíveis à proliferação de fungos.

Em quase todas as matérias-primas destinadas a gêneros alimentícios, tais como: arroz, milho, feijão, trigo, cevada, soja, castanha-do-pará, nozes, amendoim, café, sorgo, semente de algodão, frutas, presunto, queijo, leite e até vinho, já foram detectados um ou mais tipos de micotoxinas.

Por se tratar de importante problema de saúde pública, à análise de micotoxinas devem ser empregados métodos que proporcionem credibilidade e confiabilidade aos resultados analíticos emitidos pelo laboratório.

Riscos no manuseio de micotoxinas

A micotoxina pura na forma de cristal (sal), especialmente as aflatoxinas, pela sua natureza eletrostática, tende a se dispersar na área do laboratório. Precauções especiais são necessárias para se evitar a contaminação do ar, bancadas, paredes e frascos. Recomenda-se lavar o local contaminado com solução de hipoclorito de sódio a 5% e acetona. Durante o manuseio das micotoxinas, torna-se necessário o uso de luvas e máscaras. O preparo de soluções-padrão a partir de micotoxinas na forma cristalina deve ser realizado em capela de exaustão de vapores orgânicos. Descontamine o material utilizado no laboratório com solução de hipoclorito de sódio a 5% e acetona antes de ser descartado.

As micotoxinas e a amostragem

O processo de amostragem, prévio à atividade laboratorial, é responsável pelo sucesso ou fracasso de uma informação analítica. Excetuando os líquidos, os outros produtos têm uma distribuição heterogênea quando contaminados. Sabe-se que as aflatoxinas em um lote de amendoim podem estar concentradas em até 0,5% dos grãos e que alguns deles podem estar contaminados com teores excessivamente elevados. Até mesmo a distribuição destas micotoxinas em um único grão de amendoim não é uniforme e pode estar concentrada em uma pequena área superficial do grão.

O conhecimento ou o estabelecimento prévio dos riscos envolvidos na amostragem, que é a etapa determinante na variação dos resultados analíticos, torna-se essencial para que todo processo de análise não seja invalidado e, na maioria das vezes, gerando resultados sem qualquer significado analítico.

Considerando as aflatoxinas como exemplo, por serem as mais estudadas, o erro de amostragem tem sido demonstrado ser grande. Os grãos individuais de amendoim podem conter esta micotoxina em até 1000000 ng/g, caroços de algodão mais do que 5000000 ng/g e grãos de milho até 400000 ng/g. Estes extremos na concentração de aflatoxinas em unidades individuais do produto explica a grande variabilidade nos resultados de um lote em particular e a extensão do erro na amostragem.

A literatura descreve vários planos de amostragem que, para aplicação em análises fiscais torna-se inviável, mas como sugestão indicamos algumas referências, para análise de micotoxinas que integram a Resolução-RDC nº 274, de 15/10/2002, publicada no DOU em 16/10/2002 e de uma que consta da Diretiva da Comissão Européia:

1-Directive 98/53/EC
2-FAO Foods and Nutrition Paper, 55, Rome, 1993.
3-Norma FIL-IDF 50 B, 1985. Métodos de amostragem para leite e produtos lácteos.

4-Norma ISO 950, 1979. Amostragem de cereais em grãos.
5-Waltking, A.E. Amostragem e preparação de amostras de manteiga de amendoim para análise de aflatoxinas. J.A.O.A.C. 63:103-106, 1980.

401/IV Determinação de aflatoxina M_1 em leite por cromatografia em camada delgada

Este método baseia-se na extração com solvente orgânico, limpeza com celite e partição liquido-liquido, extração com clorofórmio, separação por cromatografia em camada delgada (CCD), quantificação visual por comparação com padrão e confirmação por derivatização com ácido trifluoroacético. O limite de quantificação do método é 0,3 µg/L.

Material

Agitador mecânico horizontal, balança semi-analítica, banho-maria ou rotavapor, cabine com lâmpada UV onda longa (λ = 366 nm), capela de exaustão para solventes orgânicos, espectrofotômetro UV/VIS, bastão de vidro, balão volumétrico, béquer de 500 mL, cuba cromatográfica, frasco Erlenmeyer de 500 mL, frasco âmbar de 5 mL, funil, funil de separação de 1000 mL, proveta de 100 mL, pipeta de 10 mL, microsseringas de 10, 25 e 100 µL, papel de filtro qualitativo e cromatofolha ou cromatoplaca de sílica gel G sem indicador de fluorescência (20 x 20) cm.

Reagentes

Acetona
Acetonitrila
Ácido sulfúrico (1:3)
Benzeno
Celite
Cloreto de sódio
Clorofórmio
Hexano
Isopropanol
Metanol
Nitrogênio
Aflatoxina M_1 padrão
Sulfato de sódio anidro
Tolueno
Ácido trifluoroacético – TFA
Solução TFA – Misture ácido trifluoroacético e hexano na proporção de 1:3 v/v

Procedimento

Preparação e veridicação de soluções-padrão – Proceda conforme **403/IV**

Preparação da amostra – Agite 75 mL de leite com 300 mL de metanol e 25 g de celite em frasco Erlenmeyer, por 30 minutos, em agitador mecânico horizontal. Filtre em papel de filtro, recolha a fase metanólica em funil de separação e adicione 225 mL de solução de cloreto de sódio a 4% m/v. Acrescente 100 mL de hexano e agite por 3 minutos. Recolha a fase metanólica e descarte a fase hexânica. Repita esta operação mais duas vezes. Adicione 100 mL de clorofórmio na fase metanólica e agite por três minutos e recolha o clorofórmio. Repita esta operação mais duas vezes. Junte as porções de clorofórmio em um funil de separação e adicione 300 mL de solução de cloreto de sódio a 4%. Agite e filtre a fase clorofórmica em papel de filtro com sulfato de sódio anidro. Recolha o clorofórmio, evapore até próximo à secura e transfira, quantitativamente com clorofórmio, para um frasco âmbar. Evapore o conteúdo do frasco âmbar sob corrente de nitrogênio até resíduo e proceda à separação e quantificação.

Separação – Ressuspenda a AFM_1 com 100 µL de tolueno-acetonitrila (9:1). Aplique, sobre a placa cromatográfica, 20 µL deste extrato e também pontos de 1 a 5 µL de solução-padrão de AFM_1 a 0,2 µg/mL. Desenvolva a placa em fase móvel de clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3). Seque a placa na temperatura ambiente e visualize sob luz UV (λ=366 nm).

Quantificação – Compare a intensidade de fluorescência da mancha da aflatoxina M_1 da amostra com as do padrão e os seus respectivos R_f, determinando qual mancha do padrão corresponde à da amostra. Se a intensidade da fluorescência da amostra for maior ou menor que a dos padrões, dilua ou concentre e recromatografe.

Confirmação – Para a confirmação da AFM_1 é utilizado o ácido trifluoroacético (TFA) conforme **402/IV**.

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.12 th ed., Arlington: A.O.A.C., 1975, Chapter 26. p. 476 (method 26.084).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.16 th ed., Arlington: A.O.A.C., 1995, Chapter 49. p. 3-4, 30-31, 34-35 (methods 970.44, 971.22, 980.21, 986.16).

402/IV Determinação de aflatoxina M_1 em leite por CCD ou CLAE após separação em coluna de imunoafinidade

Os mamíferos que ingerem alimentos contaminados com AFB_1 e AFB_2 secretam, em seu leite, produtos tóxicos resultantes da bioativação, conhecidos como micotoxinas do leite ou AFM_1 e AFM_2.

Aflatoxina M_1 parece estar associada à fração protéica do leite (caseína), estando assim presente não somente nos tipos fluido ou em pó como também em seus produtos derivados. Este método é aplicado para determinação de Aflatoxina M_1 em amostras de leite. O limite de quantificação (LQ) do método é 0,02 µg/L.

Material

Cabine com lâmpada UV onda longa (λ =366 nm), capela de exaustão para solventes orgânicos, centrífuga, cromatógrafo líquido de alta eficiência, espectrofotômetro UV/VIS, suporte coletor de amostra a vácuo (*Manifold*), balão volumétrico, cuba cromatográfica, frasco âmbar de10 mL, microsseringas de 10, 50, 100 e 500 µL, cromatofolhas ou cromatoplacas de sílica gel G sem indicador de fluorescência (20 x 20) cm, proveta de 100 mL, seringas de vidro de 10 e 20 mL, tubo para centrífuga de polipropileno de 50 mL e *vials* para injetor automático de 1 mL.

Reagentes

Ácido acético glacial
Ácido trifluoroacético
Acetona
Acetonitrila, grau CLAE
Ácido sulfúrico (1:3)
Benzeno
Clorofórmio
Coluna de imunoafinidade para AFM_1
Coluna fase reversa (C_{18}) para CLAE (25 x 0,4) cm
Isopropanol
Metanol, grau CLAE
Nitrogênio
Padrão de Aflatoxina M_1
Tolueno
Solução-padrão de AFM1 – Proceda conforme **403/IV**

Procedimento

Preparação e tratamento da amostra por CCD – Centrifugue 100 mL de leite por 15 minutos a 3000 rpm. Remova o sobrenadante e aqueça a (30-37)ºC. Transfira o leite centrifugado para uma seringa acoplada à coluna de imunoafinidade, e passe a amostra lentamente pela coluna com o fluxo de (2-3) mL/min sob pressão constante. Após passar

todo o volume, lave com 40 mL de água deionizada. Elimine toda a água residual da coluna e elua com 2,5 mL da solução de acetonitrila-metanol (3:2), retendo a solução por 30 segundos na coluna antes de iniciar a eluição e, em seguida, com 2,5 mL de metanol, invertendo suavemente o fluxo por 3 vezes durante a eluição. Recolha a amostra em um frasco âmbar. Evapore o extrato eluído sob corrente de nitrogênio.

Separação por cromatografia em camada delgada, quantificação e confirmação – Ressuspenda a AFM_1 com 150 µL de tolueno-acetonitrila (90:10). Aplique, sobre a placa cromatográfica, 50 µL do extrato da amostra e também 1 a 7 µL da solução-padrão de AFM_1 a 0,2 µg/mL. Desenvolva a placa em clorofórmio-acetona-isopropanol (87:10:3). Remova a placa após 12 cm de desenvolvimento do solvente e deixe secar naturalmente ao ar. Sob luz UV (λ=366 nm), localize as manchas fluorescentes indicativas da presença de AFM_1. Manchas fluorescentes com o mesmo R_f e mesma tonalidade do padrão indicam resultados positivos presuntivos. Efetue a quantificação por comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha suspeita com a do padrão. Se a intensidade de fluorescência da mancha da amostra for maior ou menor que a dos padrões, dilua ou concentre a amostra e recromatografe. Pulverize a placa com H_2SO_4 (1+3). Deixe secar e observe sob lâmpada UV longa. A fluorescência da AFM_1 muda de azul para amarelo, indicando a presença da referida micotoxina. Para a confirmação da AFM_1 é utilizado o ácido trifluoroacético (TFA).

Reação com ácido trifluoroacético-hexano (1+3) – Divida uma placa verticalmente em duas regiões e em cada uma delas cromatografe dois pontos da amostra e dois do padrão. Em uma das regiões sobreponha 1 µL da solução de TFA em um dos pontos da amostra e em um dos padrões. Aqueça a placa por 10 minutos a (35 - 40)°C e desenvolva o cromatograma com clorofórmio-acetona (85+15). Examine a placa sob lâmpada UV longa. A AFM_1 com TFA aparecerá em 1/3 do R_f da aflatoxina original.

Preparação e/ou tratamento da amostra por CLAE – Centrifugue 50 mL de leite por 15 minutos a 3000 rpm. Remova o sobrenadante e aqueça a (30-37)°C. Transfira o leite centrifugado para uma seringa acoplada à coluna de imunoafinidade e passe a amostra lentamente pela coluna, fluxo de (2-3) mL/min sob pressão constante. Após passar todo o volume, lave com 10 mL de água. Elimine toda a água residual da coluna e elua com 1,25 mL da solução de acetonitrila-metanol (3:2), retendo a solução por 30 segundos na coluna antes de iniciar a eluição e em seguida 1,25 mL de metanol, invertendo o fluxo suavemente por 3 vezes durante a eluição. Recolha a amostra eluída em um frasco âmbar. Evapore a amostra eluída sob corrente de nitrogênio até resíduo para o procedimento de separação e quantificação.

Separação por CLAE, quantificação e confirmação – Ressuspenda a AFM_1 com 500 µL da mistura de ácido acético 1%-acetonitrila-metanol (40:35:25) e injete 20 µL desta solução na coluna cromatográfica. A fase móvel utilizada é ácido acético 2%-acetonitrila-metanol (40:35:25) por 10 minutos, fluxo de 1,0 mL/min; detector de fluorescência com comprimentos de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 430 nm. A temperatura da coluna é de 35°C. O tempo de retenção da AFM_1 é de aproximadamente 3,1 minutos. É importante a injeção do padrão de AFM_1 antes do início da análise, verificando o tempo de retenção e a resposta com a curva de calibração construída.

Cálculo

Para o cálculo da concentração de AFM_1 é necessária a integração do pico e a comparação do valor encontrado com a curva de calibração construída (o equipamento já fornece) ou de acordo com seguinte fórmula:

$$\frac{(H \times C' \times VI' \times V)}{(H' \times VI \times W)} = AFM_1 \text{ em } \mu g/L \text{ ou } \mu g/kg \text{ (ppb)}$$

H = altura do pico da amostra
H' = altura do pico do padrão
C' = concentração do padrão (ng/µL)
VI' = volume injetado do padrão
VI = volume injetado da amostra
V = total do volume final da amostra (µL)
W = volume de leite representado no final do extrato (mL)

Referências bibliográficas

APPLEBAUM, R.S.; BRACKETT, R.E.; WISEMAN, D.W.; MARTH, E.H. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and ocurrence in milk and milk products – a review. **J. Food Prot.**, v. 45, n. 8, p. 752-777, 1982.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.16 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 49. p. 3-4, 30-31, 34-35 (methods 970.44, 971.22, 980.21, 986.16).

BARNES, J.M. Aflatoxins as health hazard. **J. Appl. Bacteriol.** v. 33, p. 285-298, 1970.

DRAGACCI, S.; GROSSO, F., GILBERT, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxin M_1 in Liquid Milk: Collaborative Study. **Journal of A.O.A.C. International,** v. 84, n. 2, p. 437-443, 2001.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of Aflatoxin M_1 in milk and milk products: a worldwide review. **J. Food Prot.**, v. 59, n. 10, p. 1079-1090, 1996.

403/IV Determinação de aflatoxinas por cromatografia em camada delgada

Este método é aplicado para a determinação de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 em sementes oleaginosas, cereais e seus produtos e também em rações. As aflatoxinas são extraídas com clorofórmio e com posterior remoção de interferentes por partição líquida com metanol-água-hexano. Os componentes são determinados pela comparação da intensidade de fluorescência das amostras com a dos padrões por cromatografia em camada delgada. O método pode alcançar um limite de detecção de 2,0 µg/kg (ppb) e limite de quantificação de 3,0 µg/kg (ppb).

Material

Espectrofotômetro UV/VIS com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, gabinete com lâmpada ultravioleta de 15 watts e comprimento de onda 366 nm, balança analítica, balança semi-analítica, agitador mecânico, banho-maria com temperatura controlada ou rotavapor, estufa, banho ultra-som, cilindro de nitrogênio, moinho ou liquidificador, peneiras de 20 *mesh*, capela para solventes orgânicos, béqueres de 10 e 25 mL, frascos Erlenmeyer de 25 mL e de 250 ou 300 mL, provetas 50 e 100 mL, bastão de vidro, funil de vidro, papel de filtro Whatman n° 4 ou equivalente, funil de separação de 250 ou 500 mL com torneira de teflon, pipeta graduada 10 mL, microsseringas de 10, 25 e 500 µL, cuba cromatográfica de vidro para placas de (20 x 20) cm, pulverizador para placas cromatográficas, balões volumétricos de 50 e 2000 mL, pipetas volumétricas de 1 e 25 mL e cromatoplacas ou cromatofolhas (20 x20) cm de sílica gel G sem indicador de fluorescência

Reagentes

Metanol
Clorofórmio
Hexano
Acetonitrila
Benzeno

Tolueno
Acetato de etila
Ácido fórmico
Acetona
Hhyflo-super cel, tipo celite ou equivalente
Solução de NaCl ou KCl 4% m/v
Ácido sulfúrico
Ácido trifluoroacético (TFA)
Solução de TFA-hexano (1:3), recém-preparada
Sistema de solventes para desenvolvimento da cromatografia em camada delgada:
Tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10)
Acetona-clorofórmio (10:90)
Tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (60:30:10)
Clorofórmio-acetona-isopropanol (85:12,5:2,5)
Benzeno-metanol-ácido acético (90:5:5)
Solução aquosa de ácido sulfúrico (1+3)

Soluções-padrão de aflatoxinas – Dissolva os padrões de B_1, B_2, G_1 e G_2 com volumes adequados da mistura benzeno-acetonitrila (98:2), para que se obtenha concentrações aproximadas de (1,0 a 2,5) µg/mL.

Solução de ácido sulfúrico 0,009 M – Pipete 1 mL de ácido sulfúrico, transfira para um balão de 2000 mL e complete o volume com água .

Solução A ($K_2Cr_2O_7$ 0,25 mM) – Pese aproximadamente 78 mg de dicromato de potássio previamente dessecado e dissolva em 1000 mL de ácido sulfúrico 0,009 M.

Solução B ($K_2Cr_2O_7$ 0,125 mM) – Pipete 25 mL da Solução A, transfira para um balão volumétrico de 50 mL e complete o volume com solução de ácido sulfúrico 0,009 M.

Solução C ($K_2Cr_2O_7$ 0,0625 mM) – Pipete 25 mL da Solução B, transfira para um balão volumétrico de 50 mL e complete o volume com solução de ácido sulfúrico 0,009 M.

Procedimento

Avaliação de desempenho do espectrofotômetro – Leia as absorbâncias das soluções A, B e C a 350 nm, usando como branco a solução de ácido sulfúrico 0,009 M.

Cálculo do fator de correção do espectrofotômetro:

$$\frac{A^{*} \times 1000}{C} = \text{absortividade molar } (\varepsilon)$$

A^{*}= absorbâncias das soluções A, B e C, calculadas separadamente
C = concentração das soluções A, B e C em mM

$$\frac{\varepsilon_a + \varepsilon_b + \varepsilon_c}{3} = \bar{\varepsilon}$$

$$\frac{3160}{\bar{\varepsilon}} = CF$$

$\bar{\varepsilon}$ = absortividade molar média

CF = fator de correção

O intervalo de aceitabilidade do CF: 1,05 > CF > 0,95

Nota: se o valor de CF estiver fora dos padrões, cheque novamente o método; se o valor persistir, o aparelho está descalibrado e necessita de reparo técnico.

Verificação da concentração dos padrões de micotoxinas – Após a dissolução dos padrões em seus respectivos solventes, leia as absorbâncias nos comprimentos de onda de máxima absorção (**Tabela 1**) e determine a concentração usando a seguinte fórmula:

$$\frac{A \times CF \times PM \times 1.000}{\varepsilon} = \text{micotoxina em } \mu g/mL$$

A = absorbância
CF = fator de correção do aparelho
PM = peso molecular da micotoxina (**Tabela 1**)
ε = absortividade molar da micotoxina (**Tabela 1**)

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas de algumas micotoxinas

Micotoxinas	Solventes*	Comprimento de onda (λ) nm	Absortividade Molar (ε)	Peso molecular
Aflatoxina B_1	1 2 3 4 5	360 350 350 345 350	21800 19800 20600 20300 19100	312
Aflatoxina B_2	1 2	362 350	24000 20900	314
Aflatoxina G_1	1 2	362 350	17700 17100	328
Aflatoxina G_2	1 2	362 350	19300 18200	330
Aflatoxina M_1	6	350	18815	328

Solvente 1 = metanol
Solvente 2 = benzeno-acetonitrila (98:2)
Solvente 3 = clorofórmio
Solvente 4 = heptano
Solvente 5 = tolueno
Solvente 6 = benzeno-acetonitrila (9:1)

Notas
Recomenda-se a substituição do solvente contendo benzeno por um outro menos tóxico.

A verificação dos padrões deve ser efetuada de acordo com a periodicidade do uso.

Preparação da amostra – Triture ou moa, de acordo com a natureza da amostra, a fim de que se obtenha massa homogênea, podendo utilizar liqüidificador, moinho ou moedor de carne. Passe a amostra pela peneira de 20 *mesh*. Homogeneíze novamente e retire uma sub-amostra de 30 g.

Extração e purificação – Pese 30 g da amostra previamente homogeneizada e transfira para um frasco Erlenmeyer. Adicione cerca de 10 mL de água aquecida a 60°C para facilitar a penetração do solvente orgânico nos tecidos hidrofílicos. Homogeneíze com bastão de vidro. Adicione 100 mL de clorofórmio, tampe o frasco com algodão e agite manualmente por 30 segundos. Prossiga esta operação com agitador mecânico por mais 30

minutos. Filtre o extrato clorofórmico em funil de vidro com papel de filtro qualitativo. No caso de amostra de amendoim ou derivados, adicione pequena quantidade de celite ao funil para acelerar a filtração. Colete 50 mL do extrato em outro frasco Erlenmeyer e evapore em banho-maria a 80ºC até que todo o clorofórmio tenha sido eliminado. Ressuspenda o resíduo com 50 mL de metanol, transfira quantitativamente para o funil de separação, adicione 50 mL da solução de NaCl a 4% e agite lentamente. Extraia as gorduras e os demais interferentes com três porções de 50 mL de hexano. Descarte a fração com hexano (superior). Recolha o extrato metanólico em béquer ou frasco Erlenmeyer. Transfira quantitativamente o extrato metanólico para um funil de separação limpo e extraia as aflatoxinas com 50 mL de clorofórmio, agitando o funil de separação suavemente por três minutos. Deixe as fases se separarem e recolha a inferior (clorofórmio) em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Repita a operação com mais 50 mL de clorofórmio. Recolha o total de clorofórmio juntamente com o extrato da primeira partição e evapore em banho-maria a 80ºC ou rotavapor a (50-60)°C. O resíduo deve ser transferido quantitativamente com clorofórmio para um frasco Erlenmeyer de 25 ou 50 mL e evaporado sob corrente de nitrogênio. Para efetuar a cromatografia em camada delgada, dissolva o resíduo em clorofórmio em quantidade adequada, normalmente entre 200 a 500 µL e utilize banho de ultra-som por cerca de 30 segundos para assegurar total dissolução das aflatoxinas.

Triagem das micotoxinas por cromatografia em camada delgada – Aplique em placa de sílica gel, 5 a 10 µL da amostra e alguns pontos de cada padrão, separadamente, fazendo sobrepor no segundo ponto do padrão 5 µL da amostra. Desenvolva o cromatograma em cuba previamente preparada para garantir a saturação com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10). Remova a placa depois de 12 cm de desenvolvimento do solvente e seque. Observe o cromatograma sob lâmpada de luz UV de comprimento de onda longo. Amostras suspeitas de conterem aflatoxinas devem ser quantificadas e confirmadas separadamente.

Quantificação – Aplique, nas placas 1, 3, 5, 7 µL dos padrões e 5 e 10 µL de cada amostra. Desenvolva as placas em clorofórmio-acetona (90:10) ou em tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10). Compare a intensidade da fluorescência da mancha da micotoxina da amostra com a dos padrões e determine qual das manchas da amostra corresponde a do padrão. Se a intensidade da fluorescência da mancha de menor volume utilizado da solução de amostra for maior do que a do padrão, dilua a amostra e recromatografe.

Confirmação da identidade das aflatoxinas – Realize a cromatografia bi-dimensional, utilizando a fase 1: clorofórmio-acetona-hexano (85:15:20) ou clorofórmio-acetona (90:10) e a fase 2: tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10) e faça o teste químico com ácido sulfúrico (1+3) e reação com ácido trifluoroacético, descrito a seguir:

a) teste químico – Pulverize a placa com solução aquosa de H_2SO_4 (1+3). Deixe secar e observe sob lâmpada UV (comprimento de onda longo). A fluorescência das aflatoxinas muda de azul (AFB) ou verde (AFG) para amarelo. Este teste somente confirma a ausência de aflatoxinas.

b) reação com TFA (ácido trifluoroacético) – Divida uma placa verticalmente em duas regiões e em cada um delas cromatografe dois pontos de amostra e dois de padrões. Em uma das regiões, sobreponha 1 µL de solução de TFA em um dos pontos da amostra e em um dos pontos do padrão. Aqueça a placa por 10 minutos a (35-40)ºC e desenvolva o cromatograma com clorofórmio-acetona (85+15) ou clorofórmio-acetona-isopropanol (85:12,5:2,5). Examine a placa sob lâmpada UV de comprimento de onda longo. A aflatoxina com TFA forma um hemi-acetal cujo R_f é 1/3 do R_f da aflatoxina original. Utilizando-se TFA, a aflatoxina B_1 transformar-se-à em aflatoxina B_{2a} e a aflatoxina G_1 em G_{2a}. Este teste é decisivo para confirmação da identidade das aflatoxinas B_1 e G_1.

Cálculo

$$\frac{S \times Y \times V}{Z \times W} = \text{micotoxina em µg/kg (ppb)}$$

S = µL de micotoxina padrão, de fluorescência igual à da amostra
Y = concentração-padrão da micotoxina em µg/mL
V = µL de solvente requerido para diluir o extrato final
Z = µL da mancha do extrato da amostra que deu intensidade de fluorescência igual à do padrão.
W = gramas de amostra contidas no extrato final.

Notas
O material contaminado deve ser tratado com hipoclorito de sódio a 5% e acetona, antes de ser descartado e lavado. Enxágüe bem todo material para que não fique nenhum resíduo do oxidante utilizado. Como alternativa, deixe o material contaminado por um período mínimo de 30 minutos em uma solução de hidróxido de sódio a 5%.

As aflatoxinas são hepatotóxicas e carcinogênicas; portanto a análise deve ser realizada em capela de exaustão apropriada, com máscara e luvas de borracha. Ao triturar ou moer as amostras, use máscara apropriada para não inalar o pó.

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990, chapter 49. p. 1184-1199.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1, *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 2ª ed. São Paulo: IMESP, 1976. p. 323-325.

PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin-layer chromatographic plates. **J. Assoc. Off. Analyt. Chem.**, v. 58, p. 163-164, 1975.

VELASCO, J. Replacement of benzene as a solvent for aflatoxin standards. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, p. 938A-940A, 1981.

STACK, M.E.; POHLAND, A.E. Colaborative study of a method for chemical confirmation of the identity of aflatoxin. **J. Assoc. Off. Analy. Chem.**, v. 58, p. 110-113, 1975.

404/IV Determinação de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 por CCD após separação em coluna de imunoafinidade

O objetivo do método refere-se à determinação das aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 em milho, amendoim e produtos derivados. As aflatoxinas são extraídas com solução aquosa de metanol e purificadas em uma coluna de imunoafinidade, onde anticorpos monoclonais específicos ligam-se aos antígenos, as aflatoxinas, sendo posteriormente eluídas, cromatografadas em placas de sílica gel e visualizadas as fluorescências sob luz ultravioleta. O limite de quantificação (LQ) do método é 2 µg/kg.

Material

Liqüidificador, provetas, balança semi-analítica, coluna de imunoafinidade para aflatoxinas, funil, *manifold*, béqueres, frasco âmbar, papel de filtro Whatman nº 4, seringas de vidro de 10 mL, pipeta de 2 mL, cromatoplacas, microsseringas e cuba cromatográfica.

Reagentes

Metanol
Metanol, grau CLAE
Cloreto de sódio

Procedimento

Preparação da amostra – Pese 50 g da amostra previamente triturada, e 4 g de NaCl, e

transfira para o copo do liqüidificador juntamente com 250 mL de uma solução de metanol-água deionizada (60:40). Triture por 1 minuto em alta velocidade. Ao término deste tempo, adicione 250 mL de água deionizada. Misture e filtre aproximadamente (25 a 50) mL em papel de filtro Whatman nº 4. Transfira 10 mL do filtrado para a seringa de vidro acoplada à coluna de imunoafinidade sobre o *manifold*. Na coluna de imunoafinidade, passe a amostra em um fluxo de 2 a 3 mL por minuto, lave com 20 mL de água deionizada e elimine toda a água residual da coluna. Elua as aflatoxinas passando 2 mL de metanol e colete em frasco âmbar. Evapore até à secura sob corrente de nitrogênio.

Cromatografia em camada delgada – Ressuspenda o resíduo em clorofórmio ou tolueno-acetonitrila (9:1) em quantidade adequada, normalmente 100 µL e utilize banho de ultra-som por cerca de 30 segundos para assegurar total dissolução das aflatoxinas. Aplique, em cromatofolha ou cromatoplaca de sílica gel, 10 µL da amostra, duas vezes. Sobre a 2ª mancha do extrato, aplique uma quantidade adequada dos padrões (B_1+B_2+G_1+G_2). Na mesma placa aplique: 1, 3, 5 e 7 µL de padrão de aflatoxinas. Desenvolva o cromatograma em cuba cromatográfica previamente saturada com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1) ou clorofórmio-acetona (9:1). Remova a placa após 12 cm de desenvolvimento e deixe secar naturalmente ao ar. Sob luz UV de comprimento de onda longa, localize as manchas fluorescentes com o mesmo R_f e mesma tonalidade do padrão. As amostras suspeitas de conterem aflatoxinas devem ser quantificadas e confirmadas.

Quantificação – Para a quantificação de aflatoxinas, separe-as previamente desenvolvendo as placas em clorofórmio-acetona (9:1) ou tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1). Compare a intensidade da fluorescência da mancha da amostra com a do padrão e determine qual das manchas da amostra corresponde a uma dos padrões. Se a intensidade da fluorescência da mancha de menor volume de amostra for maior que a do padrão, faça a diluição necessária e recromatografe.

Teste confirmatório da presença de aflatoxinas – Poderá ser realizado pelas seguintes técnicas:

a) reação com ácido sulfúrico – Pulverize a placa com H_2SO_4 (1+3). Deixe secar e observe sob lâmpada UV. A fluorescência da aflatoxina muda de azul (AFB_1) ou verde (AFG_1) para amarelo. Este teste somente confirma a ausência de aflatoxinas nas amostras que não mudarem para a cor amarela.

b) reação com TFA (ácido trifluoroacético) – Marque uma placa verticalmente, dividindo-a em duas regiões e em cada uma delas cromatografe dois pontos de amostra e dois de padrão. Em uma das regiões, sobreponha 1 µL de TFA em um dos pon-

tos da amostra e em um dos pontos dos padrões. Aqueça a placa por 10 minutos a (35-40)°C e desenvolva o cromatograma com clorofórmio-acetona (85:15). Examine a placa sob a lâmpada UV. A mancha da aflatoxina com TFA apresentará R_f igual a 1/3 do R_f original.

Referências bibliográficas

R-BIOPHARM RHÔNE LTD. **OCHRAPREP®: Quantitative Detection of Ochratoxin A**. 5 p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Laboratory Decontamination and Destruction of Aflatoxins B_1, B_2, G_1, G_2 in Laboratory Wastes. Lyon: WHO, 1989. (IARC n. 37).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Sampling plans for aflatoxins and analysis in peanuts and corn.** Rome: FAO, 1993 (FAO Food and Nutrition Paper, 55).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990, Chapter 49, p. 1184-1199.

405/IV Determinação de desoxinivalenol

Os tricotecenos são micotoxinas que afetam o maior número das funções biológicas dos animais contaminados: sistema nervoso, aparelho digestivo, regiões produtoras de componentes sangüíneos e pele. A intoxicação pela referida micotoxina é caracterizada por vômito, inflamação, hemorragia, recusa alimentar, diarréia, aborto, mudanças hematológicas, angina necrótica, desordens nervosas e destruição da medula óssea.

O princípio do método baseia-se na extração da micotoxina com mistura de solventes, purificação em uma coluna de carvão, eluição, cromatografia em cromatoplacas de sílica gel G, derivatização com $AlCl_3$ e visualização do composto fluorescente formado.

Material

Frascos Erlenmeyer de 10, 25, 50 e 500 mL, provetas de 50, 100 e 200 mL, pipeta, funil de vidro, funil de separação, coluna cromatográfica, placa de vidro, lâmpada UV, microsseringa, bomba de vácuo e kitassato de 125 mL.

Reagentes

Padrão de desoxinivalenol (DON)
Acetonitrila
Clorofórmio
Acetona
Isopropanol
Tricloreto de alumínio
Alumina ativada
Carvão ativo
Celite
Sílica gel G 60
Hexano

Solução de $AlCl_3$ a 15% m/v – Pese 15 g de tricloreto de alumínio. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL, dissolva e dilua ao volume com a mistura de etanol-água (1:1).

Solução-padrão de DON – Dissolva o padrão em acetato de etila tal que a concentração final seja aproximadamente 100 µg/mL.

Procedimento

Verificação da concentração da solução-padrão de DON – Faça a leitura da absorbância no espectrofotômetro UV/VIS a 260 nm e calcule a concentração de DON conforme fórmula abaixo:

$$\frac{A \times PM \times 1.000 \times f}{\varepsilon} = \mu g\ DON/mL\ diluição$$

A = absorbância
PM = peso molecular do padrão
f = fator de correção do aparelho
ε = absortividade molar do DON em acetato de etila (1410)

Preparação da amostra – Pese 50 g de amostra moída. Adicione 200 mL da mistura de acetonitrila-água (84:16) e deixe em contato com agitação mecânica por 30 minutos. Filtre e transfira 20 mL do filtrado para funil de separação. Extraia a gordura com hexano três vezes com 50 mL (o hexano fica na parte superior). Reserve o extrato e passe pela coluna cromatográfica.

Preparação da coluna cromatográfica – Coloque lã de vidro na parte inferior da coluna, em quantidade suficiente para bloquear a fase estacionária. Pese e homogeneíze em um frasco Erlenmeyer de 25 mL, a mistura de 0,7 g de carvão ativo, 0,5 g de alumina e 0,3 g de celite. Coloque esta mistura aos poucos, na coluna cromatográfica com ajuda da bomba de vácuo. Lave a coluna com 10 mL da solução de acetonitrila-água (84:16) e descarte o solvente de lavagem. Passe os 20 mL do filtrado na coluna e lave com 10 mL de solução de acetonitrila-água (84:16) e recolha o extrato em frasco Erlenmeyer de 50 mL. Evapore em banho-maria até secagem. Elua, em frasco Erlenmeyer de 10 mL, com ± 5 mL de acetato de etila e evapore em banho-maria sob corrente de nitrogênio. Elua o resíduo com 200 µL de uma mistura de clorofórmio-acetonitrila (4:1). Aplique na cromatoplaca de sílica gel G sem indicador de fluorescência, 10, 20, 30 µL da amostra e 5 e 10 µL do padrão. Desenvolva o cromatograma com clorofórmio-acetona-isopropanol (80:10:10). Remova a placa após 12 cm de desenvolvimento e deixe secar naturalmente ao ar. Pulverize com solução de $AlCl_3$ a 15%. Aqueça em estufa a 120°C durante 7 minutos e observe sob luz UV longa.

Quantificação – Compare a intensidade da fluorescência da mancha de desoxinivalenol da amostra com as do padrão e determine qual das manchas da amostra corresponde a uma das do padrão. Se a intensidade da fluorescência da mancha correspondente ao menor volume aplicado de amostra for maior que a do padrão, a amostra deverá ser diluída convenientemente e recromatografada.

Cálculo

$$\frac{S \times Y \times V}{Z \times W} = \mu g/kg$$

S = µL da solução-padrão de micotoxina com mancha com fluorescência igual à da amostra
Y = concentração da micotoxina padrão em µg/mL usada na cromatografia
V = µL do solvente requerido para diluir o extrato final
Z = µL do extrato da amostra com mancha de intensidade da fluorescência igual a do padrão
W = gramas de amostra contida no extrato final.

Referências bilbiográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington:

A.O.A.C., 1990, Chapter 49. p. 1205. (method 986.17).

SABINO, M.; ICHIKAWA, A.H.; INOMATA, E.I.; LAMARDO, L.C.A. Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** v. 49. n. 2. p.155-159, 1989.

TRUCKSESS, M.W.; NESHEIM, S.; EPPLEY, R.M. Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.,** v. 67. p. 403, 1984.

406/IV Determinação de fumonisina B por CCD ou CLAE, após separação em coluna de imunoafinidade

Fumonisina B_1 é produzida principalmente por *Fusarium moniliforme* e este método é aplicável para a determinação desta toxina em milho e produtos derivados, utilizando coluna de imunoafinidade, onde anticorpos monoclonais específicos ligam-se aos antígenos, as fumonisinas, sendo posteriormente eluídos e separados pelas técnicas: cromatografia em camada delgada (LQ: 1 mg/kg) ou por cromatografia liquida de alta eficiência (LQ=0,78 mg/kg).

Material

Balança analítica, balança semi-analítica, provetas, liqüidificador, funil, papel de microfibra, coluna de imunoafinidade para fumonisina, cromatógrafo líquido de alta eficiência, frasco âmbar, placa cromatográfica de fase reversa (RP 18), microsseringas, *manifold* e coluna cromatográfica de fase reversa C18.

Reagentes

Metanol
Cloreto de sódio
Bicarbonato de sódio
Tween 20
Acetonitrila, grau CLAE
Cloreto de potássio 4% m/v
Ácido bórico
Ácido acético glacial
Fluorescamine
o-Ftaldialdeído (OPA)
2-Mercaptoetanol
Hidróxido de sódio

Solução-tampão borato de sódio 1 M – Pese 3,8 g de tetraborato de sódio, transfira para um balão volumétrico de 100 mL, dissolva e complete o volume com água deionizada e corrija o pH para 10,4 com hidróxido de sódio 0,1 M.

Solução de fluorescamine 0,04% – Dissolva 2 mg de fluorescamine em 5 mL de acetonitrila

Reagente de derivatização (OPA) – Pese 40 mg de o-ftaldialdeído e dissolva em 1 mL de metanol e dilua com 5 mL da solução-tampão. Adicione 50 µL de 2-mercaptoetanol e misture. Estoque este reagente em um frasco âmbar vedado com papel alumínio sob temperatura de (5-15)ºC. Nestas condições, o reagente de derivatização é estável por uma semana.

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M – Dissolva 2 g de hidróxido de sódio em 500 mL de água deionizada.

Solução de ácido bórico 0,01 M – Misture 30,92 mg de ácido bórico em 50 mL de água deionizada.

Solução de cloreto de potássio 4% m/v – Dissolva 20 g de cloreto de potássio em 500 mL de água deionizada.

Solução de extração – Misture 8 volumes de metanol com 2 volumes de água deionizada.

Solução de diluição – Dissolva 12,5 g de cloreto de sódio, 2,5 g de bicarbonato de sódio e 0,05 mL de Tween 20 em 500 mL de água deionizada.

Solução de ressuspensão – Misture 1 volume de acetonitrila com 1 volume de água.

Fase móvel para CCD – Misture 7,5 volumes de metanol com 2,5 volumes de cloreto de potássio a 4%.

Solução-padrão de FB1 (50 µg/mL) – Dissolva 0,1 mg de fumonisina B_1 em 100 mL da solução de acetonitrila-água (1:1).

Procedimento – Pese 25 g da amostra triturada e tamisada (20 *mesh*). Transfira para o copo de um liqüidificador ou similar, adicione 2,5 g de cloreto de sódio e 50 mL da mistura metanol-água (8:2). Passe 10 mL do filtrado pela coluna de imunoafinidade, com fluxo de aproximadamente 3 mL/minuto. Lave a coluna com 10 mL de solução de diluição, seguido por 10 mL de água deionizada. A FB_1 deve então ser eluída da coluna

com 2 mL de solução de extração em frasco âmbar com capacidade de 4 mL. Evapore o eluato sob corrente de nitrogênio comum, podendo utilizar um banho-maria aquecido até 60°C. Armazene o resíduo à temperatura inferior a 4°C até o momento de se efetuar a cromatografia.

Cromatografia em camada delgada – Ressuspenda o resíduo da amostra com 100 µL de acetonitrila-água (1:1), agite durante 1 minuto. Aplique, na cromatoplaca de fase reversa, 10 µL deste extrato e também 2, 3, 5, 7 e 10 µL do padrão. Desenvolva a placa em solução de metanol-KCl 4% (7,5:2,5). Remova a placa, após 12 cm de desenvolvimento e deixe secar à temperatura ambiente ou com corrente de ar aquecido. Nebulize a cromatoplaca com solução-tampão e, em seguida, pela solução de fluorescamine. Espere 1 minuto e nebulize com a solução de ácido bórico-acetonitrila. Seque e observe sob luz UV longa. A FB_1 pode ser identificada pela presença de pontos amarelo-esverdeados com R_f aproximadamente 0,57. Para quantificar, compare a intensidade da fluorescência da mancha da amostra com a do padrão e determine qual das manchas da amostra corresponde a uma das do padrão. Se a intensidade da fluorescência da mancha de menor volume da amostra for maior do que a do padrão, a amostra deve ser diluída e recromatografada.

CLAE - Ressuspenda o resíduo da amostra com 800 µL de acetonitrila-água (1:1) e, segundos antes da injeção, adicione 200 µL de solução de OPA, completando assim 1 mL de solvente. Injete 20 µL desta solução na coluna cromatográfica (fase reversa C18). A fase móvel utilizada é ácido acético 1%-acetonitrila (50:50) por 15 minutos, fluxo de 0,8 mL/min, detector de fluorescência com comprimentos de onda de excitação de 335 nm e de emissão de 440 nm. A temperatura da coluna é 25°C. O tempo de retenção da FB_1 é de aproximadamente 8,1 minutos.

Nota: é importante que a injeção do padrão de FB1 seja antes do início da análise, verificando o tempo de retenção e a resposta com a curva-padrão construída.

Cálculo

Para o cálculo da concentração de FB_1 é necessária a integração do pico e a comparação do valor encontrado com a curva-padrão construída ou fornecida pelo equipamento ou de acordo com seguinte fórmula:

$$\frac{(H \times C' \times Vl' \times V)}{(H' \times Vl \times W)} = \mu g/g\ (ppm)\ de\ FB_1$$

H e H' = alturas dos picos da amostra e do padrão
C' = concentração do padrão (ng/µL)

VI' e VI = volumes injetados do padrão e da amostra
V = total do volume final da amostra (µL)
W = quantidade de amostra representado no final do extrato (g)

Referências bibliográficas

CAMARGOS, S.M. Fumonisinas em cultivares de milho no Estado de São Paulo: influência das características do cultivar e das condições climáticas. 2000. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas.

SYDENHAM, E.W. et al. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodtuffs. **J. Agric. Food Chem.** v. 39, p. 2014-2018, 1991.

SYDENHAM, E.W. et al. Liquid chromatographic determination of fumonisins B_1, B_2 and B_3 in corn: A.O.A.C. - IUPAC collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** v. 79, n. 3, p. 688-696, 1996.

407/IV Determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona por cromatografia em camada delgada

O método é aplicado para a determinação simultânea de aflatoxinas (B_1, B_2, G_1 e G_2), ocratoxina A e zearalenona em diversos alimentos. O limite de quantificação do método é 2,0 µg/kg.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, lâmpada ultravioleta de 15 Watt com comprimentos de onda curto e longo, balança analítica, balança semi-analítica, liqüidificador, moinho, banho-maria com temperatura controlada, estufa, banho de ultra-som, peneira de 20 *mesh*, cilindro de nitrogênio comum, capela com exaustão para vapores orgânicos, béqueres de 100 e 500 mL, frascos Erlenmeyer de 25 e 50 mL, provetas de 10, 50, 100, 200 e 300 mL, bastão de vidro, funil de vidro, papel de filtro qualitativo com filtração rápida, funil de separação de 500 mL com torneira de *teflon*, micro-seringas de 10, 50 e 500 µL, cuba cromatográfica para placas de (20 x 20) cm e pulverizador, balões volumétricos de (50 e 2000) mL e pipetas volumétricas de (1 e 25) mL

Reagentes

Álcool
Metanol
Clorofórmio
Cromatofolhas ou cromatoplacas de sílica gel G 60 de (20 x 20) cm e 0,25 mm de espessura
Hyflo-supercel , celite ou equivalente
Solução de KCl ou NaCl 4% m/v

Solução de sulfato cúprico a 10% m/v (clarificante)
Solução de sulfato de amônio a 30% m/v (clarificante)
Tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (60:40:10)
Acetona-clorofórmio (1:9)
Tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1)
Hexano-acetato de etila-clorofórmio-ácido fórmico (35:25:25:10)
Benzeno-metanol-ácido acético (90:5:5)

Solução de cloreto de alumínio – Pese 20 g de $AlCl_3.6H_2O$, transfira para um balão volumétrico de 100 mL, dissolva em álcool a 74% e complete o volume com o mesmo solvente.

Solução de ácido trifluoroacético (TFA) com hexano 1:3, recém-preparada.

Solução aquosa de ácido sulfúrico (1+3)
Hidróxido de amônio
Trifluoreto de boro a 14% m/v, em metanol

Soluções-padrão de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 – Prepare soluções com concentrações aproximadas a 1 µg/mL, utilizando os solventes da **tabela 1**.

Solução-padrão de ocratoxina A – Prepare uma solução de concentração aproximada de 1 µg/mL, utilizando solventes da **Tabela 1**.

Solução-padrão de zearalenona – Prepare uma solução de concentração aproximada de 70 µg/mL, utilizando solventes da **Tabela 1**.

Solução de ácido sulfúrico 0,009 M – Pipete 1 mL de ácido sulfúrico e transfira para balão de 2000 mL e complete o volume com água.

Solução A (solução de dicromato de potássio 0,25 mM) – Pese aproximadamente 78 mg de dicromato de potássio previamente dessecado e dissolva em 1000 mL de ácido sulfúrico 0,009 M.

Solução B – Pipete 25 mL da solução A e transfira para um balão de 50 mL e complete o volume com solução de ácido sulfúrico 0,009 M.

Solução C – Pipete 25 mL da solução B e transfira para balão de 50 mL e complete o volume com solução de ácido sulfúrico 0,009 M.

Procedimento

Avaliação do desempenho do espectrofotômetro - Leia as absorbâncias das soluções A, B e C a 350 nm, usando como branco a solução de ácido sulfúrico 0,009 M. Calcule, separadamente, a absortividade molar de cada uma das soluções e o fator de correção do espectrofotômetro,

$$\frac{A^* \times 1000}{C} = \text{absortividade molar } (\varepsilon)$$

A* = Absorbância das soluções A, B e C, calculadas separadamente
C = concentração das soluções A, B e C em mM

$$\frac{\varepsilon_a + \varepsilon_b + \varepsilon_c}{3} = \text{absortividade molar média } (\bar{\varepsilon})$$

$$\frac{3160}{\bar{\varepsilon}} = CF$$

CF = fator de correção do espectrofotômetro

O intervalo de aceitabilidade do CF: 1,05 > CF > 0,95

Nota: se o valor de CF estiver fora dos padrões de aceitabilidade, teste novamente o método. Se o valor persistir, o aparelho está descalibrado e necessita de reparo técnico.

Verificação da concentração dos padrões de micotoxinas – Após a dissolução dos padrões em seus respectivos solventes, leia as absorbâncias nos comprimentos de onda de máxima absorção e determine a concentração, usando os dados da **Tabela 2** e a seguinte fórmula:

$$\frac{A \times CF \times PM \times 1000}{\varepsilon} = \text{micotoxina em } \mu g/mL$$

A = absorbância
CF = fator de correção do aparelho
PM = peso molecular da micotoxina
ε = absortividade molar da micotoxina

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de algumas micotoxinas

Micotoxinas	Solvente*	Comprimento de onda (λ) nm	Absortividade Molar (ε)	Peso Molecular
Aflatoxina B_1	1 2 5 6 7	360 350 350 350 345	21800 19800 20600 19100 20300	312
Aflatoxina B_2	1 2	362 350	24000 20900	314
Aflatoxina G_1	1 2	362 350	17700 17100	328
Aflatoxina G_2	1 2	362 350	19300 18200	330
Zearalenona	4 1	317 314	6060 6000	318
Ocratoxina A	3	333	5550	403
Patulina	8	275	14600	154

Solvente 1 = metanol
Solvente 2 = benzeno-acetonitrila (98+2)
Solvente 3 = benzeno-ácido acético (99+1)
Solvente 4 = benzeno
Solvente 5 = clorofórmio
Solvente 6 = tolueno
Solvente 7 = heptano
Solvente 8 = álcool

Nota: recomenda-se a substituição do solvente contendo benzeno por um outro menos tóxico.

Preparação da amostra – Triture ou moa, de acordo com a natureza da amostra, a fim de que se obtenha massa homogênea, podendo utilizar liqüidificador, moinho ou moedor de carne. Passe por peneira de 20 *mesh*. Misture e homogeneíze novamente.

Extração e purificação – Pese 50 gramas da amostra previamente moída e homogeneíze em liqüidificador com 270 mL de metanol e 30 mL de KCl ou NaCl a 4%, por 5 minutos. Filtre e transfira 150 mL do filtrado para béquer de 500 mL. Adicione 150 mL do clarificante e 50 mL de celite. Agite com bastão de vidro e filtre novamente. Recolha

150 mL do filtrado e transfira para um funil de separação de 500 mL contendo 150 mL de água. Adicione ao funil de separação 20 mL de clorofórmio e extraia as micotoxinas agitando o funil de separação suavemente por 3 minutos. Deixe as fases se separarem e recolha a fase inferior (clorofórmica) em frasco apropriado. Repita a operação com mais 20 mL de clorofórmio. Reúna as alíquotas e retire 20 mL. Evapore o extrato em banho-maria a 80°C sob nitrogênio comum e dissolva o resíduo em um banho ultra-som com 500 µL de clorofórmio por 30 segundos.

Nota: para feijão, arroz e amendoim, use como clarificante a solução de sulfato cúprico a 10% e para milho e mandioca, a solução de sulfato de amônio a 30%.

Triagem das micotoxinas por cromatografia em camada delgada – Aplique duas vezes na placa cromatográfica, 5 µL do extrato da amostra. Sobre a segunda alíquota aplique uma quantidade adequada de padrões. Na mesma placa aplique 1, 2, 3, 4 e 5 µL de padrões. Desenvolva o cromatograma em cuba, previamente saturada com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (60+40+10). Remova a placa depois de 12 cm de desenvolvimento e deixe secar. Observe o cromatograma sob luz UV longa para aflatoxinas e ocratoxina A. Pulverize a placa com solução de $AlCl_3$, seque por 5 minutos a 110°C e observe sob lâmpada UV longa a possível presença de zearalenona. Amostras suspeitas de conterem micotoxinas devem ser quantificadas e confirmadas separadamente.

Quantificação – Aplique, separadamente para cada micotoxina, volumes correspondentes a 3, 5, 7 e 10 µL do extrato da amostra e do padrão. Para quantificação de aflatoxinas desenvolva as placas em acetona-clorofórmio (10: 90). Para a quantificação de ocratoxina A, desenvolva as placas em tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10). Para quantificação de zearalenona, desenvolva as placas em tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (60:40:10), seguida da pulverização com solução de $AlCl_3$. Compare a intensidade de fluorescência da mancha da micotoxina da amostra com as do padrão e determine qual das manchas da amostra corresponde a uma das do padrão. Se a intensidade da fluorescência da mancha de menor volume de amostra for maior que a do padrão, a amostra deverá ser diluída e recromatografada.

Testes confirmatórios para aflatoxinas – A confirmação da micotoxina analisada poderá ser realizada da seguinte maneira:

a) reação com ácido sulfúrico – Pulverize a placa com H_2SO_4 (1+3). Deixe secar e observe sob lâmpada UV longa. A fluorescência da aflatoxina muda de azul (AFB) ou verde (AFG) para amarelo. Este teste somente confirma a ausência de aflatoxinas.
b) reação com TFA (ácido trifluoroacético) – Marque uma placa, verticalmente, dividindo-a em duas regiões e em cada uma delas cromatografe dois pontos da amostra e dois do padrão Em uma das regiões sobreponha 1 µL da solução de TFA em um dos pontos da amostra e em um dos pontos dos padrões. Aqueça a placa por 10 minutos a (35-40)°C e desenvolva o cromatograma com clorofórmio-acetona (85:15). Examine a placa sob lâm-

pada UV longa. A aflatoxina com TFA aparecerá em 1/3 do R_f da aflatoxina original.

Testes confirmatórios para ocratoxina A:

a) mudança da fase móvel para hexano-acetato de etila-ácido acético (10:30:10)

b) reação química – Exponha a placa com a mancha suspeita de conter ocratoxina A ao vapor de amônia. A fluorescência da ocratoxina A na luz UV longa passa de verde para azul brilhante com aumento da sua intensidade.

c) derivatização com trifluoreto de boro a 14% em metanol – Adicione 50 µL deste composto ao frasco com o resíduo seco da amostra. Leve a uma placa aquecedora a 65ºC por 15 minutos. O resíduo do solvente deve ser removido usando nitrogênio. Redissolva em volume adequado de acetonitrila para a cromatografia. Aplique em uma placa, 10 µL do extrato original da amostra e 10 µL do extrato que reagiu com BF_3. Desenvolva o cromatograma em benzeno-metanol-ácido acético (18:1:1) e examine a placa sob luz UV de comprimentos de onda longo e curto. O éster formado tem R_f mais elevado do que o da ocratoxina A, mas com a mesma fluorescência.

Cálculo

$$\frac{S \times Y \times V}{Z \times W} = \text{micotoxina em } \mu g/kg \text{ (ppb)}$$

S = µL de micotoxina padrão, de fluorescência igual à da amostra
Y = concentração da micotoxina padrão, em µg/mL usada na cromatografia
V = µL de solvente requerido para diluir o extrato final
Z = µL da mancha do extrato da amostra, com intensidade de fluorescência igual à do padrão.
W = gramas de amostra contida no extrato final.

Nota: o material contaminado deve ser tratado com hipoclorito de sódio a 5% e acetona, antes de ser descartado e lavado. Enxágüe bem todo material para que não fique nenhum resíduo do oxidante utilizado. Como alternativa, deixe o material contaminado pelo período mínimo de 30 minutos em uma solução de hidróxido de sódio a 5%.

Referências bibliográficas

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Screening and quantification of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. **J. Assoc. Off. Anal. Chem**., v. 68:1128-1130, 1985.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in Some Brazilian Foods by using Multi-toxins thin-layer chromatografic Method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem**., v. 72, p. 22-26, 1989.

HUNT, D.C.; ME CONNIE, B.R.; CROSBY N.T. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatisation and high-performance liquid chromatography. **Analyst,** v. 105, p. 89-90, 1980.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Manual of food quantity control to training in mycotoxins analysis**: FAO, 1990. (FAO Food and Nutrition Paper, 14/10).

PZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. **J. Assoc. Off. Anal. Chem,** v. 58, n. 1. p. 163-164, 1975.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990, Chapter 49. p. 1184-1213.

408/IV Determinação de ocratoxina A em café verde por CCD e CLAE após separação por coluna de imunoafinidade – Método 1

A ocratoxina A é a micotoxina produzida por espécies fúngicas do gênero *Penicillium* e por várias espécies de *Aspergillus*. Destacamos *Aspergillus ochraceus e Penicilium verrucosum* como os principais responsáveis pela contaminação de alimentos armazenados em regiões de climas temperados, enquanto que, em países mais quentes, predominam outras espécies de *Aspergillus.* A principal matéria-prima alimentar que pode apresentar contaminação com ocratoxina A é o cereal. Os sucos de uva, vinhos tintos, cafés, cacau, frutas secas, entre outros produtos, também podem apresentar o mesmo problema. Limite de detecção (LD) por CCD = 3 μg/kg e LD por CLAE = 0,6 μg/kg.

Esta toxina pode causar danos aos rins e fígado e é carcinogênica para alguns animais.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, gabinete com lâmpada UV (λ longo), liqüdificador (*blender*), suporte coletor de amostra a vácuo (*manifold*), cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência, ultra-som, balança analítica, banho-maria, rota-

vapor, capela para solventes orgânicos, peneira de 20 *mesh*, balão volumétrico, béquer de 300 mL, cuba cromatográfica, funil, frasco âmbar de 10 mL, microsseringas de (10, 25 e 100) µL, provetas de (100 e 200) mL, seringa de vidro de 10 mL, frasco de amostras para CLAE, coluna de imunoafinidade específica para ocratoxina A, cromatoplacas ou cromatofolhas de Sílica gel G sem indicador de fluorescência (20 x 20) cm, papel de filtro comum e papel de filtro de fibra de vidro.

Reagentes

Padrão de ocratoxina A
Acetato de etila
Acetona
Ácido acético
Ácido fórmico
Bicarbonato de sódio
Cloreto de sódio
Cloreto de potássio
Clorofórmio
Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4)
Fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4)
Metanol
Padrão de ocratoxina A
Tolueno

Nota: todos os reagentes devem ser grau p.a. ou CLAE, quando for o caso

Solução-padrão de ocratoxina A - Proceda conforme método **407/IV**

Solução-tampão fosfato (PBS) – Pese 0,2 g de KH_2PO_4 anidro, 1,1 g de Na_2HPO_4 anidro, 8 g de NaCl e 0,2 g de KCl, dissolva em água e complete o volume para 1000 mL.

Procedimento

Preparação da amostra – Pese 10 g da amostra, previamente moída e tamisada (20 *mesh*), e homogeneíze em liqüidificador por 2 minutos com 200 mL de bicarbonato de sódio a 1%. Filtre em filtro de microfibra, recolha 20 mL e adicione imediatamente 20 mL de solução-tampão fosfato (PBS). Transfira o filtrado para uma seringa acoplada à coluna de imunoafinidade e passe a amostra lentamente pela coluna com fluxo de (2-3) mL/min, sob pressão constante. Após passar todo o volume, lave com 20 mL de água. Elimine

toda a água residual da coluna e elua com 2 mL da solução de metanol:ácido acético (98:2), retendo a solução por 30 segundos na coluna antes de iniciar a eluição e invertendo o fluxo suavemente por 3 vezes durante a eluição. Recolha a amostra eluída em um frasco âmbar. Evapore, sob corrente de nitrogênio, até resíduo e proceda a separação e a quantificação, que pode ser por CCD ou CLAE.

Cromatografia em camada delgada – Ressuspenda a OTA com 50 µL de tolueno-ácido acético (99:1). Aplique sobre a placa cromatográfica de (20 x 20) cm, 20 µL deste extrato e também pontos de (1-5) µL de padrão de OTA de concentração de 1,01 µg/mL. Desenvolva a cromatografia pelo método bi-drecional utilizando como fase móvel clorofórmio-acetona (90:10) na primeira etapa e tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10) na segunda etapa. Caso a separação não seja satisfatória, desenvolva pelo método bi-dimensional utilizando as mesmas fases móveis. Seque a placa em temperatura ambiente e visualize sob luz UV (λ=366nm).

Quantificação – Para a quantificação, compare a intensidade de fluorescência da mancha da OTA da amostra com as do padrão, determinando qual mancha do padrão corresponde à da amostra. Se a intensidade de fluorescência da mancha da amostra for maior ou menor que as dos padrões, dilua ou concentre amostra e recromatografe.

Cálculo

$$\frac{S \times Y \times V}{Z \times W} = \text{ocratoxina em } \mu g/kg$$

S = volume em µL de OTA padrão, de fluorescência igual à da amostra
Y = concentração da micotoxina padrão, em µg/mL usada na cromatografia
V = volume em µL de solvente requerido para diluir o extrato final
Z = volume em µL do extrato da amostra que proporcionou intensidade de fluorescência igual à do padrão
W = gramas de amostra contida no extrato final.

Confirmação – Submeta a placa ao vapor de hidróxido de amônio por 5 minutos. No caso da presença de OTA, haverá uma intensificação da coloração das manchas. Para uma melhor confirmação, utilize o BF_3 para derivatização química.

Cromatografia liquida de alta eficiência – Redissolva o resíduo com 200 µL de acetonitrila-metanol-ácidoacético 29:1 (35:35:30), homogeneize em ultra-som para dissolução total. Injete 20 µL deste extrato na coluna de fase reversa C18 com a fase móvel acetonitrila-

metanol-sol, ácido acético 29:1 (35:35:30) por 15 minutos, fluxo de 0,8 mL/min, detetor de fluorescência com comprimentos de onda de excitação de 332 nm e de emissão de 476 nm, temperatura da coluna 25°C. Utilize a integração do pico e compare com o valor da curva de calibração construída previamente ou de acordo com a seguinte formula:

Cálculo

$$\frac{H \times C' \times VI' \times V}{H' \times VI \times W} = \mu g/kg\ (ppb)$$

H = altura do pico da amostra
H' = altura do pico do padrão
C' = concentração do padrão (ng/µL)
VI´= volume injetado do padrão
VI = volume injetado da amostra
V = total do volume final da amostra (µL)
W = quantidade de amostra contida no final do extrato (g)

409/IV Determinação de ocratoxina A em café verde por CCD e CLAE após separação por coluna de imunoafinidade - Método 2

O limite de detecção (LD) deste método, quando a ocratoxina A for quantificada por CCD, é igual a 3 µg/kg e 0,6 µg/kg quando for por CLAE.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, gabinete com lâmpada UV (λ longo), liqüidificador (*blender*), suporte coletor de amostra a vácuo (*manifold*), cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência, ultra-som, balança analítica, banho-maria, rotavapor, capela para solventes orgânicos, peneira de 20 *mesh*, balão volumétrico, béquer de 300 mL, cuba cromatográfica, funil, frasco âmbar de 10 mL, microsseringas de 10, 25 e 100 µL, provetas de 100 e 200 mL, seringa de vidro de 10 mL, frasco de amostras para CLAE, coluna de imunoafinidade específica para ocratoxina A, cromatoplacas ou cromatofolhas de sílica-gel G sem indicador de fluorescência (20 x 20) cm, papel de filtro comum e papel de filtro de fibra de vidro.

Reagentes

Padrão de ocratoxina A
Acetato de etila
Acetona
Ácido acético
Ácido fórmico
Bicarbonato de sódio
Cloreto de sódio
Cloreto de potássio
Clorofórmio
Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4)
Fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4)
Metanol
Padrão de ocratoxina A
Tolueno

Nota: todos os reagentes devem ser grau p.a ou CLAE, quando for o caso.

Solução-padrão de ocratoxina A - Proceda conforme o método **407IV**.

Solução-tampão fosfato (PBS) – Pese 0,2 g de KH_2PO_4 anidro, 1,1 g de Na_2HPO_4 anidro, 8 g de NaCl e 0,2 g de KCl, dissolva em água e complete o volume para 1000 mL com o mesmo solvente.

Procedimento

Preparação da amostra – Pese 25 g da amostra, previamente triturada e tamisada (20 *mesh*), e homogeneize no liqüidificador por 5 minutos com 250 mL de solução metanol-bicarbonato de sódio 1% (70:30). Filtre em papel de filtro comum, recolha 50 mL e adicione imediatamente 200 mL de solução- tampão fosfato (PBS). Filtre até 50 mL em papel de fibra de vidro. Transfira o filtrado para uma seringa acoplada à coluna de imunoafinidade e passe a amostra lentamente pela coluna com o fluxo de (2-3) mL/min, sob pressão constante. Após passar todo o volume, lave com 10 mL de PBS e em seguida com 10 mL de água. Elimine toda a água residual da coluna e elua com 2 mL da solução de metanol, retendo a solução por 30 segundos na coluna antes de iniciar a eluição e invertendo o fluxo suavemente por 3 vezes durante a eluição. Recolha a amostra eluída em um frasco âmbar. Evapore o eluato, sob corrente de nitrogênio, até resíduo para o procedimento de separação e quantificação.

Cromatografia em camada delgada – Ressuspenda a OTA com 50 µL de tolueno-ácido acético (99:1). Aplique sobre cromatofolha de sílica gel G (10 x 10) cm ou cromatoplaca

de sílica gel G (20x20) cm, 20 µL deste extrato e também pontos de (1-5) µL de padrão de OTA (1,01 µg/mL). Desenvolva a placa com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10). Seque a placa em temperatura ambiente e visualize sob luz UV (λ=366 nm). Eventualmente, pode ser utilizada cromatografia em camada delgada bi-dimensional, utilizando a fase clorofórmio-acetona (90:10) na 1ª direção e tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10) na 2ª direção.

Quantificação – Para quantificação, compare a intensidade de fluorescência da mancha da OTA da amostra com as do padrão, determinando qual mancha do padrão corresponde à da amostra. Se a intensidade da fluorescência da mancha da amostra for maior ou menor que as dos padrões, dilua ou concentre a amostra e recromatografe.

Cálculo

$$\frac{S \times Y \times V}{Z \times W} = \text{OTA em } \mu g/kg$$

S = µL de micotoxina padrão de fluorescência igual à da amostra
Y = concentração da micotoxina padrão, em µg/mL usada na cromatografia
V = µL de solvente requerido para diluir o extrato final
Z = µL do extrato da amostra que apresentou intensidade de fluorescência igual à do padrão
W = gramas de amostra contida no extrato final.

Confirmação – Submeta a placa ao vapor de hidróxido de amônio por 5 minutos. No caso da presença de OTA, haverá uma intensificação da coloração das manchas. Para uma confirmação específica, utilize derivatização com BF_3.

Cromatografia líquida de alta eficiência – Proceda conforme o método **408/IV.**

Nota: o material contaminado deve ser tratado com hipoclorito de sódio a 5% e acetona, antes de ser descartado e lavado. Enxágüe bem todo material, para que não fique nenhum resíduo do oxidante utilizado. Como alternativa, deixe o material contaminado por no mínimo 30 minutos em uma solução de hidróxido de sódio a 5%.

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990, chapter 49. p. 1184.

NAKAJIMA, M. et al. Determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products by monoclonal antibody chromatography. **Food Agric. Immunol**., v. 2. p. 189-195, 1990.

PITET, A. et al. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **J. Agric. Food Chem**., v. 44. p. 3564-3569, 1996**.**

410/IV Determinação de ocratoxina A em café cru em grão por cromatografia em camada delgada

O método descrito refere-se a determinação simultânea de Aflatoxinas (B_1, B_2, G_1 e G_2), ocratoxina A e zearalenona em arroz, amendoim, feijão, milho, mandioca e, com algumas pequenas modificações, a determinação específica de ocratoxina A (OTA) em café cru em grão.

A micotoxina é extraída com metanol e solução de KCl ou NaCl, seguida da remoção de interferentes pela precipitação com agente clarificante e partição com clorofórmio. A quantificação da OTA baseia-se na comparação da intensidade da fluorescência com um padrão, por cromatografia em camada delgada. Este método permite a detecção de 10 µg/kg (ppb) e quantificação de 30 µg/kg (ppb) de OTA.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, gabinete para duas lâmpadas ultravioletas (λ = 366 nm) de 15 watt cada uma, balança analítica, balança semi-analítica, liqüidificador, banho-maria com temperatura controlada ou rotavapor, estufa, ultra-som, moinho que reduza os grãos a partículas de (10 a 20) *mesh,* cilindro de nitrogênio comum, peneira de (10 a 20) *mesh,* capela para solventes orgânicos, béqueres de (30, 100 e 400) mL, frasco Erlenmeyer 50 mL, provetas (10, 50, 100, 200 e 300) mL, bastão de vidro, funil de vidro de 12 cm de diâmetro, papel de filtro qualitativo Whatman nº 4 ou equivalente, funil de separação de 500 mL tipo pêra e com torneira de *teflon,* microsseringas de (10, 25 e 500) µL, cuba cromatográfica de vidro para placas de (20 x 20) cm, secador capaz de gerar ar com temperatura entre (40-50)°C, cromatofolhas ou cromatoplacas de sílica-gel G sem indicador de fluorescência (20 x 20) cm, balões volumétricos de (50 e 2000) mL e pipetas volumétricas de (1 e 25) mL.

Reagentes

Metanol
Clorofórmio

Tolueno
Acetato de etila
Acetona
Ácido fórmico
Benzeno
Hexano
Ácido acético glacial
Acetonitrila
Hyflo-super cel, celite 545 ou equivalente
Solução de KCl a 4% ou NaCl a 4%
Agente clarificante: solução de sulfato de amônio a 30%

Sistemas de solventes para desenvolvimento da cromatografia em camada delgada:
tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10) ou (60:30:10)
acetona-clorofórmio (10:90)
tolueno-acetato de etila-clorofórmio-ácido fórmico (35:25:25:10)
benzeno-metanol-ácido acético (90:5:5)
hidróxido de amônio
triluoreto de boro em metanol 14% (v/v)

Solução de ácido sulfúrico 0,009 M – Pipete 1 mL de ácido sulfúrico e transfira para balão de 2000 mL e complete com água.

Solução A – Solução de dicromato de potássio 0,25 mM – Pese 78 mg de dicromato de potássio previamente dessecado e dissolva em 1000 mL de ácido sulfúrico 0,009 M .

Solução B – Pipete 25 mL da solução A , transfira para um balão volumétrico de 50 mL e complete o volume com solução de ácido sulfúrico 0,009 M .

Solução C – Pipete 25 mL da solução B, transfira para balão volumétrico de 50 mL e complete o volume com solução de ácido sulfúrico 0,009 M.

Solução-padrão de OTA – Prepare a solução-padrão de ocratoxina A de forma a obter concentração aproximada de 1 µg/mL. Acrescente ao frasco, contendo OTA em pó, a mistura benzeno-ácido acético glacial (99:1) e transfira quantitativamente para balão volumétrico de capacidade determinada, a fim de que se obtenha solução de concentração cerca de 1 µg/mL. Proteja da luz, utilizando frasco de vidro âmbar ou envolvendo-o em papel de alumínio e conserve sob refrigeração (temperatura < 4°C).

Para a calibração dos padrões de micotoxinas é necessário que o espectrofotômetro seja calibrado previamente, a fim de se obter o fator de calibração do equipamento.

Procedimento

Avaliação do desempenho do espectrofotômetro – Leia as absorbâncias das soluções A, B e C a 350 nm, usando como branco a solução de ácido sulfúrico 0,009 M. Calcule a absortividade molar de cada uma das soluções (A, B e C).

Cálculo do fator de correção do aparelho

$$\frac{A^{*} \times 1000}{C} = (\varepsilon)$$

ε = absortividade molar
A* = Absorbâncias das soluções A, B e C, calculadas separadamente
C = Concentração das soluções A, B e C em mM

$$\frac{\varepsilon_A + \varepsilon_B + \varepsilon_C}{3} = \bar{\varepsilon}$$

$\bar{\varepsilon}$= absortividade molar média

$$\frac{3160}{\bar{\varepsilon}} = CF$$

CF = fator de correção

Intervalo de aceitabilidade: 1,05 > CF > 0,95

Nota: se o valor de CF estiver fora dos padrões, cheque novamente o método. Se o valor persistir o aparelho está descalibrado e necessita de manutenção.

Verificação da concentração do padrão de ocratoxina A – Após dissolver o padrão de OTA com solução de benzeno-ácido acético (99:1), leia a absorbância em 333 nm e calcule a concentração.

$$\frac{A \times CF \times PM \times 1000}{\varepsilon} = \text{micotoxina}$$

A = absorbância
CF = fator de correção do aparelho
PM = peso molecular da ocratoxina A = 403
ε = absortividade molar da ocratoxina A = 5550

Notas

Recomenda-se a substituição dos solventes contendo benzeno por um outro menos tóxico como metanol; neste caso, a absortividade molar é 6337 em 332 nm.
A calibração do padrão deverá ser efetuada de acordo com a periodicidade do uso.

Procedimento

Preparação da amostra – Adote o mesmo plano de amostragem usado para análise de aflatoxinas. No caso de amostras processadas, tome pelo menos 1 kg e triture até redução a partículas de (10 a 20) *mesh*. Conserve as amostras em sacos plásticos de polietileno duplo sob refrigeração.

Extração e purificação – Pese 30 g da amostra previamente homogeneizada e moída, e agite em liqüidificador por 5 minutos juntamente com 180 mL de metanol e 20 mL de KCl ou NaCl a 4%. Filtre e transfira 100 mL do filtrado para um béquer de 400 mL. Adicione 100 mL de $(NH_4)_2SO_4$ a 30% e celite em quantidade suficiente para ocupar um béquer de 30 mL. Agite com bastão de vidro. Filtre, recolha 100 mL do filtrado e transfira para um funil de separação de 500 mL com 100 mL de água. Adicione, ao funil de separação, 20 mL de clorofórmio e extraia a micotoxina agitando suavemente por 3 minutos. Deixe as fases se separarem e recolha a fase inferior (clorofórmica) em frasco Erlenmeyer de 50 mL. Repita a operação acima com mais 20 mL de clorofórmio. Recolha a fase inferior juntamente com a da extração anterior. Deste volume total retire 20 mL de clorofórmio e evapore em banho-maria a 60°C, sob corrente de nitrogênio ou em rotavapor. Dissolva o resíduo em ultra-som com 200 µL de benzeno ou metanol, por 30 segundos para proceder a cromatografia em camada delgada.

Triagem das micotoxinas por cromatografia em camada delgada – Cromatografe, em placa de sílica gel, 10 µL da amostra e dois pontos de padrão, separadamente, fazendo sobrepor, no segundo ponto do padrão, 5 µL da amostra. Desenvolva o cromatograma em cuba previamente saturada com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10). Remova a placa após de 12 cm de desenvolvimento, e deixe secar muito bem. Observe o cromatograma sob lâmpada de luz UV longa (366 nm). Amostras suspeitas de conter ocratoxina A devem ser quantificadas e confirmadas separadamente.

Determinação – Cromatografe pontos de (1-5) µL do padrão de OTA e (5-10) µL da amostra, dissolvida em quantidade adequada de metanol. Para a quantificação de ocratoxina A, desenvolva as placas em tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10). Compare a intensidade de fluorescência das manchas da amostra com as do padrão. Se a intensidade de fluorescência da mancha de menor volume de amostra for maior que a do padrão, a amostra

deverá ser diluída e novamente recromatografada.

Confirmação – Para a verificação da ausência de OTA, a placa deve ser exposta aos vapores de amônia da seguinte forma: coloque, numa cuba cromatográfica, um béquer de 50 mL com hidróxido de amônio junto à placa já desenvolvida por cerca de 5 min, e novamente observe sob a luz UV. A não mudança da coloração da fluorescência de verde-azulada (original da OTA) para azul brilhante indicará a ausência desta toxina. Entretanto, a mudança da coloração não é prova suficiente da presença da toxina, por isso são indicadas as outras técnicas: uso de padrão interno e/ou mudança de fase móvel e/ou derivatização química, no caso com BF_3.

a) padrão interno – Cromatografe, em placa de sílica gel, pontos com (5 a 10) µL da amostra e dois pontos com padrão, separadamente, fazendo sobrepor, no segundo ponto do padrão, de (5 -10) µL da amostra e evaporando o solvente com o auxílio de um secador. Desenvolva o cromatograma em cuba para cromatografia, previamente saturada com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10). Remova a placa depois de 12 cm de desenvolvimento e deixe secar muito bem. Observe o cromatograma sob lâmpada de luz UV longa (366 nm). Caso a mancha da amostra referente à ocratoxina A apresente-se compacta, recomenda-se usar esta técnica com diferentes fases móveis ,para que a ocratoxina A apresente tempo de retenção diferente das demais micotoxinas.

b) mudança de fase móvel – Tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (50:40:10) e hexano-acetato de etila-ácido acético (20:60:20)

c) derivatização da ocratoxina A – Este procedimento é o mais conclusivo, pois há formação de seus respectivos ésteres metílicos. A partir do resíduo seco final da análise, adicione 50 µL do trifluoreto de boro em metanol a 14% (v/v) e aqueça a 65ºC por 15 minutos. Ao final deste período, remova qualquer reagente remanescente com nitrogênio e redissolva o resíduo com volume adequado de acetonitrila. Faça procedimento idêntico para o padrão. Proceda a cromatografia em camada delgada como já foi indicado, colocando pontos na placa tanto para a amostra derivatizada quanto para a não derivatizada e o mesmo procedimento para o padrão. Observe a placa após o desenvolvimento sob luz UV e visualize o éster metílico da ocratoxina A obtido a partir do padrão derivatizado.

Cálculo

$$\frac{SxYxV}{ZxW} = \text{OTA em } \mu g/kg \text{ (ppb)}$$

S = µL de micotoxina padrão, de fluorescência igual à da amostra
Y = concentração da micotoxina padrão, em µg/mL usada na cromatografia
V = µL de solvente requerido para diluir o extrato final
Z = µL da mancha do extrato da amostra que deu intensidade de

fluorescência igual à do padrão.
W = gramas de amostra contida no extrato final.

Nota: o material contaminado deve ser tratado com hipoclorito de sódio a 5% e acetona, antes de ser descartado e lavado. Enxágüe bem todo material para que não fique nenhum resíduo do oxidante utilizado. Como alternativa, deixe o material contaminado por no mínimo 30 minutos em uma solução de hidróxido de sódio a 5%.

Referências bibliográficas

GOLINSKI, P.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.,** v. 67, p. 1108 -1110, 1984.

HUNT, D.C.; MC CONNIE, B.R.; CROSBY, N.T. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatisation and high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 105, p. 89-90, 1980.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ AMAYA, D. B. Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.,** v. 68, p. 1128-1130, 1985.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ AMAYA, D. B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone and Sterigmatocystin in Some Brazilian Foods by Using Multi-toxins Thin-Layer Chromatographic Method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.,** v. 72, p. 22-26, 1989.

MILANEZ, T.V.; SABINO, M. Ocratoxina A em feijão comercializado no Estado de São Paulo e sua estabilidade no cozimento . **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** v. 49, p. 131-135, 1989.

MILANEZ, T.V.; SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A. Comparison of two methods for the determination of ochratoxin A in green coffee beans. **Rev. Microbiol.,** v. 26, n. 2, p. 79-82, 1995.

411/IV Determinação de patulina em suco de maçã

Um dos maiores fungos produtores de patulina é o *Penicillium expansum* que freqüentemente causa o apodrecimento de um número grande de frutas. A maçã e o suco de maçã processado com frutos contaminados têm sido a maior fonte de patulina na dieta

humana. Esta micotoxina já foi detectada em frutas, hortaliças, cereais e também na ração animal. A contaminação mais freqüente é por *Penicillium expansum*, que se encontra em maçãs deterioradas; o grau de contaminação está relacionado com a deterioração dos frutos, ficando a patulina limitada aos tecidos deteriorados.

Este método é aplicável às análises de patulina em amostras de suco e concentrados de maçã, cujo limite de quantificação (LQ) é igual a 25 µg/L.

Material

Provetas, funil de separação, funil, papel de filtro qualitativo, banho-maria ou rotavapor, microsseringas, cromatofolhas ou cromatoplacas de sílica gel G com indicador de fluorescência, estufa, balão volumétrico, balança analítica.

Reagentes

Acetato de etila
Sulfato de sódio anidro
Clorofórmio
Tolueno
Ácido fórmico
Acetona
Metanol
Álcool

Solução-padrão de patulina – Dissolva o padrão em clorofórmio de maneira que a solução contenha 10 µg/mL. Determine a concentração do padrão utilizando o mesmo procedimento das outras micotoxinas conforme o método **407/IV**. Transfira 5 mL da solução-estoque para um balão volumétrico, evapore até resíduo sob nitrogênio e dissolva com 5 mL de álcool. Faça a leitura no espectrofotômetro em λ = 275 e proceda como para as outras micotoxinas.

MBTH (Cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona) a 0,5% – Pese 125 mg de $MBHT.HCl.H_2O$, transfira para um balão volumétrico de 25 mL e dissolva com água. Esta solução tem validade por 3 dias, quando conservada em geladeira.

Procedimento – Meça 50 mL de amostra e transfira para um funil de separação. A amostra deve ser analisada imediatamente após a abertura da embalagem. Adicione 50 mL de acetato de etila no funil e agite por 3 minutos. Recolha o acetato de etila em um frasco

Erlenmeyer. Repita esta operação três vezes. Filtre os extratos em sulfato de sódio anidro. Lave o sulfato de sódio com 20 mL de acetato de etila. Evapore os extratos até quase secura, sob nitrogênio. Dissolva imediatamente o resíduo em 500 µL de clorofórmio. Aplique em cromatofolhas ou cromatoplacas, sem indicador de fluorescência, respectivamente, 10 µL da amostra e volumes do padrão correspondentes às concentrações de (1-6) µg/mL. Desenvolva o cromatograma utilizando uma das fases móveis: tolueno-acetato de etila-ácido fórmico 90% (5:4:1), clorofórmio-metanol (95:5) ou clorofórmio-acetona (9:1). Seque a placa e pulverize com MBTH a 0,5%. Coloque em estufa por 15 minutos a 130°C. A patulina é detectada na região do visível como uma mancha amarelada se a sua quantidade for maior ou igual a 0,05 µg e, no UV com uma fluorescência amarelo-tijolo. Para a quantificação, compare a intensidade de fluorescência das manchas de patulina na amostra com as do padrão e determine qual delas corresponde à uma do padrão. Se a intensidade de fluorescência da mancha de menor volume de amostra for maior do que a do padrão, a amostra deverá ser diluída e recromatografada.

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**.15 th ed., v. 2. Arlington: A.O.A.C., 1990, chapter 49. p. 1209, (method 974.18).

Colaboradores

Myrna Sabino, Leda C. A . Lamardo, Luzia Shundo, Sandra A. Navas e Thaïs Valéria Milanez

CAPÍTULO **XXV**

GELADOS COMESTÍVEIS

XXV

GELADOS COMESTÍVEIS

Estão incluídos neste capítulo os métodos de análise para gelados comestíveis, pré-embalados ou não, prontos para o consumo, os preparados concentrados e as bases para o fabrico de gelados comestíveis.

Os gelados comestíveis são produtos prontos para o consumo submetidos ao congelamento, obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes, tais como: leite, água e açúcares. Incluem-se nesta classe, os sorvetes, os picolés e os produtos especiais gelados mistos.

Preparados para gelados comestíveis são produtos líquidos que contenham todos os ingredientes necessários em quantidades tais que, quando submetidos ao congelamento, resultem em gelados comestíveis.

Pós para o preparo de gelados comestíveis são os produtos constituidos por uma mistura de vários ingredientes e aditivos que, pela adição de água e/ou leite resultem em gelados comestíveis.

Base para gelados comestíveis são produtos constituidos de estabilizantes e/ou emulsionantes e espessantes, podendo conter outros aditivos e ingredientes que, após adição de água e/ou leite, resultem em gelados comestíveis.

Para os gelados comestíveis à base de leite, as determinações mais usuais são: sólidos totais (**429/IV**), glicídios redutores em lactose **(432/IV)**, glicídios não redutores em sacarose **(489/IV)**, protídios (**036/IV** ou **037/IV**), gorduras totais (**032/IV**), resíduos por

incineração (**485/IV**), corantes orgânicos artificiais (**051/IV**), minerais (**cap. XXIII**) e, eventualmente, vitaminas (**cap. XIX**) e alguns aditivos (**cap. V**).

No caso de preparados, pós e bases para gelados comestíveis, as determinações incluem: acidez (**253/IV**), resíduo por incineração (cinzas) (**018/IV**), glicídios totais em sacarose (**039/IV**), corantes orgânicos artificiais (**051/IV**), minerais (**cap. XXIII**), e, eventualmente, alguns aditivos (**cap. V**). Para os pós para gelados comestíveis, também incluir substâncias voláteis (**012/IV**).

Preparo da amostra

A amostra deve ser, de preferência, analisada logo após seu recebimento; se não for possível, conserve em temperatura abaixo de -15°C. Corte duas ou três porções congeladas ao acaso e transfira para o recipiente de um processador. Deixe a amostra em temperatura ambiente até se liqüefazer para depois ser homogeneizada. Se ocorrer a separação da gordura, descarte a amostra e repita, processando por tempo menor. Transfira a amostra imediatamente para um frasco, feche bem e conserve sob refrigeração, para a realização das análises. Agite antes de utilizar.

412/IV Determinação de gordura pelo método de Rose-Gottlieb

Neste método, a amostra é inicialmente tratada com hidróxido de amônio e álcool. O álcool precipita a proteína que se dissolve no hidróxido, facilitando a extração das gorduras com uma mistura de éteres. O resultado é expresso em porcentagem em massa de gordura.

Material

Balança analítica, béqueres de 50 e 150 mL, bastão de vidro, pipetas graduadas de 2 e de 10 mL, espátula, funil de separação de 250 mL, proveta de 25 mL, banho-maria, capela de exaustão, estufa ou estufa a vácuo e dessecador com sílica gel.

Reagentes

Álcool
Hidróxido de amônio
Éter
Éter de petróleo (30-60)°C

Procedimento – Pese de 4 a 5 g da amostra em béquer de 50 mL e dilua com 10 mL de água. Adicione 2 mL de hidróxido de amônio e misture. Aqueça em banho-maria por 20 minutos a 60°C e agite ocasionalmente. Transfira, com pouca água, para um funil de separação. Resfrie. Faça uma prova em branco com os reagentes usados. Adicione 10 mL de álcool e agite bem. Adicione 25 mL de éter e agite por um minuto. Adicione 25 mL de éter de petróleo e repita a agitação. Deixe em repouso até a separação das fases. Decante a fase inferior diretamente para outro funil de separação. Transfira a fase etérea para um béquer de 150 mL tarado. Repita a extração da fase aquosa, utilizando 15 mL de cada éter, por duas vezes. Reúna os extratos no béquer. Lave o funil de separação e a tampa com partes iguais dos éteres e junte aos extratos. Evapore completamente os solventes em banho-maria na capela. Seque o béquer contendo a gordura em estufa a (100 ± 1)°C ou a vácuo a (70-75)°C. Resfrie em dessecador e pese até peso constante. Prepare uma extração em branco, com 10 mL de água e os solventes utilizados no método.Corrija a massa obtida, levando em conta o resíduo obtido de um branco dos reagentes utilizados. Se a massa do branco for maior que 0,5 mg, substitua os reagentes.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{lipídios por cento m/m}$$

N = n° de g de gordura
P = n° de g da amostra

Nota: alternativamente, esta determinação poderá ser efetuada conforme o método **486/IV**.

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed. (method 952.06) Arlington: A.O.A.C., 1995. chapter 33. p. 5.

Colaboradores
Jacira Hiroko Saruwtari, Letícia Araújo Farah Nagato e Marilda Duarte

CAPÍTULO **XXVI**

CEREAIS, AMILÁCEOS E EXTRATO DE SOJA

XXVI

CEREAIS, AMILÁCEOS E EXTRATO DE SOJA

Genericamente, os cereais são designados como plantas, principalmente da família das gramíneas, cultivadas para a produção de grãos utilizados para a alimentação humana e animal. Os amiláceos são os produtos derivados de cereais e de outros vegetais (por exemplo, tubérculos) e incluem as preparações à base de farinhas, os pães, as massas alimentícias e uma série de produtos similares.

A análise dos cereais inclui, entre outras, as determinações de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, hidratos de carbono e fibra, segundo as técnicas descritas no **cap. IV** e sua identificação pelas características microscópicas.

A análise dos amiláceos pouco difere da análise dos cereais, incluindo algumas determinações específicas referentes aos componentes e aditivos empregados na sua fabricação.

Farinhas e produtos similares

A composição das farinhas varia de acordo com a origem do grão e processos tecnológicos de sua fabricação. Especificamente, as farinhas são identificadas pelo exame microscópico.

As análises de rotina incluem, entre outras, as determinações de umidade, acidez, protídios (**036/IV** ou **037/IV**), fibra alimentar (**045/IV** e **046/IV**), lipídios (**032/IV**)

e cinzas (**018/IV**). O teor de amido é calculado pela diferença centesimal da soma de umidade, cinzas, lipídios, protídios e fibra alimentar. Entre outras determinações, o teor glúten é de grande importância para avaliação das farinhas.

413/IV Farinhas e produtos similares – Determinação de umidade a 130°C

Os métodos utilizando aquecimento a 130°C, por 1 hora, 105°C, por 5 horas ou a menos de 100°C, a vácuo (25 mm de mercúrio), fornecem valores que representam a umidade livre, na temperatura de secagem, pois certa quantidade de água permanece retida, provavelmente ligada às proteínas. Os métodos de destilação e Karl Fischer produzem valores mais exatos do total de água existente.

Este método mede a umidade livre do produto na temperatura de secagem e baseia-se na perda de substâncias voláteis pelo aquecimento.

Material

Balança analítica, dessecador, estufa e cápsula de porcelana.

Procedimento – Pese, com precisão, aproximadamente 2 g da amostra em uma cápsula de porcelana previamente aquecida em estufa a 130°C, por uma hora, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Aqueça em estufa a 130°C durante 1 hora. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese. Repita a operação de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade a 130°C por cento m/m}$$

N = n° de g de umidade
P = n° de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 125.

414/IV Farinhas e produtos similares – Determinação de umidade a 105°C

Procedimento – Siga o método descrito em **012/IV**

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1:Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 125-126.

415/IV Farinhas e produtos similares – Determinação de acidez álcool-solúvel

Este método destina-se à determinação da acidez titulável em farinhas e em todos cereais e amiláceos, por facilitar a dissolução das amostras e evitar a formação de grumos quando o solvente é somente a água.

Material

Balança analítica, papel de filtro, frasco Erlenmeyer de 125 mL, frasco Erlenmeyer de 125mL com tampa e boca esmerilhada, pesa-filtro de 25 mL, pipetas volumétricas de 20 e 50mL, bureta de 10 mL e funil de ± 5 cm de diâmetro.

Reagentes

Álcool
Solução de fenolftaleína
Solução de hidróxido de sódio 0,1 N ou 0,01 N

Procedimento – Pese, com precisão, aproximadamente 2,5 g da amostra em um pesa-filtro de 25 mL. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 125 mL com tampa com o auxilio de 50 mL de álcool, medido com pipeta volumétrica. Agite o frasco algumas vezes e mantenha em repouso por 24 horas. Transfira, com auxilio de uma pipeta volumétrica, 20 mL do sobrenadante para um frasco Erlenmeyer de 125 mL. Adicione algumas gotas da solução de fenolftaleína e titule com hidróxido de sódio 0,1 N ou 0,01 N até coloração rósea persistente. Faça uma prova em branco, usando 20 mL do mesmo álcool.

Cálculo

$$\frac{(V - V') \times f \times 100}{P \times c} = \text{acidez em mL de solução N por cento v/m}$$

V = n° de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra
V'= n° de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação do branco

f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,01N ou 0,1N
P = nº de g da amostra usada na titulação
c = fator de correção (10 para solução de hidróxido de sódio 0,1 N e 100 para solução de hidróxido de sódio 0,01 N)

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1:Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 127.

416/IV Determinação de acidez da gordura extraída de farinha de trigo

Material

Aparelho de Soxhlet, peneira de malha nº 40, estufa, balança analítica, pipeta volumétrica de 50 mL e pipeta graduada de 5 mL.

Reagentes

Éter de petróleo

Solução de tolueno-álcool-fenolftaleína 0,02% – Adicione a um litro de tolueno, um litro de álcool e 0,4 g de fenolftaleína.

Solução-padrão de hidróxido de potássio 0,0178 N, livre de carbonatos
Solução de $KMnO_4$ 0,01%
Solução de $K_2Cr_2O_7$ 0,5%

Procedimento – Pese, com precisão, cerca de 10 g da amostra previamente, seca a aproximadamente 100°C, homogeneizada e passada por uma peneira de malha nº 40. Extraia, em Soxhle, com éter de petróleo por cerca de 16 horas. Complete a evaporação do solvente em banho-maria. Dissolva o resíduo do balão de extração com 50 mL da solução de tolueno-álcool-fenolftaleína e titule com solução-padrão de hidróxido de potássio a 0,0178 N até cor rósea distinta. No caso da formação de emulsão durante a titulação, disperse-a pela adição de mais 50 mL da solução tolueno-álcool-fenolftaleína. O ponto de viragem do indicador deve ser igual à cor obtida pela mistura de 2,5 mL de $KMnO_4$ a 0,01% em 50 mL de uma solução obtida pela adição de $K_2Cr_2O_7$ a 0,5%, gota a gota, em 50 mL de água, até que a coloração fique igual à da solução original da amostra a ser titulada. Faça uma titulação em branco com 50 mL de solução tolueno-álcool-fenolfta-

leína e subtraia do valor da titulação da amostra. Expresse a acidez da gordura em mg de hidróxido de potássio necessários para neutralizar os ácidos graxos livres em 100 g da amostra em base seca.

Cálculo

10 x (Vg – Vb) = acidez da gordura

Vg = volume de solução-padrão de hidróxido de potássio a 0,0178 N gasto na titulação da amostra
Vb = volume de solução-padrão de hidróxido de potássio a 0,0178 N gasto na titulação do branco

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1:Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 128-129

417/IV Farinhas e produtos similares – Determinação do pH

Procedimento – Siga o método descrito em **017/IV**.

418/IV Farinhas e produtos similares – Determinação de Glúten

Os métodos para a dosagem do glúten em farinhas de trigo são todos mais ou menos semelhantes, havendo aparelhos que tornam a operação mais rápida. A dosagem baseia-se na insolubilidade do glúten na água e na propriedade que o mesmo possui de se aglomerar formando uma massa elástica quando manuseado sob uma corrente de água, que elimina os outros constituintes da farinha. O glúten assim obtido, contém globulina, glutenina e gliadina.

Material

Balança analítica, estufa, tamis de malha 100, dessecador, béquer de 100 mL, proveta de 50 mL, vidro de relógio e bastão de vidro.

Reagentes

Solução saturada de iodo
Solução de cloreto de sódio a 5% m/v

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra em um béquer de 100 mL. Adicione 10 mL de solução aquosa de cloreto de sódio a 5%. Misture bem com auxílio de um bastão de vidro, até formar uma massa aglomerada compacta. Deixe em repouso por 30 minutos. Adicione água até cobri-la e deixe em repouso por mais 30 minutos. Lave o aglomerado com água corrente sobre um tamis de malha 100, apertando e amassando levemente com as mãos. Continue a lavar até que a água não adquira coloração azul, ao se adicionar uma gota da solução de iodo saturada. Reúna à massa, os fragmentos que eventualmente tenham passado pelo tamis. Transfira para um vidro de relógio, previamente aquecido em estufa a 105°C, por uma hora e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. Passe, se necessário, uma fina camada de vaselina sobre o vidro de relógio antes da pesagem, para evitar que a massa compacta fique grudada na superfície do vidro. Leve o vidro de relógio com a massa para estufa a 105°C, durante 5 horas. Resfrie em dessecador até temperatura ambiente e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{glúten seco por cento m/m}$$

N = n° de g de glúten seco
P = n° de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1:Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 132-133.

419/IV Pesquisa de bromato em massa fresca para pão (prova de triagem)

Este método fundamenta-se na capacidade oxidante do bromato e também de outros ânions eventualmente presentes nas massas para pães, promovendo a conversão do íon iodeto a iodo.

Material

Balança analítica, estufa, capela para substâncias corrosivas, peneira malha 40, papel de filtro ou papel para cromatografia Whatman nº 1, suporte circular de vidro (plástico ou acrílico), almofariz com pistilo, provetas de vidro, balões volumétricos de 100 mL, atomizador e papel alumínio.

Reagentes

Solução de iodeto de potássio – Dissolva 1 g de iodeto de potássio em 100 mL de água. Guarde esta solução em geladeira e use no máximo durante oito dias.

Solução aquosa de ácido clorídrico (1+3)

Solução de amido 1% m/v – Esta solução deverá ser preparada no momento do uso.

Solução de trabalho de iodeto de potássio – Misture partes iguais das soluções de iodeto de potássio e de ácido clorídrico (1+3). Coloque algumas gotas de solução de amido a 1%.

Procedimento – Distribua partes da massa fresca de pão em um pedaço de papel de alumínio de (30x30) cm. Seque em estufa a 50°C até completa evaporação da água presente na amostra e triture. Passe em peneira de malha 40 e armazene o pó fino obtido. Coloque uma folha de papel de filtro ou papel de cromatografia Whatman nº 1 circular de 11 cm de diâmetro sobre o suporte de vidro. Distribua o pó fino da amostra sobre o papel. Pulverize, com solução de trabalho de iodeto, a parte inferior do papel até o líquido atingir a amostra. A inexistência de pontos violáceos indica a ausência de agentes oxidantes e conseqüentemente, a de bromato na amostra.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1:Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 137.

420/IV Prova confirmatória de bromato por cromatografia em camada delgada

Este método é aplicado para a determinação de bromato em massas frescas para pães.

Material

Balança analítica, estufa, agitador magnético, rotavapor acoplado à bomba de vácuo, béquer de 800 mL, proveta de 500 mL, funil de Büchner, placa cromatográfica com sílica gel G 60 de (20x20) cm, cuba cromatográfica, capilar ou microseringa de (10-50) µL, frasco Erlenmeyer de 50 mL e balão volumétrico de 100 mL.

Reagentes

Solução-padrão de brometo de potássio ou de sódio a 1% m/v
Butanol

Acetona
Hidróxido de amônio
Água oxigenada a 30% (peridrol)

Solução de sulfato de zinco – Dissolva 20 g de $ZnSO_4.7H_2O$ em um litro de água.

Hidróxido de sódio 0,4 M – Dissolva 16 g de NaOH em um litro de água.

Solução-padrão de bromato de potássio ou de sódio a 1% m/v – Dissolva 1 g de $KBrO_3$ (ou $NaBrO_3$) em 100 mL de água.

Solução de fluoresceína – Dissolva 10 mg de fluoresceína em 100 mL de álcool a 50%.

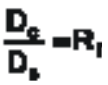
Fase móvel – Em uma proveta de 100 mL misture butanol, acetona e hidróxido de amônio na proporção de 1:3:1.

Solução-reveladora – Prepare uma solução de ácido acético e peridrol na proporção de 10:1. Em um frasco Erlenmeyer de 50 mL, adicione quantidades iguais desta solução e da solução de fluoresceína. Esta mistura deverá ser preparada no momento da revelação do cromatograma.

Procedimento – Transfira 200 mL da solução de sulfato de zinco para um béquer de 800mL. Agite vigorosamente com agitador magnético. Transfira cerca de 50 g da amostra finamente pulverizada, em porções pequenas. Continue agitando por cinco minutos ou até que toda a farinha se disperse. Adicione 50 mL de NaOH 0,4 M, sob agitação contínua. Diminua a agitação e continue por mais cinco minutos. Filtre em funil de Büchner com papel de filtro. Reserve o filtrado e transfira-o para um balão do rotavapor. Acople o balão ao rotavapor e evapore o líquido até aproximadamente 50 mL do extrato concentrado, mantendo a temperatura do banho-maria não superior a 50ºC. Ative a placa em estufa a 105ºC por uma hora. Trace colunas de 2cm de largura e marque um ponto no centro da coluna a 2 cm de altura da parte inferior da placa. Trace uma linha horizontal a 2 cm da parte superior da placa. Aplique, com auxílio de capilar ou microseringa, 5 µL do extrato concentrado em uma das colunas e 2 µL das soluções-padrão de bromato e de brometo em outras duas colunas. Coloque a fase móvel na cuba cromatográfica, tampe com uma placa de vidro e deixe saturar por cerca de uma hora. Coloque a placa imergindo a parte inferior no solvente e corra o cromatograma até que o solvente atinja cerca 1cm da parte superior da placa. Retire a placa, marque a frente do solvente e deixe secar ao ar, na capela, e aplique a solução reveladora sobre toda a superfície da placa. Seque em estufa a 105°C até o aparecimento de manchas características de cor rósea. Determine os

respectivos R_f. A comparação dos valores dos R_f dos padrões com o do componente da amostra permite a sua identificação.

Cálculo



D_c = distância percorrida pelo componente da amostra, a partir do ponto de aplicação da amostra
D_s= distância percorrida pela fase móvel, do ponto de aplicação da amostra até a frente marcada

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 137-138.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas, SP: ed. UNICAMP, 1993. p. 29-43.

Pães, biscoitos, produtos de confeitaria e massas alimentícias

Na análise das preparações a base de farinhas, as determinações de umidade (**012/V**), acidez (**016/IV**), lipídios (**032/IV**), protídios (**036/IV** ou **037/IV**), carboidratos (**038/IV** e **039/IV**), cinzas (**018/IV**) e fibras (**045/IV** e **046/IV**) são as mais gerais. Nestes produtos deve ser feita a pesquisa de corantes naturais e artificiais, de acordo com (**051/IV**).

Pães de leite devem ser examinados em relação à presença de lactose, o que poderá ser feito por cromatografia em papel (**041/IV** ou **042/IV**).

Nas massas alimentícias contendo ovos, deve ser feita a determinação de colesterol.

Os aditivos e enriquecedores devem ser pesquisados ou determinados de acordo com as técnicas específicas.

421/IV Colesterol em massas alimentícias

A determinação do teor de colesterol destina-se ao controle do número de ovos utilizados na fabricação de massas alimentícias. O mesmo método pode ser também utilizado para determinar o teor de colesterol nos ovos *in natura*, pasteurizados ou em pó.

O colesterol é extraído com solvente orgânico e após formação de complexo colorido, é medida a intensidade da cor por espectrofotometria de absorção na região do vísível.

Material

Chapa aquecedora com refluxo, balança analítica, banho-maria, espectrofotômetro UV/IS, tamis de malha 20, extrator de Soxhlet, balão de 250 mL com boca esmerilhada 24/40, balões volumétricos de 50, 100 e 200 mL, pipeta volumétrica de 5 mL e tubo de ensaio com tampa envolto em material opaco (papel alumínio).

Reagentes

Clorofórmio
Anidrido acético glacial
Ácido acético
Ácido sulfúrico
Colesterol

Solução-reagente – Misture 100 mL de ácido acético glacial, 110 mL de anidrido acético e 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. Conserve em geladeira e use no período de uma semana.

Procedimento – Pese, com precisão, aproximadamente 4g da amostra previamente moída e peneirada em tamis de 20 mesh. Leve a um cartucho de extração e mantenha em extração contínua em aparelho de Soxhlet com clorofórmio, durante 20 horas. Retire o cartucho. Reduza o volume do solvente do balão a cerca de 15 mL, destilando o solvente. Transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL com auxílio de clorofórmio. Transfira 5 mL do extrato para um tubo de ensaio envolto em material opaco. Adicione 5 mL da mistura reagente. Tampe, agite e mantenha o tubo em banho-maria a 37°C, por 20 minutos. Faça a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 625 nm, utilizando cubetas de 1 cm de caminho óptico.

Curva-padrão – Prepare uma solução-mãe utilizando 0,2 g de colesterol dissolvido em clorofórmio. Transfira para balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com o mesmo solvente. A partir desta solução-mãe, prepare diferentes diluições, com alíquotas de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mL em balões volumétricos de 100 mL e completando os volumes com clorofórmio. Transfira 5 mL de cada uma das soluções para tubos de ensaio envoltos em material opaco. Adicione 5 mL da mistura reagente. Tampe os tubos, agite e mantenha em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Leia a absorbância em espectrofotômetro a 625 nm. Trace a curva-padrão da absorbância versus concentração de colesterol.

Cálculo

Determine o teor de colesterol usando a curva-padrão previamente estabelecida e faça o cálculo para determinar a porcentagem de colesterol na amostra analisada.

Malte

Malte é o produto da germinação e posterior dessecação do grão de cevada *(Hordeum sativum)* ou de outros cereais. Entre as determinações usuais, são mais importantes as determinações do extrato e da umidade (**012/IV)**.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1:*Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 58-59.

422/IV Malte – Determinação do extrato

Material

Béqueres de 100 e 600 mL, moinho, proveta de 200 mL e funil de vidro de 20 cm de diâmetro.

Procedimento – Pese 55 g da amostra em um béquer de 100 mL. Triture em moinho ajustado de modo a proporcionar um produto que, após passar por um tamis de 121 furos por cm^2, deixe um resíduo de 9 a 11% do peso inicial. Transfira a substância moída para um béquer de 600 mL previamente tarado. Retire as partículas aderentes ao moinho e coloque-as no béquer. Ajuste, imediatamente, o peso da amostra a 50 g, removendo o excesso. (Reserve este excesso em um frasco com rolha esmerilhada para a determinação da umidade). Adicione ao béquer 200 mL de água a 46°C. Misture bem com uma bastão de vidro, impedindo a formação de grumos. Lave cuidadosamente o bastão de vidro e as paredes do béquer com 10 mL de água. (Neste ponto da análise, anote o odor do malte). Coloque o béquer em um banho de água a 46°C. Adapte ao béquer um agitador e um termômetro. Agite e mantenha a temperatura a 45°C, por 30 minutos exatos. Eleve a temperatura de 1°C por minuto até atingir 70°C. Adicione 100 mL de água previamente aquecida a 70°C. Mantenha esta temperatura por 60 minutos. Esfrie à temperatura ambiente (o tempo de resfriamento deve estar compreendido entre 10 e 15 minutos). Interrompa a agitação. Retire o agitador e o termômetro e lave com água. Seque as paredes externas do béquer. Coloque imediatamente o béquer na balança e ajuste o peso do conteúdo a 450 g, pela adição de água. Agite bem com um bastão de vidro. Deixe em repouso por 10 minutos. Agite novamente e filtre, de uma só vez, em papel de filtro pregueado.

Cubra o funil com um vidro de relógio durante a filtração. Receba o filtrado em frasco seco, tendo voltado ao filtro os primeiros 100 mL. Agite o filtrado com um movimento de rotação. Determine a densidade, a 20°C, deste filtrado conforme (**011/IV)**.

Cálculo

$$\frac{E \times (800 + A)}{100 - E} = \text{extrato por cento mím}$$

E = nº de g de sólidos por 100 g do extrato, correspondente à densidade
A = nº de g de umidade por cento da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1:Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 171-172.

Extrato de soja e bebida com extrato de soja

Extrato de soja é o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais, como por exemplo, gorduras ou óleos, açúcares, dextrinas ou amidos, aminoácidos, sais minerais e vitaminas; podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial. O extrato de soja constitui fonte de proteínas e pode ser usado como alimento ou como ingrediente para elaboração de alimentos, como por exemplo, bebida com extrato de soja. As análises usuais para extrato de soja e bebida com extrato de soja incluem as determinações de: substâncias voláteis (**483/IV**) ou (**484/IV**), resíduo por incineração (cinzas) (**018/IV**), lipídios (**486/IV**), protídios (**036/IV** ou **037/IV**), glicídios (**040/IV**) e fibra alimentar (**045/IV - 046/IV**).

Colaboradores
Cláudio de Flora, Deise Aparecida Pinatti Marsiglia, Irani Rodrigues de Oliveira, Leonídio Guilherme , Marcelo Vaz Leonardo, Marilda Duarte e Rejane W. de Abreu

CAPÍTULO **XXVII**

LEITES E DERIVADOS

XXVII

LEITES E DERIVADOS

Leite fluido: *in natura*, pasteurizado e UHT

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda. Na pasteurização, devem ser fielmente observados os limites de temperatura e o tempo de aquecimento: (72-75)°C por (15-20) segundos. Na refrigeração subseqüente, a temperatura de saída do leite não deve ser superior a 4°C. Leite UHT é aquele homogeneizado e submetido durante (2-4) segundos a uma temperatura de (130-150)°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. As principais determinações para este tipo de alimento são: acidez, estabilidade ao álcool a 68%, densidade, gordura, sólidos totais, extrato seco total e desengordurado, crioscopia e índice de refração do soro cúprico a 20°C. Para o leite pasteurizado, as provas de fosfatase e peroxidase deverão, também, ser efetuadas. Outras determinações como ácidos graxos, proteínas **(036/IV** ou **037/IV)**, caseína, lactose, resíduo por incineração (cinzas) e pesquisa de conservadores, contribuem para a avaliação da qualidade do produto.

423/IV Leites – Determinação de densidade a 15°C

O leite é uma emulsão de gordura em água e sua densidade fornece informações sobre a quantidade de gordura nele contida. De maneira geral, um acréscimo de gordura provoca uma diminuição no valor da densidade.

Material

Termolactodensímetro de Quevenne ou Gerber, balança analítica, proveta de 250 mL, mufla, dessecador com sílica-gel, placa de Petri, balão volumétrico de 1000 mL, espátula, bastão de vidro e papel absorvente.

Reagente

Solução de cloreto de sódio 44 g/L – Seque, em uma placa de Petri, cerca de 45 g de cloreto de sódio em mufla a 300°C por duas horas e resfrie em dessecador. Pese exatamente 44 g e dissolva em balão volumétrico de 1000 mL. Esta solução terá a densidade de 1,030, a 20°C.

Procedimento – Transfira, para uma proveta de 250 mL, uma quantidade da amostra previamente homogeneizada e resfriada que permita introduzir o termolactodensímetro. A temperatura deverá variar de (10-20)°C. Introduza o termolactodensímetro lentamente, evitando mergulhá-lo além do ponto de afloramento e tendo o cuidado de não encostar nas paredes da proveta. Faça a leitura ao nível do leite, no menisco superior. Levante um pouco o termolactodensímetro e enxugue a haste com papel absorvente, de cima para baixo. Mergulhe novamente o termolactodensímetro até próximo do traço anteriormente observado. Espere que a coluna de mercúrio do termômetro e o densímetro se estabilizem. Proceda a leitura da densidade e da temperatura. Expresse a densidade a 15°C utilizando a **Tabela 1**. Os valores dos graus lactodensimétricos correspondem à 2ª, 3ª e 4ª casas decimais do valor da densidade. Para obter o valor da densidade corrigida a 15°C, basta colocar 1 à esquerda do valor do grau lactodensimétrico obtido na **Tabela 1**. Se os valores da densidade não estiverem contidos nesta tabela, faça a correção da leitura acrescentando 0,0002 para cada grau acima de 15°C ou diminuindo 0,0002 para cada grau abaixo de 15°C. Ex.: para leitura a 16°C com densidade igual a 1,0150, some a esta leitura 0,0002; para leitura a 12°C com densidade igual a 1,0150, subtraia 0,0006 desta leitura.

Fator de correção do termolactodensímetro – Transfira a solução de cloreto de sódio 44 g/L para uma proveta de 250 mL e introduza lentamente o termolactodensímetro, tendo o cuidado de não encostar nas paredes da proveta. Após a temperatura estabilizar a 20°C, anote a densidade. Calcule o fator de correção, que corresponde à diferença entre o valor teórico da densidade da solução de cloreto de sódio, que é igual a 1,030 e o da densidade lida no termolactodensímetro.

Nota: o fator de correção deve ser sempre somado à densidade obtida na amostra analisada, lida no termolactodensímetro (densidade do leite a 15°C).

Tabela 1 – Correção da densidade do leite, segundo a temperatura

Graus Lactodensimétricos (leitura)	Temperatura do leite										
	10°C	11°C	12°C	13°C	14°C	15°C	16°C	17°C	18°C	19°C	20°C
	Graus lactodensimétricos (correção)										
195	189	190	191	192	193	195	196	198	200	202	204
200	193	194	195	196	198	200	201	203	205	207	209
205	198	199	200	201	203	205	207	209	211	213	215
210	203	204	205	206	208	210	212	214	216	218	220
215	208	209	210	211	213	215	217	219	221	223	225
220	213	214	215	216	218	220	222	224	226	228	230
225	218	219	220	221	223	225	227	229	231	233	235
230	223	224	225	226	228	230	232	234	236	238	240
235	228	229	230	231	233	235	237	239	241	243	245
240	233	234	235	236	238	240	242	244	246	248	250
245	238	239	240	241	243	245	247	249	251	253	255
250	242	243	245	246	248	250	252	254	256	258	260
255	247	248	250	251	253	255	257	259	261	264	266
260	252	253	255	256	258	260	262	264	266	269	271
265	257	258	260	261	263	265	267	269	271	274	277
270	262	263	265	266	268	270	272	274	276	279	282
275	267	268	270	271	273	275	277	279	281	284	287
280	271	272	274	276	278	280	282	284	286	289	292
285	276	277	279	281	283	285	287	289	291	294	297
290	281	282	284	286	288	290	292	294	296	299	302
295	286	287	289	291	293	295	297	299	301	304	307
300	290	292	294	296	298	300	302	304	306	309	312
305	295	297	299	301	303	305	307	309	312	315	318
310	300	302	304	306	308	310	312	314	317	320	323
315	305	307	309	311	313	315	317	319	322	325	328
320	310	312	314	316	318	320	322	324	327	330	333
325	315	317	319	321	323	325	327	329	332	335	338
330	320	322	324	326	328	330	332	334	337	340	343
335	325	327	329	331	333	335	337	339	342	345	348
340	329	331	333	335	338	340	342	344	347	350	353

Referências bibliográficas

FONSECA DA SILVA, P. H.; PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L; COSTA-JÚNIOR, L. C. G. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. Juiz de Fora, Minas Gerais, 1997, p.25.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 199-200.

424/IV Leites – Determinação do grau refratométrico do soro cúprico a 20°C

O método baseia-se no princípio de que a adição de água ao leite dilui as substâncias dissolvidas em seu soro. Uma leitura abaixo de 37°Zeiss do soro cúprico a 20°C sugere adição de água ao leite.

Material

Refratômetro de imersão de Zeiss, frasco Erlenmeyer de 150 mL, proveta de 50 mL, pipeta volumétrica de 10 mL, funil de vidro e papel de filtro.

Reagente

Solução cúprica – Pese 7,25 g de sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$), transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. A leitura desta solução, no refratômetro de imersão de Zeiss a 20°C, deverá ser de 36°Z.

Procedimento – Transfira para um dos copos do refratômetro de imersão de Zeiss uma quantidade correspondente a mais da metade da sua capacidade de água, recentemente fervida e resfriada. Mergulhe o prisma do refratômetro e prenda pelos grampos do respectivo suporte. Deixe nessa posição por 10 minutos, tendo o cuidado de manter o banho em uma temperatura constante. Ilumine o campo e ajuste a ocular. A porção superior do campo, de 0 a 15, aparecerá clara e nítida separada da camada inferior sombria. Faça a leitura e anote a temperatura da água. A leitura deve estar de acordo com a **Tabela 2**.

Preparo e leitura da amostra – Transfira, para um frasco Erlenmeyer de 150 mL, com o auxílio de uma pipeta, 10 mL da solução cúprica e adicione 40 mL da amostra. A adição da amostra deve ser aos poucos, com agitação. Deixe em repouso por 5 minutos. Filtre em papel de filtro. Despreze as primeiras gotas do filtrado, que deverá estar límpido. Receba o filtrado em um frasco Erlenmeyer de 150 mL, seco. Transfira o filtrado para o copo do refratômetro de imersão de Zeiss, ajuste a temperatura do banho a 20°C, mergulhe o prisma do refratômetro e prenda pelos grampos do respectivo suporte. Mantenha a temperatura do banho a 20°C e faça a leitura.

Tabela 2 – Controle no refratômetro de imersão de Zeiss

Temperatura °C	Leitura no aparelho
10,0	16,50
11,0	16,15
12,0	16,00
13,0	15,85
14,0	15,70
15,0	15,50
16,0	15,30
17,0	15,10
17,5	15,00
18,0	14,90
19,0	14,70
20,0	14,50
21,0	14,25
22,0	14,00
23,0	13,75
24,0	13,50
25,0	13,25
26,0	13,00
27,0	12,70
28,0	12,40
29,0	12,10
30,0	11,80

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 201-202.

425/IV Leites – Determinação da adição de água por crioscopia eletrônica

A crioscopia do leite corresponde à medida de seu ponto de congelamento, utilizando o crioscópio eletrônico. O valor desta medida varia em função da época do ano, região geográfica e da raça e alimentação do gado. O grau crioscópico do leite fraudado com água tende a aproximar-se de 0°C, ponto de congelamento da água. A adição de

água ao leite não só reduz a qualidade do mesmo, como também pode ocasionar contaminação dependendo da qualidade da água adicionada, representando um risco à saúde do consumidor. Neste método, a amostra é rapidamente resfriada a alguns graus abaixo do seu ponto de congelamento, sob constante agitação. A vibração resultante ocasiona um desequilíbrio térmico no interior da amostra, fazendo com que a solução libere calor de fusão. A temperatura sobe até atingir o ponto de congelamento, permanecendo constante por algum tempo. Este tempo é denominado *plateau*, durante o qual se faz a leitura do ponto de congelamento.

Material

Crioscópio eletrônico, pipetas graduadas de 5 mL e papel absorvente.

Reagentes

Soluções-padrão de sacarose a 70 e 100 g/L
Soluções-padrão de cloreto de sódio a 6,859 e 10,155 g/L

Procedimento – Cada equipamento tem sua especificação, por isto, siga as instruções do fabricante do aparelho, tais como, o tipo de banho refrigerante e o procedimento de calibração. As soluções para calibração geralmente utilizadas são as de cloreto de sódio e de sacarose, podendo ser utilizada também a água. A calibração do equipamento fornece uma referência confiável ao circuito eletrônico do crioscópio para que os resultados, dentro da faixa de calibração, sejam válidos. Adicione a solução refrigerante e calibre o equipamento usando duas soluções-padrão. Efetue três medições para cada amostra. Os resultados dos testes devem ser próximos, com uma tolerância de mais ou menos 0,002°C ou 0,002°H (Hortvet), conforme a especificação do aparelho. Após cada leitura, lave cuidadosamente o sensor com água e seque com papel absorvente. Uma vez obtidas as três leituras, calcule a média aritmética.

Nota: as concentrações das soluções-padrão devem seguir a especificação do fabricante do equipamento. As mais usadas são:

Cloreto de sódio 6,859 g/L a 20°C = - 0,408°C (- 0,422°H)
Cloreto de sódio 10,155 g/L a 20°C = - 0,600°C (- 0,621°H)
Sacarose 70 g/L a 20°C = -0,408°C (- 0,422°H)
Sacarose 100 g/L a 20°C = -0,600°C (- 0,621°H)

Cálculo

O cálculo da estimativa de fraude por adição de água pode ser realizado por meio da fórmula abaixo:

$$\frac{(B - T) \times 100}{B} = \text{porcentagem de água adicionada}$$

B = ponto de congelamento do leite autêntico (°C)
T = ponto de congelamento da amostra (°C)

Referências bibliográficas

FONSECA DA SILVA, P. H.; PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L; COSTA-JÚNIOR, L.C.G. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos.** Juiz de Fora, Minas Gerais, 1997, p.31-35.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**.16th ed. Washington: APHA, 1992, p. 516-518.

426/IV Leites – Determinação da acidez em ácido láctico

A acidez indica o estado de conservação do leite. Uma acidez alta é o resultado da acidificação da lactose, provocada por microrganismos em multiplicação no leite. A acidez tende, portanto, a aumentar à medida que o leite vai envelhecendo.

Material

Pipeta volumétrica de 10 mL, béquer de 100 mL e bureta de 10 mL.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M
Solução de fenolftaleína a 1%

Procedimento – Transfira, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL da amostra para um béquer de 100 mL (pipete previamente uma porção de leite e despreze-o). Adicione 5 gotas da solução de fenolftaleína. Titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando bureta de 10 mL, até o aparecimento de uma coloração rósea.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0,9}{A} = \text{ácido láctico por cento m/v}$$

V = nº de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 M
A = nº de mL da amostra
0,9 = fator de conversão para ácido láctico

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 203-204.

427/IV Leites – Determinação da acidez em graus Dornic

Material

Pipeta volumétrica de 10 mL, béquer de 100 mL e acidímetro de Dornic ou bureta de 10 mL.

Reagentes

Solução de Dornic (Hidróxido de sódio N/9)
Solução de fenolftaleína a 1%

Procedimento – Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL da amostra para um béquer de 100 mL. Adicione 5 gotas da solução de fenolftaleína. Titule com a solução de hidróxido de sódio N/9, utilizando bureta de 10 mL ou acidímetro de Dornic, até o aparecimento de uma coloração rósea. Faça a leitura e dê o resultado em graus Dornic.

Nota: cada 0,1 mL da solução de hidróxido de sódio N/9 equivale a 1°D.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 203-204.

428/IV Leites – Estabilidade ao etanol a 68% (teste do álcool)

Este método objetiva estimar a estabilidade térmica do leite por meio da reação com solução alcoólica. A ocorrência de coagulação se dá por efeito da elevada acidez ou desequilíbrio salino, quando se promove a desestabilização das micelas do leite pelo álcool.

Material

Tubo de ensaio de 20 mL, suporte para tubos de ensaio e pipetas graduadas de 2 mL.

Reagente

Álcool a 68% v/v

Procedimento – Adicione, em um tubo de ensaio, utilizando pipetas, 2 mL de leite e 2 mL de álcool a 68%, misture cuidadosamente e observe.

Resultado

Instável : coagulado
Estável: sem coagulação

Referência bibliográfica

FONSECA DA SILVA, P. H.; PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L; COSTA-JÚNIOR, L.C.G. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos.** Juiz de Fora, Minas Gerais, 1997, p.21.

429/IV Leites – Determinação do extrato seco total (resíduo seco a 105°C)

O extrato seco total ou resíduo seco é obtido após a evaporação da água e substâncias voláteis.

Material

Balança analítica, estufa, cápsula de porcelana, banho-maria, areia purificada, dessecador com sílica-gel, pipeta volumétrica de 5 mL, bastões de vidro e pinça metálica.

Procedimento – Pese, em uma cápsula, 10 g de areia purificada e dois bastões de vidro apoiados na borda do recipiente. Seque em estufa a (103±2)°C por 2 horas, resfrie em dessecador e pese. Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 5 mL da amostra e misture bem com auxílio dos dois bastões. Seque em banho-maria fervente e deixe em estufa a (103 ± 2)°C por 1 hora. Resfrie em dessecador e pese. Retorne à estufa por 30 minutos, resfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times P}{A} = \text{resíduo seco por cento m/v}$$

P = nº de g de resíduo seco
A = nº de mL da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 204-205.

430/IV Leites – Determinação do extrato seco total por métodos indiretos

Procedimento – Para verificar o valor do extrato seco total pelo disco de Ackermann, faça coincidir as graduações dos círculos interno e médio, correspondentes à densidade e à gordura, respectivamente. A posição da flecha indicará, no círculo externo, o extrato seco total por cento m/v. Alternativamente, determine o extrato seco total por cento m/v, por meio da **Tabela 3** ou pela fórmula de Fleishmann.

Cálculo

Calcule o resíduo seco por meio da fórmula de Fleishmann:

$$1{,}2\,G + 2665\left(\frac{100\,D - 100}{D}\right) = \text{resíduo seco, por cento, m/v}$$

G = nº de g de gordura por cento m/v
D = densidade do leite a 15ºC
Tabela 3 – Determinação do extrato seco total com relação à densidade a 15°C e à porcentagem de gordura

Densidade a 15ºC	Porcentagem de gordura										
	2,0	2,1	2,2	2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	2,9	3,0
	Extrato seco total										
1,0260	9,15	9,27	9,39	9,51	9,63	9,75	9,87	9,99	10,11	10,23	10,35
1,0261	9,18	9,30	9,42	9,54	9,66	9,78	9,90	10,02	10,14	10,26	10,38
1,0262	9,20	9,32	9,44	9,56	9,68	9,80	9,92	10,04	10,16	10,28	10,40
1,0263	9,23	9,35	9,47	9,59	9,71	9,83	9,95	10,07	10,19	10,31	10,43
1,0264	9,26	9,38	9,50	9,62	9,74	9,86	9,98	10,10	10,22	10,34	10,46
1,0265	9,28	9,40	9,52	9,64	9,76	9,88	10,00	10,12	10,24	10,36	10,48
1,0266	9,31	9,43	9,55	9,67	9,79	9,91	10,03	10,15	10,27	10,39	10,51
1,0267	9,33	9,45	9,57	9,69	9,81	9,93	10,05	10,17	10,29	10,41	10,53
1,0268	9,36	9,48	9,60	9,72	9,84	9,96	10,08	10,20	10,32	10,43	10,56
1,0269	9,38	9,50	9,62	9,74	9,86	9,98	10,10	10,22	10,34	10,46	10,58
1,0270	9,41	9,53	9,65	9,77	9,89	10,01	10,13	10,25	10,37	10,49	10,61
1,0271	9,43	9,55	9,67	9,79	9,91	10,03	10,15	10,27	10,39	10,51	10,63
1,0272	9,46	9,58	9,70	9,82	9,94	10,06	10,18	10,30	10,42	10,54	10,66
1,0273	9,48	9,60	9,72	9,84	9,96	10,08	10,20	10,32	10,44	10,56	10,68
1,0274	9,51	9,63	9,75	9,87	9,99	10,11	10,23	10,35	10,47	10,59	10,71
1,0275	9,53	9,65	9,77	9,89	10,01	10,13	10,25	10,37	10,49	10,61	10,73
1,0276	9,56	9,68	9,80	9,92	10,04	10,16	10,28	10,40	10,52	10,64	10,76
1,0277	9,58	9,70	9,82	9,94	10,06	10,18	10,30	10,42	10,54	10,66	10,78
1,0278	9,61	9,73	9,85	9,97	10,09	10,21	10,33	10,45	10,57	10,69	10,81
1,0279	9,63	9,75	9,87	9,99	10,11	10,23	10,35	10,47	10,59	10,71	10,83
1,0280	9,66	9,78	9,90	10,02	10,14	10,26	10,38	10,50	10,62	10,74	10,86
1,0281	9,68	9,80	9,92	10,04	10,16	10,28	10,40	10,52	10,64	10,76	10,88
1,0282	9,71	9,83	9,95	10,07	10,19	10,31	10,43	10,55	10,67	10,79	10,91
1,0283	9,73	9,85	9,97	10,09	10,21	10,33	10,45	10,57	10,69	10,81	10,93
1,0284	9,76	9,88	10,00	10,12	10,24	10,36	10,48	10,60	10,72	10,84	10,96
1,0285	9,79	9,91	10,03	10,15	10,27	10,39	10,51	10,63	10,75	10,87	10,99
1,0286	9,81	9,93	10,05	10,17	10,29	10,41	10,53	10,65	10,77	10,89	11,01
1,0287	9,84	9,96	10,08	10,20	10,32	10,44	10,56	10,68	10,80	10,92	11,04
1,0288	9,86	9,98	10,10	10,22	10,34	10,46	10,58	10,70	10,82	10,94	11,06
1,0289	9,89	10,01	10,13	10,25	10,37	10,49	10,61	10,73	10,85	10,97	11,09
1,0290	9,91	10,03	10,15	10,27	10,39	10,51	10,63	10,75	10,87	10,99	11,11
1,0291	9,94	10,06	10,18	10,30	10,42	10,54	10,66	10,78	10,90	11,02	11,14
1,0292	9,96	10,08	10,20	10,32	10,44	10,56	10,68	10,80	10,92	11,04	11,16
1,0293	9,99	10,11	10,23	10,35	10,47	10,59	10,71	10,83	10,95	11,07	11,19
1,0294	10,01	10,13	10,25	10,37	10,49	10,61	10,73	10,85	10,97	11,09	11,21
1,0295	10,04	10,16	10,28	10,40	10,52	10,64	10,76	10,88	11,00	11,12	11,24
1,0296	10,06	10,18	10,30	10,42	10,54	10,66	10,78	10,90	11,02	11,14	11,26
1,0297	10,09	10,21	10,33	10,45	10,57	10,69	10,81	10,93	11,05	11,17	11,29
1,0298	10,11	10,23	10,35	10,47	10,59	10,71	10,83	10,95	11,07	11,19	11,31
1,0299	10,14	10,26	10,38	10,50	10,62	10,74	10,86	10,98	11,10	11,22	11,34
1,0300	10,16	10,28	10,40	10,52	10,64	10,76	10,88	11,00	11,12	11,24	11,36
1,0301	10,19	10,31	10,43	10,55	10,67	10,79	10,91	11,03	11,15	11,27	11,39
1,0302	10,21	10,33	10,45	10,57	10,69	10,81	10,93	11,05	11,17	11,29	11,41
1,0303	10,24	10,36	10,48	10,60	10,72	10,84	10,96	11,08	11,20	11,32	11,44
1,0304	10,26	10,38	10,50	10,62	10,74	10,86	10,98	11,10	11,22	11,34	11,46
1,0305	10,29	10,41	10,53	10,65	10,77	10,89	11,01	11,13	11,25	11,37	11,49
1,0306	10,31	10,43	10,55	10,67	10,79	10,91	11,03	11,15	11,27	11,39	11,51
1,0307	10,34	10,46	10,58	10,70	10,82	10,94	11,06	11,18	11,30	11,42	11,54
1,0308	10,36	10,48	10,60	10,72	10,84	10,96	11,08	11,20	11,32	11,44	11,56
1,0309	10,39	10,51	10,63	10,75	10,87	10,99	11,11	11,23	11,35	11,47	11,59
1,0310	10,41	10,53	10,65	10,77	10,89	11,01	11,13	11,25	11,37	11,49	11,61
1,0311	10,44	10,56	10,68	10,80	10,92	11,04	11,16	11,28	11,40	11,52	11,64

Densidade a 15ºC	Porcentagem de gordura										
	2,0	**2,1**	**2,2**	**2,3**	**2,4**	**2,5**	**2,6**	**2,7**	**2,8**	**2,9**	**3,0**
	Extrato seco total										
1,0312	10,46	10,58	10,70	10,82	10,94	11,06	11,18	11,30	11,42	11,54	11,66
1,0313	10,49	10,61	10,73	10,85	10,97	11,09	11,21	11,33	11,45	11,57	11,69
1,0314	10,51	10,63	10,75	10,87	10,99	11,11	11,23	11,35	11,47	11,59	11,71
1,0315	10,54	10,66	10,78	10,90	11,02	11,14	11,26	11,38	11,50	11,62	11,74
1,0316	10,56	10,68	10,80	10,92	11,04	11,16	11,28	11,40	11,52	11,64	11,76
1,0317	10,59	10,71	10,83	10,95	11,07	11,19	11,31	11,43	11,55	11,67	11,79
1,0318	10,61	10,73	10,85	10,97	11,09	11,21	11,33	11,45	11,57	11,69	11,81
1,0319	10,64	10,76	10,88	11,00	11,12	11,24	11,36	11,48	11,60	11,72	11,84
1,0320	10,66	10,78	10,90	11,02	11,14	11,26	11,38	11,50	11,62	11,74	11,86
1,0321	10,69	10,81	10,93	11,05	11,17	11,29	11,41	11,53	11,65	11,77	11,89
1,0322	10,71	10,83	10,95	11,07	11,19	11,31	11,43	11,55	11,67	11,79	11,91
1,0323	10,74	10,86	10,98	11,10	11,22	11,34	11,46	11,58	11,70	11,82	11,94
1,0324	10,76	10,88	11,00	11,12	11,24	11,36	11,48	11,60	11,72	11,84	11,96
1,0325	10,79	10,91	11,03	11,15	11,27	11,39	11,51	11,63	11,75	11,87	11,99
1,0326	10,81	10,93	11,05	11,17	11,29	11,41	11,53	11,65	11,77	11,89	12,01
1,0327	10,84	10,96	11,08	11,20	11,32	11,44	11,56	11,68	11,80	11,92	12,04
1,0328	10,86	10,98	11,10	11,22	11,34	11,46	11,58	11,70	11,82	11,94	12,06
1,0329	10,89	11,01	11,13	11,25	11,37	11,49	11,61	11,73	11,85	11,97	12,09
1,0330	10,91	11,03	11,15	11,27	11,39	11,51	11,63	11,75	11,87	11,99	12,11
1,0331	10,94	11,06	11,18	11,30	11,42	11,54	11,66	11,78	11,90	12,02	12,14
1,0332	10,96	11,08	11,20	11,32	11,44	11,56	11,68	11,80	11,92	12,04	12,16
1,0333	10,99	11,11	11,23	11,35	11,47	11,59	11,71	11,83	11,95	12,07	12,19
1,0334	11,01	11,13	11,25	11,37	11,49	11,61	11,73	11,85	11,97	12,09	12,21
1,0335	11,04	11,16	11,28	11,40	11,52	11,64	11,76	11,88	12,00	12,12	12,24
1,0336	11,06	11,18	11,30	11,42	11,54	11,66	11,78	11,90	12,02	12,14	12,26
1,0337	11,09	11,21	11,33	11,45	11,57	11,69	11,81	11,93	12,05	12,17	12,29
1,0338	11,11	11,23	11,35	11,47	11,59	11,71	11,83	11,95	12,07	12,19	12,31
1,0339	11,14	11,26	11,38	11,50	11,62	11,74	11,86	11,98	12,10	12,22	12,34
1,0340	11,16	11,28	11,40	11,52	11,64	11,76	11,88	12,00	12,12	12,24	12,36
1,0341	11,19	11,31	11,43	11,55	11,67	11,79	11,91	12,03	12,15	12,27	12,39
1,0342	11,21	11,33	11,45	11,57	11,69	11,81	11,93	12,05	12,17	12,29	12,41
1,0343	11,24	11,36	11,48	11,60	11,72	11,84	11,96	12,08	12,20	12,32	12,44
1,0344	11,26	11,38	11,50	11,62	11,74	11,86	11,98	12,10	12,22	12,34	12,46
1,0345	11,29	11,41	11,53	11,65	11,77	11,89	12,01	12,13	12,25	12,37	12,49
1,0346	11,31	11,43	11,55	11,67	11,79	11,91	12,03	12,15	12,27	12,39	12,41
1,0347	11,34	11,46	11,58	11,70	11,82	11,94	12,06	12,18	12,30	12,42	12,54
1,0348	11,36	11,48	11,60	11,72	11,84	11,96	12,08	12,20	12,32	12,44	12,56
1,0349	11,39	11,51	11,63	11,75	11,87	11,99	12,11	12,23	12,35	12,47	12,59
1,0350	11,41	11,53	11,65	11,77	11,89	12,01	12,13	12,25	12,37	12,49	12,61

Densidade a 15ºC	Porcentagem de gordura										
	3,0	3,1	3,2	3,3	3,4	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	4,0
	Extrato seco total										
1,0260	10,35	10,47	10,59	10,71	10,83	10,95	11,07	11,19	11,31	11,43	11,55
1,0261	10,38	10,50	10,62	10,74	10,86	10,98	11,10	11,22	11,34	11,46	11,58
1,0262	10,40	10,52	10,64	10,76	10,88	11,00	11,12	11,24	11,36	11,48	11,60
1,0263	10,43	10,55	10,67	10,79	10,91	11,03	11,15	11,27	11,39	11,51	11,63
1,0264	10,46	10,58	10,70	10,82	10,94	11,06	11,18	11,30	11,42	11,54	11,66
1,0265	10,48	10,60	10,72	10,84	10,96	11,08	11,20	11,32	11,44	11,56	11,68
1,0266	10,51	10,63	10,75	10,87	10,99	11,11	11,23	11,35	11,47	11,59	11,71
1,0267	10,53	10,65	10,77	10,89	11,01	11,13	11,25	11,37	11,49	11,61	11,73
1,0268	10,56	10,68	10,80	10,92	11,04	11,16	11,28	11,40	11,52	11,64	11,76
1,0269	10,58	10,70	10,82	10,94	11,06	11,18	11,30	11,42	11,54	11,66	11,78
1,0270	10,61	10,73	10,85	10,97	11,09	11,21	11,33	11,45	11,57	11,69	11,81
1,0271	10,63	10,75	10,87	10,99	11,11	11,23	11,35	11,47	11,59	11,71	11,83
1,0272	10,66	10,78	10,90	11,02	11,14	11,26	11,38	11,50	11,62	11,74	11,86
1,0273	10,68	10,80	10,92	11,04	11,16	11,28	11,40	11,52	11,64	11,76	11,88
1,0274	10,71	10,83	10,95	11,07	11,19	11,31	11,43	11,55	11,67	11,79	11,91
1,0275	10,73	10,85	10,97	11,09	11,21	11,33	11,45	11,57	11,69	11,81	11,93
1,0276	10,76	10,88	11,00	11,12	11,24	11,36	11,48	11,60	11,72	11,84	11,96
1,0277	10,78	10,90	11,02	11,14	11,26	11,38	11,50	11,62	11,74	11,86	11,98
1,0278	10,81	10,93	11,05	11,17	11,29	11,41	11,53	11,65	11,77	11,89	12,01
1,0279	10,83	10,95	11,07	11,19	11,31	11,43	11,55	11,67	11,79	11,91	12,03
1,0280	10,86	10,98	11,10	11,22	11,34	11,46	11,58	11,70	11,82	11,94	12,06
1,0281	10,88	11,00	11,12	11,24	11,36	11,48	11,60	11,72	11,84	11,96	12,08
1,0282	10,91	11,03	11,15	11,27	11,39	11,51	11,63	11,75	11,87	11,99	12,11
1,0283	10,93	11,05	11,17	11,29	11,41	11,53	11,65	11,77	11,89	12,01	12,13
1,0284	10,96	11,08	11,20	11,32	11,44	11,56	11,68	11,80	11,92	12,03	12,16
1,0285	10,99	11,11	11,23	11,35	11,47	11,59	11,71	11,83	11,95	12,07	12,19
1,0286	11,01	11,13	11,25	11,37	11,49	11,61	11,73	11,85	11,97	12,09	12,21
1,0287	11,04	11,16	11,28	11,40	11,52	11,64	11,76	11,88	12,00	12,12	12,24
1,0288	11,06	11,18	11,30	11,42	11,54	11,66	11,78	11,90	12,02	12,14	12,26
1,0289	11,09	11,21	11,33	11,45	11,57	11,69	11,81	11,93	12,05	12,17	12,29
1,0290	11,11	11,23	11,35	11,47	11,59	11,71	11,83	11,95	12,07	12,19	12,31
1,0291	11,14	11,26	11,38	11,50	11,62	11,74	11,86	11,98	12,10	12,22	12,34
1,0292	11,16	11,28	11,40	11,52	11,64	11,76	11,88	12,00	12,12	12,24	12,36
1,0293	11,19	11,31	11,43	11,55	11,67	11,79	11,91	12,03	12,15	12,27	12,39
1,0294	11,21	11,33	11,45	11,57	11,69	11,81	11,93	12,05	12,17	12,29	12,41
1,0295	11,24	11,36	11,48	11,60	11,72	11,84	11,96	12,08	12,20	12,32	12,44
1,0296	11,26	11,38	11,50	11,62	11,74	11,86	11,98	12,10	12,22	12,34	12,46
1,0297	11,29	11,41	11,53	11,65	11,77	11,89	12,01	12,13	12,25	12,37	12,49
1,0298	11,31	11,43	11,55	11,67	11,79	11,91	12,03	12,15	12,27	12,39	12,51
1,0299	11,34	11,46	11,58	11,70	11,82	11,94	12,06	12,18	12,30	12,42	12,54
1,0300	11,36	11,48	11,60	11,72	11,84	11,96	12,08	12,20	12,32	12,44	12,56
1,0301	11,39	11,51	11,63	11,75	11,87	11,99	12,11	12,23	12,35	12,47	12,59
1,0302	11,41	11,53	11,65	11,77	11,89	12,01	12,13	12,25	12,37	12,49	12,61
1,0303	11,44	11,56	11,68	11,80	11,92	12,04	12,16	12,28	12,40	12,52	12,64
1,0304	11,46	11,58	11,70	11,82	11,94	12,06	12,18	12,30	12,42	12,54	12,66
1,0305	11,49	11,61	11,73	11,85	11,97	12,09	12,21	12,33	12,45	12,57	12,69
1,0306	11,51	11,63	11,75	11,87	11,99	12,11	12,23	12,35	12,47	12,59	12,71
1,0307	11,54	11,66	11,78	11,90	12,02	12,14	12,26	12,38	12,50	12,62	12,74
1,0308	11,56	11,68	11,80	11,92	12,04	12,16	12,28	12,40	12,52	12,64	12,76
1,0309	11,59	11,71	11,83	11,95	12,07	12,19	12,31	12,43	12,55	12,67	12,79
1,0310	11,61	11,73	11,85	11,97	12,09	12,21	12,33	12,45	12,57	12,69	12,81
1,0311	11,64	11,76	11,88	12,00	12,12	12,24	12,36	12,48	12,60	12,72	12,84
1,0312	11,66	11,78	11,90	12,02	12,14	12,26	12,38	12,50	12,62	12,74	12,86
1,0313	11,69	11,81	11,93	12,05	12,17	12,29	12,41	12,53	12,65	12,77	12,89

Densidade a 15ºC	Porcentagem de gordura										
	3,0	3,1	3,2	3,3	3,4	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	4,0
	Extrato seco total										
1,0314	11,71	11,83	11,95	12,07	12,19	12,31	12,43	12,55	12,67	12,79	12,91
1,0315	11,74	11,86	11,98	12,10	12,22	12,34	12,46	12,58	12,70	12,82	12,94
1,0316	11,76	11,88	12,00	12,12	12,24	12,36	12,48	12,60	12,72	12,84	12,96
1,0317	11,79	11,91	12,03	12,15	12,27	12,39	12,51	12,63	12,75	12,87	12,99
1,0318	11,81	11,93	12,05	12,17	12,29	12,41	12,53	12,65	12,77	12,89	13,01
1,0319	11,84	11,96	12,08	12,20	12,32	12,44	12,56	12,68	12,80	12,92	13,04
1,0320	11,86	11,98	12,10	12,22	12,34	12,46	12,58	12,70	12,82	12,94	13,06
1,0321	11,89	12,01	12,13	12,25	12,37	12,49	12,61	12,73	12,85	12,97	13,09
1,0322	11,91	12,03	12,15	12,27	12,39	12,51	12,63	12,75	12,87	12,99	13,11
1,0323	11,94	12,06	12,18	12,30	12,42	12,54	12,66	12,78	12,90	13,02	13,14
1,0324	11,96	12,08	12,20	12,32	12,44	12,56	12,68	12,80	12,92	13,04	13,16
1,0325	11,99	12,11	12,23	12,35	12,47	12,59	12,71	12,83	12,95	13,07	13,19
1,0326	12,01	12,13	12,25	12,37	12,49	12,61	12,73	12,85	12,97	13,09	13,21
1,0327	12,04	12,16	12,28	12,40	12,52	12,64	12,76	12,88	13,00	13,12	13,24
1,0328	12,06	12,18	12,30	12,42	12,54	12,66	12,78	12,90	13,02	13,14	13,26
1,0329	12,09	12,21	12,33	12,45	12,57	12,69	12,81	12,93	13,05	13,17	13,29
1,0330	12,11	12,23	12,35	12,47	12,59	12,71	12,83	12,95	13,07	13,19	13,31
1,0331	12,14	12,26	12,38	12,50	12,62	12,74	12,86	12,98	13,10	13,22	13,34
1,0332	12,16	12,28	12,40	12,52	12,64	12,76	12,88	13,00	13,12	13,24	13,36
1,0333	12,19	12,31	12,43	12,55	12,67	12,79	12,91	13,03	13,15	13,27	13,39
1,0334	12,21	12,33	12,45	12,57	12,69	12,81	12,93	13,05	13,17	13,29	13,41
1,0335	12,24	12,36	12,48	12,60	12,72	12,84	12,96	13,08	13,20	13,32	13,44
1,0336	12,26	12,38	12,50	12,62	12,74	12,86	12,98	13,10	13,22	13,34	13,46
1,0337	12,29	12,41	12,53	12,65	12,77	12,89	13,01	13,13	13,25	13,37	13,49
1,0338	12,31	12,43	12,55	12,67	12,79	12,91	13,03	13,15	13,27	13,39	13,51
1,0339	12,34	12,46	12,58	12,70	12,82	12,94	13,06	13,18	13,30	13,42	13,54
1,0340	12,36	12,48	12,60	12,72	12,84	12,96	13,08	13,20	13,32	13,44	13,56
1,0341	12,39	12,51	12,63	12,75	12,87	12,99	13,11	13,23	13,35	13,47	13,59
1,0342	12,41	12,53	12,65	12,77	12,89	13,01	13,13	13,25	13,37	13,49	13,61
1,0343	12,44	12,56	12,68	12,80	12,92	13,04	13,16	13,28	13,40	13,52	13,64
1,0344	12,46	12,58	12,70	12,82	12,94	13,06	13,18	13,30	13,42	13,54	13,66
1,0345	12,49	12,61	12,73	12,85	12,97	13,09	13,21	13,33	13,45	13,57	13,69
1,0346	12,41	12,63	12,75	12,87	12,99	13,11	13,23	13,35	13,47	13,59	13,71
1,0347	12,54	12,66	12,78	12,90	13,02	13,14	13,26	13,38	13,50	13,62	13,74
1,0348	12,56	12,68	12,80	12,92	13,04	13,16	13,28	13,40	13,52	13,64	13,76
1,0349	12,59	12,71	12,83	12,95	13,07	13,19	13,31	13,43	13,55	13,67	13,79
1,0350	12,61	12,73	12,85	12,97	13,09	13,21	13,33	13,45	13,57	13,69	13,81

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 205.

PAOLONE, L. Tabela para a determinação do resíduo seco (extrato seco) do leite. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.17, n.1/2, p.59-70, 1957.

431/IV Leites – Determinação do extrato seco desengordurado

Procedimento – Calcule o extrato seco desengordurado por cento m/v, da seguinte forma:

P-G = extrato seco desengordurado % m/v

P = nº de g do extrato seco total m/v
G = nº de g de gordura por cento m/v

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 205.

432/IV Leites – Determinação de glicídios redutores em lactose

Material

Balão volumétrico de 100 mL, pipetas volumétricas de 10 mL, pipeta graduada de 2 mL, frasco Erlenmeyer de 300 mL, funil de vidro, papel de filtro, balão de fundo chato de 300 mL, bureta de 25 mL, chapa aquecedora e garra de madeira.

Reagentes

Solução de sulfato de zinco a 30% m/v
Solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v
Soluções de Fehling tituladas (**Apêndice I**)

Procedimento – Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL da amostra para um balão volumétrico de 100 mL, adicione 50 mL de água, 2 mL da solução de sulfato de zinco a 30% e 2 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15%, misturando bem após cada adição. Deixe sedimentar durante 5 minutos, complete o volume com água e agite. Filtre em papel de filtro, recebendo o filtrado, que deverá estar límpido, em um frasco Erlenmeyer de 300 mL. Em um balão de fundo chato de 300 mL, transfira 10 mL de cada uma das soluções de Fehling e adicione 40 mL de água, aquecendo até a ebulição em chapa aquecedora. Transfira o filtrado para uma bureta de 25 mL e adicione, às gotas, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, utilizando garra de madeira, até que esta solução mude de coloração azul à incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho-tijolo).

Cálculo

$$\frac{V \times 0{,}068 \times 100}{L \times v} = \text{glicídios redutores em lactose}$$

0,068 = nº de g de lactose que corresponde a 10 mL da solução de Fehling
v = nº de mL da solução da amostra, gasto na titulação
L = nº de mL da amostra
V = nº de mL da diluição da amostra (100 mL)

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 206.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, 02/05/03, Brasilia, p. 15.

433/IV Leites – Determinação de gordura pelo método de Gerber

O método mais empregado para a determinação de gordura no leite é o de Gerber, que baseia-se na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, na centrifugação e posterior determinação da gordura. Esta determinação pode, ainda, ser feita em aparelhos automáticos.

Material

Lactobutirômetro de Gerber com respectiva rolha, balança semi-analítica, pipetadores automáticos de 10 e 1 mL, termômetro, pipeta volumétrica de 11 mL, termocentrífuga de Gerber ou centrífuga de Gerber, banho-maria, papel absorvente e luvas.

Reagentes

Ácido sulfúrico (D = 1,820 - 1,825)
Álcool isoamílico (D = 0,815)

Procedimento – Pese os lactobutirômetros com suas respectivas rolhas para verificar se os mesmos estão com os pesos equivalentes. Transfira, com o auxilio de um pipetador automático, 10 mL de ácido sulfúrico para o butirômetro. Adicione lentamente, com o auxílio de pipeta volumétrica, 11 mL da amostra, evitando que se queime ao contato com o ácido. Junte, com o auxilio de um pipetador automático, 1 mL de álcool isoamílico.

Estas adições devem ser feitas sem molhar internamente o gargalo do butirômetro; se isto acontecer, limpe cuidadosamente com um papel absorvente. Arrolhe o butirômetro, pese, utilizando luvas, e agite até completa dissolução. Centrifugue a (1200 ± 100) rpm durante 15 minutos, quando for usada a termocentrífuga. No caso de usar a centrífuga de Gerber, centrifugue por 5 minutos, leve para um banho-maria a (63 ± 2)ºC, por 2 a 3 minutos, com a rolha para baixo. Retire o lactobutirômetro da termocentrífuga ou do banho na posição vertical (rolha para baixo). Manejando a rolha, coloque a camada amarela-clara, transparente (gordura), dentro da escala graduada do lactobutirômetro. O valor obtido na escala corresponde diretamente à porcentagem de gordura, cuja leitura deve ser feita no menisco inferior.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 207-208.

434/IV Leites – Extração de gordura para determinação de ácidos graxos

Material

Balança semi-analítica, espátula, béqueres de 250 e 600 mL, pipeta graduada de 5 mL, provetas de 100 e 200 mL, vidro de relógio, agitador magnético, barra magnética, capela de exaustão, papel de filtro e fita indicadora de pH (0-14).

Reagentes

Ácido clorídrico
Éter anidro
Sulfato de sódio anidro

Procedimento – Transfira, na capela, 100 mL da amostra para um béquer de 600 mL, adicione 200 mL de éter, sob agitação. Acerte o pH com ácido clorídrico até 2. Tampe o béquer com vidro de relógio. Agite por 1 hora utilizando o agitador magnético. Filtre com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, receba o filtrado em um béquer de 250 mL e evapore, na capela, o solvente à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Faça a determinação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa (**053/IV**).

Referência bibliográfica

FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. v. 1: General aspects. 2nd ed., London: Chapman & Hall, 1999. p. 370.

435/IV Leites – Determinação de protídios

Procedimento – Transfira, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 5 mL da amostra para um frasco de Kjeldahl de 300 mL e proceda conforme método **036/IV** ou **037/IV**, utilizando o fator 6,38 para conversão de nitrogênio em proteína.

436/IV Leites – Determinação de caseína

Material

Pipeta volumétrica de 10 mL, pipeta graduada de 1 mL, béqueres de 100 e 400 mL, provetas de 10 e 100 mL, termômetro, frasco de Kjeldahl de 300 mL, papel de filtro e funil de vidro.

Reagente

Solução saturada de sulfato duplo de alumínio e potássio

Procedimento – Transfira, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL da amostra para um béquer de 100 mL. Adicione 40 mL de água a 50ºC e 1 mL de uma solução saturada de sulfato duplo de alumínio e potássio e agite. Filtre, utilizando papel de filtro e lave com 50 mL de água. Transfira o papel de filtro com o resíduo para um frasco de Kjeldahl de 300 mL e determine a caseína neste resíduo, conforme o método **036/IV** ou **037/IV**, utilizando o fator 6,38 para a conversão de nitrogênio em proteína. Faça um branco com o papel de filtro.

437/IV Leites – Determinação do resíduo por incineração (cinzas)

O resíduo por incineração (cinzas) do leite é constituído principalmente por óxidos de potássio, sódio, cálcio, magnésio, fósforo e por cloretos.

Material

Balança analítica, cápsula de porcelana, pipeta volumétrica de 20 mL, banho-maria, chapa aquecedora, mufla, dessecador com sílica-gel e pinça de metal.

Procedimento – Transfira, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 20 mL da amostra para uma cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a (550 ± 10)°C, por 2 horas, resfriada em dessecador e pesada. Evapore em banho-maria até a secagem. Carbo-

nize em chapa aquecedora na capela e incinere em mufla a (550 ± 10)°C, pelo período aproximado de 4 horas. O resíduo deverá ficar branco ou ligeiramente acinzentado, caso contrário, resfrie, adicione 0,5 mL de água, seque em banho-maria e incinere novamente. Resfrie em dessecador e pese.

Cálculo

$$\frac{100 \times P}{A} = \text{resíduo por incineração (cinzas) por cento m/v}$$

P = n° de g de resíduo
A = n°de mL da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 211-212.

438/IV Leites – Determinação da alcalinidade das cinzas em carbonato de sódio

A presença de substâncias alcalinas adicionadas ao leite faz aumentar a alcalinidade das cinzas, que é determinada por via indireta fazendo-se reagir as cinzas com uma quantidade conhecida de solução ácida padronizada e titulando o excesso deste com uma solução alcalina de concentração conhecida.

Material

Erlenmeyer de 500 mL, bastão de vidro, proveta de 50 mL, buretas de 50 mL e chapa aquecedora

Reagentes

Solução de ácido clorídrico 0,1 M
Solução de hidróxido de sódio 0,1 M
Solução de fenolftaleína a1%

Solução de cloreto de cálcio a 40% m/v neutralizada com solução de ácido clorídrico 0,1 M e filtrada

Procedimento – Transfira, quantitativamente, as cinzas obtidas em **437/IV**, para um Erlenmeyer de 500 mL, usando pequenas porções de água. Adicione, aos poucos, 50 mL

de solução de ácido clorídrico 0,1 M e leve à ebulição moderada por 5 minutos. Resfrie e adicione 30 mL da solução de cloreto de cálcio a 40% e 5 gotas de solução de fenolftaleína. Deixe em repouso por 5 minutos e titule o excesso de ácido clorídrico com solução de hidróxido de sódio 0,1 M. A titulação deve ser bastante rápida até se obter turvação e coloração rósea.

Cálculo

$$\frac{V \times M \times f \times 0{,}053 \times 100}{m} = \text{alcalinidade das cinzas, em porcentagem de } Na_2CO_3$$

V = diferença entre os volumes da solução de ácido clorídrico 0,1 M adicionado e da solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação em mL
M = molaridade da solução de hidróxido de sódio
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 M
0,053 = miliequivalentes/g de carbonato de sódio
m = nº de mL da amostra

Nota: valores normais para leite fluido: (0,015-0,030)%.; valores superiores, sobretudo acima de 0,040%, caracterizam adição de substâncias alcalinas.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasilia, 02/05/03, p.12.

439IV Leites – Determinação da alcalinidade das cinzas em solução normal

Material

Frasco Erlenmeyer de 250 mL, proveta de 50 mL, 2 buretas de 25 mL e banho-maria.

Reagentes

Ácido sulfúrico 0,1 N
Hidróxido de sódio 0,1N
Solução de fenolftaleína a 1%

Procedimento – Transfira, quantitativamente, as cinzas obtidas em **437/IV** para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, com o auxílio de 30 mL de água. Adicione 20 mL de ácido sulfúrico 0,1 N e 5 gotas da solução de fenolftaleína (a solução deve ser incolor). Aqueça em banho-maria por 5 minutos. Titule, a quente, com uma solução de hidróxido

de sódio 0,1 N até coloração rósea.
Cálculo

$$\frac{10 \times V}{A} = \text{alcalinidade das cinzas, em solução normal por cento v/v}$$

V= diferença entre o nº de mL de ácido sulfúrico 0,1 N adicionado e o nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação
A = nº de mL da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 212.

440/IV Leites – Determinação de cloretos em cloreto de sódio

Os cloretos são precipitados sob a forma de cloreto de prata em pH levemente alcalino em presença de cromato de potássio como indicador. O ponto final da titulação é visualizado pela formação do precipitado vermelho-tijolo de cromato de prata.

Material

Pipetas volumétricas de 10 e 20 mL, cápsula de porcelana, banho-maria, chapa aquecedora, capela de exaustão, mufla, proveta de 50 mL, balão volumétrico de 100 mL, béquer de 200 mL, bureta de 10 mL, funil de vidro e papel de filtro.

Reagentes

Ácido nítrico
Carbonato de cálcio
Solução de cromato de potássio a 10% m/v
Solução de nitrato de prata 0,1 M

Procedimento – Transfira, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL da amostra para uma cápsula de porcelana. Evapore em banho-maria até a secagem. Carbonize em chapa elétrica na capela. Incinere em mufla a (550 ± 10)ºC. As cinzas deverão ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas, caso contrário esfrie, adicione 0,5 mL de água, seque

em banho-maria e incinere novamente. Esfrie, adicione 50 mL de água e acidule com ácido nítrico. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com água. Filtre em papel de filtro seco e receba o filtrado em um frasco seco. Transfira, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 20 mL do filtrado para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Neutralize com carbonato de cálcio e adicione mais 0,5 g. Adicione 5 gotas de uma solução de cromato de potássio a 10%. Titule com solução de nitrato de prata 0,1 M até o aparecimento de uma coloração vermelho-tijolo.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0{,}584}{S} = \text{cloretos, em cloreto de sódio, por cento m/v}$$

V = nº de mL da solução de nitrato de prata 0,1 M gasto na titulação
f = fator da solução de nitrato de prata 0,1 M
S = nº de mL da amostra contido na solução usada para a titulação

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 213.

441/IV Leites – Identificação de amido

A prova verifica o desenvolvimento de coloração azulada após aquecimento e adição de solução iodo (solução de Lugol) à amostra, em presença de amido. O aquecimento promove a abertura da cadeia helicoidal da molécula do amido, permitindo a adsorção do iodo com o desenvolvimento da coloração caracteristica após resfriamento.

Material

Proveta de 10 mL, béquer de 50 mL e chapa aquecedora

Reagente

Solução de Lugol

Procedimento – Meça 10 mL da amostra em uma proveta. Transfira para um béquer e aqueça até ebulição em chapa aquecedora. Resfrie e adicione 2 gotas de solução de Lugol.

Na presença de amido, aparecerá uma coloração azul.
Notas
Para leite em pó, reconstitua o produto antes de realizar a prova para amido.
No caso de leite fermentado, doce de leite, leite condensado e queijo, pese 10 g da amostra, adicione 50 mL de água e misture. Aqueça até fervura, esfrie e realize a prova para amido.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 214.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasilia, 02/05/03, p.7-8.

442/IV Leites – Identificação de sacarose com resorcina

A resorcina em meio ácido condensa-se com as aldoses formando composto de coloração vermelha.

Material

Proveta de 20 mL, tubo de ensaio de 50 mL, béquer de 500 mL, chapa aquecedora, suportes para tubos de ensaios e banho-maria.

Reagentes

Ácido clorídrico
Resorcina

Procedimento – Meça 15 mL da amostra em uma proveta. Transfira para um tubo de ensaio de 50 mL. Adicione 1 mL de ácido clorídrico e 0,1 g de resorcina. Agite e aqueça em banho-maria por 5 minutos. Na presença de sacarose, aparecerá uma coloração vermelha.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 217.

443/IV Leites – Identificação de peróxido de hidrogênio com guaiacol

Material

Tubos de ensaio de 20 mL, pipetas graduadas de 2 mL e suporte para tubos de ensaios.

Reagentes

Solução alcoólica de guaiacol a 1%
Leite cru

Procedimento – Transfira 10 mL da amostra para um tubo de ensaio de 20 mL. Adicione 2 mL de uma solução de guaiacol a 1% e 2 mL de leite cru. O aparecimento de uma cor salmão indicará a presença de peróxido de hidrogênio.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 218.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasilia, 02/05/03, p.9.

444/IV Leites – Identificação de peróxido de hidrogênio com pentóxido de vanádio

O óxido de vanádio em meio ácido sulfúrico reage com o peróxido de hidrogênio formando o ácido ortoperoxivanádico de coloração rósea ou vermelha.

Material

Proveta de 10 mL e tubos de ensaio de 20 mL.

Reagente

Solução de óxido de vanádio (V_2O_5) – Pese 1 g de óxido de vanádio e adicione 100 mL de ácido sulfúrico a 6% v/v.

Procedimento – Meça 10 mL da amostra em uma proveta e transfira para um tubo de ensaio. Adicione de 10 a 20 gotas da solução de pentóxido de vanádio e agite. Na presença de peróxido de hidrogênio, aparecerá uma coloração rósea ou vermelha.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 219.

445/IV Leites – Identificação de peróxido de hidrogênio com iodeto

Material

Pipetas de 2 mL, tubos de ensaio de 20 mL, banho-maria e suporte para tubos ensaio.

Reagentes

Solução de ácido clorídrico a 1% v/v
Solução de iodeto de potássio a 10% m/v
Solução de amido a 1% m/v

Procedimento – Em um tubo de ensaio, coloque 2 mL da amostra, 2 mL de solução de ácido clorídrico a 1% e 2 mL de solução de iodeto de potássio a 10%. Aqueça por um minuto em banho-maria, resfrie e adicione 2 mL de solução de amido. O desenvolvimento de uma coloração azul indica teste positivo.

Nota: existe no mercado fita reativa própria para esta prova.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 219.

446/IV Leites – Identificação de formaldeído com floroglucina

A floroglucina reage com o formaldeído, produzindo um derivado hidroximetilado de coloração salmão.

Material

Aparelho destilador, frasco de destilação, frasco Erlenmeyer de 200 mL, tubos de ensaio de 20 mL, proveta de 10 mL e suporte para tubos de ensaio.

Reagentes

Ácido fosfórico a 20% v/v
Solução de floroglucina a 1% m/v
Solução de hidróxido de sódio a 10% v/v

Procedimento –Transfira 50 mL da amostra para um frasco de destilação e adicione 80 mL de ácido fosfórico a 20%. Destile cerca de 40 mL, recolhendo em frasco Erlenmeyer

de 200 mL. Transfira 10 mL da amostra destilada para um tubo de ensaio, adicione 1 mL da solução de floroglucina a 1%, 2 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 10% e agite. Na presença de formaldeído, aparecerá uma coloração salmão.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 219.

447/IV Leites – Identificação de formaldeído com cloreto férrico

O formaldeído em meio ácido e na presença de íon férrico produz, por aquecimento, um complexo de coloração roxa.

Material

Proveta de 5 mL, tubos de ensaio de 20 mL, pipeta de 1 mL e suporte para tubos de ensaio.

Reagentes

Ácido sulfúrico (1+1) v/v
Solução de cloreto férrico a 1% m/v

Procedimento – Transfira 5 mL da amostra destilada conforme o método **446/IV** para um tubo de ensaio e adicione 1 mL da solução de ácido sulfúrico (1+1). Adicione uma gota da solução de cloreto férrico a 1% e aqueça até a ebulição. Na presença de formaldeído aparece uma coloração roxa.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 220.

448/IV Leites – Identificação de formaldeído com ácido cromotrópico

O formaldeído aquecido com ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico, origina um produto de condensação que, oxidado posteriormente, transforma-se em um composto p-quinoidal de coloração violeta.

Material

Tubos de ensaio de 20 mL, pipetas graduadas de 1 e 5 mL, balão volumétrico de 100 mL, béquer de 500 mL, chapa aquecedora, capela de exaustão e suporte para tubos de ensaio.

Reagente

Solução saturada de ácido cromotrópico – Pese 0,5 g de ácido cromotrópico e dissolva em 100 mL de ácido sulfúrico a 72%.

Procedimento – Transfira 1 mL da amostra destilada conforme o método **446/IV** para um tubo de ensaio e adicione, na capela, 5 mL da solução de ácido cromotrópico, agite e aqueça em banho-maria por 15 minutos. Na presença de formaldeído, aparecerá uma coloração violeta.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 271.

449/IV Leites – Determinação de cloro e hipocloritos

Este ensaio fundamenta-se na formação de iodo livre a partir da reação de iodeto de potássio com cloro livre ou hipoclorito.

Material

Tubos de ensaio de 25 mL, pipetas graduadas de 1 e 5 mL, proveta de 10 mL, banho-maria e suporte para tubos de ensaio.

Reagentes

Solução de iodeto de potássio a 7,5% m/v
Ácido clorídrico (1+2) v/v
Solução de amido a 1% m/v

Procedimento – Em tubo de ensaio, transfira 5 mL da amostra, adicione 0,5 mL de solução de iodeto de potássio a 7,5% e agite. O aparecimento da coloração amarela indica a presença de cloro livre. Para confirmar, adicione 1 mL de solução de amido a 1%. Deverá desenvolver coloração azul ou violeta; não havendo mudança de coloração, adicione 4 mL de ácido clorídrico (1+2), coloque em banho-maria a 80°C por 10 minutos. Resfrie em água corrente e observe a coloração do coagulado, que na presença de hipoclorito deverá ser amarela. Para confirmação, adicione 1 mL de solução de amido a 1%. Deverá desenvolver coloração azul ou violeta. Faça uma prova em branco com ácido clorídrico.

Referência bibliográfica

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Leite em pó e soro de leite em pó. In: _____. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, 1981. v.II, cap. 14, p. 10-11.

450/IV Leites – Determinação de fosfatase

A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolítica natural do leite cru, sendo sensível às temperaturas de pasteurização. A medida da fosfatase residual é uma informação da eficiência da pasteurização. Agindo sobre o fenil fosfato dissódico, esta fosfatase libera fenol, proporcional à atividade da enzima, que reage com 2,6-dicloroquinonacloramida, produzindo o azul de indofenol, cuja intensidade de cor é medida por espectrofotometria.

Material

Espectrofotômetro UV/VIS, pipetas volumétricas de 0,5 e 5 mL e tubos de ensaio de (12x114) mm com diâmetro interno uniforme e banho-maria.

Reagentes

n-Butanol

Solução de carbonato de sódio a 8% m/v

Solução-tampão de carbonato – Pese 5,75 g de carbonato de sódio anidro, transfira para um balão volumétrico de 500 mL, adicione 5,1 g de bicarbonato de sódio e 0,55 g de fenil fosfato dissódico (isento de fenol). Misture e complete o volume com água. Este reagente é estável por 1 semana.

Solução precipitante – Pese 12,5 g de ácido tricloroacético em um béquer de 100 mL, adicione 25 mL de água, 25 mL de ácido clorídrico e misture.

Solução de sulfato de cobre – Pese 0,25 g de sulfato de cobre penta-hidratado, transfira para um balão volumétrico de 500 mL, adicione 25 g de hexametafosfato de sódio. Misture e complete o volume com água.

Solução de CQC – Pese 0,1 g de 2,6-dicloroquinonacloramida em um béquer de

100 mL, adicione 12,5 mL de álcool e misture. Coloque a solução em frasco conta-gotas âmbar. Este reagente é estável por 1 semana.

Solução-tampão com catalisador – Pese 5,1 g de bicarbonato de sódio anidro, transfira para um balão volumétrico de 500 mL e adicione 0,05 g de sulfato de cobre penta-hidratado. Misture e complete o volume com água.

Solução-estoque de fenol – Pese 0,5 g de fenol, transfira para um balão volumétrico de 500 mL. Misture e complete com água.

Solução de fenol para análise a 4 µg/mL – Transfira 2 mL da solução-estoque de fenol para um balão volumétrico de 500 mL e complete o volume com solução-tampão com catalisador.

Procedimento – Em um tubo de ensaio, coloque 10 mL da solução-tampão de carbonato. Aqueça a 37°C por 5 minutos. Adicione 1 mL da amostra e aqueça a 37°C, por 1 hora. Remova do banho e adicione lentamente, pelas paredes, 1 mL da solução precipitante. Após alguns segundos, filtre para tubo calibrado de 5 mL, ou simplesmente colete em tubo 5 mL do filtrado. Adicione 1 mL da solução de sulfato de cobre. Pipete 5 mL da solução de carbonato de sódio a 8% aquecida e agite. Adicione duas gotas de solução CQC e inverta rapidamente o tubo. Espere o desenvolvimento da cor a 37°C, por 5 minutos. Coloque 5 mL de n-butanol, inverta o tubo por 5 vezes, deixe em repouso por 1 minuto e compare a cor com os padrões ou leia, a 650 nm, comparando posteriormente com a curva-padrão.

Curva-padrão – Em seis tubos de ensaio, pipete respectivamente: 10; 9,5; 9; 8; 7 e 6 mL da solução-tampão com catalisador e, na mesma ordem, 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 mL de solução diluída de fenol. As concentrações nos tubos serão, respectivamente: 0, 4, 8, 12 e 16 µg de fenol por 10 mL. Adicione a cada tubo duas gotas de CQC, sob agitação e inverta uma vez os tubos. Incube a 37°C, durante 5 minutos. Adicione 5 mL de álcool butílico. Inverta 5 vezes os tubos para extrair a cor, feche com tampas de borracha e mantenha no refrigerador até o momento da leitura. Remova 3 mL da camada alcoólica e leia em espectrofotômetro UV/VIS a 650 nm.

Notas
Prepare sempre um controle positivo, um negativo e outro de interferentes.
Controle negativo – Aqueça 5 mL de leite cru até temperatura interna de 85°C, por 1 minuto, com agitação. Este controle não deverá apresentar coloração azul.
Controle positivo – Adicione 0,1 mL de leite cru a 100 mL de leite cru que tenha sido

fervido à temperatura interna de 85°C, por um minuto. Este controle deverá dar reação positiva (serve para testar os reagentes).

Controle de interferentes – Quando a reação na amostra revelar presença de fenóis, deve ser feito um novo teste sem a adição do reagente solução-tampão de carbonato. Uma coloração azul indica presença de interferentes fenólicos.

Existe no mercado kit para prova de fosfatase.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 221-223.

451/IV Leites – Prova de peroxidase

A peroxidase é uma enzima presente no leite, que é destruída quando aquecido acima de 75°C, por mais de 20 segundos (temperatura e tempo limites para a pasteurização do leite). Este teste avalia se o processo de pasteurização foi eficiente.

Material

Tubos de ensaio de 20 mL, pipetas graduadas de 2 e 10 mL, banho-maria, capela de exaustão, termômetro e suporte para tubos de ensaio.

Reagentes

Solução de alcoólica guaiacol a 1% v/v
Peróxido de hidrogênio a 3%

Procedimento – Transfira 10 mL da amostra para um tubo de ensaio de 20 mL, aqueça em banho-maria a (43 ± 2)°C por 5 minutos. Na capela, adicione 2 mL da solução de guaiacol pelas paredes do tubo e 3 gotas de peróxido de hidrogênio. O desenvolvimento de uma coloração salmão indica peroxidase positiva.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 223-224.
BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasilia, 02/05/03, p.9.

Leite em pó

Entende-se por leite em pó o produto obtido pela desidratação do leite integral, desnatado ou parcialmente desnatado, mediante processo tecnológico adequado. Este produto pode ser modificado com adição ou supressão de nutrientes para atender às necessidades do consumidor, levando em conta a faixa etária e exigências nutricionais específicas. As principais determinações para este tipo de alimento são: acidez em ácido láctico, substâncias voláteis, resíduo por incineração, alcalinidade das cinzas, gordura, ácidos graxos, protidíos, glicídios redutores em lactose, cromatografia de açúcares, prova de reconstituição e prova de rancidez conforme o método **333/IV**.

452/IV Leite em pó – Prova de reconstituição

Procedimento – Faça a reconstituição do produto conforme especificação do fabricante e conserve em geladeira. Observe durante 12 horas se o produto se mantém como leite fluido, isto é, estável sem precipitação.

453/IV Leite em pó – Determinação da acidez em ácido láctico

Material

Balança analítica, béquer de 100 mL, bastão de vidro, frasco Erlenmeyer de 125 mL, bureta de 10 mL e espátula.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M
Solução de fenolftaleína a 1%

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra em um béquer, transfira quantitativamente para um frasco Erlenmeyer usando 35 mL de água (amostra de leite integral) ou 50 mL de água (amostra de leite desnatado). Adicione 5 gotas de solução de fenolfta-

leína. Titule com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando bureta de 10 mL, até o aparecimento de uma coloração rósea.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0,9}{A} = \text{ácido láctico, por cento, m/m}$$

V = n° de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 M
A = nº de g da amostra
0,9 = fator de conversão para ácido láctico

Referência bibliográfica

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Leite em pó e soro de leite em pó. In: _____. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, 1981. v.II, cap. 15, p. 4-5.

454/IV Leite em pó – Determinação de substâncias voláteis

Material

Balança analítica, espátula, estufa, cápsula de porcelana, dessecador com sílica-gel e pinça de metal.

Procedimento – Pese aproximadamente 3 g da amostra em cápsula previamente tarada, seque em estufa a (93±2)°C, por uma hora, resfrie em dessecador e pese. Retorne à estufa por mais 30 minutos, resfrie em dessecador e pese. Repita as operações até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{A} = \text{substâncias voláteis por cento m/m}$$

N = nº de g das substâncias voláteis
A = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo** Lutz. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 225.

455/IV Leite em pó – Determinação de resíduo por incineração (cinzas)

Material

Balança analítica, cápsula de porcelana, mufla, dessecador com sílica-gel, chapa aquecedora, banho-maria, espátula, capela de exaustão e pinça de metal.

Procedimento – Pese aproximadamente 3 g da amostra em uma cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a (550±10)°C, por 1 hora, resfriada em dessecador e pesada. Carbonize em chapa aquecedora na capela e incinere em mufla a (550 ± 10)°C, por aproximadamente 4 horas. O resíduo deverá ficar branco ou ligeiramente acinzentado, caso contrário, esfrie, adicione 0,5 mL de água, seque em banho-maria e incinere novamente. Resfrie em dessecador e pese.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{A} = \text{resíduo por incineração (cinzas) por cento m/m}$$

N= n° de g de resíduo
A = n° de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo** Lutz. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 27.

456/IV Leite em pó – Determinação da alcalinidade das cinzas

Procedimento – Proceda conforme o método **438/IV** ou **439/IV** utilizando o resíduo por incineração (cinzas).

457/IV Leite em pó – Determinação da gordura

Procedimento – Pese aproximadamente 3 g da amostra e proceda conforme o método **486/IV.**

458/IV Leite em pó – Extração de gordura para determinação de ácidos graxos

Procedimento – Pese 10 g da amostra e proceda conforme o método **486/IV.**

459/IV Leite em pó – Determinação de protídios

Procedimento – Pese 0,5 g da amostra em papel de seda e proceda conforme o método **036/IV** ou **037/IV**.

460/IV Leite em pó - Determinação de glicídios redutores em lactose

Procedimento – Pese 1 g da amostra e, com auxílio de 50 mL de água, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume. Proceda conforme o método **432/IV.**

461/IV Leite em pó – Cromatografia de açúcares

Material

Balança semi-analítica, béquer de 100 mL, espátula, bastão de vidro, balão volumétrico de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 125 mL, funil de vidro e papel de filtro.

Reagentes

Solução de sulfato de zinco a 30% m/v
Solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra em béquer. Transfira quantitativamente com auxílio de 50 mL de água para um balão volumétrico de 100 mL. Adicione 5 mL da solução de sulfato de zinco a 30% e 5 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15% e misture. Deixe sedimentar durante 5 minutos, complete o volume com água e agite. Filtre em papel de filtro para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, o filtrado deverá estar límpido. Proceda conforme o método **041/IV**.

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasilia, 02/05/03, p.15.

Leite evaporado

Entende-se como leite evaporado o produto obtido pela evaporação de grande parte da água existente no leite fluido. Este produto tem sua análise baseada em determinações feitas na amostra diluída até reconstituição do leite. As determinações correspondem à mesmas efetuadas para o leite fluido, com exceção das provas de peroxidase, fosfatase e estabilidade ao etanol.

462/IV Leite evaporado - Prova de reconstituição

Procedimento – Faça a reconstituição do produto conforme especificação do fabricante e proceda conforme o método **452/IV.**

Queijo

Queijo é o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas e de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias, especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. A análise dos queijos envolve, entre outras, as determinações de substâncias voláteis, protídios, gordura, acidez em ácido láctico, resíduo por incineração (cinzas) (**485/IV**), além da prova amido (**441/IV**), corantes (**051/IV**), conservadores (**468/IV**), espessantes, principalmente em queijos fundidos, (**132/IV - 143/IV**) e reação de Kreis (**333/IV**).

Preparo e conservação da amostra

Procedimento – Remova, com uma faca, a crosta ou casca do queijo. Tome porções de diferentes pontos da amostra. Se o queijo for mole, homogeneíze em um gral e se for duro, rale e homogeneíze em um gral. Conserve a amostra em um frasco com rolha esmerilhada, em local arejado. Quando se tratar de queijo fresco ou de certos queijos maturados moles, perecíveis, conserve em geladeira.

463/IV Queijo - Determinação da acidez em ácido láctico

Material

Balança analítica, béquer de 100 mL, espátula, bastão de vidro, frasco Erlenmeyer de 250 mL, balão volumétrico de 100 mL, funil de vidro, papel de filtro e bureta de 10 mL.

Reagentes

Álcool a 95%, neutro
Solução de fenolftaleína a 1%
Solução de hidróxido de sódio 0,1 M

Procedimento – Pese aproximadamente 10 g da amostra e transfira para um balão volumétrico de 100 mL com álcool a 95%, neutro. Complete o volume. Deixe em contato por 6 horas. Filtre e tome uma alíquota. Adicione 5 gotas da solução de fenolftaleína e titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, até coloração rósea.
Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0{,}9}{A} = \text{ácido láctico por cento m/m}$$

V = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação
f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 M
A = nº de g da alíquota da amostra usado na titulação

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 232.

464/IV Queijo – Determinação de substâncias voláteis

Procedimento – Pese aproximadamente 3 g da amostra e proceda conforme o método **483/IV** ou **484/IV.**

465/IV Queijo – Determinação de gordura utilizando butirômetro especial

Material

Balança analítica, balança semi-analítica, béquer de 100 mL, espátula, pipeta de 5 mL, banho-maria, butirômetro especial para queijo com respectiva rolha, pipetadores automáticos de 1 e 10 mL, papel absorvente, termômetro, termocentrífuga ou centrífuga de Gerber, capela de exaustão e luvas.

Reagentes

Ácido sulfúrico (D = 1,813 - 1,817)
Álcool isoamílico (D = 0,815)

Procedimento – Pese os butirômetros com suas respectivas rolhas para verificar se os mesmos estão com os pesos equivalentes. Pese 3 g da amostra no copo do butirômetro e adapte ao mesmo. Adicione 5 mL de água a (30-40)°C, junte, lentamente, 10 mL de ácido sulfúrico, 1 mL de álcool isoamílico e água morna até completar o volume do tubo. Estas adições devem ser feitas sem molhar internamente o gargalo do butirômetro, se isto acontecer, limpe cuidadosamente com papel absorvente. Arrolhe o butirômetro, pese em temperatura ambiente e, usando luvas, agite, inverta o tubo e coloque em banho-maria a (63±2)°C, durante 15 minutos. Verifique se não restam partículas sólidas e centrifugue a (1200±100) rpm, durante 15 minutos. Leia a porcentagem de gordura diretamente na escala do butirômetro. Repita as operações de aquecimento e centrifugação, se necessário.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 233.

466/IV Queijo – Determinação de gordura utilizando butirômetro para leite

Material

Balança analítica, balança semi-analítica, espátula, béqueres de 25 e 1000 mL, bureta de 25 mL, butirômetro de Gerber para leite com respectiva rolha, pipetador automático de 1 mL, bastão de vidro, chapa elétrica, termômetro, banho maria, capela de exaustão, termocentrífuga ou centrífuga de Gerber, luvas e papel absorvente.

Reagentes

Ácido sulfúrico (D =1,50)
Álcool isoamílico (D = 0,815)

Procedimento – Pese os butirômetros com suas respectivas rolhas para verificar se os mesmos estão com os pesos equivalentes. Pese aproximadamente 1 g da amostra em um béquer de 25 mL, adicione 5 mL de ácido sulfúrico (D = 1,5), contido em uma bureta.

Aqueça em chapa aquecedora com temperatura aproximada de 250°C, agite até completa dissolução da amostra e transfira para o butirômetro. Adicione porções de 5 mL até completar o volume de 20 mL, sempre aquecendo em chapa aquecedora. Adicione, com o auxílio de um pipetador automático, 1 mL de álcool isoamílico. Estas adições devem ser feitas sem molhar internamente o gargalho do butirômetro, se isto acontecer, limpe cuidadosamente com um papel absorvente. Arrolhe o butirômetro, pese em temperatura ambiente, e agite, usando luvas, até a completa homogeneização. Leve ao banho-maria a (63 ± 2)°C por 15 minutos, com a rolha para baixo. Centrifugue a (1200±100) rpm durante 15 minutos. Retire o butirômetro da termocentrífuga ou centrífuga de Gerber na posição vertical (rolha para baixo). Manejando a rolha, coloque a camada amarelo-clara, transparente (gordura), dentro da escala graduada do butirômetro. Faça leitura na escala do butirômetro.

Cálculo

$$\frac{V \times 11{,}33}{P} = \text{lipídios, por cento, m/m}$$

V = valor lido na escala do butirômetro
11,33 = equivalente em peso de 11 mL de leite (a escala do butirômetro está graduada para 11 mL de leite)
P = n° de gramas da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 233-234.

467/IV Queijo – Determinação de protídios

Procedimento – Pese 0,5 g da amostra em papel de seda e proceda conforme método **036/IV** ou **037/IV**, considerando o fator 6,38 para a conversão nitrogênio em proteína.

468/IV Queijo – Determinação de ácido sórbico e sorbato

Procedimento – Pese 10 g da amostra e proceda conforme método **085/IV**.

469/IV Queijo – Reação de Kreis

Procedimento – Proceda conforme método **279/IV**.

Coalho

A matéria-prima básica da indústria do coalho é retirada do 4º estômago de bezerros lactentes, abatidos entre 1ª e 5ª semanas de vida. O coalho é a renina secretada pelas glândulas gástricas em forma de pró-renina, a qual é ativada pela acidez. A renina hidrolisa a caseína do leite transformando-a em pró-caseína solúvel que, em presença de íons cálcio, se converte em para-caseinato de cálcio, que é insolúvel e constitui o coágulo propriamente dito.

470/IV Coalho – Poder coagulante

Material

Balança analítica, espátula, béquer de 200 mL, pipeta volumétrica de 1 mL, balões volumétricos de 10 e 100 mL, termômetro, cronômetro e banho-maria.

Reagente

Solução de cloreto de sódio a 7% m/v
Leite cru

Procedimento

Preparo da amostra – Para o coalho líquido, transfira 1 mL da amostra para um balão volumétrico de 10 mL e complete o volume com solução de cloreto de sódio a 7%. Para o coalho em pó, pese 1 g da amostra, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com solução de cloreto de sódio a 7%.

Doseamento – Transfira 100 mL do leite para um béquer de 200 mL. Aqueça em banho-maria termostatizado a 35°C. A temperatura do banho deverá ser rigorosamente controlada. Adicione 1 mL da amostra, previamente preparada, e marque com cronômetro o tempo exato em que o coalho foi adicionado ao leite. Mantenha o leite em constante agitação, sem retirá-lo do banho-maria, até que apareçam pequenos flocos de leite coagulado na parede interna do béquer. Verifique o tempo gasto, para efeito de cálculo.

Cálculo

$$\frac{V \times 2400}{t} = \text{volume de leite coagulado em mL/1 mL de coalho líquido ou 1 g de coalho seco em pó, em 40 minutos e 35°C}$$

V = volume de leite usado na prova x 10 (no caso de coalho líquido) ou x 100 (no caso de coalho em pó)
t = tempo, em segundos, gasto para coagular o volume de 100 mL de leite

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 229-230.

Manteiga

Manteiga é o produto gorduroso obtido do creme pasteurizado derivado exclusivamente do leite de vaca, com ou sem modificação biológica. O principal componente da manteiga é a gordura do leite, sendo a parte não gordurosa constituída de água, traços de proteína, lactose e sais minerais. Pode ser adicionado de sal e corantes naturais. As análises usuais incluem as determinações de acidez em solução normal, substâncias voláteis, gordura, extrato seco desengordurado, acidez na gordura, cloretos (**028/IV**), corantes (**051/IV**), índice de refração absoluto a 40°C, índice de iodo, índice de saponificação e reação de Kreis (**333/IV**).

471/IV Manteiga – Determinação da acidez em solução normal

Material

Balança analitica, béqueres de 250 mL, espátula, termômetro, banho-maria, funil de vidro, papel de filtro e frasco Erlenmyer de 125 mL.

Procedimento – Retire partes representativas da amostra (superfície, centro e lados). Misture totalmente com uma espátula.Transfira para um béquer, aproximadamente 50 g da amostra e aqueça até fusão em banho-maria a (40-45)°C. Separe a camada gordurosa e filtre para um béquer. Pese aproximadamente 2 g da amostra filtrada e proceda conforme o método **325/IV e cálculo conforme método 481/IV**.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 235.

472/IV Manteiga – Determinação de substâncias voláteis

Este método fundamenta-se na solubilidade da gordura em éter e na insolubilidade da proteína, lactose e sais minerais, componentes normais da manteiga.

Material

Balança analítica, espátula, béquer de 250 mL, estufa, chapa aquecedora, vidro de relógio, papel absorvente e dessecador com sílica-gel.

Procedimento Em um béquer de 250 mL, previamente tarado, pese aproximadamente 10 g da amostra. Aqueça em chapa elétrica e agite discretamente, em sentido circular, retirando ocasionalmente do aquecimento para se evitar a queima ou crepitação violenta da amostra. Para observar se houve eliminação dos voláteis, utilize um vidro de relógio sobre o béquer. O não aparecimento de vapores no vidro de relógio indica o término do procedimento. Um leve odor de queimado e um resíduo de cor castanha são também indicações do término do procedimento. Limpe o béquer com papel absorvente e coloque na estufa a (103 ± 2)°C por uma hora, resfrie em dessecador e pese. Retorne por mais 30 minutos, resfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{N \times 100}{P} = \text{g por cento de substâncias voláteis m/m}$$

N = nº de g das substâncias voláteis
P = nº de g de amostra

Referência bibliográfica

SILVA, H.F. *et al.* **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. Juiz de Fora: Of. Gráfica de Impressão Gráfica e Ed.,1997. p. 82.

473/IV Manteiga – Determinação de insolúveis em éter

Material

Balança analítica, bastão de vidro, capela de exaustão, proveta de 25 mL, pipeta graduada de 10 mL, frasco porta resíduos, estufa, dessecador com sílica-gel e pinça de metal.

Reagente

Éter

Procedimento – Ao béquer que contém o resíduo obtido conforme o método **472/IV**,

adicione 25 mL de éter e homogeneíze com movimentos circulares. Se necessário, remova os resíduos aderidos na parede do béquer com um bastão de vidro, lave com éter e deixe sedimentar por 5 minutos aproximadamente. Após a sedimentação, descarte cuidadosamente a solução etérea. Faça mais 5 extrações. Limpe o béquer com um papel absorvente e coloque na estufa a (103 ± 2)°C por uma hora, resfrie em dessecador e pese. Retorne por mais 30 minutos, resfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{N \times 100}{P} = \text{g por cento de insolúveis m/m}$$

N = n° g de insolúveis
P = n° g da amostra

Referência Bibliográfica

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II-métodos físicos e químicos. Brasília (DF), 1981, XXI p. 1-3.

474/IV Manteiga – Determinação de gordura

Procedimento – Determine as substâncias voláteis conforme o método **472/IV** e os insolúveis em éter conforme **473/IV** e calcule o valor da gordura.

Cálculo

100 - (P + N) = gordura por cento m/m
P = substâncias voláteis por cento m/m
N = insolúveis em éter por cento m/m

Referência Bibliográfica

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II-métodos físicos e químicos. Brasília (DF), 1981, XXI p. 1-3.

475/IV Manteiga - Determinação do resíduo por incineração (cinzas)

Procedimento – Pese aproximadamente 3 g da amostra em cápsula de porcelana, cubra com papel de filtro de cinzas conhecidas picado e proceda conforme método **485/IV**.

476/IV Manteiga – Determinação de cloretos em cloreto de sódio

Procedimento – Utilize o resíduo por incineração (cinzas) e proceda conforme método **028/IV** ou **029/IV**.

477/IV Manteiga – Determinação do índice de refração

Material

Béqueres de 250 mL, espátula, termômetro, banho-maria, funil de vidro e papel de filtro.

Procedimento – Retire partes representativas da amostra (superfície, centro e lados). Misture totalmente com uma espátula.Transfira para um béquer, aproximadamente 20 g da amostra e aqueça até fusão em banho-maria a (40-45)°C. Separe a camada gordurosa e filtre para um béquer. Utilize a amostra filtrada e proceda conforme o método **327/IV**.

478/IV Manteiga – Determinação do índice de iodo

Material

Béqueres de 250 mL, espátula, termômetro, banho-maria, funil de vidro e papel de filtro.

Procedimento – Retire partes representativas da amostra (superfície, centro e lados). Misture totalmente com uma espátula. Transfira para um béquer, aproximadamente 20 g da amostra e aqueça até fusão em banho-maria a (40-45)°C. Separe a camada gordurosa e filtre para um béquer. Utilize a amostra filtrada e proceda conforme o método **329/IV**.

479/IV Manteiga – Determinação do índice de saponificação

Material

Béqueres de 250 mL, espátula, termômetro, banho-maria, funil de vidro e papel de filtro.

Procedimento – Retire partes representativas da amostra (superfície, centro e lados). Misture totalmente com uma espátula. Transfira para um béquer, aproximadamente 20 g da amostra e aqueça até fusão em banho-maria a (40 - 45)°C. Separe a camada gordurosa e filtre-a para um béquer Utilize a amostra filtrada e proceda conforme método **328/IV.**

480/IV Manteiga – Reação de Kreis

Material

Béqueres de 250 mL, espátula, termômetro, banho-maria a (40-45)°C, funil de vidro e papel de filtro.

Procedimento – Retire partes representativas da amostra (superfície, centro e lados). Misture totalmente com uma espátula. Transfira para um béquer, aproximadamente 50 g da amostra e aqueça até fusão em banho-maria a (40-45)°C. Separe a camada gordurosa e filtre. Utilize a amostra filtrada e proceda conforme o método **333/IV**.

Margarina

Entende-se por margarina o produto obtido por processo de hidrogenação de óleos vegetais em emulsão estável com leite ou seus constituintes ou derivados e outros ingredientes, destinado à alimentação humana. A gordura láctea, quando presente, não deverá exceder a 3% m/m do teor de gordura total. A análise é semelhante à de manteiga, devendo ser incluída a determinação de vitamina A conforme o método **357/IV**.

Doce de Leite

Entende-se por doce de leite o produto resultante da cocção de leite com açúcar, podendo ou não ser adicionado de outras substâncias alimentícias permitidas, até concentração conveniente e parcial caramelização. O produto é designado por doce de leite ou doce de leite seguida da substância adicionada que o caracteriza, como por exemplo, "doce de leite com amendoim". O doce de leite é classificado de acordo com a sua consistência em: cremoso ou em pasta e em tablete.

Preparo e conservação da amostra

Procedimento – Retire partes representativas da amostra (superfície, centro e lados). Misture totalmente com uma espátula. No caso de produtos com adições de frutas e/ou outro ingrediente, triture em gral, moinho e/ou homogeneíze em liqüidificador. Conserve em frasco bem fechado. A amostra deve ser analisada preferencialmente logo após seu

recebimento, se não for possível, conserve em refrigerador ou conforme recomendação do fabricante.

481/IV Doce de leite – Determinação da acidez em solução normal

Material

Balança analítica, chapa aquecedora, béqueres de 150 e 250 mL, bureta de 10 mL, pipeta graduada de 1 mL, bastão de vidro, espátula e termômetro.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 N
Solução de fenolftaleína a 1%

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra em béquer de 150 mL. Dissolva com 50 mL de água morna, temperatura aproximada de 50°C e misture com um bastão de vidro. Esfrie e adicione 5 gotas de solução de fenolftaleína. Titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, até coloração rósea.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 10}{P} = \text{acidez em solução normal por cento m/m}$$

V = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 N gastos na titulação
P = nº de g da amostra
f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 N

482/IV Doce de leite – Determinação da acidez em ácido láctico

Procedimento – Proceda de acordo com **453/IV**.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0,9}{P} = \text{g de ácido láctico por cento m/m}$$

V = nº de mL gastos de solução de hidróxido de sódio 0,1 M
P = gramas de amostra utilizada no ensaio
f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 M
0,9 = fator de conversão para o ácido láctico

Referência bibliográfica

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II-métodos físicos e químicos. Brasília (DF), 1981, XVI p. 5-6.

483/IV Doce de leite – Determinação de substâncias voláteis

Material

Balança analítica, espátula, cápsula de porcelana, bastão de vidro, areia purificada, banho-maria, estufa, dessecador com sílica-gel e pinça de metal.

Procedimento – Pese, em uma cápsula de porcelana, aproximadamente 10 g de areia purificada e dois bastões de vidro apoiados na borda do recipiente. Seque em estufa a (103 ± 2)°C, por 2 horas, resfrie em dessecador e pese. Pese aproximadamente 3 g da amostra, misture com auxílio dos bastões de vidro. Seque em estufa a (103 ± 2)°C, por 3 horas, resfrie em dessecador e pese. Retorne à estufa por 30 minutos, resfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{g das substâncias voláteis por cento m/m}$$

N = nº de g de substâncias voláteis
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 22.

484/IV Doce de leite – Determinação de substâncias voláteis em estufa a vácuo

Material

Balança analítica, espátula, cápsula de porcelana, bastões de vidro, areia purificada, banho-maria, estufa a vácuo, dessecador com sílica-gel e pinça de metal.

Procedimento – Pese, em uma cápsula de porcelana, aproximadamente 10 g de areia e dois bastões de vidro apoiados na borda do recipiente. Seque em estufa a (103 ± 2)°C por 2 horas, resfrie em dessecador e pese. Pese aproximadamente 3 g da amostra. Adicione 10 mL de água e misture com auxílio dos bastões de vidro. Evapore em banho-maria, seque em estufa a vácuo a (70 ± 2)ºC por 2 horas. Resfrie em dessecador e pese. Retorne à estufa por 30 minutos, resfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{g das substâncias voláteis por cento m/m}$$

N = n° de g de substâncias voláteis
P = n° de g da amostra

Referências bibliográficas

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II-métodos físicos e químicos. Brasília (DF), 1981, XVI p. 1.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 22.

485/IV Doce de leite - Determinação de resíduo por incineração (cinzas)

Material

Balança analítica, cápsula de porcelana, espátula, chapa elétrica, capela de exaustão, mufla, dessecador com sílica-gel e pinça de metal.

Procedimento – Pese aproximadamente 3 g da amostra em cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a (520 ± 10)ºC por 1 hora, resfrie em dessecador e pese. Calcine em chapa aquecedora na capela até completa carbonização ou eliminação de toda fumaça. Leve para mufla na temperatura de (550 ± 10)ºC pelo período aproximado de 4 horas. As cinzas deverão ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas, caso contrário, resfrie, adicione 0,5 mL de água, seque em banho-maria e incinere novamente. Resfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{g de resíduo por incineração por cento m/m}$$

N = nº de g do resíduo
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 27.

486/IV Doce de leite – Determinação de gordura

A gordura é determinada gravimetricamente, após a desnaturação das proteínas e carboidratos, utilizando ácido clorídrico sob aquecimento. O resíduo contendo a gordura é separado por filtração, seco e extraído com éter de petróleo.

Material

Balança analítica, espátula, béqueres de 100, 600 e 1000 mL, estufa, chapa aquecedora, bastão de vidro, pérolas de vidro ou cacos de porcelana, provetas de 100 mL, vidro de relógio, frasco Erlenmeyer de 500 mL, funil de vidro, papel de filtro, fita indicadora de pH de (0 - 14), balão de fundo chato com boca esmerilhada de 300 mL, aparelho extrator de Soxhlet, pinça de metal, dessecador com sílica-gel e capela de exaustão.

Reagentes

Ácido clorídrico
Éter de petróleo (30 - 60)°C
Solução de nitrato de prata 0,1 M

Procedimento – Pese de 5 a 10 g da amostra, em béquer de 100 mL. Transfira para um béquer de 600 mL usando 100 mL de água, se necessário, utilize água à temperatura entre (30 - 40)°C, misture com um bastão de vidro. Adicione 60 mL de ácido clorídrico, algumas pérolas de vidro ou cacos de porcelana e tampe o béquer com um vidro de relógio. Aqueça o conjunto em chapa aquecedora até a fervura, mantenha fervura durante

30 minutos. À parte, aqueça aproximadamente 1000 mL de água até temperatura de (90 - 95)°C, adicione 100 mL desta água na solução da amostra ainda quente, lavando o vidro de relógio e filtre em papel de filtro previamente umidecido. Lave várias vezes o béquer e o resíduo do papel de filtro, cuidadosamente, com água quente até que o filtrado exiba reação neutra, (utilizando fita indicadora de pH) ou ausência de cloreto (utilizando solução de nitrato de prata 0,1 M). Coloque o resíduo sobre um vidro de relógio, contendo um papel de filtro seco, seque na estufa à temperatura de (103 ± 2)°C. Envolva em outro papel de filtro ou coloque em um dedal e transfira para o aparelho extrator de Soxhlet. Acople um balão de fundo chato de 300 mL previamente aquecido em estufa a (103 ± 2)ºC por duas horas, resfriado e pesado ao aparelho extrator de Soxhlet. Extraia sob aquecimento, com aproximadamente 250 mL de éter de petróleo durante 4 horas. Retire o resíduo da extração e remova o solvente por destilação. Seque o balão contendo a gordura em estufa a (103 ± 2)°C por uma hora. Resfrie em dessecador e pese. Retorne à estufa por 30 minutos, resfrie em dessecador e pese. Repita as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{g de gordura por cento m/m}$$

N = n° de g de gordura
P = n° de gramas da amostra

Nota: a determinação de gordura poderá ser efetuada também conforme o método **412/IV**.

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists.** v. 2, (method 963.15). 16th ed. Arlington: A.O.A.C., chapter 31, 1995. p. 10.

487/IV Doce de leite - Determinação de protídios

Procedimento – Pese de 1 a 2 g da amostra, usando papel de seda e proceda conforme método **036/IV** ou **037/IV.**

488/IV – Doce de leite – Determinação de glicídios redutores em lactose

Material

Balança analítica, chapa aquecedora, béquer de 200 mL, balão volumétrico de 100 mL,

frasco Erlenmeyer de 300 mL, funil de vidro, papel de filtro, balão de fundo chato de 300 mL, pipetas graduadas de 2 mL, pipetas volumétricas de 10 mL, bureta de 25 mL, espátula, bastão de vidro e garra de madeira.

Reagentes

Solução de sulfato de zinco a 30% m/v
Solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v
Soluções de Fehling tituladas (**Apêndice I**)
Procedimento – Pese aproximadamente 2 g da amostra em béquer de 100 mL. Transfira quantitativamente com auxílio de 50 mL de água e um bastão de vidro para um balão volumétrico de 100 mL. Adicione 2 mL da solução de sulfato de zinco a 30%, misture, adicione 2 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15% e misture. Deixe sedimentar, durante 5 minutos, complete o volume do balão com água e agite. Filtre em papel de filtro para um frasco Erlenmeyer de 300 mL, o filtrado deverá estar límpido. Em balão de fundo chato de 300 mL, adicione 10 mL de cada uma das soluções de Fehling, 40 mL de água e aqueça até ebulição. Transfira o filtrado para uma bureta de 25 mL e adicione, às gotas, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho-tijolo).

Cálculo

$$\frac{A \times 0{,}068 \times 100}{V \times P} = \text{lactose por cento m/m}$$

A = n° de mL de P g da amostra
V = n° de mL da solução da amostra gasto na titulação
P = n° de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 205-206.

489/IV Doce de leite – Determinação de glicídios não redutores em sacarose

Material

Balança analítica, chapa aquecedora, banho-maria, béquer de 100 mL, balão volumétrico de 250 mL, frascos Erlenmeyer de 300 e 500 mL, balão de fundo chato de 300 mL, funil de vidro, papel de filtro, fita indicadora de pH (0 -14), bureta de 25 mL, pipetas volumétricas de 10 mL, pipetas graduadas de 2 e 5 mL, bastão de vidro, espátula e garra de madeira.

Reagentes

Ácido clorídrico
Solução de hidróxido de sódio a 30% m/v
Solução de sulfato de zinco a 30% m/v
Solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v
Soluções de Fehling tituladas (**Apêndice I**)

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra em béquer de 100 mL. Transfira quantitativamente com auxílio de 100 mL de água e um bastão de vidro para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Acidule com 2 mL de ácido clorídrico, aqueça em banho-maria fervente por 15 minutos e resfrie. Neutralize com solução de hidróxido de sódio a 30%, verifique utilizando fita indicadora de pH (0-14). Transfira para um balão volumétrico de 250 mL. Adicione 5 mL da solução de sulfato de zinco a 30% e misture. Adicione 5 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15% e misture. Deixe sedimentar, durante 5 minutos, complete o volume do balão com água, agite. Filtre em papel de filtro para um frasco Erlenmeyer de 300 mL, o filtrado deverá estar límpido. Em balão de fundo chato de 300 mL adicione 10 mL de cada uma das soluções de Fehling, 40 mL de água e aqueça até ebulição. Transfira o filtrado para uma bureta de 25 mL e adicione, às gotas, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho tijolo).

Cálculo

$$\left(\frac{A \times 0{,}05 \times 100}{V \times P} - \%\ \text{de lactose}\right) \times 0{,}95 = \text{sacarose, por cento, m/m}$$

A = n° de mL da solução de P g da amostra
V = n° de mL da solução da amostra gastos na titulação
P = n° g da amostra

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Mé-*

todos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 50-51.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa Nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasilia, 02/05/03, p. 15.

490/IV Doce de leite – Determinação de glicídios não redutores em amido

Material

Balança analítica, chapa aquecedora, capela de exaustão, banho-maria, aparelho aquecedor com acoplamento de condensador para refluxo tipo Sebelin, béquer de 600 mL, balão volumétrico de 500 mL, frasco Erlenmeyer de 500 mL, frasco Erlenmeyer com boca esmerilhada 24/40 de 500 mL, balão de fundo chato de 300 mL, proveta de 200 mL, funil de vidro, papel de filtro , fita indicadora de pH (0-14), bureta de 25 mL, pipetas volumétricas de 5 mL, bastão de vidro, vidro de relógio, pipetas graduadas de 10 e 20 mL, espátula e garra de madeira.

Reagentes

Éter
Álcool a 70%
Álcool
Ácido clorídrico
Solução de hidróxido de sódio a 30% m/v
Solução de sulfato de zinco a 30% m/v
Solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v
Soluções de Fehling tituladas (**Apêndice I**)

Procedimento – Pese aproximadamente 20 g da amostra em um béquer de 150 mL. Desengordure a amostra tratando sucessivamente com 5 porções de 20 mL de éter, misture com bastão de vidro, deixe decantar e despreze as camadas etéreas. Transfira o material desengordurado para um béquer de 600 mL, com auxílio de 5 porções de 40 mL de álcool a 70%. Misture vigorosamente com movimentos rotatórios. Coloque um vidro de relógio sobre o béquer. Aqueça em banho-maria a (85-87)°C por 1 hora, resfrie, adicione 150 mL de álcool e misture. Cubra com vidro de relógio e deixe decantar por 12 horas, (caso não decante, use centrifugação por 15 minutos a 1500 rpm). Após decantar, despreze o sobrenadante cuidadosamente. Filtre em papel de filtro seco para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, lavando com 5 porções de 60 mL de álcool a 70%. Retire o funil de vidro com o papel de filtro contendo o resíduo e transfira para outro frasco Erlenmeyer de 500 mL com

boca esmerilhada 24/40; com um bastão de vidro, fure com cuidado, o centro do papel de filtro, lavando com água e recolha no frasco Erlenmeyer. Acidule com 10 mL de ácido clorídrico e misture. Aqueça na chapa do aparelho tipo Sebelin, com acoplamento para refluxo, durante 3 horas e meia e resfrie. Neutralize com solução de hidróxido de sódio a 30%, verifique utilizando fita indicadora de pH (0-14). Transfira para um balão volumétrico de 500 mL com auxílio de água, lavando bem o frasco Erlenmeyer. Adicione 20 mL da solução de sulfato de zinco a 30% e misture, adicione 20 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15% e misture. Deixe sedimentar, durante 5 minutos, complete o volume do balão com água e agite. Filtre em papel de filtro para um frasco Erlenmeyer de 500 mL; o filtrado deverá estar límpido. Em balão de fundo chato de 300 mL, adicione 5 mL de cada uma das soluções de Fehling, 40 mL de água e aqueça até ebulição. Transfira o filtrado para uma bureta de 25 mL e adicione, às gotas, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho-tijolo).

Cálculo

$$\frac{(A \times 0{,}05 \times 100) \times 0{,}90}{2 \times V \times P} = \text{amido por cento m/m}$$

A = nº de mL da solução de P g da amostra
V = nº de mL da solução da amostra gastos na titulação
P = nº de g da amostra
0,90 = fator de transformação de hexoses para amido.

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 51 e 53-54.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasilia, 02/05/03, p. 15.

491/IV Doce de leite – Cromatografia de açúcares

Procedimento – Proceda conforme o método **461/IV**.

Leite condensado

Entende-se por leite condensado ou leite condensado com açúcar, o produto resultante da desidratação em condições próprias do leite adicionado de açúcar. As principais determinações realizadas para estes alimentos são: acidez em solução normal (**481/IV**),

acidez em ácido láctico (**482/IV**), substâncias voláteis **(483/IV**) ou (**484/IV**), resíduo por incineração (**485/IV**), gordura (**486/IV**), protídios (**487/IV**), glicídios redutores em lactose (**488/IV**), glicídios não redutores em sacarose (**489/IV**) e cromatografia de açúcares (**491/IV**).

Leites fermentados

São os produtos resultantes da fermentação do leite por fermentos lácticos próprios. Os fermentos lácticos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. Poderá ser adicionado ou não de outros produtos lácteos, bem como de outras substâncias alimentícias recomendados pela tecnologia e que não interfiram no processo de fermentação do leite pelos fermentos lácticos empregados. São exemplos de leites fermentados: iogurte, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada.

Procedimento – Retire parte representativa da amostra quando for líquida. Quando for cremosa ou pastosa, retire partes da superfície, centro e lados. Misture totalmente com uma espátula ou bastão de vidro. No caso de produtos com adições de frutas e/ou cereais e/ou outro ingrediente, triture em gral, moinho e/ou homogeneíze em liqüidificador. Conserve em frasco bem fechado. A amostra deverá ser analisada preferencialmente logo após o recebimento, se não for possível, conserve-a em refrigerador. As principais determinações físico-químicas realizadas são: pH, acidez em ácido láctico, substâncias voláteis, extrato seco total, resíduo por incineração (cinzas), gordura, protídios, glicídios redutores em lactose, glicídios não redutores em sacarose e corantes.

492/IV Leites fermentados – Determinação do pH

Procedimento – Proceda conforme método **017/IV.**

493/IV Leites fermentados – Determinação da acidez em ácido láctico

Material

Balança analítica, potenciômetro, agitador magnético, béquer de 50 mL, bureta de 25 mL, pipeta graduada de 10 mL, bastão de vidro e espátula.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M
Solução de fenolftaleína a 1%

Procedimento – Pipete 10 mL ou pese aproximadamente 10 g da amostra em um béquer de 50 mL. Adicione com pipeta graduada aproximadamente 10 mL de água isenta de gás carbônico e misture com bastão de vidro. Adicione 5 gotas da solução de fenolftaleína. Titule com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando bureta de 25 mL, até o aparecimento de uma coloração rósea. No caso de produtos onde a coloração interfere na visualização do ponto de viragem da fenolftaleína, faça titulação potenciométrica. Para isto, mergulhe os eletrodos de pH e verifique se estão bem imersos. Titule, sob agitação, com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, até pH 8,3.

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0,9}{P} = \text{g de ácido láctico por cento m/v}$$

V = n° de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação
P = n° g ou mL da amostra
0,9 = fator de conversão para o ácido láctico
f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 M

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa Nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasilia, 02/05/03, p. 11.

494/IV Leites fermentados – Determinação de substâncias voláteis e extrato seco total

Procedimento: Proceda conforme método **483/IV** ou **484/IV.**

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{substâncias voláteis por cento m/m}$$

N = n° de g das substâncias voláteis
P = n°de g da amostra
(100 - substâncias voláteis por cento m/m) = extrato seco total por cento m/m

495/IV Leites fermentados – Determinação do resíduo por incineração (cinzas)

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra e proceda conforme método **437/IV.**

496/IV Leites fermentados – Determinação de gordura

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra e proceda conforme o método **486/IV**.

497/IV Leites fermentados – Determinação de gordura com butirômetro de Gerber

Material

Balança analítica, chapa aquecedora, béquer de 100 mL, espátula, bastão de vidro, balão de volumétrico de 100 mL e termômetro.

Procedimento – Pese exatamente 10 g da amostra em um béquer de 100 mL, dissolva com 30 mL de água a (40 - 50)°C com auxílio de um bastão de vidro, transfira para um balão volumétrico de 100 mL, resfrie e complete o volume. Proceda conforme o método **433/IV**.

Cálculo

V x 10 = gordura por cento m/v

V = valor lido na escala do butirômetro

Referência bibliográfica

SILVA, P. H. F.*et al*. **Físico-química do leite e derivados – Métodos Analíticos**. Juiz de Fora: Minas Gerais. 1997. p. 154-155.

498/IV Leites fermentados – Determinação de protídios

Procedimento – Pese de 1 a 2 g da amostra e proceda conforme o método **036/IV** ou **037/IV**.

499/IV Leites fermentados – Determinação de glicídios redutores em lactose

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra e proceda conforme o método **488/IV**.

500/IV Leites fermentados – Determinação de glicídios não redutores em sacarose

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra e proceda conforme o método **489/IV**.

Bebida Láctea

Entende-se por bebida láctea o produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, reconstituídos ou não, fermentado ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea represente pelo menos 51% m/m do total de ingredientes do produto. As determinações são as mesmas do leite fermentado.

Creme de Leite

Entende-se por creme de leite o produto lácteo relativamente rico em gordura retirado do leite por procedimento tecnológico adequado, que se apresenta na forma de uma emulsão de gordura e água. É denominado "creme de leite" ou simplesmente "creme", podendo indicar-se o conteúdo de gordura apresentado. Pode passar por processo de pasteurização, esterilização ou ultra-alta temperatura (UAT). As principais determinações são: substâncias voláteis (**483/IV** ou **484/IV**), resíduo por incineração (**475/IV**), gorduras totais (**466/IV**), protídios (**467/IV**), glicídios redutores em lactose (**488/IV**) e reação de Kreis (**279/IV**).

501/IV Creme de leite – Determinação da acidez em ácido láctico

Procedimento – Pese aproximadamente 10 g da amostra, adicione 50 mL de água e proceda conforme método **453/IV**.

Colaboração:

Jacira Hiroko Saruwtari, Maria Auxiliadora de Brito Rodas e Marilda Duarte

CAPÍTULO **XXVIII**

CONDIMENTOS E VINAGRES

XXVIII

CONDIMENTOS E VINAGRES

Estão incluídos neste capítulo os métodos de análise para especiarias ou condimentos vegetais simples, condimentos preparados e vinagres.

Condimentos vegetais

Estes produtos compreendem certas plantas ou parte delas, contendo substâncias aromáticas, sápidas, com ou sem valor nutritivo, empregados nos alimentos para modificar o seu sabor.

Neste tipo de produto é importante a identificação da espécie e a verificação de adulterações. Entre os tipos de adulteração, os mais encontrados são: a adição de partes da planta de origem que não possuem as qualidades essenciais do condimento e a adição de condimentos e elementos estranhos moídos, principalmente quando o condimento é apresentado sob a forma de pó. Estes elementos adulterantes podem ser identificados pelo exame microscópico e a sua interferência nas características químicas por parâmetros químicos de qualidade, conforme estabelecidos em regulamento técnico específico.

A análise química destes produtos consiste nas determinações, entre outras, de substâncias voláteis (**012/IV**), cinzas (**018/IV**), cinzas insolúveis em ácido clorídrico a 10% (**024/IV**), extrato etéreo (**032/IV**), extrato alcoólico (**035/IV**) e teor de óleos essenciais.

A análise microbiológica também é relevante no caso desses produtos, tendo em vista os procedimentos durante a colheita e pós-colheita a que estão sujeitos.

Condimentos Preparados

Nesta categoria, incluem-se vários produtos obtidos pela simples mistura de condimentos naturais ou elaborados, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, e apresentadas sob forma de pós, pastas, molhos, em emulsão ou suspensão. São exemplos: catchup, curry, mostarda preparada, maionese, molho inglês, molho *shoyu*, temperos prontos à base de alho e sal, entre outros.

A análise destes produtos inclui, entre outras: as determinações de substâncias voláteis (**012/IV**), glicídios redutores, em glicose (**038/IV**), glicídios não-redutores, em sacarose (**039/IV**), amido (**043/IV**), cinzas (**018/IV**), extrato etéreo (**032/IV**), cloretos em cloreto de sódio (**028/IV** ou **029/IV**), corantes artificiais (**051/IV**) e acidez (**016/IV**), dependendo da composição do produto.

Nota: no caso de condimentos com alto teor de cloreto de sódio, o extrato etéreo deverá ser efetuado com éter anidro.

Tanto para condimentos simples como para os preparados, as determinações de substâncias voláteis, cinzas, lipídios, protídios, fibra alimentar, carboidratos por diferença e sódio são relevantes para fins de informação nutricional. Nesse sentido, a determinação de gorduras saturadas se faz necessária no caso de condimentos preparados contendo óleo ou gordura na sua composição, bem como acidez, para o cálculo do valor calórico, principalmente quando o condimento preparado contiver vinagre.

Mostarda preparada – Na análise deste produto, além das determinações usuais citadas em condimentos preparados, faz-se também a determinação de isotiocianato de alila.

502/IV Condimentos – Determinação de isotiocianato de alila em mostarda preparada

O isotiocianato de alila, composto responsável pelo odor e sabor pungente da mostarda, é o principal componente, em porcentagem, do óleo essencial desta especiaria.

Material

Frasco Erlenmeyer com boca esmerilhada de 250 mL, proveta de 100 mL, balões volumétricos de (50 e 100) mL, buretas de 25 mL e aparelhagem de vidro para a destilação simples.

Reagentes

Solução de hidróxido de amônio a 10% m/v
Solução de nitrato de prata 0,1 M
Ácido nítrico
Solução de tiocianato de amônio 0,1 M

Solução de sulfato de ferro III a 10% m/v

Procedimento – Pese 5 g da amostra, adicione 100 mL de água e deixe em contato, em frasco fechado, durante 2 horas a 37°C. Destile a mistura, recebendo o destilado em 5 mL de solução de hidróxido de amônio a 10%, usando um adaptador que mergulhe na solução amoniacal. Completada a destilação, adicione 25 mL de solução de nitrato de prata 0,1 M e aqueça o frasco em banho de água a (80-85)°C, durante 30 minutos, com agitação freqüente. Esfrie, complete o volume a 100 mL e filtre. Meça 50 mL do filtrado, adicione 4 mL de ácido nítrico e titule com solução de tiocianato de amônio 0,1 M, usando como indicador algumas gotas de solução de sulfato de ferro III.

Cálculo

$$\frac{25 \times 2V \times 0{,}00496 \times 100}{P} = \text{isotiocianato de alila por cento m/m}$$

V = nº de mL gasto da solução de tiocianato de amônio 0,1 M
P = nº de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v 1: *Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos*. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985. p. 281-283.

503/IV Condimentos – Determinação de óleos essenciais

Óleos essenciais são misturas complexas compostas por hidrocarbonetos de natureza terpênica e suas formas oxidadas, principalmente mono e sesquiterpenos e fenilalcanos, essencialmente, os fenilpropanos. São voláteis, odoríferos, imiscíveis ou muito pouco miscíveis com água, sendo arrastados pelo vapor d'água. São mais comuns em algumas famílias como por exemplo: *Labiatae* - hortelã, sálvia, alecrim; *Umbelliferae* - erva-doce, funcho, anis; *Lauraceae* - canela; *Zingeberaceae* - gengibre; *Myrtaceae* - cravo da Índia; *Piperaceae* - pimentas, entre outras. São produzidos nos diferentes órgãos vegetais, estando contidos em estruturas especiais ou conjuntos celulares denominados aparelhos secretores.

A determinação quantitativa do teor de óleos essenciais em condimentos vegetais faz-se regularmente em laboratório, pela execução de um procedimento simples de hidrodestilação (arraste a vapor) do vegetal, utilizando-se aparelhos de vidro, como o aparelho de Clevenger modificado, conforme a figura a seguir:

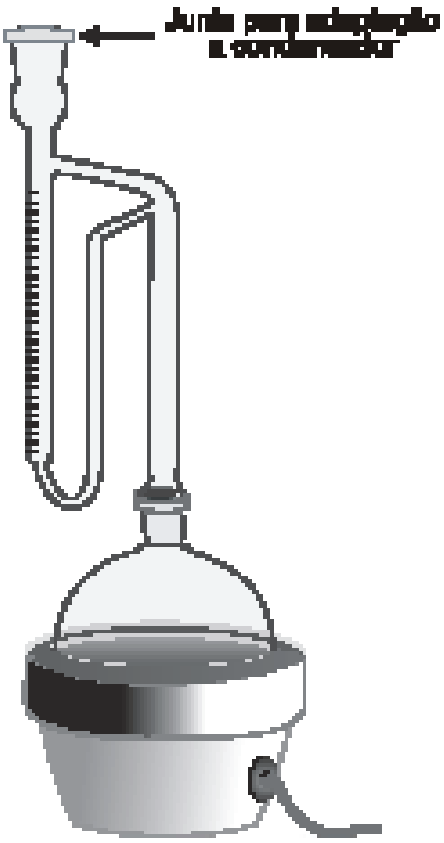


Figura 1 – Aparelho de Clevenger modificado

Material

Aparelho de Clevenger (**Figura 1**), balão de fundo redondo com capacidade de 3000 mL com junta esmerilhada 24/40, manta aquecedora com termostato e condensador de bola.

Procedimento – Pese 100 g da amostra e transfira, com auxílio de um funil, para o balão de vidro; torna-se conveniente que a quantidade de amostra não exceda 1/3 do volume do balão. Adicione água quente (cerca da metade do volume do balão) e acople ao aparelho de Clevenger. Preencha com água a parte graduada do referido aparelho antes de iniciar a destilação. Aqueça e mantenha em ebulição por no mínimo 4 horas ou destile até que duas leituras consecutivas em intervalo de 1 hora não mostrem alteração no volume de óleo obtido. Esfrie e leia o volume destilado diretamente na parte graduada do tubo de Clevenger. Forma-se inicialmente uma emulsão que com o passar das horas se separa.

Cálculo

$$\frac{100 \times n}{P} = \text{teor de óleos essenciais}$$

n= nº de mL de óleo essencial destilado
P= massa em g da amostra de condimento vegetal

Referências Bibliográficas

FREITAS, P.C.P. et al. Óleos essenciais (obtenção, análise, aplicação e usos):apostila. São Paulo: USP/CECAE. 16 p. 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association Official of Analytical Chemists**, Arlington: A.O.A.C., 1995. Chapter 43, p.3.

Vinagres

Vinagre de vinho ou simplesmente vinagre é o produto obtido pela fermentação acética do vinho, apresentando uma acidez volátil mínima de 4 g/100 mL do produto, expressa em ácido acético, sendo os outros componentes proporcionais à matéria-prima usada em sua elaboração. De acordo com a matéria-prima que lhe deu origem, o vinagre será classificado como vinagre de vinho tinto ou branco.

Fermentado acético é o produto resultante da fermentação de frutas, cereais, outros vegetais, mel ou da mistura de vegetais e hidroalcoólica, devendo apresentar uma acidez volátil, expressa em ácido acético, de no mínimo 4 g/100 mL. O fermentado acético pode ter adição de condimentos, aromas, extratos vegetais e óleos essenciais.

As características de vinagres estão definidas nos padrões de identidade e qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Na análise destes produtos, as determinações usuais são, entre outras: exame preliminar, densidade relativa, acidez total, acidez volátil, acidez fixa, álcool em volume, pH (**017/IV**), extrato seco, glicídios redutores em glicose, sulfatos, extrato seco reduzido, cinzas, dióxido de enxofre (**050/IV**) e eventualmente corantes orgânicos artificiais e contaminantes inorgânicos.

504/IV Acidez total em vinagres e fermentados acéticos pelo método volumétrico

Material

Pipeta de 10 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL, béquer de 250 mL, bureta de 25 mL, pHmetro, agitador magnético e barra magnética.

Reagentes

Solução de fenolftaleína
Solução de hidróxido de sódio 1 M

Procedimento – Pipete 10 mL de amostra num frasco Erlenmeyer de 250 mL e proceda como no método **235/IV**. Titule com solução de hidróxido de sódio 1 M, em presença da solução de fenolftaleína ou transfira a amostra para um béquer e titule com solução de hidróxido de sódio, utilizando o pHmetro para atingir o ponto final de viragem, principalmente para amostras escuras.

Cálculo

$$\frac{Vo \times M \times f \times PM}{V \times 10 \times n} = \text{ácido acético, g por 100 mL}$$

Vo = volume de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, em mL
M = molaridade da solução de hidróxido de sódio
PM = peso molecular do ácido acético
n = número de hidrogênios ionizáveis do ácido acético
V = volume da amostra em mL
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

505/IV Acidez volátil em vinagres e fermentados acéticos pelo método volumétrico

A acidez volátil é expressa em g de ácido acético por 100 mL e é determinada volumetricamente, após destilação da amostra por arraste de vapor.

Material

Pipeta de 10 mL, frasco Erlenmeyer de 250 mL, bureta de 25 mL, balão volumétrico de 100 mL, aparelho gerador de vapor e pHmetro.

Reagentes

Solução de fenolftaleína
Solução de hidróxido de sódio 1 M

Procedimento – Transfira 10 mL de amostra para o aparelho gerador de vapor e destile como descrito no método **236/IV**. Recolha no mínimo 100 mL do destilado. Titule rapidamente com solução de hidróxido de sódio 1 M, até coloração rósea persistente por 30 segundos, utilizando a solução de fenolftaleína.

Cálculo

A acidez volátil é expressa em gramas de ácido acético por 100 mL da amostra como descrito no método **236/IV**.

Nota: a acidez fixa pode ser calculada como a diferença entra a acidez total e a volátil obtida por este método, podendo ser obtida também após a evaporação da amostra.

506/IV Acidez fixa em vinagres e fermentados acéticos pelo método volumétrico

A acidez fixa é determinada no resíduo após a evaporação da amostra, por titulação com hidróxido de sódio e pode ser expressa em gramas de ácido acético por 100 mL.

Material

Pipetas de (10 e 20) mL, cápsula de porcelana, frasco Erlenmeyer de 250 mL, bureta de 25 mL e banho-maria.

Reagentes

Solução de fenolftaleína
Solução de hidróxido de sódio 0,1 M

Procedimento – Pipete (10 ou 20) mL da amostra em uma cápsula de porcelana e evapore o líquido lentamente em banho-maria fervente até secura. Transfira com água para um frasco Erlenmeyer e titule com solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Calcule o teor de acidez fixa e expresse o resultado em gramas de ácido acético por 100 mL.

Nota: a acidez volátil pode ser calculada como a diferença entre a acidez total e a acidez fixa obtida por este método.

507/IV Vinagres e fermentados acéticos – Determinação de álcool em volume

Material

Termômetro, balão volumétrico de 100 mL e conjunto de destilação.

Reagente

Solução de hidróxido de sódio 5 M

Procedimento – Ajuste a temperatura da amostra a 20°C, meça 100 mL em um balão volumétrico, transfira quantitativamente para um conjunto de destilação, lavando com água, neutralize com hidróxido de sódio 5 M (o volume pode ser calculado a partir da determinação da acidez) e proceda como descrito no método **233/IV**. Obtenha a densidade relativa do destilado e o teor alcoólico.

508/IV Vinagres e fermentados acéticos – Determinação do extrato seco total

Este método avalia o extrato seco, por evaporação da amostra em banho-maria e secagem em estufa. O extrato seco total de fermentados acéticos é expresso em gramas por litro.

Procedimento – Proceda como descrito no método **238/IV**.

509/IV Vinagres – Determinação do extrato seco reduzido

O extrato seco reduzido é obtido pelo valor do extrato seco total subtraído dos açúcares totais e dos sulfatos que excedam 1 g por litro.

Cálculo

Calcule o extrato seco reduzido como descrito no método **238/IV**.

Referências bibliográficas

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Nomativa nº 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasilia, 02/05/03, p. 18152-18173.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1:

Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 297-301.

Colaboradores
Letícia Araújo Farah Nagato e Regina Sorrentino Minazzi Rodrigues

CAPÍTULO **XXIX**

SEGURANÇA EM LABORATÓRIOS DE QUÍMICA

XXIX

SEGURANÇA EM LABORATÓRIOS DE QUÍMICA

Introdução

Na condução de um processo analítico em um laboratório de química há diversos fatores de risco, de naturezas diferentes, e é necessário que este processo seja estudado visando, além de resultados confiáveis, a segurança dos profissionais e do laboratório.

É necessário que os analistas e auxiliares tenham conhecimentos bem fundamentados sobre a natureza dos reagentes químicos envolvidos no trabalho, dos riscos de manipulação e as formas seguras de lidar com eles. Da mesma forma, devem ter conhecimento dos riscos das instalações, aparelhos e utensílios necessários às suas funções, bem como de sua utilização correta e segura. Os profissionais devem ser conscientizados e capacitados a tomar providências corretas em caso de acidentes.

Para que o trabalho em um laboratório seja seguro, vários fatores devem coexistir: instalações bem planejadas,manutenção rigorosa, quantidades necessárias de equipamentos de segurança, tanto individuais como coletivos e treinamentos para situações de rotina e de emergência. Ao se pensar em riscos em um laboratório de química, é comum associá-los aos reagentes que podem estar presentes, mas também devem ser avaliados aqueles causados por eletricidade, calor, materiais cortantes, agentes biológicos, radiações, poeiras, fumos, névoas, fumaças, gases, vapores, ruídos e riscos ergonômicos. Deve existir uma sinalização alertando sobre todos os riscos existentes. Também é necessário destacar que, além da segurança interna do laboratório, devem ser observadas as questões ambientais como um todo, evitando descartes irregulares de resíduos poluentes e tóxicos.

Não cabe, dentro dos propósitos deste livro, inserir um manual completo de segurança em laboratórios; existem publicações, tanto em meio físico quanto eletrônico, que podem nortear a montagem de um sistema de segurança adequado a este campo de trabalho e às particularidades de cada laboratório. Mas é importante lembrar sobre esta necessidade e fornecer alguns dos elementos ou critérios que devem ser observados.

É possível fazer uma associação entre um Sistema da Qualidade e um Sistema de Segurança. Assim, os métodos analíticos descritos neste livro podem ser transformados em Procedimentos Operacionais Padrão - POPs, em cada laboratório em que forem adotados. Estes procedimentos são usualmente escritos com mais detalhes, destacando cada passo do processo analítico e, de acordo com as normas da qualidade, devem ser rigorosamente seguidos. Estes POPs podem incluir características toxicológicas dos reagentes envolvidos no método, os cuidados para sua manipulação e outras questões relativas à segurança.

Também é adequado que os laboratórios elaborem ou adotem manuais de segurança que incluam todas as questões não específicas de cada metodologia. Em instituições de grande porte, é conveniente que exista alguma forma de organização interna que avalie constantemente a situação da segurança nos diversos laboratórios, como uma CIPA (Comissão Interna para Prevenção de Acidentes) ou um Núcleo, Comitê ou Comissão de Biossegurança. Esta organização interna também deve executar inspeções, tendo em vista que nem sempre situações de risco são bem detectadas pelas pessoas que trabalham no local. O trabalho desta organização interna deve, ainda, propor de soluções para os problemas existentes.

Algumas regras de segurança

A seguir estão enumeradas algumas regras gerais de segurança, às quais devem ser adicionadas aquelas necessárias a cada laboratório, de acordo com seu trabalho:

1. Ao manipular um reagente pela primeira vez, informar-se sobre a toxicidade e outros riscos que envolvam essa manipulação, consultando tabelas que existam na seção, rótulos, fichas de informações sobre produtos químicos e/ou literatura especializada.

2. Trabalhar sempre sob cabine de segurança química (capela), que é um sistema de proteção coletiva, ao realizar operações com produtos voláteis, ao trabalhar com substâncias de composição desconhecida e ou quando haja a possibilidade de formação de poeiras, névoas ou fumaça.

3. Usar máscaras de proteção respiratória quando não for possível trabalhar com equipamento de proteção coletiva; neste caso, as máscaras devem ser adaptadas ao rosto do laboratorista e providas de filtro adequado ao risco.

4. Usar óculos de proteção e luvas, bem como outros equipamentos de proteção individual (E.P.I.) sempre que necessários. Verificar, para cada tipo de substância, o tipo de luva a ser usado – luvas de procedimentos (látex) são inadequadas para o trabalho com substâncias químicas.

5. Usar o avental constantemente no trabalho, mas não é recomendável permanecer com ele fora do laboratório, especialmente durante as refeições. O avental indicado é o de algodão, grosso, com abertura frontal, preferencialmente com fecho de velcro, mangas compridas com punhos fechados também com velcro, sem bolsos na parte inferior e sem detalhes soltos que possam enroscar.

6. Evitar testar amostras por odor, mas quando isto for imprescindível, não colocá-las diretamente sob o nariz.

7. Nunca pipetar com a boca, nem mesmo água; usar aparelhos apropriados.

8. Rotular, identificando e datando, todos os frascos de solução ou reagentes que preparar.

9. Tomar cuidados redobrados ao manipular substâncias químicas contidas em frascos sem identificação.

10. No caso de reações das quais não se saiba totalmente o resultado, fazer uma experiência prévia, em pequena escala, na cabine de segurança química (capela).

11. Ao promover reações ou aquecimentos de materiais em tubo de ensaio, nunca dirigir a abertura deste contra si ou outro colega; dirigi-la para dentro da cabine de segurança química.

12. Para diluir um ácido, adicionar o ácido à água, nunca o contrário.

13. Nunca deixar sem atenção qualquer operação onde haja aquecimento ou possibilidade de reação violenta (e usar a capela).

14. Informar-se sobre a localização e maneira correta de utilizar equipamentos contra

incêndio, chuveiros de emergência, lavadores de olhos e outros equipamentos de emergência.

15. Nunca beber ou comer alimentos na área de trabalho do laboratório.
16. Nunca fumar na área de trabalho do laboratório, mesmo que não haja risco aparente.

17. Lubrificar todo material de vidro que deva ser inserido em uma rolha, a qual deve ter furo de diâmetro conveniente; as mãos devem estar protegidas por luvas apropriadas ou toalhas.

18. Nunca trabalhar no laboratório sem estar junto com outro funcionário; trabalhos perigosos necessitam de pelo menos duas pessoas.

19. Realizar todos os procedimentos conscientemente; evitar o "automatismo" e distrações.

20. Manter o laboratório arrumado, limpo e livre de materiais não pertinentes ao trabalho.

21. O chão não deve ser encerado ou escorregadio.

22. Deve existir um programa de controle de insetos e roedores.

23. Não deve ser admitida a permanência de crianças no laboratório.

24. A entrada de pessoas estranhas ao trabalho, quando necessária, somente deve ser permitida após advertências quanto a riscos existentes e precauções para evitá-los.

25. No caso de trabalhos com amostras (por exemplo, água) suspeitas de contaminação biológica, consultar um manual de segurança específico para microbiologia, usar equipamentos de proteção adequados, descontaminar imediatamente a bancada e outros materiais na eventualidade de derramamento da amostra.

26. Ainda com relação à possibilidade de contaminação biológica, conduzir todo procedimento de modo a minimizar a formação de aerossóis. Por exemplo, não abrir a centrífuga em movimento ou logo após ter parado.

27. Descontaminar todo material com suspeita de contaminação biológica antes de ser desprezado ou reutilizado. Materiais contaminados que serão autoclavados ou incinerados devem ser colocados em recipientes resistentes e em bom estado; aventais contaminados também precisam ser desinfetados de forma apropriada.

28. Acondicionar adequadamente vidrarias quebradas a serem descartadas, lavadas, se necessário, com cuidado, antes do descarte.
29. Na Instituição, um programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos, torna-se necessário.

30. Qualquer acidente ou fator de risco, por menor que seja, deve ser comunicado ao responsável pelo laboratório e à organização interna para a segurança do trabalho.

As recomendações sobre segurança devem se estender a pessoas que prestem serviços ao laboratório, como o pessoal de manutenção (interno ou externo), de limpeza, e assim por diante, por meio de um programa de capacitação adequado.

As regras de segurança aqui expostas são as mais comuns. É conveniente analisar cada uma delas em função do trabalho do laboratório e de cada funcionário, e agregar regras não mencionadas aqui e que sejam necessárias.

Antes de iniciar a rotina diária de trabalho, deve-se verificar tudo o que vai ser realizado e o material necessário, fazendo-se, portanto, uma análise do procedimento funcional a ser tomado, facilitando as tarefas, evitando o trânsito cruzado e desnecessário com outros laboratoristas e também o manuseio excessivo com o material a ser trabalhado. O preparo da bancada é fundamental.

Do ponto de vista gerencial, alguns fatores contribuem para o bom e seguro andamento do laboratório, tais como:

- A elaboração de um fluxograma de atividades para análises rotineiras
- Boa supervisão do laboratório
- Boa distribuição do espaço físico, evitando aglomerações
- Capacitação e conscientização do pessoal
- Instalação e manutenção de equipamentos de proteção coletiva
- Incentivo ao uso correto e constante dos equipamentos de proteção individual, sempre que necessário
- Substituição, sempre que possível, de substâncias tóxicas ou cancerígenas
- Inclusão da questão de qualidade e de segurança nas previsões e processos de compras, tanto para materiais de segurança, como para vidrarias e outros equipamentos.

Noções de toxicologia, riscos e prevenções no manuseio de produtos químicos

Uma substância é considerada tóxica se for capaz de afetar de forma adversa a

saúde de um organismo. Em termos de efeitos biológicos, podem ocorrer respostas locais como irritação de pele e mucosas, edema localizado devido a inflamação e, eventualmente, necrose. Podem haver reações chamadas sistêmicas, a partir da absorção da substância pelo organismo. Fazem parte dessas reações sintomas inespecíficos como náuseas, vômitos, diarréia, efeitos narcóticos como tontura, redução da atenção e da percepção, com perda de consciência e coma. Alguns agentes químicos podem agir de forma mais específica por mecanismos como a asfixia, por interferir no transporte do oxigênio, como o monóxido de carbono ou os agentes metemoglobinizantes, ou por bloquear a utilização do oxigênio no nível tecidual, como o fazem as substâncias cianogênicas (que possuem o íon CN^-) e o gás sulfídrico (H_2S). Por meio da inibição de enzimas vitais ao nosso organismo, algumas substâncias podem bloquear a produção de hemoglobina, produzindo anemia, interferir na condução nervosa, produzindo sintomas neurológicos, causar insuficiência renal e hepática, etc. Efeitos tóxicos lesando a molécula de DNA podem se manisfestar como teratogênese (deformidades em crianças nascidas de mães expostas a substâncias tóxicas), efeitos mutagênicos (mudanças de um gene em particular ou no conjunto de cromossomos) e efeitos carcinogênicos (aparecimento de câncer).

Dependendo da substância, pode haver mais de um efeito biológico adverso. Algumas substâncias podem ser acumulativas no organismo, isto é, depois que são absorvidas e distribuídas ligam-se a algum tecido do corpo (como ossos, tecido adiposo, tecidos moles como cérebro, fígado, rins e coração) e são excretados apenas lenta ou parcialmente, enquanto outras não apresentam essa característica. Independente de ser ou não acumulativa, é possível ocorrer intoxicação aguda quando houver exposição a uma concentração elevada da substância, mesmo que por um espaço de tempo curto. Dependendo da natureza e da ação do agente tóxico, com exposições repetidas, mesmo em níveis de concentração baixos, podemos ter uma intoxicação crônica.

Em alguns casos os efeitos são reversíveis, isto é, desaparecem ao cessar a exposição (com afastamento ou tratamento médico, ou ambos). Em outros, os efeitos podem ser irreversíveis, mesmo que não haja mais exposição e que a pessoa seja submetida a tratamento médico. Efeitos adversos tardios, isto é, ocorrendo bem depois da exposição ter cessado, como neuropatias, podem ocorrer em algumas situações de intoxicação aguda por altas doses.

A absorção de substâncias tóxicas no organismo pode se dar por via cutânea, respiratória, ou digestiva. No trabalho de laboratório, a absorção dessas substâncias deve ser evitada totalmente ou minimizada pelo uso de equipamentos de proteção coletiva, como as capelas, aparelhos apropriados para pipetagem e uso de equipamentos de proteção individual (E.P.Is) adequados à situação de exposição avaliada, sempre que necessários, e pela eliminação dos hábitos de comer ou fumar no ambiente de trabalho. Antes de se lidar com determinado produto químico é conveniente buscar informações sobre a sua ação tóxica sobre o organismo.

Para facilitar o acesso a essas informações, as gerências e as organizações internas para a segurança do trabalho podem optar entre vários caminhos:

- inclusão das informações necessárias, em termos de segurança, a cada procedimento operacional padrão;
- confecção de rótulos especiais contendo essas informações, que seriam aderidos ao vidro de reagentes;
- elaboração de cartazes, para cada laboratório, contendo as características dos reagentes mais usados;
- elaboração de fichas de informações de segurança para cada reagente, tipo de amostra e resíduos, a serem arquivadas em local de fácil acesso aos laboratoristas ou afixadas nas paredes do laboratório.

Estas fichas e informações adicionais também devem ser solicitadas aos fornecedores quando da compra de materiais. Também podem ser obtidas por meio eletrônico, como no sítio da Organização Mundial da Saúde com o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente e a Organização Internacional do Trabalho, onde há o programa INTOX do IPCS (sigla em inglês para o Programa Internacional de Segurança Química, que tem como endereço http://www.intox.org/databank/databank/chemicals, bem como o sítio do *National Institute for Occupational Safety and Health* (E.U.A.), endereço http://www.cdc.gov/niosh/homepage.

As informações devem incluir o modo de ação da substância, os cuidados de manipulação, armazenagem e as providências a serem tomadas em caso de acidentes, além da forma correta de descartar seus resíduos. É importante que o funcionário esteja permanentemente ciente dos riscos e cuidados ao manipular reagentes (assim como ao lidar com equipamentos). Deve ser instruído a, em caso de dúvidas, procurar previamente instruções com o chefe ou um representante da organização interna para a segurança do trabalho ou ainda em literaturas especializadas. Deve ser lembrado que todo funcionário tem direito ao acesso a essas informações, assim como aos equipamentos de segurança coletiva e individual, além do direito de recusa a trabalhos em situações que coloquem em risco a sua saúde.

Nem sempre o risco imediato ao se manipular um reagente químico está na sua ação direta sobre o organismo e sim por outros tipos de riscos envolvendo as suas propriedades como, por exemplo, a possibilidade de ser inflamável, explosivo, reagir violentamente com a água, liberar gases tóxicos em contato com a água ou outras substâncias e assim por diante. Convém, portanto, que informações deste tipo sejam levantadas.

Além dos cuidados com as substâncias usualmente presentes em diversos labo-

ratórios, é necessário estudar os cuidados requeridos em casos específicos, conforme a área de atuação. Assim, para a determinação de pesticidas, sejam organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides ou outros, é necessário lembrar que são altamente tóxicos e que podem ser absorvidos também por inalação e pela pele e, dessa forma, é preciso reunir informações de segurança específicas para se lidar com eles. No caso de preparações enzimáticas concentradas, podem ocorrer reações alérgicas e deve ser evitado o seu contato com a pele ou por inalação, pois pode haver dispersão no ar na forma de aerossol ou pó; o trabalho deve ser conduzido em laboratório com equipamentos de segurança coletiva adequados, com exaustão e renovação de ar, e com luvas e vestimentas adequadas. As micotoxinas, por sua vez, como substâncias carcinogênicas naturais, apresentam alta toxicidade, também podem ser absorvidas por inalação e pela pele, e devem ser manipuladas em cabines de segurança química, com luvas e, quando possível, com o uso de câmaras (caixas transparentes), que possibilitem a manipulação com luvas ou braços mecânicos, principalmente se estiverem no estado sólido (cristalino), pois o seu efeito eletrostático possibilita a difusão do material pelo ambiente de trabalho; se ocorrerem derramamentos, a área deve ser tratada com solução de hipoclorito de sódio a 1% e, após cerca de dez minutos, com solução de acetona a 5%.

O laboratório: projeto, construção e instalações

O projeto de um laboratório é o primeiro ponto para o estabelecimento de condições seguras de trabalho, bem como da manutenção posterior dessas condições. Ele deve levar em consideração, dentro da área disponível, as finalidades do trabalho específico do laboratório, as operações e o fluxo das amostras, os riscos decorrentes desse trabalho, o seu volume, o número provável de funcionários entre outros. De preferência, o espaço deve ser projetado com folga para possíveis aumentos, tanto de trabalho como de pessoal. Isto determinará as posições de bancadas, cabines de segurança química, chuveiros de emergência e assim por diante. Se existirem corredores no interior do laboratório, ou entre laboratórios, estes devem ter largura apropriada, de pelo menos 1,5 m, que permitam a livre circulação de pessoas, inclusive transportando materiais. Mesmo que amplos, não devem acomodar equipamentos, em uso ou não, ou reagentes, ou qualquer tipo de material: a área de circulação deve ser mantida livre de obstáculos.

Na sua construção e instalação, devem ser usados materiais não combustíveis e resistentes à ação de compostos químicos que farão parte da rotina do laboratório, como solventes, agentes corrosivos e outros. Estes materiais devem ser de boa qualidade e estar em conformidade com as respectivas normas técnicas, como as da ABNT ou normas internacionais.

Devem existir, no mínimo, duas portas, de largura suficiente (de preferência duplas, pelo menos uma delas), em áreas diferentes, abrindo para o exterior, providas de visores.

Colocar piso antiderrapante, resistente a agentes químicos e a choques mecânicos

e disposto de forma absolutamente regular, para evitar tropeções.

Prever áreas isoladas, como área para armazenamento de reagentes (somente o necessário à execução dos trabalhos, sem estoques de longo prazo), áreas para equipamentos que liberem grandes quantidades de calor (uma sala para muflas), para lavagem de materiais, vestiários internos (ante-sala de laboratórios com ambiente controlado), área para trabalhos de escritório e assim por diante.

Projetar as instalações elétricas com folgas para possíveis necessidades posteriores (expansões, reformas, novos equipamentos). As tomadas de 110 e 220 V devem ter formatos diferentes, incompatíveis, para que não ocorram casos em que aparelhos sejam ligados à tensão incorreta. Ligar todas as tomadas e aparelhos elétricos ao fio terra. Afixar nas tomadas e interruptores etiquetas com códigos relacionando-os seus respectivos quadros de força e disjuntores. Localizar estes quadros de força na área externa ao laboratório, livre de materiais inflamáveis. Se necessário, devem ser usadas luminárias e interruptores à prova de faíscas. Prover o prédio de um sistema pára-raios eficiente. Manter uma iluminação artificial com intensidade adequada e lâmpadas que forneçam radiação branca, em geral fluorescentes, com proteções contra pó e vapores.

As tubulações de água, gases sob pressão, ar comprimido, vapor, devem ser resistentes e feitas de material adequado ao fluido que irão conter. A identificação geralmente se dá por meio de cores convencionais (normatizadas pela NBR 6493, de outubro de 1994 – ABNT), e também instalar registros gerais e locais, em pontos de fácil acesso.

A ventilação deve ser suficiente para impedir o acúmulo de fumos e vapores no interior dos laboratórios. Se necessário, instalar sistemas de ventilação e exaustão forçadas, com os cuidados para que o sistema de ventilação, se existente, não influa no sistema de exaustão a ponto de comprometer a sua eficiência.

Construir as bancadas de material não combustível, com altura adequada, funcionais do ponto de vista ergonômico e resistentes aos agentes químicos que farão parte da rotina de trabalho. De preferência, não ligadas às paredes, de modo que possuam duas saídas. Se existirem bancadas paralelas, que a distância entre elas seja suficiente para a circulação (cerca de 1,5 m) e para que o laboratorista tenha espaço para recuar em caso de uma ocorrência de perigo. Se o tipo de atividade a ser desenvolvida for executada com o laboratorista sentado, prever nichos sob a bancada onde ele possa acomodar as pernas, sentando-se de forma ergonomicamente correta.

Especial atenção deve ser dedicada às cabines de segurança, que são extremamente importantes na prevenção de acidentes e especialmente na prevenção da exposição a agentes químicos. Nelas são realizados os trabalhos com desprendimento de calor, vapores, fumos, com risco de explosão ou aqueles cujas conseqüências não são bem

conhecidas previamente. O projeto da cabine de segurança e os seus acessórios precisam ser adequados aos trabalhos que serão realizados. Existem especificidades que diferenciam uma cabine de segurança química para solventes de outra para agentes corrosivos, como ácidos, por exemplo. Se no laboratório forem realizados trabalhos com materiais biológicos (ou que representem risco de contaminação biológica), deverão existir também cabines de segurança de fluxo laminar. A construção, instalação e manutenção das cabines de segurança devem ser confiadas a empresas competentes e idôneas, que assegurem a qualidade do material adquirido e do serviço prestado. A sua manutenção deve ser periódica e rigorosa.

Um dos fatores de risco presentes em laboratórios é o ruído, proporcionado por cabines de segurança, sistemas de exaustão ou ventilação, centrífugas e outros aparelhos que proporcionam uma carga (que em geral vai aumentando com o tempo, pelo envelhecimento dos equipamentos) de ruído contínuo e fatigante. Ao contrário do calor, é difícil isolar áreas específicas para o ruído. Tanto as empresas fornecedoras desses materiais como técnicos em segurança do trabalho devem ser consultados para diminuir esse fator de risco ao menor nível possível.

Adequar o sistema de esgotos ao tipo de laboratório instalado, quanto ao seu dimensionamento e ao tipo de material utilizado na sua construção. Não descartar por esse meio solventes, substâncias tóxicas ou agressivas ao meio ambiente; neutralizar ácidos e bases previamente ou, no mínimo, deixá-los bem diluídos antes do descarte. Os encanamentos nas saídas de pias e cabine de segurança química e ralos devem ter sifões para evitar o retorno de eventuais gases tóxicos presentes no esgoto.

Colocar estrategicamente e em quantidade suficiente os equipamentos de segurança (extintores, alarmes, chuveiro com lava-olhos). Os chuveiros com lava-olhos, por exemplo, posicionados junto às áreas com maior risco, devem ser testados periodicamente, de acordo com as recomendações do fabricante.

Planejar o sistema de combate a incêndios de acordo com a estrutura e natureza de trabalho do laboratório. Lembrar que há vários tipos de extintores para diferentes origens e meios de propagação para o fogo (em geral, são mais usados em laboratórios os extintores de gás carbônico e os de pó químico seco) e diferentes sistemas fixos de combate ao fogo, como hidrantes e esguichos de teto que disparam com a presença de calor. O uso de mangueiras requer treinamento específico e pode haver restrições à água como forma de combate a incêndios em laboratórios. Portanto, é conveniente consultar empresas especializadas e o Corpo de Bombeiros e, a partir de seus relatórios e recomendações, quanto ao tipo de instrumentos, suas quantidades e o posicionamento no laboratório e no prédio, planejar a montagem do sistema contra fogo, efetuar os treinamentos necessários e fazer um cronograma de manutenção. A presença de todos os dispositivos de combate a incêndio deve ser bem sinalizada e o acesso a eles deve estar permanentemente desimpedido. Na

Instituição, para suas diversas unidades, pode se necessário ou conveniente manter uma Brigada de Incêndio (consultar o Corpo de Bombeiros).

Acondicionamento de produtos químicos em laboratórios

Os reagentes não podem ser guardados de uma forma aleatória ou por ordem alfabética, pois, nesse caso, estarão sendo desrespeitadas incompatibilidades. Cada laboratório mantém acondicionados, de forma adequada, os reagentes químicos que lhe são necessários, em quantidades limitadas, que são renovadas periodicamente. O almoxarifado central, especialmente projetado para este fim, com interruptores e lâmpadas que não provoquem faíscas, piso adequado e assim por diante, fornece o material para o laboratório. O transporte de material do almoxarifado ao laboratório é realizado por meio de carrinhos, pelo menos no que diz respeito a vidrarias e reagentes químicos, os quais devem estar contidos em caixas de papelão ou outro material que diminua a possibilidade de impactos que possam causar a quebra dos frascos.

Uma vez no laboratório, os reagentes são guardados em armários adequados, com prateleiras ajustáveis para se obter o vão necessário e revestidas, quando for o caso, de material resistente ao ataque dos produtos químicos que vão ser guardados. Os frascos dos reagentes devem estar dispostos de modo a facilitar o acesso àqueles usados com maior freqüência, respeitadas as compatibilidades entre eles. Frascos pesados não são guardados em prateleiras altas. Solventes voláteis e inflamáveis são guardados em armários refrigerados ou com exaustão adequada e livres da possibilidade de ocorrência de faíscas. De preferência, os armários possuem uma altura que dispense o uso de escadas ou outros objetos para se alcançar os produtos armazenados. Se for necessário o acesso a prateleiras mais altas, fazê-lo de modo adequado, com uma escada de construção e dimensões apropriadas, mas essas prateleiras não podem conter reagentes ou outros materiais que ofereçam risco ao laboratorista. Na **Tabela 1** são citadas, como exemplo, algumas incompatibilidades entre reagentes.

Tabela 1 - Incompatibilidade entre reagentes

Manter	Fora do contato com
Acetileno	Cobre (inclusive tubos), flúor, bromo, iodo, cloro, prata, mercúrio e seus compostos
Acetona	Misturas de ácido sulfúrico e ácido nítrico concentrados
Ácido Acético	Ácido crômico, ácido nítrico, ácido perclórico, compostos hidroxilados, etilenoglicol, peróxidos e permanganatos
Manter	**Incompatibilidade entre reagentes**

Ácido Crômico	Ácido acético, ácido nítrico, naftaleno, cânfora, glicerol, terebentina, álcool, líquidos inflamáveis em geral
Ácido Fluorídrico	Amônia (gás ou solução aquosa)
Ácido Nítrico	Ácido acético, ácido crômico, ácido cianídrico, cianeto, anilina, sulfeto de hidrogênio, acetona, álcool, líquidos inflamáveis, substâncias que sofrem reações de adição de nitrato facilmente
Ácido Oxálico	Prata e mercúrio
Ácido Perclórico	Anidrido acético, bismuto e suas ligas, álcool, papel, graxas e outras substâncias orgânicas
Ácido Sulfúrico	Cloratos, percloratos, permanganatos, água
Amônia anidra	Mercúrio, cloro, iodo, bromo, ácido fluorídrico, hipoclorito de cálcio e halogênios
Anilina	Ácido nítrico, peróxido de hidrogênio
Bromo	Amônia, acetileno, butadieno, butano, propano, gás liquefeito de petróleo, hidrogênio, benzeno, terebentina, carbeto de sódio e metais finamente divididos
Carvão ativo	Hipoclorito de cálcio e todos os agentes oxidantes
Cianetos	Ácidos e Bases
Cloratos	Sais de amônio, ácidos, metais em pó, enxofre, carvão, substâncias orgânicas ou combustíveis finamente divididas
Cloro	Amônia, acetileno, butadieno, butano, propano, gás liquefeito de petróleo, solventes derivados de petróleo, hidrogênio, benzeno, terebentina, carbeto de sódio e metais finamente divididos
Cobre	Acetileno, peróxido de hidrogênio
Dióxido de cloro	Amônia, metano, fosfina, sulfeto de hidrogênio
Fluor	Deve ser totalmente isolado
Hidrocarbonetos em geral	Flúor, cloro, bromo, formol, ácido crômico, peróxido de sódio, peróxidos em geral
Iodo	Acetileno, amônia, hidrogênio
Líquidos inflamáveis	Nitrato de amônio, ácido crômico, peróxidos, halogênios, ácido nítrico
Mercúrio	Acetileno, ácido fulmínico, amônia
Metais alcalinos e alcalino-terrosos	Água, tetracloreto de carbono e outros hidrocarbonetos clorados, dióxido de carbono, halogênios
Nitrato de amônio	Ácidos, metais em pó, líquidos inflamáveis, cloratos, nitratos, enxofre, substâncias orgânicas ou combustíveis finamente divididas
Manter	**Incompatibilidade entre reagentes**

Nitreto de sódio	Chumbo, cobre e outros metais
Oxigênio	Hidrogênio, líquidos, gases e sólidos inflamáveis, óleos, graxas
Pentóxido de fósforo	Água
Permanganatos	Glicerol, etilenoglicol, ácido sulfúrico, benzaldeído
Peróxido de hidrogênio	Cromo, cobre, ferro e outros metais, inclusive seus sais, líquidos inflamáveis, materiais combustíveis, anilina e nitrometano
Peróxido de sódio	Qualquer substância oxidável, como álcoois, ácido acético glacial, benzaldeído, dissulfeto de carbono, acetato de etila
Potássio metálico	Água, tetracloreto de carbono e outros hidrocarbonetos clorados, dióxido de carbono, halogênios
Prata	Acetileno, ácido oxálico, ácido tartárico, compostos de amônio
Sódio metálico	Água, tetracloreto de carbono e outros hidrocarbonetos clorados, dióxido de carbono, halogênios
Sulfeto de Hidrogênio	Ácido nítrico fumegante, gases oxidantes

Fonte*:* Grist, NR. **Manual de Biossegurança para o Laboratório**, 2. ed. São Paulo: Santos Livraria Editora. 1995.

Nota: substâncias do lado esquerdo da tabela devem ser estocadas e manuseadas de forma a não poder acidentalmente contatar substâncias correspondentes no lado direito da coluna, sob condições não controladas, pois podem ocorrer reações violentas. De modo geral, substâncias que reajam entre si não devem ser armazenadas juntas como, por exemplo, ácidos e bases.

É conveniente que cada laboratório construa a sua tabela de incompatibilidade entre reagentes, de acordo com os materiais que utiliza. Para tanto, podem ser usadas as fichas individuais de informações de segurança, tabelas similares à **Tabela 1**, bem como sítios eletrônicos que contenham informações de segurança para substâncias químicas, como os apontados no item **Noções de toxicologia, riscos e prevenções no manuseio de produtos químicos**.

Fechar hermeticamente os frascos dos reagentes ao serem guardados. No caso de frascos com roscas, não aplicar muita força, o que dificultaria a abertura posterior dos mesmos.

A água

A água é uma substância que poucas vezes é encarada como uma fonte de perigo, mas também é um composto químico e, em algumas situações, provoca reações violentas ou apresenta propriedades que podem acarretar perigo. Assim, é necessário particularizar os casos em que seu emprego ou presença pode representar risco, principalmente quanto ao armazenamento de reagentes, seu uso, descarte e em certas emergências.

Muitos produtos químicos reagem com água de forma violenta, gerando grande quantidade de calor. Assim, se água for adicionada ao ácido sulfúrico concentrado, o calor gerado será muito intenso, provocando o arremesso de água quente e ácido sulfúrico ainda concentrado (e também quente), podendo produzir graves queimaduras pela ação do calor e do poder corrosivo do ácido. Por causa disto, há a regra segundo a qual o ácido deve ser adicionado à água e nunca o contrário. A operação deve ser conduzida de forma cuidadosa; a massa maior de água absorve parte do calor gerado. Espera-se pelo resfriamento adequado para continuar a operação, vagarosamente. Em certos casos, podem ser usados banhos de gelo para haver resfriamento mais rápido, mas também é necessário cautela, para não haver rompimento do vidro pela variação rápida de temperatura.

Determinados elementos no estado metálico como sódio, potássio, cálcio ou magnésio (quando aquecido) também reagem violentamente com a água, provocando grande desprendimento de calor e faíscas. Os produtos dessas reações são bases fortes, que são corrosivas.

Outros produtos químicos reagem com a água produzindo compostos de toxicidade variável, muitas vezes na forma de vapor. É preciso atenção, quanto à presença de água, para o armazenamento, uso e descarte destes produtos, entre os quais estão os silanos (metildiclorossilano, triclorossilano etc.), fosfetos (de sódio, alumínio etc.), hipocloritos secos (de lítio, sódio, cálcio etc), cianetos (de sódio, potássio etc.), brometo de acetila, cloreto de acetila, brometo de alumínio anidro, cloreto de alumínio anidro, pentafluoreto de alumínio, oxicloreto de cromo, ácido fluorsulfônico, pentacloreto de fósforo, tetracloreto de silício, cloreto de tionila, iodeto de acetila, magnesiodiamida, solução sulfonítrica (ácido sulfúrico + ácido nítrico), pentafluoreto de iodo, nitreto de lítio. Podem ser formados compostos como cloreto de hidrogênio, cloro, fosfina, cianeto de hidrogênio, brometo de hidrogênio, fluoreto de hidrogênio, iodeto de hidrogênio, dióxido de enxofre, amônia e dióxido de nitrogênio.

É necessário também lembrar que a água é boa condutora de eletricidade. Assim, num princípio de incêndio em que estejam envolvidos aparelhos elétricos ou existam tomadas próximas, não é conveniente fazer uso da água. Outra situação de risco no uso da água em caso de incêndio é representado pela sua utilização para apagar fogo envolvendo um solvente orgânico, imiscível com eles. A água é mais densa que a maioria dos solventes orgânicos e, se usada de forma inadequada, pode espalhar o solvente e as chamas, dificultando o combate ao incêndio.

Derramamento de produtos químicos

Em acidentes desse tipo, além dos riscos de natureza física, envolvendo o peso do recipiente, material de fabricação e estilhaços com risco de cortes, há os de natureza química do produto espalhado no ambiente, ou seja, se esse produto é corrosivo, inflamável, tóxico, volátil, ou com outras características de risco. Existem materiais absor-

ventes disponíveis no mercado específicos para esse fim e que devem estar disponíveis no laboratório. Na sua ausência, ácidos e compostos químicos corrosivos podem ser tratados com bicarbonato de sódio ou soda cáustica, após prévia adição cuidadosa de água (diluição). Soluções alcalinas podem ser diluídas e neutralizadas com ácidos fracos. Se o material for inflamável, as chamas existentes (em bicos de Bünsen etc) devem ser extintas imediatamente, deve ser fechada a válvula de gás para a sala e desligados os aparelhos elétricos que possam ser fonte de faíscas. Caso existam vapores tóxicos, evacuar a sala. Providenciar a ventilação da sala. A retirada do material deve ser feita com o uso de E.P.Is. Se necessário, acionar os bombeiros.

Cilindros de gás

Em diversos laboratórios é necessário o uso de gases sob pressão (hidrogênio, acetileno, nitrogênio, hélio, entre outros). O fornecimento deve ser feito por uma empresa idônea e que ofereça assistência quanto a questões de uso e manutenção. Os cilindros devem ser fornecidos com o nome e a cor característica de cada gás, capacete de proteção do cilindro, dados de pureza, simbologia de risco e número da ONU.

O ideal é que exista, fora do prédio, uma central de gases, à qual os laboratórios estejam ligados por meio de tubulações apropriadas, evitando a utilização de cilindros no interior do prédio. Tanto para a construção da central como para condições de armazenamento, as empresas especializadas fornecedoras devem ser consultadas, bem como sobre a compatibilidade entre gases (e outros materiais) que possam permanecer no mesmo local.

Construir esta central em local amplo, ventilado e de fácil acesso, tanto para carga e descarga de cilindros como para situações de emergência. Os cilindros devem ser mantidos protegidos de ocorrências climáticas como sol e chuva (mas possibilitando plena ventilação do interior desta central – com portas de tela de arame, por exemplo). O acesso ao interior da central deve ser controlado e restrito aos laboratórios usuários do sistema, por meio de pessoal instruído sobre os procedimentos com cilindros e gases sob pressão e ao pessoal de manutenção.

Quando esta central não estiver disponível, não armazenar os cilindros de gás no laboratório. O armazenamento deve ser feito em local razoavelmente amplo, seguro, fora de áreas de circulação, coberto, bem ventilado e, tal como no caso da central, com acesso controlado ao seu interior.

Observar também as incompatibilidades para armazenamento e uso entre os gases . Além de cilindros contendo o mesmo gás, podem ser guardados juntos aqueles quimicamente inertes, como nitrogênio ou argônio. Gases combustíveis devem estar distantes dos oxidantes; manter a uma distância segura uns dos outros gases que possam reagir entre si, como hidrogênio e acetileno.

Tanto para uso como para armazenagem, os cilindros não devem ser colocados

em contato com circuitos elétricos ou próximos a fontes de calor irradiante ou chama aberta Devem sempre permanecer em posição vertical, presos à parede com correntes ou cintas de material resistente.

Quando da instalação de um cilindro (que deve ser feita com ferramentas adequadas), verificar se não há ocorrência de vazamento, podendo o teste ser feito com mistura de água e metanol (com 10% de metanol), água e etanol ou com preparados à base de surfactantes disponíveis no mercado especificamente para esse fim. No caso de gases corrosivos, usar equipamentos de proteção individual. Não devem existir chamas ou cigarros acesos por perto. Além do bom estado geral dos cilindros, verificar que eles estejam sempre limpos, secos e isentos de graxas. Não engraxar as válvulas e, se emperradas, contatar o fornecedor. Os cilindros devem permanecer em uso até alcançar uma pressão indicada pelo próprio fabricante (normalmente 1 a 2 Kgf/cm^2), para evitar possíveis contaminações do recipiente por entrada de ar. Após o uso deve ser retirado do local de trabalho e encaminhado ao local de armazenagem. Para todas essas operações, devem ser solicitadas instruções mais detalhadas aos fabricantes.

Quanto ao transporte entre o local de armazenagem e o de uso (e vice-versa), os cilindros devem ser conduzidos em carrinhos específicos para esse fim, de tamanho apropriado; deve ser mantido preso ao carrinho e com o capacete de proteção para a válvula.

Descarte de materiais

Os materiais a serem descartados por laboratórios de análise química de alimentos incluem:

1. amostras de alimentos
2. papel e sólidos inertes (inclusive amostras)
3. papel contaminado quimicamente e reagentes sólidos (inclusive amostras)
4. soluções isentas de solventes orgânicos
5. solventes orgânicos em geral
6. vidro quebrado e recipientes em geral
7. materiais com possibilidade de contaminação microbiológica

O descarte de materiais é muito preocupante num processo de análise química. As pessoas encarregadas dessa operação devem receber instruções rigorosas quanto a algumas normas de segurança, como o uso de E.P.I. (luvas e botas) e cuidados no manuseio de certos tipos de resíduos.

Papéis e sólidos inertes são descartados como lixo comum, sem maiores preocupações. É obrigatório manter o lixo sempre tampado. Amostras de alimentos sólidos, ao serem descartadas, podem ser subdivididas em partes pequenas, com adição de um

produto que impeça seu consumo e cuja presença seja facilmente perceptível como, por exemplo, um detergente colorido. Alimentos líquidos, sem contaminação, podem ser diluídos e jogados na pia.

Recipientes vazios de amostras ou materiais utilizados pelo laboratório necessitam de uma lavagem antes do descarte. Tanto os recipientes de vidro como material de vidro quebrado ou trincado não podem ser descartados em sacos para lixo comum. Esse tipo de material deve ser colocado em caixas de papelão específicas para esse fim, para evitar ferimentos nas pessoas encarregadas da coleta.

É necessário diluir e neutralizar as soluções ácidas e básicas antes de serem despejadas em esgoto. Soluções aquosas salinas de natureza não tóxica e não agressiva ao meio ambiente também podem ser descartadas da mesma forma. Papel de filtro com material de baixa toxicidade pode sofrer uma lavagem estando ainda dentro do próprio funil e depois ser descartado com o lixo comum. Resíduos sólidos de reagentes químicos (também de baixa toxicidade) podem ser dissolvidos em quantidades relativamente grandes de água e a solução diluída, escoada pela pia, com a torneira aberta por alguns minutos.

Para solventes orgânicos o ideal é tentar o seu reaproveitamento, depois de uma recuperação procedida internamente (com normas de segurança específicas) ou por empresas especializadas. Quando esta recuperação não for possível ou conveniente, os solventes poderão ser coletados em recipientes adequados e ficar numa central de armazenamento, e posteriormente enviados a uma empresa que possua instalações apropriadas para a sua destruição, de acordo com as normas ambientais (o mesmo vale para outros resíduos com potencial tóxico ou poluente). Se o destino for a incineração, não devem ser adicionados a esses recipientes, sem o conhecimento dessa empresa, solventes não inflamáveis, como o tetracloreto de carbono ou clorofórmio. A empresa responsável pelo transporte e destinação dos resíduos deverá orientar sobre os tipos de recipientes a serem utilizados e pelos tipos de compostos que podem ser colocados juntos em um mesmo recipiente. Deve ser dada atenção especial aos materiais para os quais existam restrições de caráter ambiental, em termos de sua destinação final. Para tanto, devem ser consultadas empresas especializadas, a legislação municipal, estadual e federal e os órgãos de defesa ambiental.

Materiais com risco de contaminação microbiológica devem ser recolhidos em sacos de lixo autoclaváveis e enviados para descontaminação ou esterilização por um processo físico como a autoclavagem, e somente depois podem ser descartados. Quando algum motivo impedir este procedimento, o material deve ser tratado com desinfetante à base de hipoclorito de sódio ou outro conveniente pelo tempo necessário e depois descartado. A descontaminação química pela ação de desinfetantes, como solução de hipoclorito de sódio, iodo e outros halogenados, etanol, álcalis, fenóis e sais quaternários de amônio, deve ser feita com o conhecimento de que tipo de microorganismos deve ser tratado e também em que ambiente. Para muitos desinfetantes, o pH, a carga de matéria orgânica e a concentração são fatores importantes para determinar a eficiência

do processo.Todo material biológico, assim como vidraria quebrada que tenha entrado em contato com o material biológico, deve ser descontaminado antes do descarte. Para estes tópicos, é importante ver recomendações a respeito em um Manual de Segurança para Laboratórios de Microbiologia ou consultar um profissional especializado.

Cuidados com relação a alguns equipamentos

Fazendo novamente a associação entre Qualidade e Segurança, assim como existem POPs de metodologias analíticas, devem existir POPs para a utilização de equipamentos, os quais podem incluir recomendações sobre o uso de EPIs e outros requisitos de segurança.

Muflas

Devem, preferencialmente, estar em uma sala isolada, destinada especificamente para equipamentos geradores de calor, com sinalização adequada. O profissional deve fazer uso de equipamentos de proteção individual adequados (luvas de proteção térmica com cano longo e pinças longas de aço inoxidável). Quando uma amostra de matéria orgânica necessitar de destruição por via seca, somente deverá ser colocada em mufla após prévia carbonização (com aquecimento gradual) em bico de Bunsen, feita em cabine de segurança química. Somente quando o aquecimento máximo com o bico não provocar mais desprendimento de fumos é que a amostra pode ser transferida para a mufla. Caso contrário, poderão ocorrer a contaminação do ar do laboratório e a perda de amostra.

Refrigeradores

Devem ser usados os previstos especialmente para laboratório, eventualmente com motor fora do ambiente de trabalho para evitar faíscas que possam provocar a ignição de solventes inflamáveis e voláteis possivelmente presentes na sala ou dentro do próprio refrigerador. Mesmo que um refrigerador comum não seja utilizado para guardar esse tipo de solventes, deve ficar razoavelmente protegido (afastado) da área do laboratório em que esse tipo de solvente possa ser ocasionalmente utilizado.

Dessecadores, materiais dessecantes e uso de vácuo

Entre os materiais dessecantes normalmente utilizados estão o ácido sulfúrico, o pentóxido de fósforo (que oferecem riscos, pois suas reações com água são acompanhadas de grande desprendimento de calor e provocam queimaduras graves ao contato

com a pele), cloreto de cálcio e sílica-gel. A sílica-gel com indicador de umidade (rosa quando hidratada, azul quando seca) é segura e, quando hidratada pelo uso, fácil de recuperar em uma estufa seca a 100 ºC, sendo portanto o agente dessecante mais recomendável, tanto para dessecadores como para estufas sem ar corrente.

Ao se transferir uma amostra que tenha passado por processo de aquecimento para um dessecador, deve-se esperar algum tempo, suficiente para um certo resfriamento do cadinho, evitando o rompimento da placa de porcelana do dessecador. Após a colocação do cadinho, deixar aberto por tempo suficiente o orifício da tampa do dessecador, caso contrário a dilatação do ar devida ao aquecimento poderá expulsar violentamente a tampa do dessecador.

Ao se usar vácuo o dessecador deve estar colocado dentro de uma caixa de tela metálica para evitar projeções de estilhaços em caso de explosão. Esta observação é válida para outros casos em que se use vácuo, como nas filtrações com uso de kitassato. Quando a aparelhagem for grande, como no caso de destilação, e não se dispuser de cabine de segurança química ou tela metálica de tamanho adequado, o laboratorista deve usar óculos de segurança e trabalhar com o máximo de prudência, evitando fazer vácuo (ou desfazê-lo) com rapidez. O processo deve ser lento para permitir a acomodação das paredes de vidro à nova relação de pressões interna/externa; o material de vidro deve ser de boa qualidade. No caso de estufas de vácuo com frente de vidro, embora este seja normalmente de resistência adequada, também deve ser adaptada uma tela metálica à face exterior; a retirada e a admissão de ar também não devem ser rápidas.

Autoclaves

Usadas para esterilização de materiais e culturas. Dada a sua finalidade e modo de operação, estes aparelhos devem ser constituídos de material resistente e providos de manômetros em perfeitas condições de funcionamento. A pressão interna e o calor são os principais fatores de risco.

Antes de abrir a autoclave é necessário assegurar-se de que a mesma esteja resfriada convenientemente e o vapor tenha sido retirado; caso contrário, a violenta expansão do vapor, quando da retirada da tampa, poderá provocar ferimentos sérios ao operador e a perda do material.

Centrífugas

Verificar se o balanceamento da carga está correto, evitando o risco de quebra de algum tubo dentro da centrífuga, o que acarretaria maior formação de aerosol e até mesmo de gotículas maiores.

Os movimentos rápidos da superfície do líquido durante a centrifugação formam os aerosóis; portanto não se deve abrir a centrífuga logo após sua parada, nem enquanto estiver girando, mesmo devagar.

Materiais de vidro

Montagem de aparelhagens

Freqüentemente é necessário montar uma aparelhagem com várias peças de vidro, como no caso de destilações. Preferencialmente, as peças devem ter terminais (conexões) esmerilhados e as ligações feitas diretamente. Em outros casos, as ligações são feitas por meio de rolhas ou tubos de borracha. Cada uma das peças, independente do material de que seja feita, deve ser cuidadosamente examinada antes de se proceder à montagem do aparelho. Não devem ser usadas peças trincadas, com qualquer tipo de fissura, que permitam vazamentos ou que não proporcionem ajuste perfeito.

Após a montagem, ajustar as peças de tal forma que nenhuma delas esteja sob tensão e convenientemente presas por garras distribuídas ao longo da aparelhagem, de modo que não necessitem suportar o peso umas das outras (evitar por outro lado, um número excessivo de garras). As garras devem estar firmemente presas a suportes seguros. Verificar se as peças recurvadas não apresentam estrangulamentos internos. Vedar as conexões com parafina derretida, quando possível, aplicada com pincel.

Quando for necessário cortar um tubo de vidro para ser aplicado à aparelhagem (ou outra finalidade qualquer) deve-se observar o procedimento a seguir. Com uma lima, de preferência triangular, abre-se um sulco, não muito profundo em uma parte pequena da volta do tubo (o sulco não deve dar a volta no tubo). Estando as mãos protegidas por luvas resistentes e os olhos por óculos de segurança, segura-se o tubo com a parte limada para fora do corpo; pressiona-se o tubo com os polegares no mesmo sentido, isto é, para fora do corpo. As pontas do tubo devem em seguida ser arredondadas em uma chama. Espera-se o tubo esfriar sozinho (o resfriamento rápido com água, por exemplo, quebrará o vidro). Se este tubo for inserido em uma rolha, esta deve ter furo de diâmetro conveniente e a operação de inserção deve ser feita com lubrificação e com movimento giratório lento.

Para a perfuração furação de rolhas, observar alguns pontos como: fazer o furo pela parte inferior, apoiando sobre a mesa a parte superior da rolha (de maior diâmetro); no caso de rolhas de borracha, escolher um furador de diâmetro ligeiramente maior que o tubo a ser inserido (após a retirada do furador, o furo da rolha contrai) e o furador pode ser lubrificado com vaselina, silicone ou um pouco de óleo para evitar que a rolha se molhe; no caso de rolhas de cortiça, o furador não deve ser molhado e pode-se reforçar a superfície externa da rolha com fita adesiva, firmemente presa, para evitar seu rompimento. Em qualquer caso, o furo deve ser feito em um único sentido (não furar de ambos os lados para fazer o encontro dos orifícios no meio). Não tentar aumentar o furo de uma rolha com um furador maior; é melhor pegar outra rolha e refazer a operação.

Lavagem de vidrarias

Ao término de um trabalho analítico, todas as peças e recipientes devem passar por um processo rigoroso de lavagem. O profissional que tiver realizado o trabalho de análise deve fazer uma lavagem preliminar do material antes de entregá-lo à pessoa responsável pela limpeza final, evitando que ela se acidente pelo desconhecimento da natureza dos resíduos contidos nos frascos ou pela mistura com outros reagentes incompatíveis. Cada laboratório deve usar um processo de lavagem que lhe seja conveniente. Em geral, este processo utiliza detergente (inclusive os destinados especificamente a laboratórios) ou sabão, tornando o material escorregadio e por isto recomenda-se usar luvas de borracha antiderrapantes para proteger as mãos de arestas cortantes e evitar irritações de pele pelo contato constante com produtos químicos e agentes de limpeza. Pode ser colocada uma placa de borracha (com abertura no centro) no fundo da pia para atenuar eventuais quedas das peças de vidro.

Muitos laboratórios utilizam, além de detergentes específicos para laboratórios, soluções sulfonítricas, soluções de ácido nítrico ou clorídrico, hidróxido de potássio em álcool e outras, no processo de lavagem. Estes materiais podem ser altamente corrosivos e reativos e seu contato com a pele pode gerar queimaduras. Dessa forma, sua preparação e uso devem ser feitos por pessoal treinado, com extremo cuidado. É necessário o uso de luvas de borracha, óculos de proteção (ou escudo facial), avental e botas de borracha. O frasco a ser limpo com estas soluções deve ser pré-lavado com detergente e água corrente e, se necessário, seco previamente. Pipetas podem ser colocadas em uma proveta de 1000 mL, apoiadas sobre uma esponja de espuma colocada no fundo da proveta para amortecer o impacto. Sua retirada pode ser feita com uma pinça cuja ponta seja revestida com fita veda-rosca ou tubo de borracha. O uso da solução sulfocrômica deve ser abandonado devido aos riscos a que expõe o laboratorista, bem como pelos riscos ambientais.

Para a lavagem de vidrarias que tenham entrado em contato com micotoxinas, enxaguá-las com metanol (com os cuidados necessários também para a manipulação desta substância), retirar (armazenando para descarte posterior adequado), adicionando em seguida solução de hipoclorito de sódio a 1% e, após cerca de duas horas, solução

de acetona a 5%. Aguardar trinta minutos, enxaguar e prosseguir com a lavagem usual, como para outras vidrarias.

Nota final

Para um sistema de segurança do trabalho são necessários muitos estudos específicos que, conforme apontado ao longo deste texto, exigem consultas a publicações, entidades e profissionais especializados. O gerenciamento desse sistema exige, como no caso da qualidade, um trabalho permanente, para o qual este capítulo é apenas um breve roteiro que, lembramos, não deve ter a função de um manual de segurança.

Revisão

Arline Sydneia Abel Arcuri
Bacharel em química e doutora em físico-química pela universidade de São Paulo - USP, pesquisadora,diretora técnica da Fundação Jorge Duprat Figueiredo de segurança e medicina do trabalho - FUNDACENTRO

Eduardo Mello De Capitani
Médico, mestre em medicina e doutor em saúde coletiva pela universidade de Campinas – UNICAMP, especialista em saúde pública e medicina do trabalho, professor assistente do departamento de clínica médica da faculdade de ciências médicas da UNICAMP, coordenador do centro de controle de intoxicações, faculdade de ciências médicas do hospital das clínicas da UNICAMP.

Mary Rosa Rodrigues de Marchi
Professora assistente doutora, departamento de química analítica, instituto de química – UNESP

Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUIM) - Departamento técnico, comissão de transportes: Manual para atendimento de emergências com produtos perigosos, 3. ed. São Paulo, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** Arlington: A.O.A.C., 16th, 1997.

CARVALHO, P.R. **Boas práticas químicas em biossegurança**.Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda., 1999.

GRIST, N.R. **Manual de biossegurança para o laboratório**. 2. ed. São Paulo: Santos Livraria Editora, 1995.

OLIVEIRA, W.P. **Segurança em laboratórios químicos**. 2. ed. Coleção SESI de Segurança do Trabalho, São Paulo, Serviço Social da Indústria, 1975.

TIGLEA, P, SANTOS, C.C.M. **Manual de biossegurança para laboratórios de química**, Instituto Adolfo Lutz, Publicações Técnicas para Divulgação Interna, São Paulo, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory biosafety manual**. Geneva: WHO, 1983.

Colaborador
Paulo Tiglea

APÊNDICE I

SOLUÇÕES TITULADAS INDICADORES PAPEL REATIVO CLARIFICADORES

SOLUÇÕES TITULADAS INDICADORES PAPEL REATIVO CLARIFICADORES

ÁCIDO CLORÍDRICO

Preparo de solução 1 M – Meça 90 mL de ácido clorídrico HCl (D = 1,19) em proveta e transfira para um balão volumétrico com rolha esmerilhada. Adicione água até completar o volume de 1000 mL. Agite.

Titulação

Coloque cerca de 5 g de Na_2CO_3 em cadinho de porcelana de 50 mL. Comprima a substância contra as paredes do cadinho, com uma espátula. Aqueça a 270°C, durante uma hora. Tampe o cadinho e esfrie em dessecador contendo cloreto de cálcio anidro, durante uma hora. Transfira rapidamente o Na_2CO_3, ainda quente, para um pesa-filtro. (O Na_2CO_3 é higroscópico, devendo ser manipulado rapidamente). Esfrie em dessecador. Pese o pesa-filtro tampado. Transfira, para um frasco Erlenmeyer, cerca de 1,3 g de Na_2CO_3, pesados com precisão analítica. Pese novamente. A diferença entre as duas massas dará o nº de gramas de Na_2CO_3 a ser usado na titulação. Adicione ao frasco Erlenmeyer cerca de 75 mL de água e 2 gotas de alaranjado de metila a 0,1% , ou da mistura alaranjado de metila-índigo carmim (1 g de alaranjado de metila e 2,5 g de índigo carmim dissolvidos em 1000 mL de água e filtrados). Agite e titule.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{2 \times P}{0{,}106\ V \times M} = f$$

P = g de Na_2CO_3 usados na titulação
V = mL de HCl gastos na titulação

M = Molaridade da solução

Nota: f deve estar compreendido entre os valores 0,9 e 1,1. Em caso contrário, adicione água ou ácido e titule novamente.

Preparo de soluções de outras molaridades

Proceda como descrito no item acima, usando os valores das **Tabelas 1** e **2**. Para preparar soluções 0,01 M, tome 10 mL da solução 1 M e dilua o volume para 1000 mL.

Tabela 1 – Volume de HCl (D = 1,19) necessário para a preparação de 1000 mL de solução

Molaridade aproximada	mL de HCl*
0,01	0,9
0,02	1,8
0,10	9,0
0,50	45,0
1,00	90,0

* mL HCl/L solução = 90 x M

Tabela 2 – Quantidade aproximada de Na_2CO_3 anidro, necessária para a titulação de 25 mL de ácido padrão

Molaridade do ácido	g Na_2CO_3*
0,1	0,132
0,5	0,660
1,0	1,320

*g Na_2CO_3 = 0,053 x 25 x M

ÁCIDO OXÁLICO

Preparo de solução 0,5 M – Pese 63 g de ácido oxálico $H_2C_2O_4.2H_2O$ em balança analítica (décimo de mg) e transfira para um balão volumétrico, com rolha esmerilhada. Adicione água suficiente para 1000 mL de solução. Agite até dissolução total.

Titulação

Transfira, com o auxílio de pipeta volumétrica, 25 mL desta solução para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Adicione 200 mL de água e, depois, 10 mL de H_2SO_4 (D = 1,84), lentamente, pelas paredes do frasco. Agite e conserve a temperatura entre 50–60°C, durante a titulação. Titule com solução de permanganato de potássio 0,2 M, até o aparecimento de coloração rósea persistente, durante 30 segundos.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{V \times F}{v} = f$$

V = mL da solução de $KMnO_4$ gastos na titulação
F = fator de correção da solução $KMnO_4$.
v = mL da solução de ácido oxálico usado na titulação

Preparo de soluções de outras molaridades

Proceda como descrito no item acima, usando os valores da **Tabela 3.**

Tabela 3 – Quantidade de $H_2C_2O_4.2H_2O$ necessária para a preparação de 1000 mL de solução

Molaridade aproximada	g $H_2C_2O_4.2H_2O$*
0,005	0,63
0,05	6,30
0,5	63,00

* g $H_2C_2O_4.2H_2O$/L solução = 126 x M

ÁCIDO PERCLÓRICO

Preparo de solução 0,1 M – Meça 8,2 mL de $HClO_4$ a 72%, ou 11,4 mL de $HClO_4$ a 60%, em proveta e junte cerca de 900 mL de ácido acético glacial. Adicione, então, cuidadosamente, em pequenas porções, anidrido acético suficiente para reagir com a água do $HClO_4$, agitando após cada adição. São necessários 8,8 mL ou 14,8 mL de anidrido acético, conforme se tenha usado $HClO_4$, a 72% ou a 60%. É melhor pequeno excesso de anidrido acético (1 - 2)% do que deficiência. Complete o volume a 1 L, com ácido acético glacial. Deixe em repouso durante uma noite para completar a reação entre a água do ácido perclórico e o anidrido acético.

Titulação

Titule com biftalato de potássio $C_6H_4(CO_2H)(CO_2K)$, previamente seco em estufa a 105ºC durante uma hora e resfriado em dessecador. Pese, exatamente, cerca de 0,5106 g de biftalato e dissolva em 50 mL de ácido acético glacial. Junte 2 gotas de solução a 1% do indicador violeta genciana em ácido acético glacial e titule com a solução de $HClO_4$, até mudança da coloração azul para verde-azulada (0,5106 g de biftalato de potássio correspondem a 25 mL de solução 0,1M de $HClO_4$)

Nota: faça uma titulação em branco do ácido acético e desconte do volume de $HClO_4$ gasto na titulação.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{P}{0,2042 \times V \times M} = f$$

P = massa de biftalato usado
V = mL de solução de ácido perclórico gastos
M = Molaridade da solução

ÁCIDO SULFÚRICO

Preparo de solução 0,5 M – Meça 30 mL de H_2SO_4 (D= 1,84) em proveta e transfira cuidadosamente para balão volumétrico com rolha esmerilhada, contendo cerca de 500 mL de água. Dilua o volume a 1000 mL (*cuidado!*). Agite.

Titulação

Proceda usando a mesma técnica da titulação do ácido clorídrico.,

Cálculo do fator de correção (f)

$$f = \frac{P}{0,106 \, V \times M}$$

P = g de Na2CO3 usados na titulação
V = mL de H2SO4 gastos na titulação
M = molaridade da solução

Preparo de soluções de outras molaridades

Proceda como descrito nos itens acima, usando os valores das **Tabelas 4** e **5.**

Nota: para soluções 0,005 e 0,01 M, tome alíquotas da solução 0,5 M, respectivamente (10 e 20) mL, e dilua o volume para 1000 mL.

Tabela 4 – Volume de H_2SO_4 (D = 1,84) necessário para preparação de 1000 mL de solução

Molaridade aproximada	mL H_2SO_4 *
0,005	0,3
0,01	0,6
0,05	3,0
0,25	15,0
0,50	30,0

* H_2SO_4 /L solução = 60 x M

Tabela 5 – Quantidade aproximada de Na_2CO_3, anidro, necessária para titulação de 25 mL de ácido padrão.

Molaridade do ácido-padrão	g Na_2CO_3 *
0,05	0,132
0,25	0,662
0,50	1,320

*g Na_2CO_3 = 0,106 x 25 x M

EDTA

Preparo da solução – Pese 37,224 g do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$, transfira para um balão volumétrico, com auxílio de água e complete o volume a 1000 mL. Agite e transfira para frasco de polietileno.

Titulação

Pese exatamente cerca de 400 mg de carbonato de cálcio e transfira para um béquer de 400 mL. Adicione 50 mL de água e solução de ácido clorídrico (1+3) suficiente para dissolver todo o carbonato de cálcio. Dilua até 150 mL, com água, adicione 15 mL de solução de hidróxido de sódio 1 M e 30 mg de indicador azul de hidroxinaftol e titule com solução de EDTA, usando agitador magnético, até viragem de rosa para azul profundo.

Cálculo

$$\frac{\text{mg de } CaCO_3}{\text{mL de EDTA} \times 100{,}09} = \text{Molaridade da solução de EDTA}$$

HIDRÓXIDO DE BÁRIO

Preparo de solução 0,5 M – Pese 180 g de $Ba(OH)_2$. $8H_2O$. Transfira para um balão volumétrico e dissolva em água, recentemente fervida (isenta de CO_2) e resfriada a 25ºC, suficiente para 1000 mL . Deixe a solução em repouso durante dois dias ou até que todo o carbonato de bário se tenha depositado. Decante a solução e transfira para o frasco de polietileno. Conserve protegida contra o CO_2 do ar.

Titulação

Transfira, com auxílio de uma pipeta, 25 mL de HCl 1 M para frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 2 gotas de solução de fenolftaleína. Adicione, gota a gota, com auxílio de bureta, a solução de $Ba(OH)_2$ a ser titulada até o aparecimento de coloração rósea persistente.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{V \times F}{v} = f$$

V = mL de HCl usados na titulação
F = fator da solução de HCl
v = mL de $Ba(OH)_2$ gastos na titulação

Preparo de soluções de outras molaridades

Proceda como descrito nos itens acima, usando os valores da **Tabela 6.**

Tabela 6 – Quantidade de $Ba(OH)_2 8H_2O$ necessária para preparação de 1000 mL de solução

Molaridade aproximada	g $Ba(OH)_2.8H_2O$*
0,005	1,8
0,050	18,0
0,50	180,0

* $Ba(OH)_2$. $8H_2O$/L solução = 360 x M

HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO

Preparo de solução 1M – Pese 75 g de KOH e transfira para frasco com rolha de borracha, com auxílio de 1000 mL de água isenta de gás carbônico. Adicione, gota a gota, solução saturada de hidróxido de bário até não se formar mais precipitado. Agite. Conserve o frasco fechado em repouso durante 12 horas. Decante e transfira o líquido claro para frasco de polietileno. Conserve protegido do gás carbônico do ar.

Titulação

Transfira, com auxílio de uma pipeta, 25 mL da solução a ser titulada para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 50 mL de água, isenta de gás carbônico, e 2 gotas do indicador vermelho de metila. Titule com ácido clorídrico da mesma molaridade, com auxílio de bureta, até mudança da coloração amarela para rósea.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{V \times F}{v} = f$$

V = mL HCl gastos na titulação
F = fator de correção do ácido clorídrico
v = mL de solução de KOH usados na titulação

Preparo de soluções de outras molaridades

Proceda como descrito no item acima, usando os valores da **Tabela 7**.

Tabela 7 – Quantidade de KOH necessária para a preparação de 1000 mL da solução

Molaridade aproximada	KOH*
0,01	0,75
0,10	7,50
1,00	75,00

*g KOH/L solução = 75 x M

HIDRÓXIDO DE SÓDIO

Preparo da solução 1 M – Pese 45 g de NaOH e transfira para o frasco com rolha de borracha com auxílio de 1000 mL de água isenta de gás carbônico. Adicione, gota a gota, solução saturada de $Ba(OH)_2$ até não se formar mais precipitado. Agite. Conserve o frasco fechado em repouso durante 12 horas. Decante e transfira o líquido claro para o frasco de polietileno. Conserve protegido do gás carbônico do ar.

Titulação com biftalato de potássio

Pese, em balança analítica, cerca de 5 g de biftalato de potássio $C_6H_4(CO_2H)(CO_2K)$, previamente seco em estufa a 105°C, durante 1 hora resfriado em dessecador. Dissolva em 75 mL de água isenta de gás carbônico. Junte 2 gotas de solução de fenolftaleína e titule com a solução de hidróxido de sódio, até o aparecimento de coloração rósea persistente.

Cálculo de fator de correção (f)

$$\frac{P}{0{,}2042 \times V \times M} = f$$

P = g de biftalato de potássio usado na titulação
V = mL da solução de hidróxido de sódio gastos
M = molaridade da solução

Tabela 8 – Quantidade aproximada de $C_6H_4(CO_2H)(CO_2K)$ necessária para a titulação de 25 mL de base padrão

Molaridade de base padrão	g $C_6H_4(CO_2H)(CO_2K)$*
0,01	0,05
0,10	0,50
1,00	5,00

*g $C_6H_4(CO_2H)(CO_2K)$/L solução = 5,00 x M

Titulação com ácido clorídrico padronizado

Transfira, com auxílio de uma pipeta, 25 mL da solução a ser titulada para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 50 mL de água, isenta de gás carbônico, e 2 gotas do indicador vermelho de metila. Titule com ácido clorídrico da mesma molaridade, com auxílio de bureta, até mudança da coloração amarela para rósea.
Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{V \times F}{v} = f$$

V = mL de HCl gastos na titulação
F = fator de correção do ácido clorídrico
v = mL de solução de NaOH usados na titulação

Preparo de soluções de outras molaridades

Proceda como em preparo da solução molar usando os valores da **Tabela 9**.

Tabela 9 – Quantidade de NaOH necessária para a preparação de 1000 mL de solução

Molaridade aproximada	g NaOH*
0,01	0,45
0,10	4,50
1,00	45,00

*g NaOH/L solução = 45 x M

IODO

Preparo de solução 0,5 M – Pese 200 g de KI, isento de iodato de potássio. Transfira para um balão volumétrico escuro, com rolha esmerilhada, com auxílio de cerca de 40 mL de água. Pese cerca de 127 g de iodo ressublimado e transfira para o frasco contendo KI. Complete o volume de 1000 mL com água. Agite até total dissolução do iodo. Conserve a solução em lugar frio com ausência de luz.

Titulação

Transfira, para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, 25 mL da solução de iodo a ser titulado. Adicione 75 mL de água e, com auxílio de uma bureta, solução-padrão de tiossulfato de sódio da mesma molaridade, até coloração amarelo-clara. Junte 2 mL de solução de amido a 1% (a solução deve tornar-se azul) e complete a titulação lentamente até total descoramento.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{V \times F}{v} = f$$

V = mL da solução de $Na_2S_2O_3$ gastos na titulação
F = fator da solução de $Na_2S_2O_3$
v = mL da solução de iodo usados na titulação

Preparo de solução de outras molaridades

Proceda como descrito nos itens acima, usando os valores da **Tabela 10**.

Tabela 10 – Quantidade de iodo e de KI necessárias respectivamente para preparação de 1000 mL de solução

Molaridade aproximada	g I_2*	g KI**
0,005	1,3	2,0
0,05	13,0	20,0
0,50	130,0	200,0

*g I_2/L solução = 130 x M x 0,5
**gKI/L solução = 200 x M x 0,5

NITRATO DE PRATA

Preparo de solução 1 M – Pese 170 g de $AgNO_3$ e transfira para um balão volumétrico escuro, com rolha esmerilhada. Adicione água até completar o volume de 1000 mL e agite.

Titulação

Titule, de preferência, por via potenciométrica. Não dispondo de equipamento, proceda da maneira seguinte: Transfira uma porção de NaCl para cadinho de porcelana de 50 mL. Comprima a substância nas paredes do cadinho e aqueça em mufla, a 300ºC, por cerca de 2 horas. Resfrie em dessecador contendo cloreto de cálcio. Transfira rapidamente para pesa-filtro (NaCI é higroscópico). Pese, em balança analítica, o pesa-filtro tampado e transfira cerca de 1,45 g para cápsula de porcelana de 100 mL. Pese novamente. A diferença entre as duas pesagens dará o nº de g de cloreto de sódio a ser usado. Adicione à cápsula cerca de 25 mL de água e 1 mL de solução de cromato de potássio a 5%, como indicador. Goteje, então, a solução de $AgNO_3$ a ser titulada, com auxílio de uma bureta, até o aparecimento de cor castanho-avermelhada.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{P}{0,0585 \times V \times M} = f$$

P = g de NaCl usados na titulação
V = mLde solução de $AgNO_3$ gastos na titulação
M = molaridade da solução

Preparo de soluções de outras molaridades

Proceda como descrito nos itens acima, usando os valores das **Tabelas 11** e **12**.

Tabela 11 – Quantidade de $AgNO_3$ necessária para preparação de 1000 mL de solução

Molaridade aproximada	g $AgNO_3$ *
0,01	1,7
0,10	17,0
1,00	170,0

*g $AgNO_3$ /l solução = 170 x M

Tabela 12 - Quantidade de NaCl necessária para titular 25 mL da solução de $AgNO_3$

Molaridade aproximada	g $AgNO_3$ *
0,01	0,0145
0,10	0,1450
1,00	1,4500

*g NaCl/25 mL $AgNO_3$ = 0,058 x 25 x M

PERMANGANATO DE POTÁSSIO

Preparo de solução 0,02 M – Pese 35 g de $KMnO_4$ e transfira para um béquer de 1500 mL. Adicione 1000 mL de água, cubra com um vidro de relógio e leve a ebulição. Deixe a solução em fervura suave durante cerca de 20 minutos. Esfrie à temperatura ambiente, deixe em repouso em frasco fechado por alguns dias, no escuro, e filtre através de cadinho de Gooch com placa porosa. Transfira o filtrado para frasco escuro, com rolha esmerilhada.

Titulação

Transfira 5 g de oxalato de sódio - $Na_2C_2O_4$ para um cadinho de porcelana de 50 mL. Comprima a substância nas paredes do cadinho. Aqueça em estufa a 105°C, por 2 horas. Resfrie em dessecador com cloreto de cálcio. Pese em balança analítica, por diferença, cerca de 1,67 g de oxalato de sódio e transfira para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Adicione cerca de 240 mL de água e depois, lentamente, pelas paredes do frasco, 12,5 mL de ácido sulfúrico (D = 1,84). Esfrie a 25ºC. Agite até dissolução total do oxalato. Adicione cerca de 90% da quantidade requerida da solução de permanganato de potássio a ser titulada, sob agitação. Aqueça a 60ºC, agite e complete a titulação adicionando a solução de permanganato até obter coloração rósea persistente, durante 30 segundos.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{2 \times P}{0{,}134 \times V \times M \times 5} = f$$

P = nº de g de $Na_2C_2O_4$ usado na titulação
V = mL de solução de $KMnO_4$ gastos na titulação
M = molaridade da solução

Preparo de soluções de outras molaridades

Proceda como descrito no item acima, usando os valores das **Tabelas 13** e **14**.

Nota: para preparar solução 0,02 M, tome 10 mL da solução 0,02 M e dilua a 100 mL, em um balão volumétrico, com água.

Tabela 13 – Quantidade de $KMnO_4$ necessária para preparação de 1000 mL de solução

Molaridade aproximada	g $KMnO_4$ *
0,002	0,32
0,05	3,20
0,50	32,00

*g $KMnO_4$/ L solução = 160 x M

Tabela 14 – Quantidade de $Na_2C_2O_4$ necessária para titular 25 mL de solução de $KMnO_4$

Molaridade $KMnO_4$	g $Na_2C_2O_4$ *
0,005	0,0167
0,050	0,1670
0,50	1,6700

*g $Na_2C_2O_4$/L solução = 0,134 x 25 x M

TIOCIANATO DE AMÔNIO

Preparo da solução M – Pese 80 g de NH_4SCN e transfira para balão volumétrico âmbar, com rolha esmerilhada. Adicione água até completar o volume de 1000 mL e agite.

Titulação

Transfira, para frasco Erlenmeyer, com auxílio de pipeta, 25 mL de solução-padrão de nitrato de prata 1 M. Adicione 5 mL de ácido nítrico 6 M e 1 mL de solução do indicador (solução a 40% de sulfato de ferro III e amônio em ácido nítrico a 1%, v/v). Adicione a solução de tiocianato a ser titulada, com auxílio de bureta, agitando vigorosamente, até o aparecimento de coloração castanha.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{V \times F}{v} = f$$

V = mL da solução de $AgNO_3$ usados na titulação
F = fator de correção da solução de $AgNO_3$
v = mL da solução de tiocianato gastos na titulação

Preparo de soluções de outras molaridades

Proceda como descrito nos itens acima, usando os valores da **Tabela 15**.

Tabela 15 – Quantidade de NH_4SCN necessária para a preparação de 1000 mL de solução

Molaridade aproximada	g NH_4SCN *
0,01	0,8
0,10	8,0
1,00	80,0

*g NH_4SCN/L solução = 80 x M

TIOSSULFATO DE SÓDIO

Preparo da solução 1 M – Pese 260 g de $Na_2S_2O_3.5H_2O$ e transfira para um balão volumétrico âmbar, com rolha esmerilhada, com auxílio de água previamente fervida e resfriada e complete o volume até 1000 mL, com a mesma água. Junte 0,01 g de HgI_2 para estabilizar a solução.

Titulação

Transfira 5 g de $K_2Cr_2O_7$, finamente pulverizado, para um pesa-filtro. Aqueça em estufa a (140 - 150)ºC, durante 1 hora. Esfrie em dessecador. Pese, em balança analítica, 1,2 g do dicromato e transfira para frasco Erlenmeyer de 500 mL, com rolha esmerilhada, contendo 100 mL de água fria, previamente fervida, 30 g de iodeto de potássio (isento de iodato) e 60 mL de ácido clorídrico (D = 1,19). Feche o frasco e agite. Deixe em repouso, em ausência de luz, durante 5 minutos. Lave a rolha e as paredes do frasco com água previamente fervida e resfriada. Titule o iodo liberado com a solução de tiossulfato de sódio a ser padronizada, agitando continuamente. Quando a coloração se tornar amarela-clara, junte 2 mL de solução de amido. A solução deve tornar-se azul. Continue adicionando a solução de tiossulfato, gota a gota, até a mudança de cor azul-esverdeada para verde-pálida.

Cálculo do fator de correção (f)

$$\frac{P \times 5}{0{,}294 \times V \times M} = f$$

P = g de $K_2Cr_2O_7$ usados na titulação
V = mL de solução de $Na_2S_2O_3$ gastos na titulação
M = molaridade da solução

Preparo de solução de outras molaridades
Proceda como descrito nos itens acima, usando os valores da **Tabela 16**.

Tabela 16 – Quantidades de $Na_2S_2O_3.5H_2O$ e de $K_2Cr_2O_7$ necessárias para preparar e titular, respectivamente, 1000 mL de solução.

Molaridade aproximada	g $Na_2S_2O_3.5H_2O$*	g $K_2Cr_2O_7$**
0,01	2,6	0,012
0,10	26,0	0,120
1,00	260,0	1,200

*g $Na_2S_2O_3.5H_2O$/L solução = 260 x M

**g $K_2Cr_2O_7$/L solução = 25 x 0,049 x M

SOLUÇÃO DE DORNIC (NAOH 1/9 N)

Preparo da solução – Pese 4,7 g de hidróxido de sódio e transfira para um balão volumétrico com tampa de borracha, de 1000 mL, e complete o volume com água recentemente fervida (isenta de CO_2) e resfriada.

Titulação

Pese, com precisão, 4,5382 g de biftalato de potássio, seco em estufa a 120°C, por uma hora e resfriado a temperatura ambiente em dessecador. Transfira para um balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com água. Transfira, com uma bureta, 20 mL desta solução-padrão para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicione 2 gotas de solução de fenolftaleína e gota a gota, com auxílio de uma bureta, a solução de Dornic a ser titulada, até o aparecimento de coloração rósea persistente. Deverão ser gastos 20 mL da solução de Dornic para neutralizar os 20 mL da solução-padrão.

SOLUÇÃO DE FEHLING

Preparo das soluções:

Solução A – Pese 34,639g de sulfato de cobre - $CuSO_4.5H_20$, transfira para um balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Solução B – Pese 173 g de tartarato de sódio e potássio - $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$ e dissolva em 250 mL de água. Adicione 250 mL de solução de NaOH a 20%, recém-preparada. Complete o volume até 1000 mL.

Titulação

Transfira, para balão de titulação, 10 mL de cada uma das soluções, A e B. Adicione 40 mL de água. Aqueça até a ebulição e adicione, com auxílio de bureta, solução-padrão de glicose a 1%, m/v, mantendo a fervura, sob agitação, até a solução se tornar incolor (no fundo do balão deverá aparecer um resíduo avermelhado).

Nota: a massa de glicose usada deverá ser conhecida até a 3ª casa decimal.

Cálculo do fator (f) das soluções

(g de glicose correspondente a 10 mL de cada uma das soluções A e B).

V x 0,01 = f

V = mL da solução de glicose gastos
P = título da solução de glicose (g%)

Nota: o valor de f deverá ser da ordem de 0,05 g.

INDICADORES

Alaranjado de metila a 0,1%

Intervalo de viragem: pH 3,1 e 4,4, respectivamente, de vermelho (abaixo de 3,1) a amarelo (acima de 4,4).

Preparo da solução – Pese 0,1 g de alaranjado de metila e dissolva em água suficiente para 100 mL de solução. Filtre, se necessário. Conserve a solução em frasco de rolha esmerilhada com conta-gotas.

Fenolftaleína a 1%

Intervalo de viragem: pH 8,2 a 9,8, respectivamente, de incolor a vermelho-arroxeado. Após 9,8 a coloração fica vermelha intensa ocorrendo modificações na molécula do indicador.

Preparo da solução – Pese cerca de 1 g de fenolftaleína e adicione álcool a 95%, suficiente para 100 mL. Filtre, se necessário. Conserve a solução em frasco escuro de rolha esmerilhada com conta-gotas.

Solução de amido

Preparo da solução – Agite 1 g de amido solúvel em 10 mL de água. Adicione a esta mistura 200 mL de água em ebulição, mantendo a fervura durante 2 minutos. Esfrie e conserve em geladeira.

Vermelho congo a 0,5%

Intervalo de viragem: pH 3,0 a 5,2, respectivamente, de violeta (abaixo de 3,0) a vermelho (acima de 5,2).

Preparo da solução – Pese 0,5 g de vermelho-congo e dissolva em álcool a 10%, suficiente para 100 mL. Filtre, se necessário. Conserve a solução em frasco de rolha esmerilhada com conta-gotas.

Vermelho de metila a 0,2%

Intervalo de viragem: pH 4,2 a 6,3, respectivamente, de vermelho (abaixo de 4,2) a amarelo (acima de 6,3).

Preparo da solução – Pese 0,2 g de vermelho de metila e dissolva em álcool a 95%, suficiente para 100 mL. Filtre, se necessário. Conserve a solução em frasco de rolha esmerilhada com conta-gotas.

PAPEL REATIVO

Preparo do papel – Corte tiras de papel de filtro de 1 cm de largura e 5 cm de comprimento. Mergulhe as tiras em ácido clorídrico (1+3). Retire. Lave com água, até que 5 mL da água de lavagem não apresente reação ácida com 2 gotas de solução de vermelho de metila. Mergulhe as tiras em hidróxido de amônio (1+3). Retire. Lave com água até que 5 mL da água de lavagem não apresente coloração rósea com 2 gotas de solução de fenolftaleína. Seque as tiras espontaneamente. Embeba as tiras de papel de filtro, depois de secas, na solução do indicador. Seque as tiras espontaneamente, em atmosfera isenta de vapores ácidos ou alcalinos. Conserve em frasco escuro, com rolha esmerilhada.

CLARIFICADORES

Creme alumina

Creme alumina é indicado para clarificar produtos de açúcar levemente coloridos. Pode ser usado, também, juntamente com acetato básico de chumbo. Neste caso, ele aumenta a ação clarificadora do chumbo e permite o uso de quantidades menores da solução de acetato básico de chumbo.

Preparo da solução – Prepare uma solução saturada de sulfato duplo de alumínio e potássio. Alcalinize a solução com hidróxido de amônio. Agite. Deixe o precipitado sedimentar. Lave com água, por decantação, até que a água da lavagem dê reação muito leve para sulfatos, com solução de cloreto de bário a 10%. Decante o líquido sobrenadante. Conserve a suspensão do creme alumina em frasco com rolha esmerilhada.

Solução de acetato básico de chumbo

Preparo da solução – Pese 430 g de acetato de chumbo, neutro - $Pb(C_2H_3O_2)_2.3H_2O$, adicione 130 g de litargírio - PbO recentemente ativado e complete o volume com água até 1000 mL. Aqueça e mantenha em ebulição por 30 minutos. Deixe a mistura esfriar e sedimentar. Separe o líquido sobrenadante por decantação e dilua com água recentemente fervida e fria até a densidade específica da solução alcançar 1,25.

Notas

No preparo da solução, pode-se substituir a mistura de acetato neutro de chumbo e litargírio pelo acetato básico de chumbo.

Use a quantidade mínima exigida na clarificação, pois há erros no desvio polarimétrico de açúcares causados por um excesso de solução de acetato básico de chumbo.

Ative o litargírio aquecendo em mufla a (650-670)ºC, por um período entre entre 2h e 30 min a 3 h.

Solução de acetato neutro de chumbo

Preparo da solução – Prepare uma solução saturada de $Pb(C_2H_3O_2)_2.3H_2O$. Seu uso é especialmente indicado na polarimetria de açúcares redutores.

Solução de nitrato básico de chumbo

Preparo da solução – Misture volumes iguais de uma solução de hidróxido de sódio a 5% e de uma solução de nitrato de chumbo a 50%. Agite. Lave o precipitado por decantação. Adicione água até formar uma pasta. Conserve em frasco com rolha esmerilhada.

AREIA PURIFICADA PARA A DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

Preparo da areia – Pese 1 kg de areia, passe por peneira comum e em seguida por peneira ABNT nº 20 com abertura de 0,85 mm. Transfira a areia peneirada para um béquer de 4000 mL, lave várias vezes com água de torneira para retirar os resíduos pequenos e leves. Após a retirada da maior parte do resíduo, adicione 1000 mL de ácido clorídrico (1:1), em capela química de exaustão. Antes de colocar o ácido, deixe uma camada de 4 cm de água no béquer com areia. Deixe em contato por 90 minutos, agite ocasionalmente com bastão de vidro de 1 cm de diâmetro, retire a solução ácida e lave 10 vezes com água de torneira, em capela. Lave com água até que não haja reação para cloreto (teste, colocando aproximadamente 20 mL de água de lavagem em béquer de 100 mL e adicione 5 gotas de solução de nitrato de prata). Escoe a água. Seque a areia em cápsula de porcelana a 105°C e em seguida aqueça a 900°C por 6 horas, em mufla.

Colaborador

Jaim Lichtig

APÊNDICE **II**

GUIA CITAC / EURACHEM

GUIA PARA QUALIDADE EM QUÍMICA ANALÍTICA

UMA ASSISTÊNCIA À ACREDITAÇÃO

Preparado em conjunto pela CITAC
(Cooperação sobre Rastreabilidade Internacional em Química Analítica)
e EURACHEM (Enfoque para Química Analítica na Europa)

Traduzido sob os auspícios da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária em apoio com a UNESCO.

GUIA PARA QUALIDADE EM QUÍMICA ANALÍTICA

UMA ASSISTÊNCIA À ACREDITAÇÃO

Este documento foi produzido pelo Grupo de Trabalho conjunto, formado pela CITAC e EURACHEM, e se baseia em documentos anteriores, incluindo o CITAC Guia 1, publicado em 1995 e o Guia EURACHEM WELAC publicado em 1993. Esta edição, traduzida sob os auspícios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária **(ANVISA)** e da **UNESCO**, aborda os novos requisitos da norma ISO/TEC 17025:1999 – "Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração".

Título original: "Guide to Quality in Analytical Chemistry - An Aid to Accreditation", edition 2002.

A tradução e revisão deste material foram produzidas no Contexto da Cooperação UNESCO/ANVISA: Galdino Guttmann Bicho – revisor
Paulo Afonso Lopes da Silva – revisor
Mariana Mieko Mandai – revisora
Marco Antonio de Azevedo Martins – revisor
Claudinei Oliveira Zima - revisor

Publicado em 2002

Os direitos autorais desse guia são de propriedade das
organizações representadas pela CITAC e EURACHEM.

Esta edição foi publicada pela CITAC e EURACHEM.

GUIA PARA QUALIDADE EM QUÍMICA ANALÍTICA

ÍNDICE

Seção Título

1. Metas e objetivos
2. Introdução
3. Definição e Terminologia
4. Acreditação
5. Escopo
6. A tarefa analítica
7. Especificação do requisito analítico
8. Estratégia analítica
9. Análises não rotineiras
10. Pessoal
11. Amostragem, manuseio e preparação das amostras
12. Ambiente
13. Equipamentos
14. Reagentes
15. Rastreabilidade
16. Incerteza de medição
17. Métodos/ procedimentos para ensaios e calibração
18. Validação de metodologia
19. Calibração
20. Materiais de referência
21. Controle de qualidade e ensaios de proficiência
22. Computadores e sistemas controlados por computador
23. Auditoria do laboratório e análise crítica

Referências e Bibliografia

Siglas

Apêndices

A Auditoria de Qualidade – Áreas de Particular Importância em um Laboratório Químico
B Intervalos de Calibração e Verificações de Desempenho
C Tabela de Comparação – ISO/IEC 17025:1999 x ISO/IEC Guia 25:1990 (ILAC G15:2001)IEC Guia 25:1990 (ILAC G15:2001)

1. METAS E OBJETIVOS

1.1 A meta deste guia é fornecer aos laboratórios diretrizes sobre a melhor prática para as operações analíticas por eles realizadas. O guia abrange análises qualitativa e quantitativa realizadas em bases rotineiras e não-rotineiras. Um guia em separado abrange trabalhos de pesquisa e desenvolvimento (Guia CITAC/EURACHEM Referência A1 na página 43).

1.2 O guia objetiva auxiliar aquelas pessoas implementando a garantia da qualidade em laboratórios. Para aqueles que trabalham com acreditação, certificação ou outra conformidade com requisitos particulares da qualidade, ele irá ajudar a explicar o que esses requisitos significam. O guia também será útil para aqueles envolvidos na avaliação da qualidade de laboratórios analíticos, por comparação com esses requisitos de qualidade. Referências cruzadas às normas ISO/IEC 17025, ISO 9000 e aos requisitos das Boas Práticas de Laboratório (GLP) da OECD, são fornecidas.

1.3 Este documento foi desenvolvido a partir da anterior Guia 1 CITAC (que, por sua vez, foi baseada no Guia EURACHEM/WELAC), e atualizado para levar em conta novos materiais e desenvolvimentos, particularmente os novos requisitos da norma ISO/IEC 17025.

1.4 Esse guia foi produzido por um grupo de trabalho constituído por David Holcombe, LGC, RU; Bernard King, NARL, Austrália; Alan Squirrell, NATA, Austrália e Maire Walsh, Laboratório Estadual, Irlanda. Além disto, ao longo dos anos de elaboração deste guia e de suas versões anteriores, tem havido extensa contribuição por parte de um grande número de indivíduos e organizações, incluindo: CITAC, EURACHEM, EA, ILAC, A.O.A.C.I, IUPAC, CCQM, entre outros (consulte a lista de Acrônimos na página 58).

1.5 Este guia se concentra nas questões técnicas da garantia da qualidade (GQ), com ênfase naquelas áreas onde há a necessidade de uma interpretação particular para ensaios químicos ou medições relacionadas. Existe um número de aspectos adicionais de GQ, onde nenhuma orientação é dada, já que estes são integralmente focados em outros documentos, tal como a norma ISO/IEC 17025. Estes incluem: registros; relatórios; sistemas da qualidade; subcontratação; reclamações; requisitos do fornecedor; revisão de contratos; confidencialidade e manipulação de dados.

2. INTRODUÇÃO

2.1 O valor das medições químicas depende do nível de confiança que pode ser estabelecido nos resultados. De maneira crescente, a comunidade de analistas químicos está adotando princípios de GQ que, embora não garantindo realmente a qualidade dos dados produzidos, eleva a possibilidade deles serem bem fundamentados e se adequarem ao fim pretendido.

2.2 Uma GQ apropriada pode permitir que um laboratório mostre que possui instalações e equipamentos adequados para execução de análises químicas e que o trabalho foi realizado por pessoal competente de uma maneira controlada, seguindo um método validado documentado. A GQ deve focar questões centrais que determinem resultados de qualidade, custos e oportunidades, e evitem desvio de energias para questões menos importantes.

2.3 Uma boa prática de GQ, incluindo seu reconhecimento formal por acreditação, certificação etc., ajuda a garantir que os resultados sejam válidos e adequados aos fins propostos. Contudo, é importante que tanto os laboratórios quanto seus clientes entendam que a GQ não pode garantir que 100% dos resultados individuais sejam confiáveis. Existem duas razões para isto:

1. Lapsos/erros grosseiros podem ocorrer, quando, por exemplo, os resultados de duas amostras forem confundidos. Em um laboratório bem operado, a freqüência de lapsos será pequena, porém não igual à zero.

2. Erros aleatórios e sistemáticos também ocorrem, levando à incerteza no resultado medido. A probabilidade de um resultado se situar dentro da faixa de incerteza declarada depende do nível de confiança empregado, mas, novamente, mesmo em um laboratório bem organizado desvios nos resultados irão ocasionalmente ocorrer e, muito ocasionalmente, o desvio será grande.

A tarefa da GQ é administrar a freqüência das falhas de qualidade. Quanto maior for o esforço empregado, menor será o número de falhas de qualidade que podem ser esperadas. É necessário equilibrar o custo da GQ com o benefício na redução das falhas de qualidade a um nível aceitável (diferente de zero).

2.4 Os princípios da GQ foram formalizados em uma variedade de normas ou protocolos publicados. Aqueles mais amplamente reconhecidos e usados em ensaios químicos incidem em três grupos e são aplicados de acordo com as necessidades individuais de um laboratório. Os três grupos são:

2.4.1 ISO/IEC 17025:1999: (Ref B1) Esta norma aborda a competência técnica de laboratórios para a realização de ensaios e calibrações específicos, e é usada em todo o mundo por organismos de acreditação de laboratórios, como um requisito básico para a acreditação;

2.4.2 ISO 9001:2000: (Ref B2) e suas equivalentes nacionais e internacionais. Esta norma se refere principalmente à gestão da qualidade para instalações que realizam a produção ou prestam serviços, incluindo análises químicas;

2.4.3 Princípios de Boas Práticas de Laboratório (GLP) da OECD: 1998 (Ref B3) e suas equivalentes nacionais e setoriais. Estas diretrizes dizem respeito aos processos e condições organizacionais sob os quais estudos de laboratório, relativos a determinado trabalho regulamentar, são realizados.

2.5 Além disto, existem abordagens sobre Gestão da Qualidade Total (GQT) para GQ, que dão ênfase à melhoria contínua (a nova ISO 9001:2000 dá mais ênfase neste aspecto). O fundamental neste guia é o enfoque que, em nível técnico, a boa prática em GQ analítica independe do sistema formal de GQ adotado.

2.6 Um laboratório pode decidir criar seus próprios procedimentos de GQ, ou pode adotar um dos protocolos estabelecidos. Neste último caso, ele pode reivindicar conformidade informal com o protocolo ou, em condições ideais, pode ser submetido a uma avaliação independente por parte de uma entidade especializada oficial, com o objetivo de obter aprovação independente de seu sistema da qualidade. Tal avaliação/aprovação independente é variavelmente conhecida como acreditação, registro ou certificação, dependendo de qual norma esteja sendo usada na avaliação. Em áreas específicas de análise, a acreditação é algumas vezes obrigatória, porém, na maioria dos casos, o laboratório é livre para decidir que espécies de medidas de GQ ele deseja adotar. O caminho pela avaliação independente tem reconhecidas vantagens, particularmente onde os clientes do laboratório necessitem de evidência objetiva da competência técnica do laboratório. Para obter esclarecimentos sobre o termo "acreditação", conforme usado neste guia, veja as seções 3.2 e 4 abaixo.

3. DEFINIÇÕES E TERMINOLOGIA

Existe uma pluralidade de termos importantes usados em gestão da qualidade e avaliação de conformidade, cujo significado pode variar conforme o contexto em que eles forem usados. É importante compreender a distinção entre os diferentes termos. Alguns deles são aqui apresentados. A referência básica é a ISO Guia

2:1996 – Ref B4. Outros termos podem ser encontrados na ISO 9000:2000 – Ref B5 (Nota: ISO 8402:1994 – Qualidade – Vocabulário – foi retirada).

3.1 ***QUALIDADE***: Grau em que um conjunto de características inerentes satisfaz requisitos (ISO 9000:2000).

3.2 ***ACREDITAÇÃO***: 'Procedimento pelo qual uma entidade autorizada concede reconhecimento formal de que uma organização ou pessoa é competente para realizar tarefas específicas' (ISO Guia 2-1996).

3.2.1 No contexto de um laboratório realizando medições, acreditação é o reconhecimento formal de que o laboratório é competente para executar calibrações ou ensaios específicos, ou tipos específicos de calibrações ou ensaios. O mecanismo pelo qual a acreditação é concedida está descrito abaixo na seção 4, e o documento dos principais requisitos é a norma ISO/IEC 17025:1999.

3.2.2 Acreditação é também usada no contexto das atividades baseadas na norma ISO 9000, para descrever o processo pelo qual uma organização nacional reconhece formalmente os organismos de certificação como competentes para avaliar e certificar organizações, como estando em conformidade com a série de normas ISO 9000 ("sistemas de gestão da qualidade").

3.3 ***CERTIFICAÇÃO***: 'Procedimento pelo qual um organismo de terceira parte fornece garantia por escrito de que um produto, processo ou serviço está em conformidade com requisitos especificados' (ISO Guia 2:1996). A Certificação (algumas vezes conhecida como registro) difere basicamente da acreditação na medida em que a competência técnica não é especificamente focada.

3.4 ***GARANTIA DA QUALIDADE (GQ)***: GQ descreve as medidas globais que um laboratório utiliza para assegurar a qualidade de suas operações. Tipicamente estas podem incluir:

Um sistema da qualidade
Ambiente de laboratório adequado
Pessoal instruído, treinado e habilitado
Procedimentos e registros de treinamento
Equipamento adequadamente conservado e calibrado
Procedimentos para controle da qualidade
Métodos documentados e validados

Rastreabilidade e incerteza de medição
Procedimentos de verificação e divulgação
Ações preventivas e corretivas
Ensaios de proficiência
Auditorias internas e procedimentos de análise crítica
Procedimentos para reclamações
Requisitos para reagentes, calibradores, padrões de medida e materiais de referência.

3.5 ***CONTROLE DA QUALIDADE (CQ)***: 'As técnicas operacionais e atividades que são usadas para preencher os requisitos para qualidade.

Procedimentos de controle da qualidade se aplicam para assegurar a qualidade de amostras específicas ou lotes de amostras, e incluem:

Análise de materiais de referência/padrões de medida
Análise de amostras cegas
Uso de amostras de controle da qualidade e gráficos de controle
Análise de brancos
Análise de amostras fortificadas
Análises em duplicata

ENSAIOS DE PROFICIÊNCIA

Mais detalhes sobre controle da qualidade e ensaios de proficiência são apresentados na seção 21.

3.6 ***AUDITORIA E ANÁLISE CRÍTICA***: Na prática, auditorias da qualidade adotam dois formatos. A auditoria realizada por uma entidade externa independente, como parte do processo de acreditação, é mais comumente conhecida como ***avaliação***. "Auditorias da qualidade" realizadas dentro do laboratório são algumas vezes subdivididas em: ***auditoria***, frequentemente chamada de "auditoria interna" (que verifica se os procedimentos da qualidade se fazem presentes e estão sendo inteiramente implementados) e ***análise crítica*** (verificação para assegurar que o sistema da qualidade é eficaz e atinge os objetivos). A ***análise crítica*** é realizada pela gerência executiva com responsabilidade pela política de qualidade e trabalho do laboratório.
Neste guia, o termo ***auditoria*** se refere à auditoria interna; ***avaliação*** se refere à auditoria externa.

3.7 ***NORMA (STANDARD)***: Esta palavra possui uma variedade de significados distintos na língua inglesa. No passado, ela foi usada rotineiramente para se referir primeiramente a normas escritas amplamente adotadas, isto é, procedimentos, especificações, recomendações técnicas, etc., e em segundo lugar, a padrões químicos ou físicos usados para fins de calibração. Neste guia, para minimizar a confusão, ***norma*** é usada somente no sentido de ***normas escritas***. O termo ***padrão de medida*** é usado para descrever ***padrões químicos ou físicos***, usados para fins de calibração ou validação, tais como: produtos químicos de pureza estabelecida e suas correspondentes soluções de concentração conhecida; filtros UV; pesos, etc. Materiais de referência são uma (importante) categoria de padrões de medida.

3.8 ***MATERIAL DE REFERÊNCIA (MR)***: 'Material ou substância, com um ou mais valores de suas propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos, para ser usada na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou na atribuição de valores a materiais.' (ISO Guia 30 – Ref C1).

3.9 ***MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO (MRC)***: 'Material de referência, acompanhado de um certificado, com um ou mais valores de suas propriedades certificadas por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido.' (ISO Guia 30:1992 – Ref C1).

3.10 ***RASTREABILIDADE***: 'Propriedade do resultado de uma medição ou do valor de um padrão estar relacionado a referências estabelecidas, geralmente a padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia contínua de comparações, todas com incertezas estabelecidas.' (VIM 1993 – Ref B6).

3.11 ***INCERTEZA DE MEDIÇÃO***: Parâmetro associado ao resultado de uma medida que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao medidor. (VIM 1993 – Ref B6).

4 ACREDITAÇÃO

4.1 As referências à acreditação nesta e nas seções sucessivas se referem à ISO/IEC 17025:1999 (Ref B1). Seus requisitos serão implementados por laboratórios e acreditados por organismos de acreditação durante um período de transição de três anos, findando em dezembro de 2002. A norma é consideravelmente maior do que a sua predecessora e contém alguns requisitos novos ou ampliados, como abaixo sumarizado, mas grande parte do novo material estava previamente contido em

documentos suplementares de orientação. Assim, a escala dos novos requisitos não é tão grande como possa parecer em princípio. Uma tabela comparando as cláusulas da ISO/IEC 17025:1999 e de sua predecessora, a ISO/IEC Guia 25: 1990, é encontrada no Apêndice C.

4.2 Em resumo, a norma ISO/IEC 17025 inclui requisitos novos ou ampliados referentes ao seguinte:

- Revisão de Contratos — comunicações de pré-contrato para garantir que os requisitos sejam adequadamente especificados e os serviços atendam inteiramente aos requisitos do cliente;
- Aquisição de serviços e suprimentos — uma política e procedimentos são requeridos para assegurar-se de que sejam adequados à finalidade;
- Amostragem — um plano e procedimentos de amostragem são necessários quando a amostragem fizer parte do trabalho do laboratório;
- Ação preventiva — ação pró-ativa que procura melhorar os processos, minimizando assim a necessidade de ações corretivas;
- Validação de metodologia, rastreabilidade e incerteza de medição — ênfase significativamente acentuada nesses requisitos;
- Opiniões e interpretações — isto é agora permitido em relatórios de ensaio.

4.3 Os requisitos das principais normas/protocolos de qualidade possuem muitos elementos em comum ou similares. Por exemplo, a ISO/IEC 17025 incorpora os elementos do sistema da qualidade da ISO 9001 (1994) que são aplicáveis aos laboratórios. Uma comparação das principais normas/protocolos é apresentada abaixo:

Título	**ISO/IEC 17025:1999**	**ISO 9001: 2000**	**BPL OECD 1998 Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvolvimento**
Escopo	1	1	Seção I – 1
Referências normativas	2	2	
Termos e definições	3	3 ISO 9000:2000	Seção I – 2
Requisitos gerenciais	4	Várias	Seção II – 1.1
Organização	4.1		
Diretor de estudo			Seção II - 1.2

Título	ISO/IEC 17025:1999	ISO 9001: 2000	BPL OECD 1998 Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvolvimento
Gerente da Qualidade	4.1.5	5.5.2	Pessoal da GQ ≠ GLP
Sistema da Qualidade	4.2	4	Seção II - 2
Política da Qualidade	4.2.2	5.3	
Manual da Qualidade	4.2.2	4.2.2	
Comprometimento da gerência com a qualidade	4.2.2	5.1	
Controle de documentos	4.3	4.2.3	
Aprovação e emissão de documentos	4.3.2	4.2.3	
Alterações em documentos	4.3.3	4.2.3	Seção II – 7.1
Análise crítica dos pedidos, propostas e contratos	4.4	7.2	
Subcontratação	4.5		
Aquisição de serviços e suprimentos	4.6	7.4	
Verificação de suprimentos	4.6.2	7.4.3	Seção II – 6.2.3 (somente item de ensaio)
Foco no cliente		5.2, 8.2.1	
Atendimento ao cliente	4.7	7.2.3	
Reclamações	4.8	7.2.3	
Controle de trabalho não-conforme	4.9	8.3	
Melhoria		8.5	
Análise de causas	4.10.2	8.5.2	
Ação corretiva	4.10.3 4.10.4	8.5.2	
Ação preventiva	4.11	8.5.3	
Controle de registros	4.12	4.2.4	Seção II – 10
Auditorias internas	4.13, 4.10.5	8.2.2	Seção II – 2.2
Análises críticas pela gerência	4.14	5.6	
Requisitos técnicos gerais	5.1		
Pessoal	5.2	6.2	Seção II - 1.3
Acomodações e condições ambientais	5.3	6.3, 6.4	Seção II – 3
Métodos de ensaio e calibração	5.4	7.5.1	Seção II – 7

Título	ISO/IEC 17025:1999	ISO 9001: 2000	BPL OECD 1998 Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvolvimento
Validação de metodologias	5.4.5	7.5.2	
Incerteza de medição	5.4.6		
Verificações de cálculo e de transcrições	5.4.7.1		Seção II – 8.3
Validação da TI	5.4.7.2	6.3	Seção II - 1.1.2 (q)
Equipamentos	5.5	7.5.1	Seção II - 4
Qualificação de equipamentos	5.5.2	7.5.1, 7.5.2	Seção II - 5.1
Rastreabilidade da medição	5.6	7.6	
Calibração	5.6	7.6	Seção II – 4.2
Padrões de referência e materiais de referência	5.6.3	7.6	Seção II – 6
Amostragem	5.7		
Manuseio de itens de ensaio ou calibração (transporte/armazenagem/identificação/ descarte)	5.8	7.5.5	
Identificação da amostra	5.8.2	7.5.3	Seção II – 8.3.1
Garantia da qualidade dos resultados de medição	5.9	7.5.1, 7.6, 8.2.3, 8.2.4	Seção II – 2
Apresentação dos resultados	5.10		Seção II – 9
Opiniões e interpretações	5.10.5		
Transmissão eletrônica	5.10.7		
Emendas aos relatórios	5.10.9	8.3	Seção II 9.1.4

Nota: Considerações estão sendo feitas para o alinhamento dos requisitos do sistema de gestão da qualidade da Seção 4 (baseada na ISO 9001: 1994) da ISO/IEC 17025: 1999 com a ISO 9001: 2000.

4.4 A acreditação é concedida a um laboratório para um conjunto específico de atividades (isto é, ensaios ou calibrações) após a avaliação daquele laboratório. Tais avaliações irão incluir tipicamente um exame dos procedimentos analíticos em uso, o sistema da qualidade e a documentação da qualidade. Os procedimentos analíticos serão examinados para garantir que eles sejam tecnicamente apropriados ao

fim pretendido e que tenham sido validados. O desempenho dos ensaios pode ser testemunhado para garantir que os procedimentos documentados estejam sendo seguidos e possam ser, de fato, acompanhados. O desempenho do laboratório em esquemas de ensaios de proficiência pode ser também examinado. A avaliação pode, adicionalmente, incluir uma "auditoria de desempenho", onde é necessário que o laboratório analise amostras fornecidas pela entidade acreditadora e atinja níveis de precisão aceitáveis. Essa auditoria de desempenho é efetivamente uma forma de ensaio de proficiência (ver a seção 21).

4.5 É de responsabilidade do laboratório garantir que todos os procedimentos usados sejam apropriados ao seu fim pretendido. O processo de avaliação examina este aspecto de "adequação ao uso".

4.6 Cada entidade acreditadora possui procedimentos estabelecidos com os quais ela opera, avalia laboratórios e concede a acreditação. Por exemplo, as entidades acreditadoras de laboratórios operam, segundo requisitos baseados na ISO/IEC Guia 58 (Ref C8). Similarmente, entidades oferecendo esquemas de certificação operam segundo os requisitos da ISO/IEC Guia 62 (Ref 19).

4.7 Da mesma forma, avaliadores são escolhidos por critérios especificados. Por exemplo, os critérios de seleção para nomeação de avaliadores para avaliar em nome das entidades acreditadoras de laboratórios são especificados na ISO/IEC Guia 58. Estes incluem o requisito de conhecimento técnico nas áreas específicas de operação sendo avaliadas.

4.8 O benefício da acreditação é permitir aos clientes em potencial do laboratório terem confiança na qualidade do serviço desempenhado. Vários desenvolvimentos internacionais significam que a aprovação conferida por acreditação e outras avaliações possuem reconhecimento mundial. Muitas entidades acreditadoras de laboratórios (que foram avaliadas e confirmadas como satisfazendo requisitos relevantes — ver 4.6 acima) assinaram um acordo multilateral (o Acordo ILAC) para reconhecer a equivalência dos esquemas de acreditação de laboratório. Acordos internacionais similares foram desenvolvidos para entidades associadas a esquemas de certificação.

4.9 A orientação fornecida abaixo será útil para laboratórios buscando acreditação relativa à ISO/IEC 17025, certificação relativa à ISO 9001, ou conformidade/registro com os princípios das BPL (GLP).

5. ESCOPO

5.1 Um laboratório pode aplicar GQ a toda ou parte de suas operações. Quando um laboratório reivindica conformidade, pela certificação ou por acreditação, a uma norma específica, é importante que seja claro a que esta conformidade, por certificação ou acreditação, se aplica. A declaração formal das atividades que foram certificadas com a ISO 9000, ou acreditadas pela ISO 17025, é conhecida como "escopo". A ISO 9000 e as BPL necessitam apenas de uma breve descrição das atividades envolvidas, mas, no caso da ISO/IEC 17025, uma descrição detalhada do trabalho específico abrangido pela acreditação é normalmente requerido.

5.2 A gestão da qualidade é auxiliada por uma clara declaração das atividades, que idealmente devem definir a amplitude do trabalho envolvido, mas sem restringir a operação do laboratório. Diferentes normas da qualidade possuem regras diferentes, mas, para a ISO/IEC 17025, o escopo pode ser, tipicamente, definido em termos de:

i) gama de produtos, materiais ou tipos de amostras ensaiadas ou analisadas;

ii) medições (ou tipos de medições) realizadas;

iii) especificação ou método/equipamento/técnica usados;

iv) concentração, faixa e incerteza de medição, conforme apropriado.

5.3 A definição do escopo em termos específicos é claramente mais facilmente aplicada a laboratórios realizando ensaios de rotina, segundo procedimentos estabelecidos. Quando ensaios fora-de-rotina são realizados, é desejável uma abordagem mais flexível ao escopo. O escopo deve, todavia, ser tão específico quanto viável e o sistema de GQ mantido pelo laboratório deve assegurar que a qualidade dos resultados está sob controle.

5.4 Um laboratório que deseje alterar seu escopo, adicionando ensaios complementares ou alterando a metodologia dos ensaios existentes, irá necessitar da aprovação da entidade acreditadora, que deverá ter uma política específica para tais situações. Tipicamente, é possível se conceder mudanças simples por meio do exame da documentação. Para mudanças mais complexas, particularmente onde novas técnicas estejam envolvidas, pode ser requerida uma avaliação adicional.

6. A TAREFA ANALÍTICA

6.1 A análise é uma investigação complexa em múltiplos estágios que podem ser sumarizados nas sub-tarefas relacionadas abaixo. Quando apropriado, a seção correspondente deste guia é também listada. Nem todas as etapas serão necessárias a cada vez que uma medição de rotina for realizada. Também, na realidade, a medição é muitas vezes um processo iterativo, que passa pela série linear de etapas mostradas abaixo:

- Especificação dos requisitos — ver Seção 7
- Análise das informações *
- Pensamento criativo *
- Plano de estudo * — ver Seção 8
- Amostragem — ver Seção 22
- Preparação da amostra
- Análise preliminar *
- Identificação/confirmação da composição
- Análise quantitativa
- Coleta e análise de dados
- Interpretação de dados/solução de problemas
- Divulgação/recomendações

Os itens marcados com * são de maior significância no contexto da análise fora-de-rotina.

O processo é descrito sob forma de um fluxograma na Figura 1 da Seção 19.

6.2 Embora normas distintas enfatizem diferentes aspectos de GQ, e algumas das etapas acima não sejam especificamente cobertas, é importante que a GQ de cada estágio seja considerada, e abordada onde relevante.

7 ESPECIFICAÇÃO DO REQUISITO ANALÍTICO

7.1 O laboratório tem o dever de prestar um serviço analítico que seja apropriado para resolver os problemas de seus clientes.

7.2 A chave para uma boa análise é uma especificação clara e adequada dos requisitos. Isto precisará ser produzido em cooperação com o cliente, que pode necessitar de ajuda considerável para converter seus requisitos funcionais numa tarefa analítica técnica. O requisito analítico pode ser também desenvolvido durante os trabalhos de uma comissão, mas não deve sofrer desvios. Quaisquer mudanças são possíveis de serem orientadas pelo cliente, mas devem ter o acordo de ambos: cliente e laboratório. A especificação do pedido analítico deve abordar as seguintes questões:

- Contexto analítico
- Informações requeridas
- Relevância (Nível crítico)/risco aceitável
- Restrições de tempo
- Restrições de custos
- Amostragem
- Requisitos de rastreabilidade
- Incerteza de medição
- Requisitos do método, incluindo preparação da amostra
- Identificação/confirmação/caracterização
- Critérios de limites
- Requisitos de GQ/CQ
- Requisitos do plano de pesquisa/aprovação

7.3 O nível da documentação deve ser proporcional à escala e nível crítico da tarefa e inclui a produção de qualquer "análise de informações" e "pensamento criativo".

8. ESTRATÉGIA ANALÍTICA

8.1 Todo trabalho analítico deve ser adequadamente planejado. Um plano destes pode ser, em sua forma mais básica, simplesmente uma entrada em um caderno de anotações. Planos mais detalhados deverão ser apropriados para tarefas maiores e mais complicadas. Para trabalho realizado segundo as BPL*s*, há um requisito específico de que o trabalho seja realizado segundo ***planos de estudo*** documentados.

8.2 Os planos, tipicamente, deverão indicar o ponto de partida e de término pretendido da tarefa específica em conjunto com a estratégia para alcançar as metas desejadas. Quando, durante a evolução do trabalho, for apropriado alterar a estratégia, o plano deve ser corrigido de acordo.

9 ANÁLISES FORA-DE-ROTINA

9.1 Análises fora-de-rotina podem ser consideradas também como tarefas, mas que são realizadas ocasionalmente, onde metodologia confiável já se encontra estabelecida, ou como tarefas onde cada amostra requer uma abordagem diferente e a metodologia precisa ser estabelecida na ocasião. Orientações são dadas na Referência A1.

9.2 Os custos da medição química refletem os custos associados aos vários estágios de desenvolvimento do método, validação, instrumentação, consumíveis, manutenção con-

tínua, participação de pessoal, calibração, controle de qualidade, etc. Muitos desses custos são independentes do número de amostras que serão subseqüentemente analisadas usando-se esse método. Assim, quando um único método puder ser usado para um grande quantidade de amostras, os custos analíticos unitários serão comparativamente baixos. Quando um método tiver que ser especialmente desenvolvido apenas para poucas amostras, os custos analíticos unitários podem ser muito altos. Para tal análise fora-de-rotina, alguns custos podem ser reduzidos pelo uso de métodos genéricos, isto é, métodos que são amplamente aplicáveis. Em alguns casos, a subcontratação de serviços de um laboratório especializado em um tipo particular de trabalho poderia ser a melhor solução custo/benefício. Contudo, quando o trabalho for subcontratado, procedimentos de GQ apropriados devem ser empregados.

9.3 Em termos simples, uma medição pode ser convenientemente descrita em termos de uma etapa de isolamento e um estágio de medição. Raramente um analito pode ser medido sem primeiro separá-lo da matriz da amostra. Assim, a finalidade da etapa de isolamento é simplificar a matriz na qual o analito é finalmente medido. Freqüentemente o procedimento de isolamento pode variar muito pouco para uma ampla variedade de analitos numa faixa de matrizes de amostra. Um bom exemplo de um procedimento de isolamento genérico é a técnica de digestão para isolar traços de metais em alimentos.

9.4 Da mesma forma, uma vez que os analitos tenham sido isolados da matriz da amostra e estejam presentes em um meio comparativamente limpo, tal como um solvente, pode ser possível ter um único método genérico para cobrir a medição de uma ampla variedade de analitos. Por exemplo, cromatografia gasosa, ou espectrofotometria UV-Visível.

9.5 A documentação de tais métodos genéricos deve ser elaborada de forma que possa acomodar facilmente as pequenas mudanças relacionadas com a extração, depuração ou medição de diferentes analitos, por exemplo pelo uso de tabelas. Os parâmetros que podem ser variados são: tamanho da amostra, quantidade e tipo dos solventes de extração, condições de extração, colunas cromatográficas ou condições de separação, ou ajustes de comprimento de onda no espectrômetro.

9.6 O valor de tais métodos para análises fora-de-rotina é que, quando uma nova combinação de analito/matriz é encontrada, freqüentemente é possível incorporá-la a um método genérico existente, com validação adicional, cálculos de incerteza da medição e documentação apropriados. Assim, os custos adicionais incorridos são minimizados em comparação com o desenvolvimento integral de um novo método. O método

deve definir as verificações que precisarão ser realizadas para os diferentes analitos ou tipos de amostras, a fim de verificar se a análise é válida. Informações suficientes precisarão ser registradas, a fim de que o trabalho possa ser repetido, precisamente da mesma maneira, numa data futura. Quando uma análise específica subseqüentemente se torna rotina, um método específico pode ser validado e documentado.

9.7 É possível acreditar uma análise fora-de-rotina, e a maior parte das entidades acreditadoras terá uma política para avaliar tais métodos e descrevê-los no programa ou escopo de acreditação do laboratório. O ônus caberá ao laboratório de demonstrar aos avaliadores que ao usar estas técnicas ele está satisfazendo todos os critérios da norma de qualidade relevante. Particularmente, a experiência, a capacitação e o treinamento do pessoal envolvido, serão importantes fatores na determinação se tais análises podem ou não ser acreditadas.

10. PESSOAL

10.1 A gerência do laboratório deve definir, normalmente, os níveis mínimos de qualificação e experiência necessários aos principais cargos dentro do laboratório. As análises químicas devem ser realizadas por um analista qualificado, experiente e competente, ou sob a supervisão deste. Outra equipe de funcionários sênior do laboratório possuirá normalmente competências similares. Menores qualificações formais podem ser aceitáveis quando o pessoal possuir relevante e extensa experiência e/ou o escopo das atividades for limitado. A equipe qualificada em nível de graduação deverá ter, normalmente, pelo menos dois anos de experiência em trabalho pertinente antes de ser considera composta por analistas experientes. O pessoal em treinamento, ou sem nenhuma qualificação relevante, pode realizar análises, desde que tenham comprovadamente recebido um nível adequado de treinamento e sejam adequadamente supervisionados.

10.2 Em determinadas circunstâncias, os requisitos mínimos de qualificações e experiência para o pessoal que realiza tipos particulares de análises podem ser especificados em regulamentos.

10.3 O laboratório deve assegurar que todo o pessoal receba treinamento adequado para o desempenho competente dos ensaios e operação dos equipamentos. Quando apropriado, isto deverá incluir treinamento nos princípios e teorias por trás de técnicas particulares. Quando possível, medidas objetivas devem ser tomadas para avaliar o alcance da competência durante o treinamento. Somente analistas que possam demonstrar a competência necessária, ou que sejam adequadamente super-

visionados, podem realizar ensaios nas amostras. A competência continuada deve ser monitorada, por exemplo, usando-se técnicas de controle de qualidade. A necessidade de reciclar periodicamente o pessoal precisa ser considerada, quando um método ou técnica não estiver em uso regular. Muito embora a administração do laboratório seja responsável por assegurar o fornecimento de treinamento adequado, deve ser enfatizado que a manutenção de um forte elemento de auto-instrução é desejável, particularmente entre os analistas mais experientes.

10.4 O laboratório deve manter um registro atualizado do treinamento que cada membro do pessoal tenha recebido. A finalidade desses registros é fornecer evidências de que cada membro da equipe foi adequadamente treinado, e sua competência para realizar ensaios específicos foi avaliada. Em alguns casos, pode ser pertinente declarar quaisquer limitações específicas acerca da evidência sobre a competência. Os registros devem incluir, tipicamente:

I) qualificações acadêmicas;
II) cursos internos e externos freqüentados;
III) instrução prática relevante (e reciclagem, conforme necessário).

Possivelmente, também:

IV) participação em esquemas de ensaios de proficiência e/ou de GQ, com os dados associados;
V) artigos técnicos publicados e apresentações em conferências.

10.5 Em alguns casos, pode ser mais apropriado registrar a competência em termos de técnicas específicas, ao invés de métodos.

10.6 O acesso a esses registros de treinamento será necessário no andamento do trabalho diário. O acesso a outros registros de pessoal, normalmente guardados de modo centralizado pelo laboratório e listando detalhes pessoais, pode ser restrito por legislação nacional sobre a proteção de dados.

11. AMOSTRAGEM, MANUSEIO E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

11.1 Ensaios analíticos podem ser requeridos por uma variedade de motivos, incluindo o estabelecimento do teor médio do analito em um material, estabelecimento do perfil de concentração do analito em um material, ou determinação da contaminação local em um material. Em alguns casos, por exemplo, na análise forense, pode

ser apropriado examinar todo o material. Em outros, é apropriado coletar uma determinada quantidade de amostra. Claramente a maneira com que as amostras são obtidas irá depender do objetivo da análise.

11.2 A importância da fase de amostragem não pode deixar de ser exaustivamente enfatizada. Se a porção ensaiada (amostra) não for representativa do material original, não será possível relacionar o resultado analítico medido àquele no material original, não importando a qualidade do método analítico, nem o cuidado na condução da análise. Planos de amostragem podem ser aleatórios, sistemáticos ou seqüenciais, e podem ser empregados para obtenção de informações quantitativas ou qualitativas, ou para determinar a conformidade ou não-conformidade com uma especificação.

11.3 A amostragem sempre contribui para a incerteza de medição. Conforme a metodologia analítica é aprimorada e os métodos permitam ou requeiram o uso de porções menores de amostra para o ensaio, as incertezas associadas à amostragem se tornam cada vez mais importantes e podem elevar a incerteza total do processo de medição. A incerteza de medição associada à sub-amostragem, etc, deve ser sempre incluída na incerteza de medição do resultado do ensaio, mas a incerteza de medição associada ao processo básico de amostragem é normalmente tratada em separado.

11.4 Em muitas áreas de ensaios químicos os problemas associados à amostragem têm sido abordados e métodos têm sido validados e publicados. Os analistas também devem se referir às normas nacionais ou setoriais, conforme apropriado. Quando métodos específicos não estiverem disponíveis, o analista deve depender da experiência ou adaptar métodos a partir de aplicações similares. Quando em dúvida, o material de interesse e quaisquer amostras dele obtidas devem sempre ser tratados como heterogêneos.

11.5 A seleção de uma amostra ou amostras apropriadas, a partir de uma grande quantidade de material, é um estágio muito importante na análise química. Raramente ele é direto. Idealmente, se os resultados finais produzidos tiverem que ser de algum valor prático, os estágios da amostragem devem ser realizados por um amostrador capacitado com conhecimento do contexto global da análise, ou sob a direção deste. Possivelmente, tal pessoa poderá ser um analista experiente, ou alguém especificamente treinado em amostragem. Quando não for prático utilizar tal pessoa capacitada na obtenção das amostras, o laboratório é encorajado a interagir com o cliente para fornecer assessoria e possivelmente assistência prática, a fim de assegurar que a amostragem seja a mais apropriada possível. Uma "armadilha" muito

comum é subestimar a importância do procedimento de amostragem delegando-o a um empregado inexperiente e sem treinamento.

11.6 A terminologia usada em amostragem é complicada e pode ser desconcertante. Também, os termos usados podem não ser consistentes entre uma aplicação e outra. Ao documentar um procedimento de amostragem é importante assegurar que todos os termos utilizados sejam claramente definidos, a fim de que o procedimento fique claro para outros usuários. Da mesma forma, é importante assegurar, ao se comparar dois procedimentos distintos, que a terminologia usada seja consistente. Por exemplo, deve se tomar cuidado no uso da palavra *"bulk"* (granel), visto que esta pode se referir à combinação de amostras individuais, ou a uma massa indiferenciada.

11.7 Um dos melhores tratamentos da terminologia de amostragem é apresentado nas recomendações publicadas pela IUPAC (Ref. E7), que descreve os termos usados na amostragem de mercadorias embaladas ou de mercadorias a granel. Neste exemplo, o procedimento de amostragem reduz a ***partida*** original, através de ***lotes*** ou ***bateladas, incrementos, amostras primárias*** ou ***brutas, amostras compostas*** ou ***agregadas, subamostras*** ou ***amostras secundárias,*** para uma ***amostra de laboratório.*** A ***amostra de laboratório***, se heterogênea, pode ser mais adiante preparada para produzir a ***amostra de ensaio.*** A ***amostra de laboratório,*** ou a ***amostra de ensaio,*** é considerada como sendo o final do procedimento de amostragem. É possível que as operações dentro desse procedimento estejam sujeitas a incertezas de amostragem.

11.8 Para o propósito da orientação dada abaixo foram usadas as seguintes definições, conforme propostas pela IUPAC:

Amostra: Uma parcela do material selecionada para representar um corpo maior do material.

Manuseio de amostra: Se refere à manipulação a que as amostras são expostas durante o processo de amostragem, desde sua seleção a partir do material original até o descarte de todas as amostras e porções de ensaio.

Subamostra: Se refere a uma parcela da amostra obtida por seleção ou divisão; uma unidade individual do lote aceita como parte da amostra ou; a unidade final da amostragem multifásica.

Amostra de laboratório: Material primário entregue ao laboratório.

Amostra de ensaio: A amostra preparada a partir da amostra de laboratório.
Preparação da amostra: Isto descreve os procedimentos seguidos para selecionar a porção de ensaio a partir da amostra (ou subamostra) e inclui: processamento no laboratório; mistura (homogeneização); redução; *coning & quartering*[1]; *riffling*[2]; moagem e trituração.

Porção de ensaio: Se refere ao material efetivo, pesado ou medido para a análise.

11.9 Uma vez recebida no laboratório, a(s) ***amostra(s) de laboratório*** pode(m) necessitar de posterior tratamento, tal como subdivisão e/ou moagem e trituração, antes da análise.

11.10 A menos que especificado de outra forma, a porção de ensaio colhida para análise deve ser representativa da amostra de laboratório. Para garantir que a porção de ensaio seja homogênea, pode ser necessário reduzir o tamanho das partículas por trituração ou moagem. Se a amostra de laboratório for grande, pode ser necessário subdividi-la antes da trituração ou moagem. Cuidados devem se tomados para garantir que uma segregação não ocorra durante a subdivisão. Em alguns casos será necessário moer ou triturar grosseiramente a amostra antes da subdivisão em amostras de ensaio. A amostra pode ser subdividida por uma variedade de mecanismos, incluindo *coning & quartering*, *riffling*, ou por meio de um divisor rotativo de amostra ou de um divisor centrífugo. A etapa de redução do tamanho das partículas pode ser executada manualmente (almofariz/gral e pistilo) ou mecanicamente usando-se moinhos ou trituradores. Cuidados devem ser tomados para evitar a contaminação cruzada de amostras, assegurando-se de que o equipamento não contamine a amostra (p. ex. metais) e que a composição da amostra não seja alterada (p. ex. perda de umidade) durante a moagem ou trituração. Muitos métodos padronizados de análise contêm uma seção que detalha a preparação da amostra de laboratório, antes da retirada da porção de ensaio para análise. Em outros casos, a legislação lida com este aspecto como uma questão genérica.

11.11 As operações analíticas começam com a medição de uma ***porção de ensaio*** a partir da amostra de laboratório ou da amostra de ensaio, e prosseguem por meio de várias operações até a medição final.

11.12 Existem regras importantes a serem seguidas ao se planejar, adaptar, ou seguir uma estratégia de amostragem:

11.12.1 O problema que necessita de tomada de amostras e da análise subseqüente deve ser compreendido, e o procedimento de amostragem elaborado de acordo. A estratégia de amostragem usada irá depender da natureza do problema, p. ex.:

a) determinar a concentração média de analito no material;
b) conhecer o perfil da distribuição do analito no material;

c) o material é suspeito de contaminação por um analito particu lar;
d) o contaminante está distribuído de modo heterogêneo (ocorre em pontos distintos) no material;
e)podem existir outros fatores não-analíticos a serem considerados, incluindo a natureza da área sob exame.

11.12.2 Deve se tomar cuidado ao se presumir que o material seja homogêneo, mesmo quando ele parece ser. Quando o material se encontra claramente em duas ou mais fases físicas, a distribuição do analito pode variar dentro de cada fase. Neste caso, pode ser apropriado separar as fases e tratá-las como amostras distintas. Da mesma maneira, pode ser apropriado combinar e homogeneizar as fases para formar uma amostra única. Em sólidos, pode haver uma variação considerável na concentração do analito se a distribuição do tamanho de partícula do material principal variar significativamente e, durante um período de tempo, o material puder acomodar-se. Antes da amostragem pode ser apropriado, se praticável, homogeneizar o material para assegurar uma distribuição do tamanho da partícula representativa. Similarmente, a concentração do analito pode variar dentro de um sólido onde diferentes partes do material estiveram sujeitas a diferentes esforços (*stresses*). Por exemplo, considerar a medição do monômero de cloreto de vinila (VCM) na estrutura de um frasco de PVC. A concentração do VCM varia significativamente dependendo de se ela é medida no gargalo do frasco, nas curvaturas (ombro), nos lados ou na base.

11.12.3 As propriedades do(s) analito(s) de interesse devem ser levadas em conta. Volatilidade, sensibilidade à luz, instabilidade térmica e reatividade química podem ser considerações importantes no planejamento da estratégia de amostragem e escolha do equipamento, embalagem e condições de armazenamento. Equipamentos utilizados para amostragem, subamostragem, manuseio de amostra, preparação e/ou extração de amostra devem ser selecionados de modo a evitar alterações indesejadas na natureza da amostra, que possam influenciar os resultados finais. A significância de erros gravimétricos ou volumétricos que possam ocorrer durante a amostragem deve ser considerada, e todos os equipamentos críticos devem estar calibrados. Pode ser apropriada a adição de produtos químicos à amostra, tais como ácidos ou antioxidantes, para estabilizá-la. Isto é de particular importância na análise residual, onde existe o risco da adsorção do analito na superfície do recipiente de armazenagem.

11.12.4 Pode ser necessário considerar o uso e o valor do restante do material original, após uma amostra ter sido retirada para análise. Uma amostragem feita com pouco cuidado, especialmente se destrutiva, pode tornar toda a partida/carregamento do material inoperante ou sem valor.

11.12.5 Qualquer que seja a estratégia usada para a amostragem, é de vital importância que o amostrador mantenha um registro claro dos procedimentos seguidos, a fim de que o processo de amostragem possa ser exatamente repetido.

11.12.6 Quando mais de uma amostra for retirada do material original pode ser útil incluir um diagrama como parte integrante da documentação, para indicar o padrão da amostragem. Isto deverá tornar mais fácil a repetição da amostragem numa data futura, podendo também auxiliar na obtenção de conclusões a partir dos resultados do ensaio. Uma aplicação típica, onde um esquema deste será útil, é na amostragem de solos sobre uma ampla área para monitorar sedimentos das emissões de chaminés.

11.12.7 Quando o laboratório não tiver sido responsável pela fase de amostragem, ele deve declarar no relatório que as amostras foram analisadas como recebidas. Se o laboratório tiver conduzido ou dirigido a fase de amostragem, ele deve informar sobre os procedimentos utilizados e comentar acerca de quaisquer limitações decorrentes impostas aos resultados.

11.13 A embalagem da amostra e os instrumentos usados para manipulação da amostra devem ser selecionados de forma que todas as superfícies em contato com a amostra sejam essencialmente inertes. Atenção particular deve ser dedicada à possível contaminação das amostras por metais ou plastificantes lixiviados (migrados) do recipiente, ou de sua tampa, para a amostra. A embalagem deve também garantir que a amostra possa ser manipulada sem ocasionar um risco químico, microbiológico, ou outro qualquer.

11.14 O fechamento da embalagem deve ser adequado, de forma a garantir que não haja vazamento da amostra, e que a própria amostra não seja contaminada. Em algumas circunstâncias, por exemplo, quando amostras tiverem sido coletadas para fins legais, a amostra deve ser lacrada de forma que o acesso a ela somente seja possível pela ruptura do lacre. A confirmação do estado satisfatório dos lacres irá então, normalmente, fazer parte do relatório analítico.

11.15 O rótulo da amostra é um importante aspecto da documentação e deve identificá-la, sem ambigüidade, a planos ou notas relacionadas. A rotulagem é particularmente importante, mais adiante no processo analítico, quando a amostra possa ter sido dividida, subamostrada, ou modificada de alguma forma. Em tais circunstâncias, informações adicionais podem ser apropriadas, tais como referências à amostra

principal, e a quaisquer processos usados para extrair ou subamostrar a amostra. A rotulagem deve ser firmemente afixada na embalagem da amostra e, quando apropriado, ser resistente ao desbotamento, autoclavação, derramamento de reagentes ou da própria amostra, e a variações razoáveis de temperatura e umidade.

11.16 Algumas amostras, por exemplo, aquelas envolvidas em litígio, podem ter requisitos especiais para rotulagem e documentação. Pode ser necessário que os rótulos identifiquem todos aqueles indivíduos que estiveram envolvidos com a amostra, incluindo a pessoa que coletou a amostra e os analistas envolvidos nos ensaios. Isto pode ser suportado por recibos, para atestar que um signatário (conforme identificado no rótulo) entregou a amostra para o próximo signatário, comprovando assim que a continuidade da amostra foi mantida. Isto é normalmente conhecido como "cadeia de custódia".

11.17 As amostras devem ser guardadas a uma temperatura apropriada e de tal modo que não haja riscos ao pessoal do laboratório, e a integridade das amostras seja preservada. As áreas de armazenagem devem ser mantidas limpas e organizadas, a fim de que não haja risco de contaminação ou de contaminação cruzada, ou de danos à embalagem ou a quaisquer lacres pertinentes. Condições ambientais extremas (p.ex. temperatura, umidade), que possam alterar a composição da amostra devem ser evitadas, já que isto pode levar à perda de analito por degradação ou adsorção, ou a um aumento na concentração do analito (micotoxinas). Se necessário, deve ser empregado monitoramento ambiental. Um nível de segurança apropriado deve ser exercido a fim de restringir o acesso não autorizado às amostras.

11.18 Todo o pessoal envolvido na administração do sistema de manuseio da amostra deve ser corretamente treinado. O laboratório deve ter uma política documentada para a retenção e descarte de amostras. O procedimento de descarte deve levar em conta as orientações acima citadas.

11.19 Para avaliar integralmente um resultado analítico para avaliação de conformidade, ou para outros fins, é importante ter conhecimento do plano de amostragem e de sua base estatística. Procedimentos de amostragem para inspeção por variáveis presumem que a característica sendo inspecionada é mensurável e segue a distribuição normal. Visto que a amostragem para inspeção por atributos é um método pelo qual a unidade de produto é classificada como conforme ou não-conforme, ou o número de não-conformidades na unidade de produto é contado com relação a um determinado conjunto de requisitos. Na inspeção por atributos, o risco associado com a aceitação/rejeição de não-conformidades é pré-determinado pelo *nível de*

qualidade aceitável (NQA) ou a *qualidade limite (QL)*.

12. AMBIENTE

12.1 Amostras, reagentes, padrões de medida e materiais de referência devem ser armazenados para garantir sua integridade. Em particular, as amostras devem ser armazenadas de modo que a contaminação cruzada não seja possível. O laboratório deve resguardar as amostras contra a deterioração, contaminação e perda de identidade.

12.2 O ambiente do laboratório deve ser suficientemente desobstruído (não abarrotado), limpo e arrumado, de modo a assegurar que a qualidade do trabalho desenvolvido não seja comprometida.

12.3 Pode ser necessário restringir o acesso em áreas específicas de um laboratório, devido à natureza do trabalho nelas realizado. As restrições podem ser feitas por motivos de proteção, segurança, ou sensibilidade à contaminação ou interferências. Exemplos típicos pode ser o trabalho envolvendo explosivos, materiais radioativos, carcinogênicos, análise forense, técnicas PCR (Reação de Cadeia de Polimerase) e análise residual. Quando tais restrições estiverem em vigor, o pessoal deve estar ciente:

I) do uso pretendido de uma área em particular;
II) das restrições impostas ao trabalho dentro dessas áreas;
III) dos motivos para a imposição de tais restrições;
IV) dos procedimentos a serem seguidos quando tais restrições forem violadas.

12.4 Na seleção de áreas que serão designadas para novos trabalhos, o uso anterior da área deve ser levado em consideração. Antes do uso, devem ser feitas verificações para garantir que a área esteja livre de contaminação.

12.5 O laboratório deve proporcionar condições ambientais apropriadas e os controles necessários para a realização de ensaios específicos, ou para a operação de equipamento específico, incluindo: temperatura, umidade, isenção de vibração, isenção de contaminação microbiológica em suspensão no ar ou em poeira, iluminação especial, proteção contra radiação, e serviços específicos. Condições ambientais críticas devem ser monitoradas e mantidas dentro de limites predeterminados.

12.6 Um desvio das condições ambientais críticas pode ser indicado por sistemas de monitoramento ou pelo controle de qualidade analítico em ensaios específicos. O im-

pacto de tais falhas pode ser avaliado como parte integrante dos ensaios de robustez durante a validação do método e, quando apropriado, estabelecidos procedimentos de emergência.

12.7 Procedimentos de descontaminação podem ser apropriados quando o ambiente ou o equipamento estiver sujeito à mudanças de uso, ou quando ocorrer contaminação acidental.

13. EQUIPAMENTOS (Ver também Apêndice B)

13.1 *Categorias de equipamentos*

13.1.1 Todo o equipamento usado nos laboratórios deve ser de uma especificação suficiente para a finalidade pretendida, e mantido num estado de manutenção e calibração consistente com seu uso. Equipamentos normalmente encontrados no laboratório químico podem ser classificados como:

i) equipamento para serviços gerais, não usado para medições ou com mínima influência sobre medições (p. ex. chapas quentes, agitadores, vidraria não-volumétrica e vidraria usada para medição grosseira de volume, tais como provetas) e sistemas para aquecimento ou ventilação de laboratório;

ii) equipamento volumétrico (p. ex. frascos, pipetas, picnômetros, buretas, etc.) e instrumentos de medição (p. ex. hidrômetros, viscosímetros de tubo em "U", termômetros, cronômetros, espectrômetros, cromatógrafos, medidores eletroquímicos, balanças, etc.);

iii) padrões de medida física (pesos, termômetros de referência);

iv) computadores e processadores de dados.

13.2 *Equipamento para serviços gerais*

13.2.1 Equipamento para serviços gerais será conservado, tipicamente, apenas por meio de limpeza e verificações de segurança, conforme necessário. Calibrações ou verificações de desempenho serão neces-

sárias onde a regulagem puder afetar significativamente o ensaio ou o resultado analítico (p. ex. a temperatura de um forno de mufla, ou banho com temperatura constante). Tais verificações precisam ser documentadas.

13.3 ***Equipamento volumétrico e instrumentos de medição***

13.3.1 O uso correto destes equipamentos é crítico para as medições analíticas e, assim, ele deve ser corretamente utilizado, conservado e calibrado, levando-se em conta os aspectos ambientais (seção 12). O desempenho de algumas vidrarias volumétricas (e afins) é dependente de fatores específicos, que podem ser afetados pelos métodos de limpeza, etc. Além de requererem procedimentos estritos para manutenção, tais aparelhos podem, consequentemente, necessitar mais regularmente de calibração, dependendo do uso. Por exemplo, o desempenho de picnômetros, viscosímetros com tubo em "U", pipetas e buretas, são dependentes da "molhabilidade" e das características da tensão superficial. Procedimentos de limpeza devem ser escolhidos de modo a não comprometer essas propriedades.

13.3.2 Atenção deve ser dada à possibilidade de contaminação originada pela estrutura do equipamento em si, que pode não ser inerte, ou pela contaminação cruzada originada do uso anterior. No caso de vidrarias volumétricas, procedimentos de limpeza, armazenagem e segregação de equipamentos volumétricos podem ser críticos, particularmente para análises residuais, onde a dissolução e a adsorção podem ser significativas.

13.3.3 O uso correto combinado com manutenção, limpeza e calibração periódicas não irá necessariamente garantir que um instrumento funcione adequadamente. Quando apropriado, devem ser realizadas verificações periódicas de desempenho (p. ex. verificação da resposta, estabilidade e linearidade das fontes, sensores e detectores, a eficiência da separação em sistemas cromatográficos, a resolução, alinhamento e precisão do comprimento de onda de espectrômetros, etc.), ver Apêndice B.

13.3.4 A freqüência de tais verificações de desempenho pode ser especificada em manuais ou procedimentos operacionais. Caso contrário, ela deverá ser determinada pela experiência e baseada na necessidade, tipo e desempenho anterior do equipamento. Os intervalos entre as verificações devem ser mais curtos do que o tempo que o equipamento leva, na prática, para ultrapassar os limites aceitáveis.

13.3.5 Muitas vezes é possível criar verificações de desempenho — verificações de adequação do sistema — dentro dos métodos de ensaio (p. ex. baseado nos níveis de resposta esperados dos detectores ou sensores para materiais de referência, a resolução das misturas de componentes por sistemas de separação, as características espectrais de padrões de medida etc.). Essas verificações devem ser satisfatoriamente concluídas, antes do equipamento ser usado.

13.4 ***Padrões de medida física***

13.4.1 Onde quer que os parâmetros físicos sejam decisivos para o correto desempenho de um ensaio em particular, o laboratório deve possuir, ou ter acesso, ao padrão de medida relevante, como um meio de calibração.

2.2.2 Em alguns casos, um ensaio e seu desempenho são na verdade definidos em termos de uma peça específica do equipamento, e verificações serão necessárias para confirmar que o equipamento está de acordo com a especificação relevante. Por exemplo, valores do ponto de fulgor para uma amostra inflamável específica são dependentes das dimensões e geometria dos aparelhos utilizados no ensaio.

13.4.3 Materiais padrões de medição e quaisquer certificados anexos devem ser armazenados e utilizados de maneira consistente para a preservação do estado de calibração. Deve ser dada consideração particular a qualquer recomendação de armazenagem mencionada na documentação fornecida com o padrão de medida.

13.5 ***Computadores e processadores de dados.*** Os requisitos para computadores são apresentados na seção 20.

14. REAGENTES

14.1 A qualidade dos reagentes e de outros materiais consumíveis deve ser apropriada ao uso pretendido. Devem ser feitas considerações a respeito da seleção, compra, recebimento e armazenamento de reagentes.

14.2 A qualidade de qualquer reagente crítico utilizado (incluindo água) deve ser mencionada no método, juntamente com o guia sobre quaisquer precauções específicas a serem observadas na sua preparação, armazenamento e uso. Essas precauções incluem toxicidade, inflamabilidade, estabilidade térmica ao ar e a luz; reatividade com outros produtos químicos; reatividade com recipientes específicos; e outros riscos. Reagentes e materiais de referência preparados no laboratório devem ser rotulados para identificar a substância, concentração, solvente (quando diferente da água), quaisquer precauções ou riscos especiais, restrições de uso, e data de preparação e/ou validade. A pessoa responsável pela preparação deve ser identificável a partir do rótulo ou dos registros.

14.3 O correto descarte de reagentes não afeta diretamente a qualidade da análise da amostra, contudo ele faz parte das boas práticas de laboratório e deve obedecer aos regulamentos nacionais sobre saúde e segurança, ou meio ambiente.

14.4 Quando a qualidade de um reagente for crítica para um ensaio, a qualidade de um novo lote deve ser verificada em comparação com o lote anteriormente em uso (de saída), antes de seu emprego, desde que o lote de saída seja reconhecido como sendo ainda utilizável.

15. RASTREABILIDADE

15.1 A definição formal de rastreabilidade é apresentada em 3.10 e uma declaração de política da CITAC foi preparada (Ref A6). Um guia sobre a rastreabilidade de medições químicas está sendo desenvolvido (Ref A7). A rastreabilidade diz respeito ao requisito de relacionar os resultados das medições aos valores de padrões ou referências rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades, o SI. Isto é alcançado com o emprego de padrões primários (ou outros padrões de alto nível), que são utilizados para estabelecer padrões secundários que, por sua vez, podem ser usados como padrões em calibrações de trabalho e sistemas de medição relacionados. A rastreabilidade é estabelecida em um nível declarado de incerteza de medição, onde cada etapa na cadeia da rastreabilidade acrescenta mais incerteza. A rastreabilidade

é importante porque ela assegura que medições feitas em laboratórios diferentes, ou em diferentes ocasiões, sejam comparáveis. Conforme acima indicado, é uma questão de escolha vincular a rastreabilidade a referências locais ou a referências internacionais.

15.2 Medições químicas são feitas, invariavelmente, pelo cálculo do valor a partir de uma equação de medição que envolve os valores medidos de outras quantidades, tais como: massa, volume, concentração de padrões químicos etc. Para que a medição em questão seja rastreável, todas as medições associadas aos valores usados na equação de medição, usada para calcular o resultado, precisam ser também rastreáveis. Outras quantidades não presentes na equação de medição, tais como pH, temperatura etc, podem também afetar significativamente o resultado. Quando for este o caso, a rastreabilidade de medições usadas para controle dessas quantidades também precisa ser rastreável a padrões de medição apropriados.

15.3 O estabelecimento da rastreabilidade de quantidades físicas, tais como massa, volume etc., é prontamente alcançado pelo uso de padrões de transferência, no nível de incerteza necessário para medições químicas. As áreas problemáticas para químicos são normalmente as validações de métodos (químicos) e as calibrações. A validação estabelece que o método mede, de fato, o que ele foi destinado a medir (p. ex. metil-mercúrio em peixes). A validação estabelece que a equação de medição usada para calcular os resultados é válida. A calibração é normalmente baseada no uso de soluções gravimetricamente preparadas de materiais de referência de substâncias puras. As questões importantes aqui são identidade e pureza, a primeira sendo mais problemática em química orgânica, onde níveis muito maiores de detalhamento estrutural são frequentemente requeridos e confusões entre componentes similares podem facilmente ocorrer. A incerteza de uma medição irá, em parte, depender da incerteza da pureza do padrão químico utilizado. Contudo, somente no caso de alguns materiais orgânicos, onde problemas de pureza e estabilidade podem ser acentuados, ou onde uma análise de alta precisão dos componentes principais for requerida, é que a pureza irá constituir um grande problema.

15.4 Para muitas análises, onde extração, digestão, derivatização e saponificação são normalmente requeridas, o principal problema pode ser adquirir um bom conhecimento da quantidade de analito na amostra original, relativamente ao resultado obtido ao final do processo de medição. Esta propensão (algumas vezes chamada de "recuperação") pode ser devido a perdas no processamento, contaminação ou interferentes. Alguns destes efeitos são manifestados dentro das incertezas de reprodutibilidade, mas outros são efeitos sistemáticos e necessitam de uma consideração

separada. As estratégias disponíveis para determinar as tendências do método incluem:

- Uso de métodos primários ou de referência, de tendência conhecida e pequena;
- Comparações com matrizes combinadas de MRCs;
- Medição de brancos e amostras gravimetricamente fortificadas;
- Estudo de perdas, contaminações, interferentes e efeitos de matrizes.

O estabelecimento da rastreabilidade desta parte do processo de medição requer a correlação da tendência da medição com referências apropriadas, tais como os valores contidos em materiais de referência de matrizes combinadas. Deve ser observado que a medição da recuperação de amostras fortificadas não simula necessariamente a extração do analito nativo das amostras. Na prática, isto não constitui normalmente um problema quando as amostras forem líquidas e/ou totalmente digeridas. Contudo, podem ocorrer problemas com a extração de sólidos. Por exemplo, um analito fortificado pode estar livremente disponível na superfície das partículas da amostra, enquanto que o analito nativo pode estar fortemente adsorvido dentro das partículas e, portanto, mais difícil de ser extraído.

15.5 A maioria das medições químicas pode, em princípio, se fazer rastreável para o mol. Quando, contudo, o analito for definido em termos funcionais, tal como gordura ou proteína baseada numa determinação de nitrogênio, então a especificação da medição em termos de mols não é viável. Nesses casos, a quantidade sendo medida é definida pelo método. Nestes casos, a rastreabilidade é para padrões de quantidades de componentes usados para calcular o resultado, por exemplo, massa e volume, e os valores produzidos por um método padronizado e/ou os valores determinados por um material de referência. Tais métodos são denominados métodos empíricos. Em outros casos, a limitação em alcançar a rastreabilidade segundo o SI, deriva da dificuldade em avaliar a tendência e sua incerteza, tal como a recuperação dos analitos em matrizes complexas. As opções aqui são definir o mensurando pelo método e estabelecer a rastreabilidade, conforme referências mencionadas, incluindo um método de referência/material de referência. Tais medidas possuem um `menor nível´ de rastreabilidade, mas também possuem uma menor Incerteza de Medição, relativa às referências estabelecidas. Alternativamente, a tendência pode ser estimada e corrigida para a incerteza, devido à tendência poder ser também estimada e incluída na avaliação da incerteza global. Isto irá permitir que a rastreabilidade ao SI seja reivindicada.

16. INCERTEZA DE MEDIÇÃO

16.1 Incerteza de medição é formalmente definida em 3.11. As boas práticas na avaliação da incerteza de medição são descritas num Guia ISO (Ref B7), e uma interpretação para medição química, incluindo um número de exemplos trabalhados, é fornecida num Guia CITAC/EURACHEN (Ref A2). A incerteza de medição caracteriza a faixa de valores dentro da qual o valor real deve se situar, com um nível de confiança especificado. Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Para que as medidas sejam de valor prático, é necessário ter algum conhecimento de sua confiabilidade ou incerteza. Uma declaração da incerteza associada a um resultado transmite ao cliente a `qualidade´ do resultado.

16.2 A ISO/IEC 17025:1999 requer que os laboratórios avaliem sua incerteza de medição. Existe também um requisito para divulgar a incerteza de medição em circunstâncias especificas, por exemplo, quando ela for relevante para interpretação do resultado do ensaio (o que é muitas vezes o caso). Assim, a declaração da incerteza de medição em relatórios de ensaios deve se tornar prática comum no futuro (Ref B18).

16.3 Uma declaração de incerteza é uma estimativa quantitativa dos limites, dentro dos quais o valor de um mensurando (tal como uma concentração de analito) é previsto se situar. A incerteza pode ser expressa como um desvio-padrão ou um múltiplo calculado do desvio-padrão. Na obtenção ou estimativa da incerteza relativa a um método e analito específico, é essencial assegurar que a estimativa considere explicitamente todas as fontes possíveis de incerteza, e avalie componentes significativos. A repetitividade ou reprodutibilidade, por exemplo, não são normalmente estimativas completas da incerteza, visto que nenhuma delas leva inteiramente em conta quaisquer incertezas associadas a efeitos sistemáticos inerentes a um método.

16.4 Uma ampla variedade de fatores torna qualquer resultado de medição analítica possível de se desviar do valor verdadeiro. Por exemplo, os efeitos da temperatura nos equipamentos volumétricos, reflexão e dispersão da luz em instrumentos espectroscópicos, variações de voltagem na rede elétrica, a interpretação dada por cada analista aos métodos especificados e recuperações de extrações incompletas, todas elas influenciam potencialmente o resultado. No que for razoavelmente possível, tais erros precisam ser minimizados por controles externos ou explicitamente corrigidos, por exemplo: pela aplicação de um fator de correção adequado. O desvio exato de um único resultado de medição do valor verdadeiro (desconhecido) é,

contudo, impossível de ser obtido. Isto ocorre porque os diferentes fatores variam de experimento a experimento, e porque o efeito de cada fator sobre o resultado nunca é exatamente conhecido. A possível faixa de desvios precisa ser, portanto, estimada.

16.5 A principal tarefa na atribuição de um valor para a incerteza de uma medição é a identificação das fontes relevantes de incerteza e a atribuição de um valor a cada contribuição significativa. As contribuições distintas precisam ser então combinadas (conforme mostrado na seção 16.13), afim de fornecer um valor global. É necessário manter registros das fontes individuais de incerteza identificadas, do valor de cada contribuição e a origem do valor (por exemplo: medições repetidas, referências de literatura, dados de MRCs, etc.).

16.6 Na identificação das principais fontes de incerteza, a seqüência completa de eventos necessários para atingir a finalidade da análise deve ser considerada. Tipicamente, essa seqüência inclui amostragem e subamostragem, preparação de amostra, extração, depuração, concentração ou diluição, calibração de instrumento (incluindo preparação do material de referência), análise instrumental, processamento de dados brutos e transcrição do resultado produzido.

16.7 Cada um dos estágios terá fontes de incerteza associadas. As incertezas de componentes podem ser avaliadas individualmente ou em grupos apropriados. Por exemplo, a repetitividade de uma medição pode servir como uma estimativa de contribuição total da capacidade de variabilidade aleatória, devido a um número de etapas num processo de medição. Da mesma forma, uma estimativa da tendência global e sua incerteza podem ser derivadas de estudos de materiais de referência certificados com matrizes combinadas e estudos de fortificação.

16.8 O tamanho das contribuições de incerteza pode ser estimado de diversas maneiras. O valor de um componente de incerteza, associado a variações aleatórias em fatores de influência, pode ser estimado pela medida da dispersão dos resultados de um número adequado de determinações sob uma faixa de condições representativas. (Em tais investigações, o número de medições não deve ser normalmente inferior a dez). Os componentes de incerteza originados do conhecimento imperfeito, por exemplo, de uma tendência ou tendência em potencial, podem ser estimados com base em um modelo matemático, julgamento profissional fundamentado, comparações interlaboratoriais internacionais, experimentos sobre sistemas modelo, etc. Estes diferentes métodos para estimativa dos componentes individuais de incerteza podem ser válidos.

16.9 Quando as contribuições de incerteza forem estimadas em grupos, é importante, apesar de tudo, registrar as fontes de incerteza que são consideradas como sendo incluídas em cada grupo, e medir e registrar valores dos componentes individuais de incerteza, quando disponíveis, como uma verificação sobre a contribuição do grupo.

16.10 Se forem usadas informações provenientes de resultados de comparações interlaboratoriais, é essencial considerar incertezas originadas fora do escopo de tais estudos. Por exemplo, valores nominais para materiais de referência são tipicamente informados como uma faixa, e quando diversos laboratórios usam o mesmo material de referência num experimento colaborativo, a incerteza no valor do material de referência não é incluída na variação interlaboratorial. Da mesma forma, experimentos interlaboratoriais utilizam tipicamente uma faixa restrita de materiais de ensaio, normalmente homogeneizados com cuidado, de modo que a possibilidade de falta de homogeneidade e diferenças na matriz, entre amostras reais e materiais de ensaio nos experimentos colaborativos, devem ser também levadas em consideração.

16.11 Tipicamente, as contribuições da incerteza para resultados analíticos podem incidir em quatro grupos principais:

i) Contribuições da variabilidade aleatória de curta duração, tipicamente estimada a partir de experimentos de repetitividade.

ii) Contribuições, tais como: efeitos do operador, incerteza de calibração, erros de escala graduada, efeitos do equipamento e do laboratório, estimativas a partir dos experimentos de reprodutibilidade entre laboratórios, intercomparações internas, resultados de ensaios de proficiência ou por julgamento profissional.

iii) Contribuições fora do escopo dos ensaios interlaboratoriais, tais como incerteza dos materiais de referência.

iv) Outras fontes de incerteza, tais como: variabilidade da amostragem (falta de homogeneidade), efeitos de matriz e incerteza sobre hipóteses subjacentes (tais como hipóteses sobre integridade da derivatização).

6.12 As contribuiçõe.s de incerteza para cada fonte devem ser todas expressas da mesma forma, idealmente como desvios padrão ou desvios padrão relativos. Em alguns casos, será necessário efetuar conversões. Por exemplo, os limites dos materiais de referência são frequentemente presumidos como tendo limites absolutos. Uma distribuição retangular de largura W tem um desvio padrão $W/(2\sqrt{3})$. Intervalos de confiança podem ser convertidos em desvios-padrão, dividindo-se

pelo valor "t" de Student apropriado para grandes amostras estatísticas (1,96 para limites de confiança de 95%).

16.13 Após uma lista de incertezas ser disponibilizada, os componentes individuais podem ser combinados. Quando fontes individuais de incerteza forem independentes, a expressão geral para a incerteza padrão combinada ***u*** é:

$$u = \sqrt{\sum (\partial R/\partial x_i)^2 \cdot u(x_i)^2}$$

onde $\partial R/\partial x_i$ é o diferencial parcial do resultado R, com relação a cada valor intermediário (ou outra `quantidade de influência´, tal como uma correção x_i), e $u(x_i)$ é o componente de incerteza associado a x_i.

16.14 Essa expressão simplifica consideravelmente os dois casos mais comuns. Quando as quantidades de influência ou resultados intermediários são adicionados ou subtraídos para fornecer o resultado, a incerteza ***u*** é igual à raiz quadrada da soma dos contribuintes dos componentes da incerteza ao quadrado, todos expressos como desvio-padrão. Quando os resultados intermediários forem combinados por multiplicação ou divisão, o desvio padrão relativo (DPR) combinado é calculado extraindo-se a raiz quadrada da soma dos DPRs ao quadrado, para cada resultado intermediário, e a incerteza padrão ***u*** combinada é calculada a partir do DPR combinado e do resultado.

16.15 A incerteza global deve ser expressa como um múltiplo do desvio-padrão calculado. O multiplicador recomendado é 2, isto é, a incerteza é igual a 2***u***. Quando as contribuições forem originadas de erros normalmente distribuídos, este valor irá corresponder aproximadamente a um intervalo de confiança de 95%.

16.16 Não é normalmente seguro estender este argumento a maiores níveis de confiança sem o conhecimento das distribuições envolvidas. De modo particular, é normalmente constatado que distribuições de incerteza experimentais são muito mais amplas no nível de confiança de 99%, do que seria previsto por hipóteses de normalidade.

16.17 Freqüentemente não é necessário avaliar as incertezas para cada tipo de ensaio e amostra. Será normalmente suficiente investigar a incerteza somente uma vez para um método específico, e utilizar as informações para estimar a incerteza de medição para todos os ensaios realizados dentro do escopo daquele método.

17. MÉTODOS/PROCEDIMENTOS PARA ENSAIOS E CALIBRAÇÃO

17.1 É responsabilidade do laboratório o uso de métodos apropriados à aplicação requerida. O laboratório pode usar o seu próprio critério ou pode selecionar um método em consulta com o cliente, ou ainda, o método pode ser especificado em regulamento, ou pelo cliente.

17.2 Os padrões de qualidade freqüentemente favorecem o uso de padrões ou métodos colaborativamente testados, sempre que possível. Embora isto possa ser desejável em situações onde um método tiver que ser amplamente usado, ou definido em regulamento, algumas vezes um laboratório pode ter um método próprio mais adequado. As considerações mais importantes são de que o método deva ser adequado ao fim pretendido, seja adequadamente validado e documentado, e forneça resultados que sejam rastreáveis com relação às referências mencionadas em um nível de incerteza apropriado.

17.3 A validação de um padrão ou método colaborativamente testado não deve ser considerada implícita, a despeito de quão impecável seja a origem do método - o laboratório deve se certificar de que o grau de validação de um método específico é adequado ao fim proposto, e que o próprio laboratório é capaz de verificar quaisquer critérios de desempenho declarados.

17.4 Métodos desenvolvidos internamente devem ser adequadamente validados, documentados e autorizados antes do uso. Onde eles estiverem disponíveis, materiais de referência com matrizes combinadas devem ser usados para determinar qualquer tendência, ou quando isto não for possível, os resultados devem ser comparados com outra(s) técnica(s), de preferência baseada(s) em diferentes princípios de medição. A medição da recuperação de analito fortificado, gravimetricamente adicionado, medição dos brancos e o estudo de interferências e efeitos matriciais podem ser também usados para verificação da tendência ou recuperação imperfeita. A estimativa da incerteza deve fazer parte deste processo de validação e, além de cobrir os fatores acima, deve abordar questões, tais como a homogeneidade e estabilidade das amostras. Uma recomendação sobre validação de metodologia é apresentada na seção 18.

17.5 A documentação de métodos deve incluir dados de validação, limitações de aplicabilidade, procedimentos para controle da qualidade, calibração e controle de documentos. Um laboratório documentando métodos pode achar conveniente adotar um formato comum, tal como a ISO 78-2: (Ref C10), que fornece um modelo útil. Além disto, recomendações sobre documentação de métodos estão

disponíveis por outras fontes, tais como órgãos de acreditação e órgãos nacionais de normalização.

17.6 Desenvolvimentos em metodologias e técnicas irão requerer que os métodos sejam alterados de tempos em tempos e, assim, a documentação do método deve estar sujeita a um controle adequado de documentos. Cada cópia do método deve apresentar o número/data da edição, autoridade da edição e número da cópia. Deve ser possível determinar a partir dos registros, qual é a versão mais atualizada de cada método autorizado para uso.

17.7 Métodos obsoletos devem ser descontinuados, mas devem ser guardados para fins de arquivo e identificados claramente como obsoletos. A diferença de desempenho entre métodos revisados e obsoletos deve ser estabelecida, de modo que seja possível comparar dados novos e antigos.

17.8 Quando métodos forem revisados, a validação precisa ser também atualizada. A revisão pode ser de menor natureza, envolvendo diferentes tamanhos de amostra, diferentes reagentes etc. De modo alternativo, ela pode envolver mudanças significativas, tais como o uso de tecnologia ou metodologia radicalmente diferente. O nível de revalidação requerido aumenta com a escala das mudanças feitas no método.

18 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

18.1 Verificações precisam ser realizadas para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e para demonstrar que o método seja cientificamente coerente, sob as condições nas quais ele deve ser aplicado. Essas verificações são coletivamente conhecidas como validação. A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico. As principais características de desempenho incluem:

- Seletividade e especificidade (descrição do mensurando);
- Faixa de medição;
- Calibração e rastreabilidade;
- Tendência *;
- Linearidade;
- Limite de detecção/ Limite de quantificação;

- Robustez;
- Precisão

* Em alguns campos da medição química, o termo recuperação é usado para descrever a tendência total; em outros campos, recuperação é usada em relação a determinados elementos de tendência.

As características acima são inter-relacionadas, muitas delas contribuindo para a incerteza total de medição, e os dados gerados podem ser usados para avaliar a incerteza de medição (ver seção 16 e ref C13) durante a validação.

A boa prática na validação do método é descrita em um Guia EURACHEM (Ref A3). Observe que não existe um acordo unânime sobre a interpretação de alguns dos termos acima, nem sobre as convenções usadas na sua determinação. Assim, ao mencionar dados de validação, é recomendável mencionar quaisquer convenções adotadas.

18.2 A extensão da validação deve ser claramente indicada no método documentado, de modo que o usuário possa avaliar a adequação do método às suas necessidades específicas.

18.3 Métodos padrão deverão ser desenvolvidos e validados colaborativamente por um grupo de especialistas (ref C14-C19). Este desenvolvimento deve incluir a abordagem de todos os aspectos necessários de validação e respectiva incerteza. Contudo, a responsabilidade permanece sendo firmemente do usuário, para garantir que a validação documentada do método esteja suficientemente completa para preencher inteiramente suas necessidades. Mesmo se a validação for concluída, o usuário ainda precisará verificar se as características de desempenho documentadas (p. ex. fidelidade e precisão) podem ser obtidas no seu próprio laboratório.

18.4 Conforme acima indicado, existem diferentes opiniões a respeito da terminologia e do processo de validação do método. As explicações a seguir complementam aquelas em outras partes deste guia e tem a intenção de servir como uma diretriz, ao invés de um ponto de vista definitivo.

18.5 ***Seletividade*** de um método se refere à extensão até a qual ele pode determinar analito(s) específico(s) numa mistura complexa, sem interferência dos outros componentes na mistura. Um método, que seja seletivo para um analito ou grupo de analitos, é dito como sendo *específico.* A aplicabilidade do método deve ser estudada usando-se várias amostras, variando desde padrões de medida pura até

misturas com matrizes complexas. Em cada caso a recuperação do(s) analito(s) de interesse deve ser determinada e as influências de interferência suspeitas devidamente mencionadas. Quaisquer restrições na aplicabilidade da técnica devem ser documentadas no método. Este trabalho irá permitir que seja feita uma clara descrição do mensurando.

18.6 ***Faixa:*** Para a análise quantitativa, a faixa de trabalho para um método é determinada pelo exame de amostras com diferentes concentrações de analito e determinação da faixa de concentrações para qual a incerteza admissível possa ser alcançada. A faixa operacional é geralmente mais extensa do que a faixa linear, que é determinada pela análise de um número de amostras de concentrações de analito variáveis e cálculo da regressão a partir dos resultados, normalmente usando o método dos mínimos quadrados. A relação entre a resposta do analito e a concentração não precisa ser perfeitamente linear para que o método seja efetivo. Para métodos apresentando boa linearidade, é normalmente suficiente plotar uma curva de calibração, usando-se padrões de medida em 5 níveis distintos de concentração (mais o branco). Um maior número de padrões de medida será necessário quando a linearidade for baixa. Em análise qualitativa é comum examinar amostras replicadas e padrões de medida ao longo de uma faixa de concentrações, para estabelecer em que concentração um ponto de corte confiável pode ser traçado entre detecção e não-detecção (ver também a seção 18.8).

18.7 ***Linearidade*** para métodos quantitativos é determinada pela medição de amostras com concentrações de analito abrangendo a faixa reivindicada do método. Os resultados são usados para obter uma reta por regressão com relação ao cálculo de analito, usando-se o método dos mínimos quadrados. É conveniente que um método seja linear ao longo de uma faixa específica, mas este não é um requisito absoluto. Quando a linearidade for inatingível para um procedimento específico, deve ser determinado um algoritmo adequado para cálculos.

18.8 Para métodos qualitativos existe a possibilidade de haver um limite de concentração abaixo do qual uma identificação positiva se torna não-confiável. A faixa de respostas deve ser examinada pelo ensaio de uma série de amostras e padrões de medida, constituída de brancos e de amostras contendo uma faixa dos níveis do analito. Em cada nível de concentração, será necessário medir aproximadamente 10 replicatas. Uma curva de resposta de resultados de % positiva (ou negativa) *versus* concentração deve ser traçada. A partir dessa curva será possível determinar a concentração limite, na qual o ensaio se torna não-confiável. No

exemplo abaixo mostrado, a identificação positiva do analito cessa de ser 100 % confiável abaixo de 100 $\mu g.g^{-1}$.

Exemplo:

Concentração ($\mu g.g^{-1}$)	*Nº de Replicações*	*Positiva/Negativa*
200	10	10/0
100	10	10/0
75	10	5/5
50	10	1/9
25	10	0/10
0	10	0/10

18.9 O ***limite de detecção*** de um analito é muitas vezes determinado ela análise epetida de uma porção de amostras de brancos, e é a concentraçã de analito uja resposta é equivalente à resposta média de brancos + 3 desvi padrão. É ossível que seu valor seja diferente para diferentes tipos de amostr

18.10 O ***limite de quantificação*** é a menor concentração de analito, que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. Ele deve ser estabelecido usando-se uma amostra ou padrão de medida apropriado, isto é, ele é normalmente o ponto mais baixo na curva de calibração (excluindo o branco). Ele não deve ser determinado por extrapolação. Várias convenções assumem o limite como sendo de 5, 6 ou 10 desvios-padrão da medição do branco.

18.11 ***Solidez:*** Algumas vezes também chamada de robustez. Quando diferentes laboratórios usam o mesmo método, eles introduzem inevitavelmente pequenas variações no procedimento, que pode ter ou não uma influência significativa sobre o desempenho do método. A solidez de um método é testada, pela introdução deliberada de pequenas alterações no método e exame das conseqüências. Um grande número de fatores pode precisar ser considerado, mas devido ao fato da maioria destes ter um efeito desprezível, será normalmente possível variar diversos deles de uma só vez. A solidez é normalmente avaliada pelo laboratório de origem, antes que outros laboratórios colaborem.

18.12 A ***tendência (algumas vezes chamada de recuperação)*** de um sistema de medição (método) é o erro sistemático desse sistema de medição. As questões associadas à estimativa da tendência e recuperação são comentadas na seção 15.4.

Além da avaliação da tendência, é importante estimar a incerteza de medição

associada à tendência e incluir este componente na estimativa global da incerteza de medição.

18.13 A ***precisão*** de um método é a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e é normalmente expressa em termos de desvio-padrão. Ela é geralmente dependente da concentração do analito, e esta dependência deve ser determinada e documentada. A precisão pode ser expressa de diferentes maneiras, dependendo das condições em que for calculada. Repetitividade é um tipo de precisão relacionada a medições feitas sob condições que podem ser repetidas, isto é: mesmo método; mesmo material; mesmo operador; mesmo laboratório; curto período de tempo entre as medições. Reprodutibilidade é um conceito de precisão relacionada a medições feitas sob condições que podem ser reproduzidas, isto é: mesmo método; operadores diferentes; laboratórios diferentes; equipamentos diferentes; longo período de tempo entre as medições. Precisão é um componente da Incerteza de Medição (ver seção 16).

18.14 Observe que estas declarações de precisão se aplicam à análise quantitativa. Análises qualitativas podem ser tratadas de uma maneira ligeiramente diferente. A análise qualitativa efetivamente é uma medição de "sim/não" para um determinado valor limite de analito. Para métodos qualitativos a precisão não pode ser expressa como um desvio padrão ou um desvio padrão relativo, mas pode ser expressa como taxas de verdadeiro e falso positivo (e negativo). Essas taxas devem ser determinadas numa variedade de concentrações abaixo do nível limite, no nível limite, e acima deste. Os dados obtidos por um método de comparação confirmatório devem ser usados sempre que um método apropriado para tal fim estiver disponível. Se um método destes não estiver disponível, amostras de brancos, fortificadas ou não, podem ser analisadas.

% de falsos positivos = falsos positivos x 100/ total de negativos conhecidos

% de falsos negativos = falsos negativos x 100/ total de positivos conhecidos

18.15 Confirmação é algumas vezes confundida com repetitividade. Enquanto que a repetitividade requer que a medição seja realizada diversas vezes por uma mesma técnica (método), a confirmação requer que a medição seja realizada por mais de uma técnica. A confirmação aumenta a confiança na técnica sob exame, e é especialmente útil quando as técnicas adicionais operam por princípios significativamente diferentes. Em algumas aplicações, por exemplo, na análise de

componentes orgânicos desconhecidos por cromatografia gasosa, o uso de técnicas confirmatórias é essencial.

19. CALIBRAÇÃO

19.1 Calibração é um conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre valores de quantidades indicados por um instrumento de medição ou sistema de medição, ou valores representados por um material de referência, e os valores correspondentes estabelecidos por padrões (ver VIM-B6). A maneira usual para realizar a calibração é submeter porções conhecidas da quantidade (p. ex: usando-se um padrão de medida ou material de referência) ao processo de medição e monitorar a resposta assim obtida. Informações mais detalhadas sobre materiais de referência são apresentadas no próximo capítulo.

19.2 Um programa geral para calibração no laboratório químico deve ser criado para assegurar que todas as medições que possuam um efeito significativo sobre os resultados do ensaio ou calibração sejam rastreáveis a um padrão de medida, de preferência um padrão de medida nacional ou internacional, tal como um material de referência. Quando apropriado e possível, devem ser usados materiais de referência certificados. Quando padrões de medida formalmente definidos não estiverem disponíveis, um material com propriedades e estabilidade adequadas deve ser selecionado ou preparado pelo laboratório, e usado como um padrão de medida do laboratório. As propriedades requeridas desse material devem ser caracterizadas por ensaios repetidos, preferencialmente por mais de um laboratório e usando-se uma variedade de métodos validados (ver ISO Guia 35: Ref C6).

19.3 Ensaios analíticos podem ser subdivididos em classes gerais, dependendo do tipo de calibração requerida:

19.3.1 Alguns ensaios analíticos dependem criticamente da medição de propriedades físicas, tais como a medição de peso em gravimetria e a medição de volume em titrimetria (volumetria). Visto que essas medições possuem um efeito significativo sobre os resultados do ensaio, é essencial um programa de calibração adequado para estas grandezas. Além disto, a calibração de dispositivos de medição usados para estabelecer a pureza ou concentração de padrões químicos, precisa ser considerada.

19.3.2 Quando um ensaio for usado para medir uma propriedade empírica de uma

amostra, tal como ponto de fulgor, o equipamento é muitas vezes definido num método padrão nacional ou internacional, e materiais de referência rastreáveis devem ser usados para fins de calibração, quando disponíveis. Equipamentos novos ou recentemente adquiridos devem ser verificados pelo laboratório antes do uso para garantir a conformidade com as especificações, desempenho e dimensões requeridos.

19.3.3 Instrumentos, tais como cromatógrafos e espectrômetros, que necessitem de calibração como parte integrante de sua operação normal, devem ser calibrados usando-se materiais de referência de composição conhecida (provavelmente soluções de produtos químicos puros).

19.3.4 Em alguns casos, a calibração de todo o processo analítico pode ser realizada por comparação do resultado de medição de uma amostra com o resultado produzido por um material de referência adequado, que foi submetido ao mesmo processo analítico integral como a amostra. O material de referência pode ser uma mistura sintética preparada no laboratório a partir de materiais de pureza conhecida (e de preferência certificados) ou uma matriz comercial de material de referência certificado. Contudo, em tais casos, uma estreita combinação entre a amostra para ensaio e a matriz do material de referência, em termos da natureza da matriz, e a concentração do analito precisa ser assegurada.

19.4 No entanto, em muitos casos, a calibração somente é realizada no estágio final de medição. Por exemplo, a calibração de um método de cromatografia gasosa pode ser realizada utilizando-se uma série de padrões de medida, que são soluções sintéticas do analito de interesse em várias concentrações. Essa calibração não leva em conta fatores, tais como a contaminação ou perdas que ocorrem durante os estágios de preparação e extração ou derivação da amostra. Portanto, é essencial durante o processo de validação do método explorar os problemas em potencial da contaminação e perdas, pelo manuseio de matrizes de materiais de referência ou amostras fortificadas, ao longo de todo o processo de medição, e definir o procedimento de calibração diária e as respectivas verificações de controle da qualidade (ver também a seção 15.4).

19.5 Programas individuais de calibração devem ser estabelecidos dependendo dos requisitos específicos da análise. Além disto, pode ser necessário verificar a calibração do instrumento após qualquer parada, intencional ou não, e após algum serviço ou outra manutenção substancial. O nível e a freqüência de calibração devem estar baseados na experiência anterior (histórico do equipamento) e devem ser ao menos aqueles recomendados pelo fabricante. Um Guia sobre

calibração é apresentado no Apêndice B e inclui intervalos típicos de calibração para vários tipos de instrumentos simples e indica os parâmetros que podem requerer calibração em instrumentos analíticos mais complexos. A freqüência de calibração requerida irá depender da estabilidade do sistema de medição, do nível de incerteza requerido e de quão crítico é o trabalho.

19.6 Procedimentos para a realização de calibrações devem ser adequadamente documentados, quer como parte integrante de métodos analíticos específicos, quer como um documento geral de calibração. A documentação deve indicar como realizar a calibração, a freqüência de calibração necessária, e a ação a ser tomada no caso de falha na calibração. Intervalos de freqüência para recalibração de padrões de medida física devem ser também indicados.

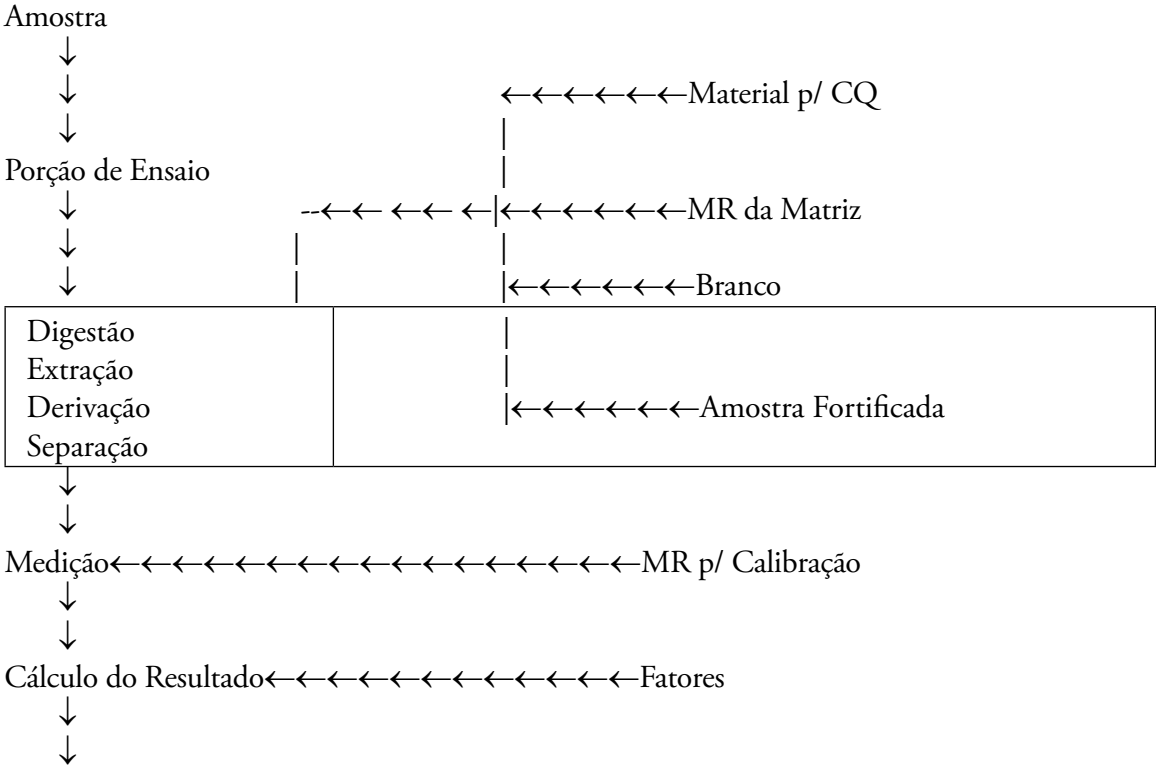


FIGURA 1

19.7 A calibração de vidrarias volumétricas normalmente se refere a um solvente específico a uma temperatura específica. A calibração raramente é válida quando as vidrarias forem usadas com outros solventes, devido às diferenças nas densidades, características de molhabilidade, tensão superficial etc. Isto é particularmente pertinente para vidrarias volumétricas calibradas para fornecer um

volume determinado. Outros equipamentos volumétricos podem ser afetados quando se usam solventes com altas taxas de expansão térmica. Nessas situações, as vidrarias devem ser recalibradas usando-se o solvente pertinente, na temperatura correta. Alternativamente, para maior precisão, as medições podem ser muitas vezes feitas por massa, ao invés de volume.

19.8 A Figura 1 é um processo analítico típico e ilustra a função da calibração em relação à validação do método e ao controle de qualidade.

20. MATERIAIS DE REFERÊNCIA (MR)

20.1 Uma série de Guias ISO relativa aos materiais de referência está disponibilizada (Ref C1-C6).

20.2 ***Materiais de referência e materiais de referência certificados*** são definidos na seção 3. Eles são usados para calibração, validação de metodologias, verificação de medições, avaliação da Incerteza de Medição e para fins de treinamento.

20.3 Materiais de referência podem assumir uma variedade de formas, incluindo MRs de substâncias puras, MRs de matrizes e soluções ou misturas. Os itens abaixo são exemplos de materiais de referência:

- cloreto de sódio 95% puro;
- uma solução aquosa contendo 1% (m/v) de sulfato de cobre (II) e 2% (m/v) de cloreto de magnésio;
- um polímero em pó com uma faixa específica de distribuição de peso molecular;
- um sólido cristalino fundindo na faixa de 150-151º C;
- leite em pó contendo uma quantidade conhecida de vitamina C.

20.4 Para muitos tipos de análises, a calibração pode ser realizada utilizando-se materiais de referência preparados no laboratório, a partir de produtos químicos de pureza e composição conhecidas. Alguns produtos químicos podem ser adquiridos com um certificado do fabricante declarando a pureza do material. Alternativamente, produtos químicos com pureza declarada, mas não certificada, podem ser adquiridos de fornecedores idôneos. Qualquer que seja a fonte, é responsabilidade do usuário estabelecer que a qualidade de tais materiais seja satisfatória. Algumas vezes, ensaios adicionais precisarão ser realizados pelo laboratório. Normalmente, um novo lote de um produto químico deve ser confron-

tado com o lote anterior. De maneira ideal, todos os produtos químicos a serem usados para fins de material de referência devem ser adquiridos de fabricantes com sistemas comprovados de GQ. Contudo, um sistema de GQ não garante automaticamente a qualidade dos produtos do fabricante, e os laboratórios devem tomar todas as medidas razoáveis para confirmar a qualidade de materiais críticos. O controle de impurezas é importante, especialmente para a análise de traços (residual), onde eles podem causar interferências. Atenção especial deve ser dada às recomendações dos fabricantes sobre a armazenagem e prazo de validade. Além disso, é necessário cautela, já que os fornecedores nem sempre disponibilizam informações sobre todas as impurezas.

20.5 O uso de materiais de referência apropriados pode propiciar rastreabilidade essencial e permitir que os analistas demonstrem a precisão dos resultados, calibrem equipamentos e métodos, monitorem o desempenho do laboratório e validem métodos, permitindo, ainda, a comparação de métodos através do uso como padrões de transferência (de medida). O seu uso é fortemente encorajado, sempre que apropriado.

20.6 A incerteza da pureza de um material de referência de substância pura precisa ser considerada em relação à incerteza associada a outros aspectos do método. De maneira ideal, a incerteza associada a um material de referência, usado para fins de calibração, não deve contribuir em mais de um terço (1/3) da incerteza de medição global.

20.7 A composição do material de referência certificado deve ser a mais próxima possível da composição das amostras. Quando existirem interferências de matriz, um método deve ser idealmente validado usando-se um material de referência de matriz combinada, certificado de uma maneira confiável. Se um material deste tipo não estiver disponível, pode ser aceito o uso de uma amostra fortificada com o material de referência.

20.8 É importante que qualquer material de referência certificado usado tenha sido produzido e caracterizado de uma maneira tecnicamente válida. Usuários de MRCs devem estar cientes de que nem todos os materiais são validados com o mesmo nível de rigor. Detalhes de experimentos de homogeneidade, ensaios de estabilidade, os métodos usados na certificação e as incertezas e variações nos valores declarados de analitos, são normalmente fornecidos pelo produtor e devem ser usados para avaliar a procedência dos MRCs. O material deve vir acompanhado de um certificado, que inclua uma estimativa da incerteza do

valor certificado (ver seção 16). A Guia ISO 34 (Ref C5) e um Guia ILAC (Ref B15) lidam com critérios para a competência dos provedores de materiais de referência. Esses guias podem constituir a base para uma futura avaliação de provedores de materiais de referência.

20.9 Materiais de referência e materiais de referência certificados devem ser claramente rotulados, de forma que sejam identificados sem ambigüidades e relacionados com os respectivos certificados ou outra documentação anexa. Informações devem ser disponibilizadas, indicando o prazo de validade, condições de armazenamento, aplicabilidade e restrições de uso. Materiais de referência preparados dentro do laboratório, p. ex. como soluções, devem ser tratados como reagentes para fins de rotulagem, ver seção 14.2.

20.10 Materiais de referência e padrões de medição devem ser manipulados de forma a protegê-los de contaminação ou degradação. Procedimentos para treinamento do pessoal devem refletir estes requisitos.

21. CONTROLE DE QUALIDADE E ENSAIOS DE PROFICIÊNCIA

21.1 O significado dos termos `controle de qualidade´ e `Garantia da Qualidade (GQ)´ varia, muitas vezes, conforme o contexto. Em termos práticos, GQ se refere às medidas globais tomadas pelo laboratório para regulamentar a qualidade, enquanto que controle de qualidade descreve as medidas individuais que dizem respeito à qualidade de amostras individuais ou lotes de amostras.

21.2 Como parte de seus sistemas da qualidade e para monitorar o desempenho analítico diário e lote a lote, os laboratórios devem operar um nível apropriado de verificações de controle interno da qualidade (CQ) e participar, sempre que possível, de rodadas de ensaios de proficiência apropriados (CQ externo). O nível e tipo de CQ irão depender do estado crítico, natureza da análise, freqüência da análise, tamanho do lote, grau de automação, e da dificuldade e confiabilidade dos ensaios.

21.3 ***CQ Interno***: Este pode assumir uma variedade de formas, incluindo o uso de: brancos; padrões de medida; amostras fortificadas; amostras cegas; análises de replicatas e amostras de CQ. O uso de gráficos de controle é recomendado, particularmente para o monitoramento das amostras de controle de CQ (Ref C20-22).

21.3.1 O nível de CQ adotado deve ser comprovadamente suficiente para assegurar a validade dos resultados. Diferentes tipos de controle de qualidade podem ser usados para monitorar diferentes tipos de variações no processo. Amostras de CQ, analisadas em intervalos no lote de amostras, irão indicar a dispersão do sistema; o uso de vários tipos de branco irá indicar quais são as contribuições do instrumento, além daquelas atribuídas ao analito; análises em duplicata fornecem uma verificação da repetitividade, conforme ocorre com o uso de amostras cegas.

21.3.2 As amostras de CQ são amostras típicas, suficientemente estáveis e disponíveis em quantidades suficientes para serem disponibilizadas para análise durante um período prolongado de tempo. Ao longo desse período, a variação aleatória no desempenho do processo analítico pode ser acompanhada pelo monitoramento do resultado obtido na análise da amostra de CQ, normalmente através de sua inclusão num gráfico de controle. Uma vez que o resultado da amostra de CQ seja aceitável, é provável que os resultados das amostras, do mesmo lote em que foi incluída a amostra de CQ, possam ser considerados confiáveis. A aceitabilidade do resultado obtido com a amostra de CQ deve ser verificada o mais breve possível no processo analítico, a fim de que, no caso de falha do sistema, o menor esforço possível tenha sido gasto na análise de amostras não confiáveis.

21.3.3 É responsabilidade do analista definir e justificar um nível apropriado de controle de qualidade, baseado numa avaliação de risco, que leve em conta a confiabilidade do método, e o estado crítico do trabalho. É amplamente aceito que em análises de rotina, um nível de CQ interno de 5% seja definido como razoável, isto é, 1 em cada 20 amostras analisadas deve ser uma amostra de CQ. Contudo, para métodos de rotina robustos, com alta quantidade de amostras, um menor nível de CQ pode ser razoável. Para procedimentos mais complexos, um nível de 20% não é incomum e, em certas ocasiões, mesmo 50% pode ser requerido. Para análises realizadas com pouca freqüência, uma validação completa do sistema deve ser realizada em cada ocasião. Isto pode envolver tipicamente o uso de um material de referência contendo uma concentração certificada ou conhecida de analito, seguido por análises de replicatas da amostra e da amostra fortificada (uma amostra à qual uma quantidade conhecida do analito foi deliberadamente adicionada). Análises realizadas com mais freqüência devem ser submetidas a procedimentos sistemáticos de CQ, incorporando o uso de gráficos de controle e amostras de verificação.

21.4 ***Ensaios de proficiência (CQ Externo)***: Uma das melhores maneiras para um laboratório analítico monitorar seu desempenho, com relação a seus próprios requisitos e às normas de outros laboratórios, é participar regularmente de rodadas de ensaios de proficiência (Ref C7). Ensaios de proficiência ajudam a destacar não só o desempenho da repetitividade e reprodutibilidade entre laboratórios, mas também a existência de erros sistemáticos, isto é, a tendência. Ensaios de proficiência e outros tipos de intercomparações são aceitos como meios importantes de monitoramento da qualidade em níveis nacional e internacional.

21.5 Os organismos de acreditação também reconhecem o benefício desse tipo de ensaios como evidência objetiva da competência do laboratório e da eficiência do processo de avaliação em si. Quando possível, os laboratórios devem selecionar rodadas de Ensaios de Proficiência, que operem de acordo com as boas práticas internacionais (Ref C7) e tenham transparência evidente da qualidade, p. ex. pela acreditação ou outra inspeção de parceiros (Ref B16). Laboratórios acreditados são normalmente solicitados à participar em ensaios de proficiência, (quando existirem rodadas apropriadas), como parte integrante de seus protocolos de GQ. É importante monitorar os resultados dos ensaios de proficiência, como um meio de verificação de desempenho e tomada de ações corretivas, quando necessário.

22. COMPUTADORES E SISTEMAS CONTROLADOS POR COMPUTADOR

22.1 Em laboratórios de ensaios químicos, computadores possuem uma ampla variedade de usos, incluindo:

- controle de condições ambientais críticas;
- monitoramento e controle do inventário;
- programação de calibrações e manutenções;
- controle de estoque de reagentes e padrões de medida;
- projeto e desempenho de experimentos estatísticos;
- programação de amostras e monitoração da produção do trabalho;
- geração de gráficos de controle;
- monitoramento de procedimentos de ensaio;
- controle da instrumentação automatizada;
- captura, armazenagem, recuperação, processamento de dados, manual ou automaticamente;
- correspondência das amostras com os dados em biblioteca;
- geração de relatórios de ensaio,

- processamento de texto;
- comunicação.

22.2 Interfaces e cabos fornecem conexões físicas entre diferentes partes do computador ou entre diferentes computadores. É importante que as interfaces e cabos sejam escolhidos para se adequarem à aplicação específica, visto que eles podem afetar seriamente a velocidade e a qualidade da transferência dos dados.

22.3 O ambiente onde se processam ensaios químicos cria riscos específicos para a operação de computadores e armazenagem das mídias de computador. Recomendações normalmente podem ser encontradas nos manuais de operação, porém, cuidados especiais devem ser adotados visando evitar danos provocados por produtos químicos, contaminação microbiológica ou por poeira, aquecimento, umidade, e campos magnéticos.

22.4 A validação inicial deve verificar o maior número possível de aspectos da operação de um computador. Verificações similares devem ser realizadas se o uso do computador for alterado, ou após manutenção, ou revisão do software. Quando um computador for utilizado para a coleta e processamento de dados associados a ensaios químicos, para validação desta função, é geralmente suficiente assumir sua correta operação se o computador produzir respostas previstas para a entrada de parâmetros conhecidos. Programas de computador que efetuam cálculos podem ser validados pela comparação com resultados calculados manualmente. Deve ser notado que algumas falhas poderão ocorrer somente quando um grupo particular de parâmetros for inserido. Em ensaios químicos, verificações adequadas sobre as funções de coleta e manipulação de dados podem ser feitas utilizando-se um Material de Referência Certificado para a validação inicial, usando-se, então, um padrão secundário de medida como material de controle de qualidade para verificações repetitivas regulares. Quaisquer recomendações feitas pelo fabricante devem ser levadas em consideração. O procedimento de validação usado para um sistema em particular e quaisquer dados registrados durante a validação devem ser documentados. Pode ser difícil validar esses sistemas de forma isolada do instrumento analítico que produz o sinal original. Normalmente, todo o sistema é validado de uma só vez, através do uso de padrões de medida química ou materiais de referência. Essa validação é normalmente aceitável. É conveniente ilustrar a validação usando-se exemplos de aplicações típicas:

22.4.1 ***Programas processadores de texto*** são amplamente usados em laboratórios

para gerar uma ampla variedade de documentação. O laboratório deve assegurar que o uso de programas processadores de texto seja suficientemente controlado a fim de prevenir a produção de relatórios não-autorizados ou outros documentos. Em casos mais simples, onde o computador representa um pouco mais do que uma máquina de escrever eletrônica, a validação é alcançada verificando-se manualmente as cópias impressas. Sistemas mais sofisticados lêem e processam dados para produzir automaticamente relatórios em formatos predeterminados. Esses sistemas necessitarão de verificações adicionais.

22.4.2 ***Instrumentos controlados por microprocessador*** terão normalmente uma rotina de verificação automática que é ativada quando o instrumento é ligado, e deverá incluir o reconhecimento e verificação de todos os equipamentos periféricos. Muitas vezes o software não é acessível. Sob muitas circunstâncias, a validação pode ser realizada pelo teste dos vários aspectos de funcionamento do instrumento, usando-se parâmetros conhecidos, p. ex: pelo ensaio de materiais de referência, padrões de medida física ou química, ou amostras de controle de qualidade.

22.4.3 ***Sistemas de manipulação ou processamento de dados, sistemas de integração.*** Antes de poder ser processado, o sinal de saída do instrumento analítico precisará, normalmente, ser convertido em um sinal digital, usando-se um conversor analógico/digital. Os dados digitalizados são então convertidos em um sinal reconhecível (números, picos, espectros, de acordo com o sistema) pelo algoritmo do software. O algoritmo toma várias decisões (tal como decidir onde os picos começam e terminam, ou quando um número deve ser arredondado para cima ou para baixo), de acordo com as instruções programadas. O algoritmo é uma fonte comum de desempenho imprevisto, e a validação deve testar a lógica por trás das decisões tomadas pelo algoritmo.

22.4.4 ***Sistema automatizado controlado por computador.*** Sistema que pode envolver um ou mais dos exemplos anteriores, operado de forma simultânea ou numa seqüência de tempo controlada. Estes sistemas normalmente serão validados pela verificação da operação satisfatória (incluindo desempenho em circunstâncias extremas) e estabelecimento da confiabilidade do sistema antes que seja permitido que ele funcione sem acompanhamento. A validação deve consistir de uma validação de componentes individuais, além de uma verificação global sobre o diálogo entre componentes individuais e o computador de controle. Uma avaliação deve ser feita sobre as possíveis causas de mau funcionamento do sistema. Uma consideração importante é que o computador, interfaces e cabos

de conexão tenham suficiente capacidade para as tarefas requeridas. Se qualquer parte do sistema for sobrecarregada, sua operação será retardada, havendo a possibilidade de perda de dados. Isto pode ter sérias conseqüências quando as operações incluírem rotinas sincronizadas. Quando possível, o software de controle deve ser ajustado para reconhecer e destacar qualquer mau funcionamento e identificar os dados associados. O uso de amostras de controle de qualidade e padrões analisados em intervalos nos lotes de amostras deve ser então suficiente para monitorar o correto desempenho em bases diárias. Rotinas de cálculo podem ser verificadas por meio de testes com valores de parâmetros conhecidos. A transferência eletrônica de dados deve ser verificada para assegurar que nenhuma degradação tenha ocorrido durante a transmissão. Isto pode ser realizado no computador com o uso de 'arquivos de verificação', mas, sempre que praticável, a transmissão deve ser resguardada por uma cópia impressa dos dados.

22.4.5 ***Sistemas de Gerenciamento de Informações do Laboratório (SGIL).*** Estes sistemas são cada vez mais populares como um meio de gerenciamento das atividades dos laboratórios. Um SGIL é um sistema baseado em computador com software que permite o confronto eletrônico, cálculo e disseminação de dados, frequentemente recebidos diretamente dos instrumentos analíticos. Ele incorpora processamento de texto, banco de dados, planilhas eletrônicas e capacidade de processamento de dados, e pode executar uma variedade de funções, incluindo: registro e rastreamento de amostras; atribuição e alocação de ensaios; geração de folhas de trabalho; processamento dos dados capturados; controle de qualidade; controle financeiro; e geração de relatórios. A operação do SGIL pode estar limitada ao próprio laboratório, ou pode fazer parte de um amplo sistema de computação corporativo. As informações podem ser inseridas manualmente ou descarregadas diretamente da instrumentação analítica, ou de outros dispositivos eletrônicos, tais como leitores de código de barras. As informações fornecidas pelo sistema podem ser geradas em meio eletrônico ou por cópias impressas. As saídas eletrônicas podem se constituir de dados brutos ou processados, gravados em outros computadores dentro da mesma organização, ou remotos, transmitidos através de um modem ou por correio eletrônico. Da mesma forma, as informações podem ser descarregadas para um disco de armazenamento eletrônico. Quando os dados são transmitidos de um sistema para outro, pode haver o risco da corrupção de dados devido à incompatibilidades dos sistemas ou da necessidade de reformatar as informações. Um sistema bem projetado permite que altos níveis de GQ sejam atingidos, desde o ponto de entrada de amostras até a produção do relatório final. Requisitos de validação específicos incluem o gerenciamento do acesso a várias funções, os passos de auditoria

para catalogar alterações e o gerenciamento de arquivos. Quando os dados forem transmitidos eletronicamente será necessário incorporar verificações de segurança para proteção contra corrupção de dados e acesso não-autorizado.

23. AUDITORIA DO LABORATÓRIO E ANÁLISE CRÍTICA

23.1 Ver seção 3.6 acerca da terminologia aplicada.

23.2 Um aspecto importante da gestão da qualidade é o reexame periódico do sistema da qualidade pela própria gerência do laboratório. Em geral, todos os aspectos do sistema da qualidade devem ser examinados pelo menos uma vez por ano. O sistema deve ser examinado de duas maneiras. Em primeiro lugar, ele deve ser examinado para assegurar que esteja suficientemente bem documentado para permitir uma implementação adequada e consistente, e que o pessoal esteja realmente seguindo o sistema descrito. Este exame é normalmente conhecido como auditoria (em oposição à avaliação ou auditoria externa conduzida por órgãos de acreditação ou certificação). Em segundo lugar, o sistema deve ser examinado a fim de verificar se ele atende aos requisitos do laboratório, de seus clientes e, se apropriado, do padrão de gestão da qualidade. Ao longo do tempo, as necessidades do laboratório e de seus clientes irão se modificar e o sistema da qualidade deve evoluir para continuar a atender seus objetivos. Este segundo tipo de exame é normalmente conhecido como análise crítica, e deve ser realizado pelo menos anualmente. Esta análise é realizada pelo nível gerencial do laboratório e utiliza informações de várias fontes, incluindo resultados de auditorias internas, avaliações externas, participação em ensaios de proficiência, estudos do controle interno da qualidade, tendências de mercado, reclamações e elogios de clientes, etc.

23.3 O programa de auditoria e análise crítica é normalmente coordenado pelo gerente da qualidade do laboratório, que é responsável por assegurar que os auditores tenham o treinamento correto, orientação e autoridade necessária para condução da auditoria. As auditorias são normalmente realizadas por pessoal do laboratório que trabalha fora da área em exame. Isto, é claro, nem sempre é possível onde o grupo de trabalho é reduzido.

23.4 As auditorias podem ser realizadas de duas maneiras básicas. Na auditoria horizontal, o auditor irá examinar em detalhes aspectos individuais do sistema da qualidade, por exemplo, calibração ou relatórios. Na auditoria vertical, o auditor irá selecionar uma amostra e acompanhar seu andamento no laboratório, desde o recebimento até a disposição final, examinando todos os aspectos do

sistema da qualidade relacionados ao seu processamento.

23.5 Uma lista de verificação, detalhando os aspectos de um laboratório químico que devem ser examinados durante uma auditoria da qualidade, se encontra listada no Apêndice A deste Guia.

23.6 A análise-crítica pela gerência deve ser realizada em intervalos regulares. Uma vez por ano é normalmente suficiente, muito embora, para laboratórios com um amplo escopo de acreditação, pode ser necessário dividir a análise crítica em módulos distintos, que podem ser examinados durante o curso de um ano. Os assuntos abordados na análise crítica anual devem incluir uma avaliação do sistema da qualidade e questões que afetem a qualidade analítica, auditorias internas, ações corretivas e preventivas, *feedback* e reclamações de clientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A seção a seguir apresenta Referências úteis (Subseções A, B, C — estas são referidas no texto — endereços de Websites (D), e a Bibliografia (E)).

A. GUIAS CITAC e EURACHEM (disponíveis em CITAC www.citac.ws e EURACHEM www.eurachem.org)

1. Quality Assurance for Research and Development and Non-Routine Analysis: 1998 (CITAC/EURACHEM)

2. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement: 2000 (CITAC/EURACHEM) (ver também site - Ref D12)

3. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: 1998 (EURACHEM)

4. Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement: 1998 (EURACHEM/IUPAC/ISO/A.O.A.C.I)
5. Selection, Use & Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes by Laboratories: 2000 (EURACHEM)

6. CITAC Policy Statement on Traceability in Chemical Measurement: 2000

7. CITAC/EURACHEM Guide on Traceability in Chemical Measurements: 2002 (em preparação)

B. REFERÊNCIAS BÁSICAS

1. ISO/IEC 17025:1999 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

2. ISO 9000:2000 Quality Management Systems - Fundamentals & Vocabulary

3. OECD Principles of Good Laboratory Practice: 1998 (Code: ENV/MC/CHEM(98)17 download: http://www1.oecd.org/ehs/ehsmono/01E88455.pdf)

4. ISO/IEC Guide 2:1996 Standardization and related activities - General vocabulary (currently under revision as ISO 17000)

5. ISO 9001:2000 Quality Management Systems - Requirements

6. International vocabulary of basic and general terms in metrology (VIM) - 2nd edition 1993 (ISO/BIPM/IEC/IFCC/IUPAC/IUPAP/OIML)

7. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), ISO Geneva Switzerland, 1995.

8. Meeting the Measurement Uncertainty and Traceability Requirements of ISO/IEC 17025 in Chemical Analysis" - B King, Fresenius Journal, 2001

9. The selection and use of reference materials - A basic guide for laboratories and accreditation bodies - draft EEEE/RM 2002 - prepared by B King 2000

10. Position of third party quality assessment of reference materials and their production EEEE/RM/069 rev 1: Draft 2001

11. APLAC Policy and Guidance on the Estimation of Uncertainty of Measurement in Testing – Draft April 2002

12. ILAC P10: 2002 ILAC Policy on Traceability of Measurements Results

13. ILAC G8: 1996 Guidelines on Assessment and Reporting of Compliance with

Specification

14. ILAC G9: 1996 Guidelines for the Selection and Use of Certified Reference Materials

15. ILAC G12: 2000 Guidelines for the Requirements for the Competence of Reference Material Producers
16. ILAC G13: 2000 Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes

17. ILAC G15: 2001 Guidance for Accreditation to ISO/IEC 17025

18. ILAC G17: 2002 Guidance for Introducing the Concept of Uncertainty of Measurement in Testing in Association with the Application of the Standard ISO/IEC 17025

Nota: Outras Diretrizes produzidas por Órgãos Regionais de Acreditação são também relevantes aqui (ver endereços de Websites na Seção D, nºs 7, 8 e 9 abaixo). Além disto, a maioria dos órgãos nacionais de acreditação publicam diretrizes fundamentando seus requisitos (normalmente baseados em normas ISO).

C. OUTRAS REFERÊNCIAS (Guias e Normas ISO)

1. ISO Guide 30:1992 Terms and definitions used in connection with reference materials

2. ISO Guide 31:2000 Reference materials -- Contents of certificates and labels

3. ISO Guide 32:1997 Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials

4. ISO Guide 33:2000 Uses of certified reference materials

5. ISO Guide 34:2000 General requirements for the competence of reference material producers
6. ISO Guide 35:1989 (under revision) Certification of reference materials -- General and statistical principles

7. ISO/IEC Guide 43:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons - Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes and Part 2: Selection

and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies

8. ISO/IEC Guide 58: 1993 Calibration and testing laboratory accreditation systems – general requirements for operation and recognition. (To be replaced by ISO/IEC 17011 General requirements for bodies providing assessment and accreditation)

9. ISO/IEC Guide 62:1996 General requirements for bodies operating assessment and certification/registration of quality systems

10. ISO 78-2:1999 Chemistry -- Layouts for standards -- Part 2: Methods of chemical analysis

11. ISO/DIS 10576-1:2001 Statistical Methods - Guidelines for the evaluation with specified requirements Pt 1. General principles

12. ISO 3534 Statistics -- Vocabulary and symbols -- Parts 1, 2 and 3 (1999)

13. ISO/DTS 21748-2002 (under preparation) Guide to the use of repeatability and reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation.

14. ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 1: General principles and definitions ISO 5725-1:1994/Cor 1:1998

15. ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method

16. ISO 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method

17. ISO 5725-4:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method
18. ISO 5725-5:1998 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method

19. ISO 5725-6:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and

results -- Part 6: Use in practice of accuracy values

20. ISO 7870:1993 Control charts - General guide and introduction

21. ISO 7966:1993 Acceptance control charts

22. ISO 8258:1991 Shewhart control charts.

D. ENDEREÇOS DE WEBSITES ÚTEIS

1. CITAC - www.citac.ws

2. EURACHEM - www.eurachem.org

3. ISO - www.iso.ch

4. (ISO)REMCO - www.iso.org/remco

5. COMAR (Base de Dados dos Materiais de Referência - www.comar.bam.de

6. A.O.A.C. - www.A.O.A.C..org

7. ILAC - www.ilac.org

8. APLAC - www.ianz.govt.nz/aplac

9. EA - www.european-accreditation.org

10. BIPM - www.bipm.fr

11. OECD - www.oecd.org

12. www.mutraining.com (site baseado no treinamento sobre credenciamento e incerteza de medida)

13 www.measurementuncertainty.org (fórum/máquina de busca MU – vinculada à Ref A2)

E. BIBLIOGRAFIA

1. A.O.A.C. International – ISO 17025 and the Laboratory – An Introduction to Laboratory Accreditation: 2000
(A.O.A.C. Internacional – ISO 17025 e o Laboratório – Uma Introdução a Acreditação de Laboratórios: 2000)

2. A.O.A.C. International – Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories – 3rd Edition 2000 – F M Garfield, E Klesten, J Husch ISBN-0-935584-70-6
(A.O.A.C. Internacional – Princípios da Garantia da Qualidade para Laboratórios Analíticos – 3ª Edição 2000 – F M Garfield, E Klesten, J Husch ISBN-0-935584-70-6)

3. Crosby, Neil T; Patel, Indu, General principles of good sampling practice, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1995
(Crosby, Neil T; Patel, Indu, Princípios gerais de boas práticas de amostragem, Cambridge: Sociedade Real de Química, 1995)

4. Enell, J. W., "Which Sampling Plan Should I Choose?", Journal of Quality Technology 1984, 16(3), 168-171
(Enell, J. W., "Que Plano de Amostragem Devo Escolher?", Jornal de Tecnologia da Qualidade 1984, 16(3), 168-171)

5. Garfield, F. M., "Sampling in the Analytical Scheme", J. – Assoc. Off. Anal. Chem. 1989, 72(3), 405-411
(Garfield, F. M., "Amostragem no Esquema Analítico", J. – Assoc. Profissional de Quím. Anal. 1989, 72(3), 405-411)

6. Gy, Pierre, Sampling for analytical purposes, Chichester: Wiley, 1998
(Gy, Pierre, Amostragem para fins analíticos, Chichester: Wiley, 1998)

7. Horwitz, W., "Nomenclature for sampling in Analytical Chemistry", IUPAC, Pure Appl. Chem. 1990, 62(6), 1193-1208
(Horwitz, W., "Nomenclatura para amostragem em Química Analítica", IUPAC, Quím. Pura Apl. 1990, 62(6), 1193-1208)

8. Horwitz, W., "Problems of Samplings and Analytical Methods", J. – Assoc. Off. Anal. Chem. 1976, 59(6), 1197-1203
(Horwitz, W., "Problemas de Amostragens e Métodos Analíticos", J. – Assoc. Profissional de Quím. Anal. 1976, 59(6), 1197-1203)

9. Horwitz, W., "Design, conduct and interpretation of method performance stu-

dies", IUPAC Protocol, 1994
(Horwitz, W., "Projeto, condução e interpretação dos estudos de desempenho de métodos", Protocolo IUPAC, 1994)

10. Kateman, G., Buydens, L., Quality Control in Analytical Chemistry, 2nd ed. New York: Wiley, 1993
(Kateman, G., Buydens, L., Controle de Qualidade em Química Analítica, 2ª ed. New York: Wiley, 1993)

11. Keith, L. H., Environmental Sampling and Analysis, A Practical Guide, Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1991
(Keith, L. H., Amostragem e Análise Ambiental, Um Guia Prático, Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1991)

12. Keith, L. H., Principles of Environmental Sampling, ACS, Washington DC, 1988
(Keith, L. H., Princípios da Amostragem Ambiental, ACS, Washington DC, 1988)

13. Keith, Lawrence H (Ed), Principles of environmental sampling, 2nd ed, Washington DC, American Chemical Society 1996
(Keith, Lawrence H (Ed), Princípios da amostragem ambiental, 2ª ed, Washington DC, Sociedade Americana de Química1996)

14. Kratochvil, B., Wasllace, D., and Taylor, J. K., "Sampling for Chemical Analysis", Anal. Chem. 1984, 56(5), 113R-129R
(Kratochvil, B., Wasllace, D., e Taylor, J. K., "Amostragem para Análise Química", Quím. Anal. 1984, 56(5), 113R-129R)

15. Miller, J. C.; Miller, J. N. Statistics for Analytical Chemistry, 4th ed Ellis Horwood 1998
(Miller, J. C.; Miller, J. N. Estatística para Química Analítica, 4ª ed. Ellis Horwood 1998)

16. Prichard, E., Analytical Measurement Terminology – (UK´s Valid Analytical Measurement Program, LGC Ltd) ISBN 0-85404-443-4, 2000
(Prichard, E., Terminologia de Medição Analítica – (Programa de Medição Analítica Válido no RU, LGC Ltd) ISBN 0-85404-443-4, 2000)

17. Prichard, E., Quality in the Analytical Chemistry Laboratory, ACOL, Wiley 1997
(Prichard, E., Qualidade no Laboratório de Química Analítica, ACOL, Wiley 1997)

18. Stoeppler, Marcus (Ed), Sampling and sample preparation: practical guide for analytical chemists; Berlin: Springer Verlag, 1997
(Stoeppler, Marcus (Ed), Amostragem e preparação de amostras: guia prático para químicos analíticos; Berlim: Springer Verlag, 1997)

19. Taylor, B. N., Kuyatt, C. E., Guidelines for evaluating and expressing uncertainty in NIST measurement results, NIST technical note 1297, 1994, National Institute of Standards and Technology
(Taylor, B. N., Kuyatt, C. E., Diretrizes para avaliação e divulgação da incerteza em resultados de medidas NIST, nota técnica NIST 1297, 1994, Instituto Nacional de Normas e Tecnologia)

20. Taylor, J. K., "Quality Assurance of Chemical Measurements", Lewis Publishers, Michigan, 1987
(Taylor, J. K., "Garantia da Qualidade de Medições Químicas", Lewis Publishers, Michigan, 1987)

21. UK DTI VAM Programme – General Guidelines for use with a protocol for QA of Trace Analysis 1998
(Programa UK DTI VAM – Diretrizes Gerais para uso com um protocolo para GQ de Análise Residual 1998)

22. Youden, W. J., and Steiner, E. H., Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists. Statistical techniques for collaborative tests. Planning and analysis of results of collaborative tests. Washington DC: A.O.A.C., 1975
(Youden, W. J., e Steiner, E. H., Manual estatístico da Associação Profissional de Químicos Analíticos. Técnicas estatísticas para ensaios cooperativos. Planejamento e análise de resultados dos ensaios cooperativos. Washington DC: A.O.A.C., 1975)

SIGLAS

Seguem alguns acrônimos comuns:

A.O.A.C. – Association of Official Analytical Chemists (USA)

APLAC – Asia-Pacific Laboratory Accreditation Cooperation

BIPM – International Bureau of Weights and Measures

CCQM -Consultative Committee for Amount of Substance

CITAC – Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry

EA – European Cooperation for Accreditation

IEC – International Electrotechnical Commission

ILAC – International Laboratory Accreditation

ISO – International Organization for Standardization

ISO/REMCO – International Organization for Standardization, Committee on Reference Materials
IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

JCTLM – Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

OIML - International Organization on Legal Metrology

APÊNDICE A

Auditoria da Qualidade – Áreas de particular importância em um laboratório químico.

1. Pessoal

i) O pessoal possui a combinação adequada de instrução, qualificações acadêmicas ou vocacionais, experiência e treinamento prático para o serviço desempenhado.

ii) O treinamento prático é realizado segundo critérios estabelecidos, os quais, sempre que possível, são objetivos. São mantidos registros atualizados dos treinamentos.

iii) Os ensaios somente são realizados por analistas autorizados.

iv) O desempenho do pessoal realizando as análises é observado pelo auditor.

2. Ambiente

i) O ambiente do laboratório é adequado para o trabalho realizado.

ii) As instalações e utilizades do laboratório são adequados para o trabalho realizado.

iii) Existe separação adequada entre trabalhos potencialmente conflitantes.

iv) As áreas do laboratório são suficientemente limpas e organizadas, para garantir que a qualidade do trabalho realizado não seja comprometida.

v) Existe separação adequada na recepção de amostras, preparação, depuração, e áreas de medição, para garantir que a qualidade do trabalho realizado não seja comprometida.

vi) O cumprimento dos regulamentos de segurança é consistente com os requisitos da norma de gerenciamento da qualidade.

3. Equipamento

i) O equipamento em uso é adequado a sua finalidade.

ii) Os principais instrumentos são corretamente cuidados, sendo mantidos registros de sua manutenção.

iii) Instruções adequadas para o uso de equipamentos estão disponibilizadas.

iv) Equipamentos críticos, p. ex: balanças, termômetros, vidrarias, cronômetros, pipetas etc. são individualmente identificados, corretamente calibrados (com rastreabilidade adequada), os certificados correspondentes ou outros registros demonstrando a rastreabilidade a padrões de medida nacionais de medição estão disponíveis.

v) O equipamento calibrado é adequadamente etiquetado, ou de outra forma identificado, para assegurar que ele não seja confundido com equipamento não-calibrado, e para garantir que seu estado de calibração fique claro ao usuário.

vi) Verificações de desempenho e procedimentos de calibração dos instrumentos são documentados e disponibilizados aos usuários.

vii) Procedimentos de calibração e verificações de desempenho de instrumentos são realizados em intervalos apropriados e mostram que a calibração é mantida e o desempenho diário é aceitável. Ações corretivas apropriadas são tomadas, quando necessário.

viii) Registros de calibração, verificações de desempenho e ações corretivas são mantidas.

4. Métodos e Procedimentos

i) Métodos desenvolvidos internamente são plenamente documentados, adequadamente validados e autorizados para uso.

ii) Alterações de métodos são adequadamente autorizadas.

iii) Cópias de métodos publicados e oficiais são disponibilizadas.

iv) A versão mais atualizada do método é disponibilizada ao analista.

v) As análises (são observadas para verificar se) seguem os métodos especificados.

vi) Os métodos têm um nível apropriado de orientações sobre a calibração e o controle de qualidade.

vii) A incerteza foi estimada.

5. Padrões de Medidas Química e Física, Materiais de Referência Certificados e Reagentes.

i) Os padrões de medida requeridos para os ensaios são prontamente disponibilizados.
ii) Os padrões de medida são certificados, ou são os "melhores" disponíveis.
iii) A preparação dos padrões de trabalho (padrões secundários) e dos reagentes é documentada.

iv) Padrões de medida, materiais de referência e reagentes são corretamente identificados e armazenados. Onde apropriado, são aplicadas (anotadas) as datas de "abertura" e de validade.

v) Novos lotes de padrões de medida e reagentes críticos ao desempenho do método são confrontados com lotes antigos (anteriores) antes do uso.

vi) Materiais com a correta especificação estão sendo usados nos ensaios.

vii) Quando padrões de medida ou materiais de referência forem certificados, cópias do certificado são disponibilizadas para inspeção.

6. Controle de Qualidade

i) Existe um nível apropriado de controle de qualidade para cada ensaio.

ii) Quando gráficos de controle são usados, o desempenho é mantido dentro de critérios aceitáveis.

iii) Amostras verificadoras do CQ são ensaiadas por procedimentos definidos, na freqüência requerida, e existe o registro atualizado dos resultados e medidas tomadas quando os resultados excedem os limites de ação.

iv) Os resultados de reanálises aleatórias de amostras apresentam uma medida de concordância aceitável em relação aos resultados das análises originais.

v) Quando apropriado, o desempenho em esquemas de ensaios de proficiência e/ou comparações interlaboratoriais é satisfatório e não destacou quaisquer problemas ou problemas em potencial.

vi) Existe um sistema eficaz para vinculação do desempenho nos ensaios de proficiência com o controle de qualidade diário.

7. Controle das Amostras

i) Existe um sistema eficaz documentado para o recebimento de amostras, relacionando essas amostras às análises requisitadas, mostrando o andamento da análise, emissão de relatório, e destinação final da amostra.

ii) As amostras são corretamente identificadas e armazenadas.

8. Registros

i) Cadernos de anotações/folhas de trabalho (planilhas) ou outros registros apresentam a data do ensaio, analista, analito(s), detalhes da amostra, observações do ensaio, controle de qualidade, todos os cálculos brutos, quaisquer descrições de instrumentos relevantes, dados brutos, e dados de calibração relevantes.

ii) Cadernos de anotações/planilhas são indeléveis, sendo os erros riscados ao invés de apagados ou ocultados, e os registros são assinados pelos analistas.

iii) Quando um erro for corrigido a alteração é rastreável à pessoa que fez a correção.

iv) O laboratório possui e usa procedimentos para verificar a transferência de dados e cálculos realizados.

9. Relatórios de Ensaio

i) As informações apresentadas em relatórios são consistentes com os requisitos da norma, do cliente, e refletem quaisquer condições estipuladas no método documentado.

10. Diversos

i) Procedimentos documentados estão implementados para lidar com reclamações e dúvidas, e falhas do sistema.

ii) Existe evidência adequada de ação corretiva (no caso de falhas no sistema) e ação preventiva. A efetividade é avaliada em ambos os casos.

iii) O Manual da Qualidade do Laboratório está atualizado e é acessível a todo o pessoal envolvido no trabalho.

iv) Existem procedimentos documentados para a subcontratação de trabalhos, incluindo a verificação de adequação.

v) Auditorias verticais em amostras aleatórias (isto é, verificações feitas numa amostra, examinando todos os procedimentos associados a sua análise, desde o recebimento até a emissão de um relatório) não ressaltam quaisquer problemas.

APÊNDICE B

Intervalos de Calibração e Verificações de Desempenho.

B1. Na Tabela App B-1 são dadas orientações sobre a calibração de equipamentos em uso normal em laboratórios analíticos e dos quais a calibração de outros instrumentos pode ser dependente. Recomendações mais abrangentes são disponiveis na literatura (ver bibliografia nº 32) e também em manuais de equipamentos.

Tabela App B-1

	Tipo de Instrumento	*Freqüência de Verificação*	*Parâmetros a serem Verificados*
(a)	Balanças	Depende do uso	Linearidade, Ponto zero, Exatidão (usando pesos calibrados)
(b)	Vidrarias Volumétricas	Depende do uso	Exatidão, Precisão (pipetas/buretas)
(c)	Hidrômetros (em operação)	Anualmente	Calibração de um ponto contra hidrômetro de referência
(d)	Hidrômetros (de referência)	5 anos	Calibração de um ponto usando-se padrão de medida de densidade específica conhecida
(e)	Barômetros *	5 anos	Um ponto
(f)	Cronômetros (ver nota)	2 anos ou menos, dependendo do uso	Exatidão
(g)	Termômetros (de referência)	5 anos	Pontos críticos na escala, pontos fixos, p. ex. ponto de congelamento
(h)	Termômetros	Anualmente, dependendo do uso	Verificação de pontos específicos com termômetro de referência

Nota: Instrumentos assinalados com "*" normalmente serão calibrados em um laboratório de calibração acreditado, mas devem, pelo menos, apresentar rastreabilidade a padrões de medida nacionais.

Sinais de rádio-tempo nacionais, ou sinais de tempo por telefone, proporcionam uma fonte apropriada de calibração rastreável do tempo absoluto e da diferença de tempo. Cronômetros com movimentos eletrônicos/de quartzo são geralmente mais exatos e estáveis do que cronômetros mecânicos convencionais, e necessitarão ser calibrados com menor freqüência.

B2. Os seguintes aspectos dos instrumentos abaixo listados podem precisar ser verificados, dependendo do método:

B2.1 *Cromatógrafos (em geral):*

i) Verificações do sistema geral, precisão de injeções repetidas de amostras, transporte.

ii) Desempenho da coluna (capacidade, resolução, retenção).

iii) Desempenho do detector (saída, resposta, ruído, dispersão, seletividade, linearidade).

iv) Sistemas de aquecimento/termostatizados (exatidão, precisão, estabilidade, características de rampa).

v) Amostrador automático (exatidão e precisão das rotinas sincronizadas).

B2.2 *Cromatografia Líquida e Iônica:*

i) Composição da fase móvel.

ii) Sistema de liberação da fase móvel (precisão, exatidão, isenção de oscilações).

B2.3 *Sistemas de medição por Eletrodo, incluindo condutivímetro, pHmetro e detertor íon-seletivo:*

i) Tendência do eletrodo ou resposta reduzida.

ii) Verificações de ponto fixo e inclinação, usando padrões de medida química.

B2.4 *Aparelhos de Aquecimento/Resfriamento, incluindo freezers, refrigeradores, fornos,*

esterilizadores a ar quente, incubadoras, aparelhos para ponto de fusão e ebulição, banhos de óleo, estufas, autoclaves e banhos-maria:

i) Calibração periódica do sistema sensor de temperatura usando-se termômetro ou pirômetro calibrados, apropriados.

ii) Estabilidade térmica, reprodutibilidade.

iii) Taxas e ciclos de aquecimento/resfriamento.

iv) Capacidade de atingir e manter a pressão ou vácuo.

B2.5 *Espectrômetros e espectrofotômetros, incluindo absorção atômica, determinação fluorimétrica, plasma induzido acoplado – emissão ótica, infravermelho , luminescência, massa, ressonância magnética nuclear, fluorescência ultra-violeta/visível e de raios X:*

i) Exatidão do comprimento de onda selecionado, precisão, estabilidade.

ii) Estabilidade da fonte.

iii) Desempenho do detetor (resolução, seletividade, estabilidade, linearidade, exatidão, precisão).

iv) Relação sinal/ruído.

v) Calibração do detetor (massa, ppm, comprimento de onda, freqüência, absorbância, transmitância, largura de banda, intensidade etc.).

vi) Controladores e indicadores de temperatura interna, onde aplicável.

B2.6 *Microscópios:*

i) Poder de resolução.

ii) Desempenho sob várias condições de iluminação (fluorescência, polarização etc.).

iii) Calibração do retículo (para medição de comprimento).

B2.7 *Amostradores automáticos:*

i) Exatidão e precisão dos sistemas síncronos.

ii) Confiabilidade dos programas de sequenciamento.

iii) Exatidão e precisão do sistema alimentador de amostra.

APÊNDICE C

Comparação entre ISO/IEC 17025:1999 e ISO/IEC Guia: 1990 (Esta tabela é reproduzida da ILAC G15:2001, Diretrizes para Acreditação de acordo com a ISO/IEC 17025)

Item da lista de conteúdo da ISO/IEC 17025	**ISO/IEC 17025 Cláusula**	**ISO/IEC Guia 25**
Escopo	1.1	1.1
	1.2	-
	1.3	-
	1.4	1.3
	1.5	*7.6 Nota*
	1.6	*Introdução*
Referências normativas	2	2
Termos e definições	3	3
Requisitos gerenciais		
Organização	4.1.1	4.1
	4.1.2	1.2
	4.1.3	4.1
	4.1.4	-
	4.1.5 (a)	4.2 a)
	4.1.5 (b)	4.2 b)
	4.1.5 (c)	4.2 i)
	4.1.5 (d)	4.2 c)
	4.1.5 (e)	5.2 b), 5.2 c)
	4.1.5 (f)	4.2 d)
	4.1.5 (g)	4.2 e)
	4.1.5 (h)	4.2 f)
Item da lista de conteúdo da ISO/IEC 17025	**ISO/IEC 17025 Cláusula**	**ISO/IEC Guia 25**
	4.1.5 (i)	4.2 g)
	4.1.5 (j)	4.2 h)

Sistema da qualidade	4.2.1	5.1
	4.2.2	5.1, 5.2 a)
	4.2.2 (a)	5.1
	4.2.2 (b)	5.2 a)
	4.2.2 (d)	5.2 a)
	4.2.2 (e)	5.1
	4.2.3	5.2
	4.2.4	5.2 n)
Controle de documentos	4.3.1	5.2 e)
	4.3.2.1	5.2 d)
	4.3.2.2 (a)	5.1, 5.2 d)
	4.3.2.2 (b)	5.2 d)
	4.3.2.2 (c)	5.2 d)
	4.3.2.2 (d)	5.2 d)
	4.3.2.3	5.2 d)
	4.3.3.1	5.2 d)
	4.3.3.2	5.2 d)
	4.3.3.3	5.2 d)
	4.3.3.4	5.2 d)
Análise crítica dos pedidos, propostas e contratos	4.4.1	5.2 i)
	4.4.1 (a)	5.2 i)
	4.4.1 (b)	5.2 i)
	4.4.1 (c)	5.2 i)
	4.4.2	5.2 i)
	4.4.3	5.2 i)
	4.4.4	5.2 i)
	4.4.5	5.2 i)
Subcontratação de ensaios e calibrações	4.5.1	14.1
	4.5.2	14.1
Item da lista de conteúdo da ISO/IEC 17025	**ISO/IEC 17025 Cláusula**	**ISO/IEC Guia 25**
	4.5.3	-
	4.5.4	14.2

Aquisição de serviços e suprimentos	4.6.1	10.8, 15.2
	4.6.2	15.1
	4.6.3	-
	4.6.4	15.3
Atendimento ao cliente	4.7	-
Reclamações	4.8	16.1
Controle de trabalho não-conforme	4.9.1	5.2 o)
	4.9.1 (a)	5.2 o)
	4.9.1 (b)	5.2 o)
	4.9.1 (c)	5.2 o)
	4.9.1 (d)	5.2 o) , 13.6
	4.9.1 (e)	5.2 o)
	4.9.2	16.2
Ação corretiva	4.10.1	16.2
	4.10.2	16.2
	4.10.3	16.2
	4.10.4	16.2
	4.10.5	16.2
Ação preventiva	4.11.1	-
	4.11.2	-
Controle de registros	4.12.1.1	12.1
	4.12.1.2	12.2
	4.12.1.3	12.2
	4.12.1.4	10.7 e)
	4.12..2.1	12.1
	4.12..2.2	-
	4.12..2.3	-
Auditorias internas	4.13.1	5.3
	4.13.2	5.3
	4.13.3	5.5
Item da lista de conteúdo da ISO/IEC 17025	**ISO/IEC 17025 Cláusula**	**ISO/IEC Guia 25**
	4.13.4	-
Análise crítica pela gerência	4.14.1	5.4

	4.14.2	5.5
Requisitos técnicos		
Generalidades	5.1.1	-
	5.1.2	-
Pessoal	5.2.1	6.1
	5.2.1	6.2
	5.2.3	-
	5.2.4	5.2 e)
	5.2.5	6.3
|Acomodação e condições ambientais	5.3.1	7.1, 7.2
	5.3.2	7.3
	5.3.3	7.4
	5.3.4	7.5
	5.3.5	7.6
Métodos de ensaio e calibração, e validação de metodologia	5.4.1	10.2, 10.1, 10.5
	5.4.2	10.3
	5.4.3	-
	5.4.4	10.4
	5.4.5.1	-
	5.4.5.2	10.4
	5.4.5.3	-
	5.4.6.1	10.2
	5.4.6.2	10.2
	5.4.6.3	-
	5.4.7.1	10.6
	5.4.7.2	10.7
	5.4.7.2 (a)	10.7 b)
	5.4.7.2 (b)	10.7 c)
	5.4.7.2 (c)	10.7 d)
Item da lista de conteúdo da ISO/IEC 17025	**ISO/IEC 17025 Cláusula**	**ISO/IEC Guia 25**
Equipamentos	5.5.1	8.1
	5.5.2	9.1

	5.5.3	10.1
	5.5.4	-
	5.5.5 (a)	8.4 a)
	5.5.5 (b)	8.4 b)
	5.5.5 (c)	-
	5.5.5 (d)	8.4 d)
	5.5.5 (e)	8.4 f)
	5.5.5 (f)	8.4 g)
	5.5.5 (g)	8.4 h)
	5.5.5 (h)	8.4 i)
	5.5.6	8.2
	5.5.7	8.2
	5.5.8	8.3
	5.5.9	-
	5.5.10	-
	5.5.11	-
	5.5.12	-
Rastreabilidade das medições	5.6.1	9.1
	5.6.2.1.1	9.2
	5.6.2.1.2	9.3
	5.6.2.2.1	9.2
	6.5.2.2.2	9.3
Rastreabilidade das medições (cont.)	5.6.3.1	9.4, 9.5
	5.6.3.2	9.7
	5.6.3.3	9.6
	5.6.3.4	-
Amostragem	5.7.1	10.5
	5.7.2	-
	5.7.3	-
Manuseio dos itens de ensaio e calibração	5.8.1	11.4
Item da lista de conteúdo da ISO/IEC 17025	**ISO/IEC 17025 Cláusula**	**ISO/IEC Guia 25**
	5.8.2	11.1
	5.8.3	11.2

	5.8.4	11.3
Garantia da qualidade de resultados de ensaio e calibração	5.9	5.6, 5.6 a)
	5.9 (a)	5.6 c)
	5.9 (b)	5.6 b)
	5.9 (c)	5.6 d)
	5.9 (d)	5.6 e)
	5.9 (e)	5.6 f)
Apresentação dos resultados	5.10.1	13.1
	5.10.2 (a)	13.2 a)
	5.10.2 (b)	13.2 b)
	5.10.2 (c)	13.2 c)
	5.10.2 (d)	13.2 d)
	5.10.2 (e)	13.2 h)
	5.10.2 (f)	13.2 e), 13.2 f)
	5.10.2 (g)	13.2 g)
	5.10.2 (h)	13.2 i)
	5.10.2 (i)	13.2 k)
	5.10.2 (j)	13.2 m)
	5.10.2 (k)	13.2 n)
	5.10.3.1	13.2 j)
	5.10.3.1 (a)	-
	5.10.3.1 (b)	13.2 l)
	5.10.3.1 (c)	-
	5.10.3.1 (d)	-
	5.10.3.1 (e)	-
	5.10.3.2 (a)	-
	5.10.3.2 (b)	--
	5.10.3.2 (c)	--
	5.10.3.2 (d)	-
Item da lista de conteúdo da ISO/IEC 17025	**ISO/IEC 17025 Cláusula**	**ISO/IEC Guia 25**
	5.10.3.2 (e)	--
	5.10.3.2 (f)	-