

ORG. OTINIEL MOREIRA DO NASCIMENTO  
LAIRA LIMA DA SILVA  
IZABEL BASTOS PEREIRA NETA  
DOUGLAS WELLINGTON FERREIRA E FERREIRA  
ROSEMARY MARIA PIMENTEL COUTINHO  
VITÓRIA NAZARÉ COSTA SEIXAS

# Carnes e Derivados

PARÂMETROS E METODOLOGIAS PARA  
O CONTROLE DE QUALIDADE





## **Universidade do Estado do Pará**

### **Reitor**

Rubens Cardoso da Silva

### **Vice-Reitor**

Clay Anderson Nunes Chagas

### **Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação**

Renato da Costa Teixeira

### **Pró-Reitora de Graduação**

Ana da Conceição Oliveira

### **Pró-Reitora de Extensão**

Alba Lúcia Ribeiro Raithy Pereira

### **Pró-Reitor de Gestão e Planejamento**

Carlos José Capela Bispo



## **Editora da Universidade do Estado do Pará**

### **Coordenador e Editor-Chefe**

Nilson Bezerra Neto

### **Conselho Editorial**

Francisca Regina Oliveira Carneiro

Hebe Morganne Campos Ribeiro

Joelma Cristina Parente Monteiro Alencar

Josebel Akel Fares

José Alberto Silva de Sá

Juarez Antônio Simões Quaresma

Lia Braga Vieira

Maria das Graças da Silva

Maria do Perpétuo Socorro Cardoso da Silva

Marília Brasil Xavier

Núbia Suely Silva Santos

Robson José de Souza Domingues (Presidente)

Pedro Franco de Sá

Tânia Regina Lobato dos Santos

Valéria Marques Ferreira Normando

© EDUEPA 2018

## Realização

Universidade do Estado do Pará - UEPA  
Editora da Universidade do Estado do Pará - EDUEPA



### Normalização e Revisão

Marco A. da C. Camelo  
Nilson Bezerra Neto

### Capa

Mayra Sarges

### Diagramação

Odivaldo T. Lopes

### Apoio Técnico

Alexandre Nicolau Saraty  
Bruna Toscano Gibson  
Jarina Silva  
Arlene Sales Duarte Caldeira  
Maria Cláudia da Silva Faro

## Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da UEPA / SIBIUEPA

Seixas, Vitória Nazaré Costa

Carne e derivados: parâmetros e metodologias para o controle de qualidade / Vitória Nazaré Costa Seixas et al. – Belém: EDUEPA, 2018.

00 p.

Vários colaboradores

Inclui bibliografias

ISBN: 978-85-8458-036-1

1. Carne - Qualidade. 2. Controle de qualidade. I. Título.

CDD 22.ed. 664.907

Ficha Catalográfica: Rita Almeida CRB-2/1086

### Editora filiada



Associação Brasileira  
das Editoras Universitárias

Editora da Universidade do Estado do Pará - EDUEPA  
Travessa D. Pedro I, 519 - CEP: 66050-100  
E-mail: eduepa@uepa.br/livrariadauepa@gmail.com

---

# **Carnes e Derivados**

**PARÂMETROS E METODOLOGIAS PARA  
O CONTROLE DE QUALIDADE**

---

## PREFÁCIO

Há uma carência de livros brasileiros que abordem exclusivamente metodologias de análises qualitativas e quantitativas como meio de pesquisa. Além desse fato, faz-se necessário trazer à tona a discussão sobre a qualidade dos alimentos, com vista a atender as demandas contemporâneas de pesquisa e de saúde pública. É exatamente para cobrir essas lacunas que este livro foi organizado. Com ele, objetiva-se abordar metodologias de análise que são rotineiramente utilizadas em laboratórios de controle de qualidade de produtos alimentícios, em especial das carnes. Considerando que o consumo de carne cresce em todo o mundo devido a uma necessidade fisiológica de ingerir proteínas, a carne também fornece outros minerais, tais como ferro, fósforo e potássio. Ressalta-se ainda que a vitamina B12 encontra-se exclusivamente em produtos de origem animal, logo se percebe a importância da presença desses alimentos na composição de uma dieta saudável.

Nesse contexto, o controle de qualidade tornou-se imprescindível em todos os locais de produção de alimentos, devido ao fato de que o Brasil é um grande produtor de carnes para consumo interno e exportação. Ao mesmo tempo, há uma grande demanda por alimentos mais saudáveis e seguros para atender a um público que está cada vez mais exigente.

Ao desenvolver o presente trabalho, os autores buscaram sistematizar um conjunto de metodologias analíticas desenvolvidas pelo Ministério da Agricultura (MAPA), voltadas para estudantes e profissionais da área de alimentos. Os roteiros analíticos apresentam uma breve definição conceitual, facilitando ao leitor um maior entendimento, seguido de uma sequência de procedimentos descritos de forma a permitir a reprodutibilidade das análises, otimizando assim a aprendizagem ou a aplicação das técnicas apresentadas em laboratórios de controle de qualidade.

Organizado pelos Tecnólogos de Alimentos (UEPA – Mara-

---

bá) em parcerias com as professoras Doutoradas Pesquisadoras, Vitoria Seixas (UEPA) e Rosemary Coutinho (IFPA), o presente livro foi construído visando contribuir com a pesquisa acadêmica e a formação profissional dos discentes.

**Prof. Dr. Cléber Silva e Silva**

Graduação em Licenciatura em Química pela Universidade Federal do Pará (2004), mestrado e doutorado em Química pela Universidade Federal do Pará (2013). Atualmente, é Professor Pesquisador do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA).

---

## SUMÁRIO

<b>1. CARNES</b> .....	<b>11</b>
1.1. DEFINIÇÃO	11
1.2. PROVA DE COCÇÃO.....	14
1.3. GLICÍDIOS POR CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL – PROVA QUALITATIVA.....	15
1.4. RESÍDUO POR INCINERAÇÃO – CINZAS.....	17
1.5. PROTÍDIOS – MÉTODO DE KJELDAHL CLÁSSICO.....	19
1.6. DETERMINAÇÃO DO pH DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR POTENCIOMETRIA.....	22
1.7. DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DA GORDURA TOTAL DE CARNES, PESCADOS E PRODUTOS DERIVADOS.....	23
1.8. CORANTES ARTIFICIAIS ORGÂNICOS – PROVA QUALITATIVA.....	27
1.9. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR GRAVIMETRIA.....	28
1.10. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE, VOLÁTEIS E DE PROTEÍNA EM CORTES DE AVES POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR).....	31
1.11. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR OXIDIMETRIA.....	34
1.12. DETERMINAÇÃO DE CLORETOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR ARGENTOMETRIA.....	39
1.13. FOSFATOS POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	44
1.14. PROVA PARA SULFITO COM VERDE DE MALAQUITA.....	46

1.15.	PROVA PARA NITRITOS.....	46
1.16.	REAÇÃO PARA AMÔNIA – PROVA DE ÉBER.....	48
1.17.	REAÇÃO DE KREIS.....	49
1.18.	PROVA PARA FORMALDEÍDO.....	51
1.19.	DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMIDO.....	52
1.20.	DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE HIDROXIPROLINA.....	58
1.21.	DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE NITRITOS.....	63
1.22.	DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE NITRATOS.....	67
1.23.	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA PELO MÉTODO ELISA.....	76

## **2. PRODUTOS DE SALSICHARIA EMBUTIDOS E NÃO EMBUTIDOS..... 93**

2.1.	DEFINIÇÃO.....	93
2.2.	AMIDO.....	94
2.3.	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA.....	95
2.4.	DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMIDO.....	98
2.5.	CLORETOS.....	98
2.6.	MÉTODO MERCUROMÉTRICO.....	100
2.7.	NITRITOS.....	101
2.8.	NITRATOS.....	101
2.9.	ÁCIDO SÓRBICO E SEUS SAIS.....	101
2.10.	PROVAS PARA FORMOL.....	104
2.11.	COM ÁCIDO CROMOTRÓPICO.....	105

2.12.	COM FENILHIDRAZINA.....	106
2.13.	PROVA PARA ÁCIDO BÓRICO.....	107
2.14.	MÉTODO COM PAPEL DE CÚRCUMA.....	108
2.15.	MÉTODO COM GLICEROL OU MANITOL.....	109
2.16.	PROVA PARA ÁCIDOS SALICÍLICO.....	110
2.17.	PROVA PARA ÁCIDO BENZÓICO.....	112
2.18.	PROVA PARA ANÍDRIDO SULFUROSO E SULFITOS - MÉTODO COM PAPEL IODATADO AMIDONADO.....	113
2.19.	MÉTODO COM VERDE MALAQUITA.....	114
2.20.	ACIDEZ DA GORDURA.....	115
2.21.	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ.....	116
2.22.	ÍNDICE DE PERÓXIDO.....	118
2.23.	RANÇO NA GORDURA - PROVA DE KREISS.....	118
2.24.	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (T.B.A.).....	120
2.25.	FOSFATOS.....	122
2.26.	MÉTODO PELO VANADO-MOLIBDATO DE AMÔNIO.....	123
2.27.	CORANTES ARTIFICIAIS.....	126
2.28.	MÉTODO DE ARATA.....	127
2.29.	DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE HIDROXIPROLINA.....	131
<b>3.</b>	<b>EXTRATO DE CARNE.....</b>	<b>135</b>
3.1.	PREPARO DA AMOSTRA E DA SOLUÇÃO ESTOQUE.....	135
3.2.	UMIDADE E VOLÁTEIS.....	135
3.3.	RESÍDUO MINERAL FIXO.....	137
3.4.	CLORETOS MÉTODO DE MOHR.....	138

3.5.	MÉTODO MERCUROMÉTRICO.....	139
3.6.	CREATININA- MÉTODO DE HADORN.....	140

#### **4. PRODUTOS CÁRNEOS ENLATADOS OU ENVASADOS..... 147**

4.1.	DEFINIÇÃO.....	147
4.2.	UMIDADE E VOLÁTEIS.....	147
4.3.	RESÍDUO MINERAL FIXO.....	149
4.4.	PROTÍDIOS.....	150
4.5.	LIPÍDIOS.....	154
4.6.	GLICÍDIOS REDUTORES.....	156
4.7.	GLICÍDIOS NÃO REDUTORES.....	159
4.8.	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA.....	161
4.9.	AMIDO.....	162
4.10.	CLORETOS - MÉTODO DE MOHR.....	162
4.11.	NITRITOS.....	162
4.12.	NITRATOS.....	162
4.13.	ÁCIDO SÓRBICO E SEUS SAIS.....	162
4.14.	PROVA PARA FORMOL.....	163
4.15.	PROVAS PARA ACIDO BÓRICO.....	163
4.16.	MÉTODO COM GLICEROL OU MANITOL.....	164
4.17.	PROVA PARA ACIDO SALICÍLICO.....	164
4.18.	PROVA PARA ACIDO BENZÓICO.....	164
4.19.	PROVAS PARA ANÍDRIDO SUIFUROSO E SUIFITOS - MÉTODO COM VERDE MALAQUITA.....	164
4.20.	ACIDEZ DA GORDURA.....	164
4.21.	ÍNDICE DE PERÓXIDOS.....	164
4.22.	RANÇO NA GORDURA - PROVA DE KREISS.....	164

---

4.23.	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (T.B.A.).....	165
4.24.	FOSFATOS.....	165
4.25.	CORANTES.....	165
<b>5.</b>	<b>GELATINA.....</b>	<b>168</b>
5.1.	DEFINIÇÃO.....	168
5.2.	UMIDADE E VOLÁTEIS.....	168
5.3.	RESÍDUO MINERAL FIXO.....	169
5.4.	NITROGÊNIO TOTAL.....	169
5.5.	ANIDRIDO SULFUROSO E SULFITO.....	174

---

---

## 1. CARNES

### 1.1. DEFINIÇÃO

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 a 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% (IAL, 2008).

#### 1.1.1. 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 3mm 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 200g. 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, homogeneíze reincorporando a possível separação do líquido, gelatina ou gordura.

### 1.1.2. Características Sensoriais

O exame sensorial da aparência, textura, odor e sabor é de grande importância, pois são essas as características que mais se alteram no início da deterioração das carnes.

*Aparência* – Própria de cada espécie, uniforme, sem acúmulo sanguíneo, 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 pardo-cento 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 equinos e muares, seu tom é vermelho-escuro, enquanto nas aves varia de amarelo-avermelhado ao amarelo-esbranquiçado. Essas colorações podem também estar relacionadas ao frescor e ao tempo de exposição do corte ao ambiente, pois à medida que o corte envelhece ocorre o escurecimento da superfície, que se torna progressivamente escura ou acinzentada, podendo apresentar iridescência 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 e ranço. O odor da carne suína tende a ser mais intenso em animais inteiros (odor espermático), sendo mais perceptível quando a carne é aquecida, 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.

---

## 1.2. PROVA DE COCÇÃO

### 1.2.1. Princípio

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 (IAL, 2008).

### 1.2.2. Material

- I. Bico de Bunsen;
- II. Chapa aquecedora ou banho-maria;
- III. Balança semi-analítica;
- IV. Béquer de 250mL;
- V. Vidro de relógio.

### 1.2.3. Procedimento

- Utilize amostra moída e devidamente homogeneizada.
- Em um béquer de 250mL, coloque aproximadamente 20g 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.

---

### **1.3. GLICÍDIOS POR CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL – PROVA QUALITATIVA**

#### **1.3.1. Princípio**

Os métodos cromatográficos aplicáveis á 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 (IAL, 2008).

#### **1.3.2. Material**

- I. Balança analítica;
- II. Estufa;
- III. Papel para cromatografia Whatman n° 1;
- IV. Pipetas de 1 e 5mL;
- V. Capilares de vidro;
- VI. Cuba cromatográfica com cânula;
- VII. Atomizador;
- VIII. Béquer de 250mL;
- IX. Funil de vidro e frasco Erlenmeyer de 100mL.

##### **1.3.2.1. Reagentes**

- I. Soluções-padrão a 2% dos açúcares a serem identificados;
- II. n-Propanol;
- III. Acetato de etila;

- IV. Solução de anilina a 4%, em álcool;
- V. Solução de difenilamina a 4%, em metanol;
- VI. Ácido fosfórico;
- VII. Fase móvel – n-propanol - acetato de etila - água (65:10:25).

#### 1.3.2.2. Preparo da solução

#### 1.3.2.3. 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 (5mL) e ácido fosfórico (1mL).

#### 1.3.3. Procedimento

- Pese cerca de 10g da amostra em um béquer de 250mL e dissolva com aproximadamente 100mL de água, mantendo em contato por no mínimo duas horas.
- Filtre em papel de filtro, recolhendo o filtrado em béquer de 250mL.
- Reserve o filtrado para aplicar no papel para cromatografia.
- Corte o papel Whatman nº 1 com largura de 15cm e comprimento de 57cm.
- Faça uma linha com grafite ao longo da largura do papel, a 6cm da base.
- Marque seis pontos com a distância mínima de 3cm 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 descendente 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 dos respectivos Rf's.
- Compare os valores dos Rf's dos padrões com os Rf's dos componentes da amostra.

#### 1.3.3.1. Cálculo do fator de retenção, Rf:

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

Onde:

Dc = distância percorrida pelo componente da amostra ou padrão

Ds = distância percorrida pela fase móvel.

## 1.4. RESÍDUO POR INCINERAÇÃO – CINZAS

### 1.4.1. Princípio

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 (IAL, 2008).

#### 1.4.2. Material

- I. Cápsula de porcelana ou platina de 50mL;
- II. Mufla;
- III. Banho-maria;
- IV. Dessecador com cloreto de cálcio anidro ou sílica gel;
- V. Chapa elétrica;
- VI. Balança analítica;
- VII. Espátula e pinça de metal.

#### 1.4.3. Procedimento

- Pese 5 a 10g 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 550°C, 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 0,5mL 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.

#### 1.4.3.1. Cálculo

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

Onde:

N = n° de g de cinzas

P = n° de g da amostra

## 1.5. PROTÍDIOS – MÉTODO DE KJELDAHL CLÁSSICO

### 1.5.1. Princípio

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. Amostras contendo nitratos podem perdê-los durante a digestão. Nestes casos, deve-se adicionar ácido salicílico ou fenol (cerca de 1g), 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 (IAL, 2008).

### 1.5.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Frascos de Kjeldahl de 500 a 800mL;
- III. Chapa elétrica ou manta aquecedora;
- IV. Balão de destilação;
- V. Frasco Erlenmeyer de 500mL;
- VI. Bureta de 25mL;
- VII. Espátula;
- VIII. Papel de seda;
- IX. Dedal e pipeta graduada de 25mL ou pipetador automático.

#### 1.5.2.1. Reagentes

- I. Ácido sulfúrico;
- II. Ácido sulfúrico 0,05M;
- III. Sulfato de cobre;
- IV. Sulfato de potássio;

- V. Dióxido de titânio;
- VI. Solução fenolftaleína;
- VII. Vermelho de metila a 1% m/v;
- VIII. Zinco em pó;
- IX. Hidróxido de sódio a 30% m/v;
- X. Hidróxido de sódio 0,1M;
- XI. Mistura catalítica – Dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6.

### 1.5.3. Procedimento

- Pese 1g da amostra em papel de seda.
- Transfira para o balão de Kjeldahl (papel+amostra).
- Adicione 25mL de ácido sulfúrico e cerca de 6g 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 1g 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 25mL de ácido sulfúrico 0,05M, contido em frasco Erlenmeyer de 500mL 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 0,1M, usando vermelho de metila.

#### 1.5.3.1. Cálculo

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

Onde:

V = diferença entre o nº de mL de ácido sulfúrico 0,05M 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 (6,25)

## 1.6. DETERMINAÇÃO DO pH DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR POTENCIOMETRIA

### 1.6.1. Princípio

Este método tem por objetivo determinar a concentração de íons hidrogênio (pH) da amostra. Fundamenta-se na medida da concentração de íons hidrogênio da amostra, utilizando-se potenciometria (BRASIL, 2014).

### 1.6.2. Materiais

- I. Bastão de vidro;
- II. Béquer.
- III. Balança analítica;
- IV. pHmetro.

#### 1.6.2.1. Reagentes

- I. Solução tampão pH 4,0;
- II. Solução tampão pH 7,0.

### 1.6.2.2. Precauções analíticas

Toda a água utilizada deve ser destilada ou deionizada, exceto quando especificado. Amostras de alimentos em geral devem ser consideradas como de risco biológico, evitando-se o contato direto com pele e mucosas. Todos os procedimentos devem ser realizados com uso de equipamentos de proteção individual. O item de ensaio deve preferencialmente estar à temperatura ambiente.

### 1.6.3. Procedimento

- Calibrar o pHmetro com as soluções-tampão 4,0 e 7,0. Em um béquer, pesar cerca de 50 g de amostra finamente picada.
- Com auxílio de bastão de vidro, homogeneizar com cerca de 20mL de água deionizada e medir o pH. Realizar duas leituras.

#### 1.6.3.1. Cálculos

Calcular a média das leituras. O resultado a ser expresso é a média das leituras, com duas casas decimais.

#### 1.6.3.2. Aceitabilidade dos resultados

Todos os resultados devem ser aceitos se os requisitos para execução do ensaio forem atendidos. Em caso de funcionamento inadequado do equipamento, falta de energia durante o ensaio, ou outro motivo, o ensaio deve ser interrompido, e os resultados não devem ser emitidos.

## 1.7. DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DA GORDURA TOTAL DE CARNES, PESCADOS E PRODUTOS DERIVADOS

### 1.7.1. Princípio

Este método tem por objetivo determinar a gordura total em amostras de carnes, pescados e produtos derivados. O método

se baseia na solubilidade dos lipídios em solventes apropriados e sua conseguinte determinação gravimétrica (BRASIL, 2014).

### 1.7.2. Materiais

- I. Algodão desengordurado;
- II. Balões de Soxhlet ou tubos “reboilers”;
- III. Cápsulas metálicas;
- IV. Cartuchos de celulose para extração;
- V. Dessecadores com sílica-gel;
- VI. Pinça metálica;
- VII. Provetas de 100mL e 500mL;
- VIII. Balança analítica, com precisão mínima de quatro casas decimais;
- IX. Determinador de gordura com aquecimento elétrico;
- X. Estufa;
- XI. Placa aquecedora.

#### 1.7.2.1. Reagentes

- I. Acetona ( $C_3H_6O$ );
- II. Éter de petróleo, n-hexano ( $C_6H_{14}$ ) ou éter etílico anidro ( $C_4H_{10}O$ ), livre de peróxidos.

### 1.7.3. Procedimento

- Retirada da gordura do algodão: em uma bandeja, colocar algodão e imergi-lo em éter, deixando em repouso dentro da capela.
- Quando o éter tiver evaporado, levar o algodão à estufa a 105°C, por aproximadamente duas horas e depois guardar.
- Preparo dos balões de Soxhlet e tubos “reboilers”: antes do uso, os balões de Soxhlet ou tubos reboilers são desengordurados, lavados, secos e tarados, para utilização em nova extração. Secar em estufa, a 105°C, por aproximadamente uma hora.

- Retirar e esfriar em dessecador.
- Pesar e identificar. Feito esse procedimento, os balões ou tubos estão prontos para utilização.
- Preparo da amostra: pesar cerca de 3g de amostra homogeneizada sobre algodão desengordurado em cápsula metálica.
- Secar em estufa a 105°C durante duas horas ou usar a amostra após a determinação da umidade.
- Com auxílio de um chumaço de algodão desengordurado imerso em acetona, transferir a amostra seca e fragmentada, juntamente com o algodão para um cartucho de extração com auxílio de pinça metálica.
- Colocar os cartuchos nos balões ou nos tubos “reboilers” previamente tarados e pesados e levá-los ao extrator. Realizar o ensaio, em duplicata.
- Extração (extrator Soxhlet – Tecnal): pendurar os cestos com cartuchos de extração contendo as amostras, devidamente identificados, nos respectivos ganchos das varetas. Adicionar 90mL de solvente em cada tubo.
- Conectar os tubos aos condensadores, descendo as varetas de forma que os cartuchos fiquem em imersão no solvente.
- Aquecer o éter a 85°C, por três horas. Em seguida, elevar a temperatura a 95°C, deixando extrair por mais quatro horas.
- Aumentar a temperatura para 130°C e passar à lavagem dos cartuchos, subindo as varetas e travando os condensadores, para que o solvente se acumule.
- Soltar vagarosamente as varetas, de forma que o solvente lave os cartuchos.
- Repetir esse procedimento por mais duas vezes.
- Proceder à recuperação do solvente, aumentando a temperatura do extrator para 150°C e travando totalmente as varetas, para que o solvente se acumule novamente nos condensadores.

- Quando a maior parte do solvente tiver evaporado dos tubos, desligar o aparelho. Soltar os tubos e levar à placa aquecedora, com exaustão ligada, para evaporação do solvente remanescente.
- Secar os tubos em estufa a 105°C, por trinta minutos. Esfriar em dessecador e pesar.
- Recolher em proveta o solvente recuperado nos condensadores, para uso em outras análises.
- Extração (extrator Soxhlet – Gerhardt): adicionar os cartuchos dentro dos tubos de extração juntamente com os suportes. Adicionar 140mL de solvente em cada tubo.
- Encaixar os tubos no equipamento. Selecionar a programação adequada no computador acoplado ao equipamento. O processo é automático e terá uma duração de aproximadamente 2h30min. Após esse período, selecionar se necessário, o programa secagem ou realizar a mesma em placa de aquecimento, para a evaporação do solvente remanescente. Secar os tubos em estufa a 105°C, por trinta minutos.
- Esfriar em dessecador e pesar.
- Recolher em proveta o solvente recuperado nos condensadores, para uso em outras análises.

### 1.7.3.1. Resultados

O resultado final é a média das replicatas. O resultado deve ser expresso em g/100g de gordura total (GT), com duas casas decimais, calculado conforme a fórmula abaixo para cada replicata:

$$GT(g/100g) = \frac{(MC - MB)}{MA} \times 100$$

Onde:

MA = massa da amostra (g);

MB = massa do tubo ou balão (g);

MC = massa do tubo ou balão + gordura total (g).

---

**Nota:** Todos os resultados devem ser aceitos se os requisitos para execução do ensaio forem atendidos. Em caso de funcionamento inadequado do equipamento, quebra de vidraria, perda de amostra durante a realização do ensaio ou outro motivo, o ensaio deve ser interrompido e os resultados não devem ser emitidos.

## **1.8. CORANTES ARTIFICIAIS ORGÂNICOS – PROVA QUALITATIVA**

### **1.8.1. Princípio**

O método é aplicável a amostras de alimentos coloridos artificialmente e baseia-se na separação dos corantes por cromatografia ascendente em papel (IAL, 2008).

### **1.8.2. Material**

- I. Banho-maria;
- II. Capela para solventes;
- III. Lã natural branca de 20cm;
- IV. Régua de 20cm;
- V. Papel;
- VI. Whatman nº 1 (20x20cm), bécquer de 25 e 200mL;
- VII. Bastão de vidro;
- VIII. Capilar de vidro;
- IX. Cuba de vidro (21x21x10)cm.

#### **1.8.2.1. Reagentes**

- I. Ácido clorídrico
- II. Hidróxido de amônio
- III. Padrões de corantes orgânicos artificiais a 0,1%/v

### 1.8.3. Procedimento

- Para a extração dos corantes, coloque em um béquer de 200mL aproximadamente 30 a 50 g da amostra, 100mL de água e cerca de 20cm de um fio de lã natural branca e misture bem.
- Acrescente algumas gotas de HCl ( $\pm 0,5\text{mL}$ ) 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 25mL e adicione algumas gotas de hidróxido de amônio ( $\pm 0,5 \text{ mL}$ ). Em seguida, adicione 10mL 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 auxílio 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 (Rf), 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.

## 1.9. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR GRAVIMETRIA

### 1.9.1. Princípio

Este método tem por objetivo determinar a umidade em produtos de origem animal, através de dessecação em estufa, por método gravimétrico (BRASIL, 2014).

---

A umidade é determinada pela perda de massa em condições na qual água e substâncias voláteis são removidas por evaporação em estufa de secagem (BRASIL, 2014).

### 1.9.2. Materiais

- I. Cápsulas de alumínio ou de porcelana;
- II. Colher de metal;
- III. Dessecador;
- IV. Pinça metálica;
- V. Balança analítica, com precisão mínima de quatro casas decimais;
- VI. Estufa de secagem.

#### 1.9.2.1. Precauções analíticas

- Amostras de alimentos em geral devem ser consideradas como de risco biológico, evitando-se o contato direto com pele e mucosas. Equipamentos de proteção individual e uniforme apropriado à condução da marcha analítica devem ser utilizados durante todo o processo. Utilizar pinças apropriadas à manipulação das cápsulas durante o ensaio.
- Não pesar cápsulas quentes ou mornas, sem que tenham sido resfriadas por pelo menos trinta minutos em dessecador

#### 1.9.3. Procedimento

- Secar cápsulas de alumínio ou porcelana em estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  durante uma hora.
- Esfriar em dessecador e pesar.
- Pesar amostra preparada e homogeneizada e levar à estufa, de acordo com a natureza do produto.
- Esfriar em dessecador e pesar.
- Repetir as operações de secagem, esfriando em dessecador, até que o valor entre as pesagens seja inferior a 0,1% da massa inicial da amostra. Para produtos lácteos, a secagem deve ser

conduzida sem que haja escurecimento da amostra.

- Trabalhar em duplicata.

#### 1.9.3.1. Dados para análise

#### 1.9.3.2. Produtos cárneos (produtos de salsicharia, enlatados, charque e produtos curados e gelatina).

- Massa da amostra: cerca de 5g;
- Temperatura da estufa: 105°C;
- Tempo até a primeira pesagem: 3 horas;
- Tempo, na estufa, entre pesagens até massa constante: 1 hora.

#### 1.9.3.3. Carne mecanicamente separada

- Massa da amostra: cerca de 5g;
- Temperatura da estufa: 85°C;
- Tempo até a primeira pesagem: 18 horas;
- Tempo, na estufa, entre pesagens até massa constante: 1 hora.

#### 1.9.3.4. Banha, toucinho e sebo conforme item 1.9.3.3.

#### 1.9.3.5. Cálculos

Utiliza-se a seguinte fórmula para cada cápsula:

$$\text{Umidade (g/100g)} = \frac{(MA - MB)}{MC} \times 100$$

Onde:

MA = massa da cápsula + amostra (g);

MB = massa da cápsula + amostra após secagem (g);

MC = massa de amostra.

### 1.9.3.6. Expressão dos resultados

O resultado final de cada amostra será a média dos resultados das duas cápsulas (duplicatas), expresso em g/100g, com uma casa decimal.

## 1.10. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE, VOLÁTEIS E DE PROTEÍNA EM CORTES DE AVES POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

### 1.10.1. Princípio

Tem por objetivo descrever a metodologia utilizada pelo POA para a determinação do teor de umidade e voláteis simultaneamente com o teor de proteína em amostras de cortes de aves (frangos, galinhas, patos e galeto) in natura, resfriados ou congelados, utilizando o método de Espectroscopia de Infravermelho Próximo (BRASIL, 2013).

#### 1.10.1.1. Espectroscopia de infravermelho próximo.

A Espectroscopia de Infravermelho Próximo, do inglês Near Infrared Spectroscopy (NIRS), tornou-se uma técnica moderna em análise instrumental, pois é um método rápido, não destrutivo e na maioria das vezes não é necessário o preparo da amostra a ser analisada. Este é um sistema de detecção que revela a radiação além da região visível do espectro, onde a região espectral do infravermelho próximo compreende números de onda no intervalo de (12.800 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ ). A espectroscopia de infravermelho (EI) é utilizada principalmente para análise quantitativa de componentes orgânicos. A EI é também conhecida como espectroscopia de vibração, visto que o espectro surge das transições nos níveis de energia vibracional da ligação covalente da molécula.

### 1.10.1.2. Princípios de Instrumentação

A NIRS possui os mesmos componentes básicos dos instrumentos utilizados na espectroscopia de UV–VIS. Consiste em três componentes básicos: uma fonte de radiação infravermelha, um seletor de comprimento de onda para dispersar a energia gerada e isolar o comprimento de onda solicitado e um detector para medir a intensidade da radiação dispersante.

Um equipamento que utiliza a Espectroscopia de Infravermelho Próximo para quantificação de componentes cárneos como: umidade, proteína e gordura é o FoodScan™.

### 1.10.2. Materiais

- I. Papel toalha;
- II. Cápsulas do analisador FoodScan;
- III. Espátulas;
- IV. Analisador de Carnes e Queijos FoodScan.

#### 1.10.2.1. Precauções analíticas

- Manter as amostras sob refrigeração, de acordo com sua exigência de armazenamento até o momento do ensaio;
- Caso o ensaio de umidade e proteína não sejam realizados até aproximadamente 1h após a moagem, manter a amostra sob refrigeração;
- A análise de umidade e proteína tem que iniciar em até 24h após a moagem das amostras;
- A colocação da amostra nas cápsulas é realizada de forma homogênea, sem deixar bolhas de ar, e a superfície é o mais plana possível.

### 1.10.3. Procedimento

- Moer as amostras.

- Colocar em funcionamento o FoodScan™ segundo a instrução de uso do equipamento IU POA 47. As amostras são colocadas nas duas cápsulas com a espátula de forma regular e consistente.
- Colocar a cápsula dentro do equipamento e dar o comando START para a leitura correspondente da umidade e proteína. Identificar a amostra no programa.
- Repetir o procedimento para a segunda cápsula.
- Limpar a cápsula e a espátula entre cada nova amostra, utilizando papel toalha.

#### 1.10.3.1. Avaliação Intralaboratorial e critério de aceitação de resultados

O desvio padrão da amostra entre as leituras do NIRS, para uma mesma cápsula, segue o seguinte critério de aceitação:

- I. Muito bom se é menos de 0,5%;
- II. Aceitável se está entre 0,5 e 1,5%;
- III. Não aceito se é maior que 2%.

A amplitude entre as duplicatas é verificada por carta-controle, conforme POP POA/19, com o objetivo de verificar tendências na diferença entre vias. No caso de a diferença entre as duas vias ser maior do que o esperado, realiza-se uma terceira leitura, caso haja amostra disponível. Neste caso, utilizam-se os resultados mais próximos para a composição da média final. Os resultados que necessitarem de confirmação por metodologia clássica são verificados por carta controle, conforme POP POA/19, com o objetivo de visualizar tendências na diferença de resultados entre métodos. Se for detectada uma variação acima do esperado, o laboratório interrompe a emissão de resultados por este método, até que este seja reavaliado.

Se os resultados obtidos por este método destoarem acima do esperado entre si, sem a possibilidade de realização de uma terceira

via ou situarem-se na faixa de dúvida para o corte em questão, a amostra é realizada por metodologia clássica.

## **1.11. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR OXIDIMETRIA**

### **1.11.1. Princípio**

Este método tem por objetivo determinar o índice de peróxidos de produtos de origem animal, indicando o grau de oxidação da gordura animal.

A oxidação da gordura é um processo autocatalítico que se desenvolve em aceleração crescente. Fatores como temperatura, enzimas, luz e íons metálicos podem influenciar a formação de radicais livres. O radical livre, em contato com oxigênio molecular, forma um peróxido que, em reação com outra molécula oxidável, induz a formação de hidroperóxido e outro radical livre. Os hidroperóxidos dão origem a dois radicais livres, capazes de atacar outras moléculas e formar mais radicais livres, dando assim uma progressão geométrica. As moléculas formadas, contendo o radical livre, ao se romperem formam produtos de massa molecular mais baixa (aldeídos, cetonas, álcoois e ésteres), os quais são voláteis e responsáveis pelos odores da rancificação.

Devido à sua ação fortemente oxidante, os peróxidos orgânicos, formados no início da rancificação da gordura, atuam sobre o iodeto de potássio liberando iodo, que será titulado com tiosulfato de sódio em presença de amido como indicador. O método determina todas as substâncias que oxidam o iodeto de potássio nas condições de teste, exprimindo o volume, em mL, de solução volumétrica diluída de tiosulfato de sódio necessário para a titulação indireta dos peróxidos presentes em 1 g de matéria graxa (BRASIL, 2014)

### 1.11.2. Materiais

- I. Bureta de 25mL;
- II. Cápsula de porcelana;
- III. Erlenmeyer de 250mL;
- IV. Erlenmeyer de 500mL de boca esmerilhada;
- V. Estufa;
- VI. Pipeta volumétrica de 25mL;
- VII. Provetas de 50mL, 500mL e 1000mL;
- VIII. Balança analítica e semi-analítica;
- IX. Chapa aquecedora;
- X. Cronômetro.

#### 1.11.2.1. Reagentes

- I. Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) p.a.;
- II. Ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) 37%;
- III. Amido solúvel p.a.;
- IV. Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) p.a.;
- V. Iodeto de potássio ( $\text{KI}$ ) p.a.;
- VI. Sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) p.a.;
- VII. Tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) p.a.

#### 1.11.2.2. Padrão

- I. Dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) padrão primário.

#### 1.11.2.3. Precauções analíticas

Este método emprega substâncias químicas nocivas e procedimentos que podem representar risco ao operador. Equipamentos de proteção individual e uniforme apropriado à condução da marcha analítica devem ser utilizados durante todo o processo.

Amostras de alimentos em geral devem ser consideradas como de risco biológico, evitando-se o contato direto com pele e mucosas.

Deixar o item de ensaio atingir a temperatura ambiente antes da pesagem, em frascos totalmente fechados.

Caso haja gasto excessivo do tiosulfato de sódio 0,01M, trocar a solução titulante para tiosulfato de sódio 0,1M.

#### 1.11.2.4. Preparo de soluções

##### 1.11.2.4.1 Solução de clorofórmio-ácido acético

- Em duas provetas, medir 200mL de clorofórmio e 600mL de ácido acético.
- Misturar e homogeneizar. Armazenar em frasco âmbar.

##### 1.11.2.4.2 Solução de clorofórmio-ácido acético 2:3 (v/v)

- Em duas provetas, medir 200mL de clorofórmio e 600mL de ácido acético.
- Misturar e homogeneizar. Armazenar em frasco âmbar.

##### 1.11.2.4.3 Solução saturada de iodeto de potássio

- Em um tubo de ensaio, adicione iodeto de potássio em 10mL de água deionizada, até a saturação do reagente, representada pela formação de um precipitado mesmo sobre agitação.
- Esse reagente deve ser preparado no dia do ensaio.

##### 1.11.2.4.4 Solução de tiosulfato de sódio 0,1M

- Pesar cerca 25g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em um béquer de 500mL, dissolver com água deionizada, previamente fervida e fria.
- Transferir para balão volumétrico de 1000mL e completar o volume.

#### 1.11.2.4.5 Solução de tiosulfato de sódio 0,01M

- Tomar alíquota de 100mL da solução 0,1M, utilizando uma pipeta volumétrica e transferir para um balão volumétrico de 1000mL.
- Completar o volume com água deionizada.

#### 1.11.2.4.6 Solução indicadora de amido 1%(m/v)

- Em uma proveta, medir 40mL de água.
- Dissolver 0,5g em um béquer, aquecer até a dissolução completa do amido e transferir para balão de 50mL, avolumando com água deionizada.
- Armazenar em frasco à temperatura ambiente.

#### 1.11.3. Procedimento

- Transferir porções dos produtos processados para erlenmeyer de 500mL.
- Adicionar cerca de 10g de sulfato de sódio anidro. Sob exaustão, adicionar 200mL de clorofórmio.
- Agitar por 2 a 3 minutos para completa extração da gordura.
- Filtrar em papel de filtro qualitativo pregueado para erlenmeyer de 250mL.
- Transferir volumetricamente 25mL para erlenmeyer de 250mL.
- Adicionar 37mL de ácido acético p.a. e 1mL de solução saturada de iodeto de potássio.
- Esperar 1 minuto, agitando ocasionalmente em ausência de luz. Adicionar 30mL de água e titular com solução de tiosulfato de sódio 0,01M usando solução de amido a 1% como indicador.
- Determinação da massa na alíquota: pipetar volumetricamente 25mL do extrato clorofórmico para uma cápsula previamente desengordurada e tarada.
- Sob exaustão, evaporar o solvente em banho-maria a 60°C.

Secar em estufa a 105°C por 30 minutos, esfriar em dessecador e pesar.

- Usar a massa da gordura obtida para os cálculos.
- Efetuar prova em branco, subtraindo seu resultado da titulação da amostra.

#### 1.11.4. Padronização das soluções

- Transferir cerca de 5g de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) finamente pulverizado, para estufa e aquecer a 140 a 150°C durante uma hora.
- Esfriar em dessecador.
- Para fatorar uma solução de tiosulfato de sódio 1M, pesar 1,2 g de dicromato de potássio e transferir para frasco Erlenmeyer de 500mL com rolha esmerilhada, contendo 100mL de água fria, previamente fervida, 30g de iodeto de potássio (isento de iodato) e 60mL de ácido clorídrico.
- Para padronizações de outras concentrações, estes reagentes devem ser utilizados em quantidades proporcionais.
- Fechar o frasco e agitar.
- Deixar em repouso, em ausência de luz, durante 5 minutos. Lavar a rolha e as paredes do frasco com água fria, previamente fervida.
- Titular o iodo liberado, com a solução de tiosulfato de sódio a ser padronizado, agitando continuamente.
- Quando a coloração se tornar amarelo-clara, juntar 2mL de solução de amido 0,5 % m/v.
- A solução deve se tornar azul. Continue adicionando a solução de tiosulfato, gota a gota, até a mudança de cor azul esverdeado para verde-pálido.

##### 1.11.4.1. Cálculo

Cálculo do fator de correção (fc)

O fator de correção é calculado através da seguinte equação:

$$fc = \frac{m}{0,049 \times V \times M}$$

Onde:

m = massa (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 titulante.

#### 1.11.4.2. Resultados

O resultado a ser expresso é a média das duplicatas, em mEq/kg e deve ser calculado de acordo com a equação:

$$\text{Índices de peróxidos (mEq / kg)} = \frac{(V - B) \times C \times f \times 1000}{m}$$

Onde:

V = volume (mL) de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra;

B = volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco, em mL;

C = Concentração da solução de tiosulfato de sódio;

f = fator de correção da solução de tiosulfato de sódio;

m = massa da amostra, em gramas, ou massa da amostra na alíquota.

### 1.12. DETERMINAÇÃO DE CLORETOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR ARGENTOMETRIA

#### 1.12.1. Princípio

Este método tem por objetivo determinar o teor de cloretos ou cloretos em NaCl de produtos de origem animal.

O ensaio fundamenta-se na reação do nitrato de prata com cloretos em presença de cromato de potássio como indicador, em pH levemente alcalino. Os íons cloretos (presentes na amostra) reagem com nitrato de prata, formando cloreto de prata. O excesso de nitrato de prata reage com o indicador formando um precipitado (cromato de prata), de cor vermelho-tijolo ou marrom.

A adição de cloretos pode ter a finalidade de “mascarar” uma adulteração no leite pela adição de água, permitindo a correção da densidade e a crioscopia do leite. Quando empregada paralelamente a outras provas de inspeção do leite, a pesquisa de cloretos pode confirmar suspeita de fraudes por adição de água e sal.

Em leite fluido, a prova é qualitativa, e o resultado positivo indica a presença de quantidades superiores a 0,08 a 0,1% de cloretos. Quando o teor de cloretos é normal, a quantidade de nitrato de prata adicionada é excessiva, reagindo com o indicador. Por outro lado, quando o teor de cloretos é elevado, haverá menor quantidade de prata disponível para reagir com o indicador e, como consequência, menor quantidade de precipitado será formada, com diminuição da intensidade da coloração. Isto é, quanto maior a concentração de cloretos na amostra, menor a intensidade de coloração (BRASIL, 2014).

### 1.12.2. Materiais

- I. Balão volumétrico de 100mL;
- II. Bastão de vidro;
- III. Béqueres de 100 e 250mL;
- IV. Bureta de 25mL;
- V. Cadinhos e cápsulas de porcelana;
- VI. Erlenmeyers de 125 e 250mL;
- VII. Funil;
- VIII. Papel de filtro qualitativo;

- I. Pipetas graduadas de 1 e 5mL;
- II. Pipetas volumétricas de 10, 25, 100mL;
- III. Tubos de ensaio;
- IV. Agitador magnético;
- V. Balança analítica, com precisão mínima de quatro casas decimais;
- VI. Forno-mufla;
- VII. Placa aquecedora.

#### 1.12.2.1. Reagentes

- I. Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ );
- II. Carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ );
- III. Cromato de potássio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ );
- IV. Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ).

#### 1.12.2.2. Padrão

- I. Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), material de referência.

#### 1.12.3. Preparo de soluções e reagentes

##### 1.12.3.1. Solução de cromato de potássio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) a 5%(m/v)

- Em balança analítica, pesar 5g de cromato de potássio em um béquer 100mL e dissolver utilizando água deionizada transferindo para um balão de 100mL.
- Essa solução tem validade de um ano em frasco de vidro âmbar, sob temperatura ambiente.

##### 1.12.3.2. Solução de ácido nítrico 1:9 (v/v)

- Transferir aproximadamente 500mL de água deionizada para o balão volumétrico de 1000mL.
- Na capela de exaustão, adicionar lentamente, pelas paredes do balão, 100mL de ácido nítrico com auxílio de uma proveta.

- Completar o volume com água e armazenar em frasco âmbar a temperatura ambiente.

#### 1.12.3.3. Solução de nitrato de prata 0,1M (mol/L)

- Pesar 17g de nitrato de prata em um béquer de 100mL, dissolver com água deionizada com auxílio de um bastão de vidro.
- Transferir para um balão volumétrico de 1000mL, completar o volume e homogeneizar.
- Transferir a solução preparada para frasco âmbar sob refrigeração.

#### 1.12.3.4. Solução de nitrato de prata 0,01M (mol/L)

- Tomar uma alíquota de 100mL da solução 0,1M, utilizando pipeta volumétrica e passar para um balão de 1000mL.
- Completar volume com água deionizada.

#### 1.12.3.5. Fatoração das soluções de nitrato de prata 0,1M e 0,01M

- Secar 5g de cloreto de sódio padrão (material de referência) em estufa a 105°C, por cerca de 12 horas, ou por 2 horas a 150°C.
- Resfriar em dessecador.

#### 1.12.3.6. Para fatorar uma solução de nitrato de prata 0,1M

- Pesar, em balança analítica, cerca de 0,145g
- Em erlenmeyer de 125mL adicionar cerca de 25mL de água e 1mL de solução cromato de potássio a 5%/m/v, como indicador.
- Gotejar a solução de  $\text{AgNO}_3$  a ser fatorada com auxílio de uma bureta de 25mL, até o aparecimento de cor castanho-avermelhada.

**Nota:** A solução de nitrato de prata deve ser padronizada mensalmente (ou antes do uso).

### 1.12.3.7. Cálculos

Cálculo do fator de correção (f):

$$f = \frac{m}{0,0585 \times V \times M}$$

Onde:

m = massa (g) de NaCl usados na titulação;

V = volume (mL) de solução de AgNO<sub>3</sub> gastos na titulação;

M = concentração (molaridade) da solução.

### 1.12.3.8. Cálculos e expressão dos resultados

O resultado a ser expresso é a média das duplicatas e deve ser calculado de acordo com as fórmulas abaixo:

Cálculo da concentração de cloretos em g/100g:

$$\text{Cloretos (g / 100g)} = \frac{V \times f \times 0,355}{m}$$

Onde:

V = volume (mL) de solução de AgNO<sub>3</sub> 0,1M gasto na titulação;

f = fator da solução de AgNO<sub>3</sub> 0,1M;

m = massa de amostra (g).

Cálculo da concentração de cloretos em NaCl (g/100g):

$$\text{Cloretos em NaCl (g / 100g)} = \frac{V \times f \times 0,585}{m}$$

Onde:

V = volume (mL) de solução de AgNO<sub>3</sub> 0,1M gasto na titulação;

f = fator da solução de AgNO<sub>3</sub> 0,1M;

m = massa de amostra (g).

## 1.13. FOSFATOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

### 1.13.1. Princípio

Fundamenta-se na reação do molibdato de amônia em meio sulfúrico com o fósforo na forma de ortofosfato para formar o complexo molibdofosfato de amônio. Este complexo é reduzido por solução de hidroquinona e sulfito de sódio, formando o azul da molibdeno (BRASIL, 1981).

### 1.13.2. Material

- I. Balões volumétricos de 100, 250, 500 e 1000mL;
- II. Pipetas de 25 e 50mL;
- III. Proveta;
- IV. Espectrofotômetro ou fotocolorímetro.

### 1.13.2.1. Reagentes

- I. Solução de vanado-molibdato de amônio
- II. Solução-estoque de fosfato
- III. Solução-padrão de fosfato

### 1.13.2.2. Preparo de soluções

#### 1.13.2.2.1 Solução de vanado-molibdato de amônio

- Dissolva 20g molibdato de amônio -  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 1g de vanadato de amônio -  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , separadamente, em cerca de 300mL de água quente e filtre, se necessário.
- Misture as duas soluções, adicione 140mL de ácido nítrico e dilua para um litro.
- Este reativo é estável por três meses.

#### 1.13.2.2.2 Solução-estoque de fosfato

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

#### 1.13.2.2.3 Solução-padrão de fosfato

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

#### 1.13.3. Procedimento

- Dissolva as cinzas obtidas de 5g da amostra em ácido clorídrico (1:2), transfira para um balão volumétrico de 100mL 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 100mL.
- Adicione 25mL do reagente vanado-molibdato de amônio e complete o volume com água até 100mL.
- Homogeneíze e espere 10 minutos para fazer a leitura a 420nm.
- Determine a quantidade de fosfato correspondente, usando a curva padrão previamente estabelecida ou o valor da absorvidade.

##### 1.13.3.1. Curva-padrão

- Em uma série de balões volumétricos de 100mL, meça volumes de solução padrão contendo valores de 5 a 6,2mg de  $P_2O_5$ . Quando for usado um espectrofotômetro, utilize volumes de solução-padrão de fosfato contendo de 0,2 a 2,0mg de  $P_2O_5$ .
- Adicione 25mL 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 420nm, usando como branco 25mL de vanado-molibdato de amônio, completando com água até 100mL.

## 1.14. PROVA PARA SULFITO COM VERDE DE MALAQUITA

### 1.14.1. Princípio

Baseia-se na mudança de cor do corante orgânico verde de malaquita na presença de anidrido sulfuroso e de sulfites (IAL, 2008).

### 1.14.2. Material

- I. Balança semi-analítica;
- II. Espátula;
- III. Cápsula de porcelana;
- IV. Pipeta graduada de 1mL.

#### 1.14.2.1. Reagente.

- I. Solução de verde malaquita a 0,02% m/v.

### 1.14.3. Procedimento

- Pese 3,5g da amostra em capsula de porcelana.
- Acrescente 0,5mL 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 Dióxido de enxofre – Prova qualitativa ou Dióxido de enxofre – Método quantitativo de Monier- Williams.

## 1.15. PROVA PARA NITRITOS

### 1.15.1. Princípio

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-pazobenzeno- p-sulfônico, de coloração rósea (BRASIL, 1981).

#### 1.15.2. Material

- I. Tubos de ensaio de 25mL;
- II. Papel de filtro qualitativo;
- III. Pipetas graduadas de 1 e 10mL.

##### 1.15.2.1. Reagentes

- I. Solução de ácido sulfanílico;
- II. Solução de cloridrato de alfa-naftilamina.

##### 1.15.2.2. Preparo das soluções

###### 1.15.2.2.1 Solução de ácido sulfanílico

- Pese 0,5g de ácido sulfanílico e dissolva em 150mL de solução aquosa de ácido acético (1:4).

###### 1.15.2.2.2 Solução de cloridrato de alfa-naftilamina

- Dissolva 0,4g de cloridrato de alfa-naftilamina em 150mL de

ácido acético (1:4). Se não dissolver bem, aqueça, deixe em repouso e decante ou filtre em algodão.

### 1.15.3. Procedimento

- Faça um macerado da amostra com água e filtre.
- Em um tubo de ensaio, pipete 10mL do filtrado, adicione 1mL da solução de ácido sulfanílico e agite.
- Adicione 1mL 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-Hosvay uma coloração vermelha fugaz, que passa a amarela-parda como se fosse prova negativa.

## 1.16. REAÇÃO PARA AMÔNIA – PROVA DE ÉBER

### 1.16.1. Princípio

O estado de conservação de alimentos proteicos 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 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sob a forma de vapores brancos (IAL, 2008).

### 1.16.2. Material

- I. Provetas de 50 e 150mL;
- II. Balão volumétrico de 250mL;
- III. Tubos de ensaio de 25mL;
- IV. Arame de 20cm de comprimento com extremidade recurvada tipo anzol.

### 1.16.2.1. Reagentes

- I. Ácido clorídrico;
- II. Éter;
- III. Álcool.

### 1.16.2.2. Prepare da solução

#### 1.16.2.2.1 Reagente de Éber

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

### 1.16.3. Procedimento

- Transfira 5mL do reagente de Éber para um tubo de ensaio de 25mL.
- 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.

## 1.17. REAÇÃO DE KREIS

### 1.17.1. Princípio

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 oxi-

dação dos triglicerídeos, resultando em composto de condensação de coloração rósea ou vermelha, cuja intensidade e proporcional a oxidação (IAL, 2008).

### 1.17.2. Material

- I. Rotavapor;
- II. Balança semi-analítica;
- III. Papel de filtro
- IV. Frasco Erlenmeyer de 500mL com boca esmerilhada e tampa;
- V. Balão de fundo chato de 300mL com boca esmerilhada;
- VI. Proveta de 150mL;
- VII. Proveta de 50mL com boca esmerilhada e tampa;
- VIII. Pipeta de 5mL;
- IX. Funil e papel de filtro qualitativo.

#### 1.17.2.1. Reagentes

- I. Éter;
- II. Ácido clorídrico;
- III. Solução de floroglucina em éter a 0,1%*m/v*.

### 1.17.3. Procedimento

- Separe cerca de 30g das partes gordurosas da carne ou 100g do produto cárneo previamente triturado.
- Transfira para um frasco Erlenmeyer de 500mL.
- Adicione de 100 a 150mL 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 300mL.
- Evapore o filtrado em rotavapor, sob vácuo, a temperatura máxima de 40 °C.
- Transfira, com auxílio de uma pipeta, 5mL da gordura fundida

(resíduo do balão) para uma proveta de 50mL.

- Adicione 5mL de ácido clorídrico, tampe e agite por 30 segundos.
- Adicione 5mL de solução de floroglucina, tampe e agite novamente por 30 segundos.
- Deixe em repouso por 10 minutos.
- Na presença de ranço, a camada inferior apresentara 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% (3,8mL de uma solução 0,002M diluída para 100mL). Se a intensidade for à mesma, ou inferior, pode-se deixar de levar em consideração o resultado, contanto que as características sensoriais do produto sejam satisfatórias.

## 1.18. PROVA PARA FORMALDEÍDO

### 1.18.1. Princípio

O formaldeído é considerado uma substancia conservante de material biológico. Sua adição e proibida em alimentos. A floroglucina reage com o formaldeído em meio alcalino produzindo o derivado hidroximetilado, de coloração salmão fugaz (IAL, 2008).

### 1.18.2. Material

- I. Balança semi-analítica;
- II. Aquecedor elétrico;
- III. Condensador de Liebig;
- IV. Balão de Kjeldahl de 600mL;
- V. Proveta de 100mL;
- VI. Frasco Erlenmeyer de 200mL;
- VII. Tubos de ensaio;

VIII. Pipetas graduadas de 1, 2 e 5mL.

#### 1.18.2.1. Reagentes

- I. Solução de ácido fosfórico a 20%v/v;
- II. Solução de floroglucina ( $C_6H_6O_3$ ) a 1%*m/v*;
- III. Solução de hidróxido de sódio a 10%*m/v*.

#### 1.18.3. Procedimento

- Pese cerca de 10g da amostra, previamente triturada e homogeneizada em béquer.
- Transfira para balão de Kjeldahl com auxílio de 80mL de solução de ácido fosfórico a 20%. Ligue o balão ao conjunto de destilação de Liebig.
- Aqueça até ebulição e destile cerca de 40mL em frasco Erlenmeyer de 200mL. Coloque em tubo de ensaio 5mL do destilado, adicione 1mL 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.

## 1.19. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMIDO

### 1.19.1. Princípio

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, ou-

tros 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 contém teores consideráveis de açúcares simples e de amido em sua composição, superestimando o valor real. O método baseia-se na determinação espectrofotométrica a 500nm do composto colorido formado pela reação entre os reativos de Somogyi-Nelson e a glicose proveniente da hidrólise do amido. Como 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  $\text{Cu}^{++}$  à  $\text{Cu}^+$ , e na oxidação do açúcar a ácido orgânico. O  $\text{Cu}^+$  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 (IAL, 2008).

### 1.19.2. Material

- I. Espectrofotômetro UV/VIS;
- II. Centrífuga;
- III. Balança analítica;
- IV. Estufa;
- V. Chapa de aquecimento com aparelho de refluxo acoplado;
- VI. Papel indicador de pH;
- VII. Banho-maria;
- VIII. Dessecador;
- IX. Papel de filtro;

- X. Termômetro;
- XI. Béqueres de 500 e 1000mL;
- XII. Balões volumétricos de 100, 250 e 1000mL;
- XIII. Tubos de centrífuga de 15mL;
- XIV. Pipetas graduadas de 5 e 10mL;
- XV. Pipeta volumétrica de 1mL;
- XVI. Frasco Erlenmeyer de 500mL com boca esmerilhada;
- XVII. Tubos de Folin-Wu de 25mL;
- XVIII. Cubeta de vidro com caminho óptico de 10mm;
- XIX. Bureta de 10mL;
- XX. Proveta de 25mL.

#### 1.19.2.1. Reagentes

- I. Álcool;
- II. Éter de petróleo;
- III. Ácido clorídrico;
- IV. Solução de hidróxido de sódio 40% m/v;
- V. Ácido sulfúrico ( $D = 1,84 \text{ g/mL}$ ).

#### 1.19.2.2. Preparo das soluções

##### 1.19.2.2.1 Reativo A

- Dissolva 25g de carbonato de sódio, 25g de tartarato duplo de sódio e potássio, 20g de bicarbonato de sódio e 200g de sulfato de sódio anidro em 800mL de água.
- Transfira para balão volumétrico de 1000mL e complete o volume com água.

##### 1.19.2.2.2 Reativo B

- Dissolva, em água, 15g de sulfato de cobre penta-hidratado.

Transfira para um balão volumétrico de 100 mL.

- Adicione duas gotas de ácido sulfúrico ( $D = 1,84 \text{ g/mL}$ ) e complete o volume com água.

#### 1.19.2.2.3 Reativo de Somogyi ou reativo cúprico

- Adicione 1 mL do reativo B a 25 mL do reativo A em proveta no momento da análise.

#### 1.19.2.2.4 Reativo de Nelson

- Dissolva 25g de molibdato de amônio em 450mL de água.
- Adicione 21mL de ácido sulfúrico e agite.
- Adicione 2g de arseniato de sódio hepta-hidratado, dissolvido em 25mL de água.
- Deixe em banho a  $37^{\circ}\text{C}$ , por um período de 24 a 48h.

#### 1.19.2.2.5 Solução de acetato de zinco di-hidratado a 12%<sub>m/v</sub>

- Pese 120g de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , dissolva em 30mL de ácido acético glacial e 600mL de água. Transfira para um balão volumétrico de 1000mL e complete o volume com água.

#### 1.19.2.2.6 Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 6%<sub>m/v</sub>

- Pese 60g de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e dissolva em 800mL de água.
- Transfira para balão volumétrico de 1000mL e complete o volume com água.

#### 1.19.2.2.7 Solução-padrão de glicose a 250 $\mu\text{g/mL}$

- Seque uma quantidade arbitrária de glicose anidra em estufa a  $80^{\circ}\text{C}$ , por 2h.
- Deixe esfriar em dessecador.

- Pese 250mg, transfira quantitativamente para balão de 1000mL com água, complete o volume e homogeneíze.
- A concentração dessa solução-estoque é 250mg/L ou 250µg/mL.

### 1.19.3. Procedimento

- Pese 1g da amostra homogeneizada, em tubo de centrífuga.
- Adicione 10mL de solução álcool-éter de petróleo (1:3), agite com a ajuda de uma fina haste de ferro e centrifugue a 2500rpm, por 5 minutos.
- Despreze o sobrenadante e repita o procedimento anterior. Adicione 10mL de álcool a 80% v/v a 80°C ao resíduo, agite com fina haste de ferro e centrifugue a 2500rpm, por 5 minutos.
- Despreze o sobrenadante e repita a extração alcoólica. Seque o resíduo em estufa a 70°C, por 20 minutos.
- Transfira o resíduo obtido no tubo de centrífuga, com auxílio de 100mL de água, para um frasco Erlenmeyer de 500mL com boca esmerilhada.
- Adicione 5mL de ácido clorídrico.
- Hidrolise em refluxo por 90 minutos.
- Esfrie e neutralize o hidrolisado com solução de hidróxido de sódio a 40% até pH  $\pm$  7 (volume gasto aproximado 6mL), verificando com papel indicador de pH.
- Transfira para um balão volumétrico de 250mL e clarifique adicionando 5mL de solução de acetato de zinco e 5mL de solução de ferrocianeto de potássio (reagentes Carrez). Complete o volume, tampe e agite com vigor.
- Deixe em repouso por 15 minutos, agitando vigorosamente várias vezes nesse período. Filtre para um frasco Erlenmeyer e reprecipite com hidróxido de sódio a 40% até pH  $\pm$  11 (gasto aproximado 0, 5mL).
- Filtre, transfira 1mL do filtrado para tubo de Folin-Wu e adicione

1mL 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 a reação com reativo cúprico).

- Esfrie, adicione 1mL de reativo de Nelson e complete o volume com água até a primeira marca do tubo de Folin-Wu (12,5mL) e homogeneíze.
- Proceda as leituras de absorvância das soluções contra o branco de reagentes, no comprimento de onda 500nm.

**Nota:** Caso as soluções estejam concentradas, isto é, a absorvância 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 (25mL). Neste caso, o resultado final (% de amido) deverá ser duplicado.

#### 1.19.3.1. Curva-padrão

- Transfira alíquotas de 0 (branco); 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1mL da solução padrão estoque de glicose para tubos de Folin-Wu.
- Adicione 1mL de reativo de Somogyi ou reativo cúprico, deixe imerso em banho-maria fervente por 20 minutos. Esfrie, adicione 1mL de reativo de Nelson, complete o volume com água até a primeira marca do tubo de Folin-Wu (12,5mL) e homogeneíze.
- Proceda as leituras de absorvância das soluções contra o branco, no comprimento de onda 500nm. Proceda a regressão linear dos valores de absorvância obtidos (eixo y) e das concentrações de glicose de 4, 8, 12, 16 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (eixo x).
- Utilize nos cálculos os valores dos coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1 cm).

### 1.19.3.2. Cálculos

$$\frac{(A - b) \times 0,3125}{a \times p} = \text{glicose \%}$$

Onde:

Glicose (%) x 0,9 = amido por cento m/m

A = absorvância da amostra

b = coeficiente linear da curva-padrão de glicose

a = absorvância (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

## 1.20. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE HIDROXIPROLINA

### 1.20.1. Princípio

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 558nm (IAL, 2008).

### 1.20.2. Material

- Processador de alimentos;

- Chapa elétrica equipada com condensador resfriado com água para refluxo;
- Balança analítica;
- Banho-maria com temperatura termostaticamente controlada a  $(60 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ ;
- Espectrofotômetro UV/VIS;
- Cubeta de vidro de caminho óptico de 10mm;
- Papel de filtro qualitativo de diâmetro 12,5cm;
- pHmetro;
- Frascos Erlenmeyer com boca esmerilhada de 100, 250 e 500mL;
- Tubos de ensaio com tampa de 10mL;
- Balões volumétricos de 50, 100, 500 e 1000mL;
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10 e 20mL.

#### 1.20.2.1. Reagentes

- I. Ácido clorídrico 6M
- II. Solução-padrão estoque de hidroxiprolina a  $600\mu\text{g}/\text{mL}$

#### 1.20.2.2. Preparo das soluções

##### 1.20.2.2.1 Ácido clorídrico 6M

- Misture volumes iguais de HCl e água.

##### 1.20.2.2.2 Solução-padrão estoque de hidroxiprolina a $600\mu\text{g}/\text{mL}$

- Dissolva 60mg 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  $4^\circ\text{C}$ .
- *Opção:* dissolva 120mg em balão de 200mL e complete o volume com água.

#### 1.20.2.2.3 Solução-padrão intermediária de hidroxiprolina a 6µg/mL

- Pipete 5mL da solução estoque em balão volumétrico de 500mL. Complete o volume com água.
- Prepare a solução no dia de seu uso.

#### 1.20.2.2.4 Solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina

- Pipete 5, 10, 20 e 30mL 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.

#### 1.20.2.2.5 Solução-tampão (pH 6)

- Dissolva 30g de ácido cítrico mono-hidratado ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ), 15g de hidróxido de sódio e 90g de acetato de sódio tri-hidratado ( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ) em cerca de 500mL de água.
- Transfira a solução para balão volumétrico de 1000mL.
- Adicione 290mL 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 4°C e em frasco escuro.

#### 1.20.2.2.6 Solução oxidante

- Dissolva 1,41g do reagente cloramina T em 100mL da solução tampão pH 6.
- A solução é estável 1 semana a 4 °C, em frasco escuro.

#### 1.20.2.2.7 Reagente de cor

- Dissolva 10g de 4-dimetilaminobenzaldeído em 35mL de ácido perclórico a 60% m/m.
- Adicione vagorosamente, com agitação, 65mL de 2-propanol.
- Prepare a solução no dia de seu uso.

### 1.20.3. Procedimento

- Pese, com precisão, cerca de 4g da amostra em duplicata em frascos Erlenmeyer de 250 ou 500mL. A amostra não deve aderir às paredes laterais.
- Adicione 30mL de HCl 6M e algumas pérolas de vidro (ou cacos de porcelana) a cada frasco. Aqueça a fervura branda por 8 horas, sob refluxo.
- Transfira quantitativamente o hidrolisado para balão volumétrico de 500mL 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 4°C.
- 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 3,6µg/mL. A diluição de 5mL do filtrado para 50mL é usualmente satisfatória.
- Pipete 2mL 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  $(20 \pm 2)$  minutos à temperatura ambiente.
- Adicione 1mL do reagente de cor e misture vigorosamente. Feche cada tubo com tampa ou papel alumínio. Imediatamente, coloque os tubos em banho de água a  $(60 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  por exatamente 15 minutos.
- Resfrie os tubos em água corrente por 3 minutos. Meça a absorbância das soluções contra o branco de reagentes a  $(558 \pm 2)$  nm.

#### 1.20.3.1. Curva-padrão

- Prepare a curva-padrão para cada série de medições.
- Transfira 2mL de água (branco) e 2mL de cada solução-padrão de trabalho aos tubos de ensaio e proceda a adição da solução oxidante e do reagente de cor conforme procedimento da

amostra.

- Construa a curva com absorvância no eixo y e concentrações de hidroxiprolina 0,3; 0,6; 1,2 e 1,8µg/mL no eixo x.
- Calcule os coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1cm).

### 1.20.3.2. Cálculos

$$\frac{(A-b)}{a \times p} = \text{hidroxiprolina (H), em g / 100g}$$

Onde:

A = absorvância do filtrado da amostra diluída 10 vezes (5mL em 50mL)

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.

$$\frac{B \times 100}{\% \text{ Proteína total}} = \text{tecido colagenoso relativo (BR) em g / 100g}$$

% 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 0,030µg/mL de hidroxiprolina na alíquota de análise (com desvio-padrão relativo de 6,5%) e de 0,0075g/100 g de hidroxiprolina na amostra (Della Torre *et al.* 2004).

---

## 1.21. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE NITRITOS

### 1.21.1. Princípio

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-pazobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante é determinado espectrofotometricamente a 540nm (BRASIL, 1999).

### 1.21.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Espectrofotômetro UV/VIS;
- III. Banho-maria;
- IV. Balão volumétrico âmbar de 50mL;
- V. Balões volumétricos de 100, 200, 250 e 1000mL;
- VI. Provetas de 25 e 50mL;
- VII. Béqueres de 100 e 200mL;
- VIII. Frasco Erlenmeyer de 250 ou de 500mL;
- IX. Funil;
- X. Papel de filtro qualitativo;
- XI. Pipeta graduada de 5mL;
- XII. Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 e 20mL.

#### 1.21.2.1. Reagentes

- I. Solução de tetraborato de sódio deca-hidratado a 5%*m/v*;
- II. Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 15%*m/v*;
- III. Solução de acetato de zinco diidratado a 30%*m/v* ou sulfato de zinco hepta-hidratado a 30%*m/v*;

- IV. Reagente sulfanilamida a 0,5%*m/v*;
- V. Reagente NED a 0,5%*m/v*;
- VI. Solução-padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) a 0,2g/L;
- VII. Solução-padrão de trabalho a 8 $\mu\text{g/mL}$ .

**Obs:** Utilize preferencialmente água deionizada isenta de nitritos e/ou nitratos no preparo dos reagentes e na realização da análise.

#### 1.21.2.2. Prepare das soluções

##### 1.21.2.2.1 Solução de tetraborato de sódio deca-hidratado a 5%*m/v*

- Dissolva 50g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  em água e complete o volume até 1000mL.

##### 1.21.2.2.2 Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 15%*m/v*

- Dissolva 150g de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em água e complete o volume até 1000mL.

##### 1.21.2.2.3 Solução de acetato de zinco diidratado a 30% *m/v* ou sulfato de zinco hepta-hidratado a 30%*m/v*

- Dissolva 300g de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 30mL de ácido acético glacial e 500mL de água (aqueça brandamente, se necessário) e complete o volume até 1000mL.
- Alternativamente, dissolva 300g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em água e complete o volume até 1000mL.

##### 1.21.2.2.4 Reagente sulfanilamida a 0,5%*m/v*

- Dissolva 1,25g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$  em 250mL de solução de ácido clorídrico (1:1). Aqueça brandamente, se necessário.
- A solução é estável por 1 a 2 meses.

#### 1.21.2.2.5 Reagente NED a 0,5%<sub>m/v</sub>

- Dissolva 0,5g de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina ( $C_{12}H_{16}C_{12}N_2$ ) em 100mL 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.

#### 1.21.2.2.6 Solução-padrão de nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) a 0,2 g/L

- Pese 200mg de nitrito de sódio, previamente seco por 1 hora a 105°C, dissolva em água e dilua para 1000mL. Essa solução-padrão estoque é estável por 2 semanas, se mantida a 4°C.

#### 1.21.2.2.7 Solução-padrão de trabalho a 8µg/mL

- Pipete 10mL da solução-padrão estoque de nitrito de sódio em um balão volumétrico de 250mL e complete o volume com água.

### 1.21.3. Procedimento

- Pese 10g de amostra triturada e homogeneizada em um béquer de 200mL.
- Adicione 5mL de solução de tetraborato de sódio, misture com bastão de vidro e acrescente cerca de 50mL de água quente (80°C).
- Deixe em banho-maria por 15 minutos, agitando frequentemente 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 200mL. Lave bem o béquer com aproximadamente 50mL de água.
- Deixe esfriar e adicione 5mL de solução de ferrocianeto de potássio e 5mL de solução de acetato de zinco (ou sulfato de zinco como alternativa).

- 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 250mL. Pipete 10mL do branco de reagentes e das amostras, respectivamente, para balões volumétricos âmbar de 50mL.
- Adicione 5mL de reagente sulfanilamida, deixe reagir por 5 minutos e adicione 3mL 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 540nm contra o branco de reagentes.

#### 1.21.3.1. Curva-padrão

- Pipete alíquotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7mL da solução-padrão de trabalho de nitrito de sódio ( $8\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para balões volumétricos de 50mL.
- Adicione, a cada um, 5mL de reagente sulfanilamida, misture por rotação e, após 5 minutos, adicione 3mL de reagente NED.
- Complete o volume e homogeneíze. Deixe a cor desenvolver por 15 minutos e determine a absorbância a 540nm 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  $1,12\mu\text{g}/\text{mL}$  no eixo x. Calcule os coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1 cm).

#### 1.21.3.2. Cálculo

$$\frac{(A - b) \times 1000}{p \times a} = \text{nitrito de sódio, em mg / kg}$$

Onde:

A = absorvância da amostra

b = coeficiente linear da reta obtida na curva-padrão

a = absorvidade (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<sub>2</sub> (ou 0,021 µg/mL de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) na alíquota de análise, com desvio padrão relativo de 3,7% (TAKEMOTO *et al.*, 1999).

## 1.22. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE NITRATOS

### 1.22.1. Princípio

O nitrato é reduzido a nitrito em coluna de cádmio metálico em meio alcalino. A reação baseia-se na diazotização 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 540nm (BRASIL, 1999).

### 1.22.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Espectrofotômetro UV/VIS;
- III. Banho-maria;
- IV. Coluna de cádmio;

- V. Balões volumétricos âmbar de 50mL;
- VI. Balões volumétricos de 100, 200, 250 e 1000mL;
- VII. Provetas de 25 e 50mL;
- VIII. Béqueres de 100 e 200mL;
- IX. Frasco Erlenmeyer de 250 ou de 500mL;
- X. Funil;
- XI. Papel de filtro qualitativo;
- XII. Pipeta graduada de 5mL;
- XIII. Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 e 20mL.

#### 1.22.2.1. Reagentes

- I. Solução de tetraborato de sódio deca-hidratado a 5% m/
- II. Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 15% m/
- III. Solução de acetato de zinco di-hidratado a 30% m/v ou sulfato de zinco hepta-hidratado a 30% m/v
- IV. Solução de EDTA a 5% m/v
- V. Reagente sulfanilamida a 0,5% m/v
- VI. Reagente NED a 0,5% m/v
- VII. Solução-tampão pH (9,6-9,7)
- VIII. Solução-padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) a 200mg/L
- IX. Solução-padrão de trabalho a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- X. Solução-padrão de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ )
- XI. Solução-padrão de trabalho de nitrato de sódio a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

**Obs:** Utilize preferencialmente água deionizada isenta de nitritos e/ou nitratos no preparo dos reagentes e na realização da análise.

#### 1.22.2.2. Prepare das soluções

##### 1.22.2.2.1 Solução de tetraborato de sódio deca-hidratado a

5%*m/v*

- Dissolva 50g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  em água e complete o volume até 1000mL.

#### 1.22.2.2.2 Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 15% *m/v*

- Dissolva 150g de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em água e complete o volume até 1000mL.

#### 1.22.2.2.3 Solução de acetato de zinco di-hidratado a 30% *m/v* ou sulfato de zinco hepta-hidratado a 30% *m/v*

- Dissolva 300g de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 30mL de ácido acético glacial e 500mL de água (aqueça brandamente se necessário), complete o volume até 1000mL.
- Alternativamente, dissolva 300g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em água e complete o volume até 1000mL.

#### 1.22.2.2.4 Solução de EDTA a 5%*m/v*

- Pese 5g de  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , dissolva com água e complete o volume de 100mL. Guarde em frasco de polietileno.

#### 1.22.2.2.5 Reagente sulfanilamida a 0,5% *m/v*

- Dissolva 1,25g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$  em 250mL de solução de ácido clorídrico (1:1). Aqueça brandamente, se necessário.
- A solução é estável por 1 a 2 meses.

#### 1.22.2.2.6 Reagente NED a 0,5%*m/v*

- Dissolva 0,5g de cloreto de alfa-naftiletlenodiamina ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{C}_{12}\text{N}_2$ ) em 100mL 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).

#### 1.22.2.2.7 Solução-tampão pH (9,6-9,7)

- Dilua 20mL de ácido clorídrico em 700mL de água.
- Adicione 50mL de hidróxido de amônio.
- Verifique o pH e ajuste para (9,6-9,7) com HCl ou  $\text{NH}_4\text{OH}$ , se necessário. Complete o volume até 1000mL e misture.

#### 1.22.2.2.8 Solução-tampão pH (9,6-9,7) diluída (1:9)

- Dilua 100mL da solução-tampão pH (9,6-9,7) em balão de 1000mL e complete o volume com água.

#### 1.22.2.2.9 Solução-padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) a 200 mg/L

- Pese 200mg de nitrito de sódio, previamente seco por 1 hora a  $105^\circ\text{C}$ , dissolva em água e dilua para 1000mL. Essa solução-padrão estoque é estável ao menos por 2 semanas, se mantida a  $4^\circ\text{C}$ .

#### 1.22.2.2.10 Solução-padrão de trabalho a $8\mu\text{g}/\text{mL}$

- Transfira 10mL da solução-padrão estoque para um balão volumétrico de 250mL e complete o volume com água.

#### 1.22.2.2.11 Solução-padrão de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ )

- Desseque o nitrato de sódio por 1 hora a  $105^\circ\text{C}$ .
- Pese, com precisão, 0,1g e dissolva em água.
- Adicione 50mL da solução-tampão pH (9,6-9,7) e complete para balão de 100mL com água. Essa solução-padrão é estável ao menos por duas semanas, se mantida a  $4^\circ\text{C}$ .

#### 1.22.2.2.12 Solução-padrão de trabalho de nitrato de sódio a $10\mu\text{g}/\text{mL}$

- Dilua 1mL em balão de 100mL com água. A solução-padrão de nitrato de sódio de trabalho deve ser preparada no momento da

análise.

#### 1.22.2.2.13 Preparação da coluna de cádmio

- Estire um tubo de vidro de 1,5cm de diâmetro e 15cm de altura (coluna).
- Compacte um pequeno chumaço de lã de vidro na extremidade afilada da coluna, acrescente uma camada de 1cm de areia tratada.

#### 1.22.2.2.14 Preparação do cádmio esponjoso

- Prepare 500mL 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 200mL 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 2M; deixe em contato (repouso) por 2 minutos, remova o ácido clorídrico sobrenadante; lave o cádmio com água até pH neutro; adicione ácido clorídrico 0,1M 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 10cm.
- Adapte ao topo da coluna um funil de separação de 100mL, com haste de 10mm de diâmetro e 25cm 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.

#### 1.22.2.2.15 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 10mL/min respeitando a seguinte ordem: 25mL de ácido clorídrico 0,1M, 50mL de água e 25mL de solução-tampão diluída (1:9).

#### 1.22.3. Procedimento

- Pese 10g de amostra triturada e homogeneizada em béquer de 200mL. Adicione 5mL de solução de tetraborato de sódio, misture com baqueta de vidro e acrescente cerca de 50mL de água quente (80°C).
- Deixe em banho-maria por 15 minutos, agitando frequentemente 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 200mL.
- Lave bem o béquer com aproximadamente 50mL de água.
- Deixe esfriar e adicione 5mL de solução de ferrocianeto de potássio e 5mL 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 250mL.
- Transfira uma alíquota de 20mL do filtrado (primeiramente do branco de reagentes e, na sequência, as amostras) para béquero de 100mL.
- Adicione 5mL da solução-tampão pH (9,6-9,7). Se turvar, adicione 2mL de solução de EDTA 5%. Passe pela coluna de cádmio a um fluxo que não exceda 6mL/minuto, recolhendo diretamente em balão volumétrico de 100mL.
- Lave as paredes do béquero no mínimo três vezes consecutivas com aproximadamente 15mL de água, passando sequencialmente pela coluna de cádmio.
- Continue a passagem de água pela coluna até completar o volume de 100mL no balão volumétrico.
- Pipete 10mL (do branco de reagentes e das amostras), respectivamente, para balões volumétricos de 50mL.
- Adicione 5mL de reagente sulfanilamida, agite por rotação, após 5 minutos adicione 3mL de reagente NED, complete o volume com água, misture e deixe desenvolver a cor por 15 minutos.
- Determine a absorbância a 540nm 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).

#### 1.22.3.1. 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 100mL, uma alíquota de 20mL da solução padrão de trabalho de nitrato de sódio ( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 5mL da solução-tampão pH (9,6-9,7).
- Passe pela coluna de cádmio a um fluxo que não exceda 6mL/minuto, recolhendo diretamente em balão volumétrico de 100mL.
- Lave as paredes do béquer no mínimo três vezes consecutivas com aproximadamente 15mL de água, passando sequencialmente pela coluna de cádmio.
- Continue a passagem de água pela coluna até completar o volume de 100mL no balão volumétrico. Pipete 10mL para um balão volumétrico de 50mL.
- Adicione 5mL de reagente sulfamilamida, agite por rotação; após 5 minutos, adicione 3mL de reagente NED e complete o volume com água.
- Após 15 minutos, faça a leitura a 540nm 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.

#### 1.22.3.2. Curva-padrão de nitrito de sódio

- Pipete alíquotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7mL da solução padrão de trabalho de nitrito de sódio ( $8\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para balões volumétricos de 50mL.
- Adicione, a cada um, 5mL de reagente sulfanilamida, misture por rotação e, após 5 minutos, adicione 3mL de reagente NED.
- Complete o volume e homogeneíze.
- Deixe desenvolver a cor por 15 minutos e determine a

absorbância a 540nm 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 1,12µg/mL no eixo x. Calcule os coeficientes linear e angular da reta (absortividade, considerando o caminho óptico da cubeta de 1cm).

### 1.22.3.3. Cálculos

$$\frac{(A - b) \times 5000}{p \times a} = \text{nitrito de sódio total, em mg / Kg}$$

$$\frac{(A - b) \times 1000}{p \times a} = \text{nitrito de sódio, em mg / Kg}$$

Onde:

Nitrato de sódio (em  $\text{NaNO}_2$ ) = nitrito de sódio total - nitrito de sódio

Nitrato de sódio (em  $\text{NaNO}_3$ ) = (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 = absorvidade, coeficiente angular da curva-padrão de nitrito de sódio

p = massa nitrato de sódio padrão em g

30,8 = fator (diluição e conversão  $\text{NaNO}_3 / \text{NaNO}_2$ )

**Nota:** O limite de quantificação do método é de  $0,032\mu\text{g/mL}$  de  $\text{NaNO}_2$  (ou  $0,021\mu\text{g/mL}$  de  $\text{NO}_2^-$ ) na alíquota de análise, com desvio padrão relativo de 3,7% (TAKEMOTO et al., 1999).

## 1.23. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA PELO MÉTODO ELISA

### 1.23.1. Princípio

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. A amostra é geralmente ana-

lisada 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 (IAL, 2008).

### 1.23.2. Material

- I. Lavadora e leitora de placas de ELISA;
- II. Pipeta digital de 8 ou 12 canais, pipetasmonocanais de (5-50)  $\mu\text{L}$ , (50-200)  $\mu\text{L}$  e (100 1000)  $\mu\text{L}$  com ponteiras;
- III. Reservatórios de reagentes para cada solução;
- IV. Triturador de amostras, homogeneizador Ultra-Turrax ou DiAx 900 (Heidolph) ou equivalente;
- V. Papel de filtro Whatman n° 541;
- VI. Tubos de vidro pirex graduados de 10mL com tampas de plástico;
- VII. Banho-maria;
- VIII. Placas de imuno ensaio de poliestireno fundo chato de 96 cavidades (equivalente Nunc Maxisorp 442404);
- IX. Microtubos plásticos de 1mL com tiras de tampas e suporte (8x12 fileiras) para diluição serial e pré-incubação; caixas plásticas com tampa para colocar placas de ELISA;
- X. Balões volumétricos de 10, 25 e 50mL; funil de vidro de 7cm; almofariz; balança analítica;
- XI. pHmetro;
- XII. Estufa;
- XIII. Cronômetro e papel gráfico semi-log (linear/4 ciclos log).

### 1.23.2.1. Reagentes

- I. Acetona;
- II. Uréia;
- III. 2-Mercaptoetanol;
- IV. Azida sódica ( $\text{NaN}_3$ );
- V. Clorofórmio-metanol – 2:1 (v/v);
- VI. Álcool-água (acidificado) – 80:20 (v/v), acidificado com 2 gotas de HCl/L;
- VII. Tampão Tris-HCl a 0,25M;
- VIII. Proteína de soja padrão;
- IX. Solução de sensibilização (50 vezes concentrada);
- X. Solução de sensibilização de trabalho;
- XI. Solução-tampão salina de fosfato TFS pH 7,1;
- XII. Solução-tampão de trabalho TFST;
- XIII. Soluções imunorreagentes;
- XIV. Solução anticorpo-positivo;
- XV. Solução anticorpo-negativo;
- XVI. Solução conjugado;
- XVII. Solução-substrato de fosfatase em meio tampão.

### 1.23.2.2. Prepare das soluções

#### 1.23.2.2.1 Tampão Tris-HCl a 0,25M

- Pese 30,3g de tris (hidroximetil) amino metano em um litro de água e ajuste ao pH 8,6 com HCl.

#### 1.23.2.2.2 Proteína 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 proteico de soja Supro 500E (Protein

Technologies International, USA) na preparação da solução de sensibilização.

#### 1.23.2.2.3 Solução de sensibilização (50 vezes concentrada)

- Misture, em balão volumétrico de 50mL, 4,5mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2M, 8mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,2M, 625 $\mu\text{L}$  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) $^\circ\text{C}$  por 16 horas.

**Nota:** o valor 625 $\mu\text{L}$  da solução-padrão foi calculado para corresponder a 2,5mg de proteína de soja no pó de acetona, uma vez que a solução-padrão descrita no item (b) do procedimento contém 100 mg/25mL.

#### 1.23.2.2.4 Solução de sensibilização de trabalho

- Misture, em um balão volumétrico de 50mL, 4,5mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2M, 8mL  $\text{NaHCO}_3$  0,2M e água para completar o volume.
- Homogeneíze e retire 1mL desta solução, repondo o volume da solução com 1mL da solução de sensibilização 50 vezes concentrada.

#### 1.23.2.2.5 Solução-tampão salina de fosfato TFS pH 7,1

- Misture, em um balão volumétrico de 1000mL, 85g de  $\text{NaCl}$ , 10,7g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3,9g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5g de  $\text{NaN}_3$  e água até completar o volume para 1000mL.

#### 1.23.2.2.6 Solução-tampão de trabalho TFST

- Misture 100mL da solução-tampão TFS, 1,5mL de Tween 20 e 900mL de água.

#### 1.23.2.2.7 Soluções imunorreagentes

#### 1.23.2.2.8 Solução anticorpo-positivo

- Dilua, em um balão volumétrico de 50mL, 5 $\mu\text{L}$  de antissoro de coelho para proteína de soja (equivalente Sigma-Aldrich S-2519),

conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e complete o volume com solução-tampão TFST.

#### 1.23.2.2.9 Solução anticorpo-negativo

- Em um balão volumétrico de 50mL, pipete B $\mu$ L de soro normal de coelho e complete o volume com solução-tampão TFST.

#### 1.23.2.2.10 Solução conjugado

- Em um balão volumétrico de 25mL, pipete C $\mu$ L de IgG anticoelho produzido em cabra conjugado à fosfatase alcalina (equivalente Sigma-Aldrich A-7539), conservado a  $(2 - 8)^{\circ}\text{C}$  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.

#### 1.23.2.2.11 Solução-substrato de fosfatase em meio tampão

- Misture, em um balão volumétrico de 25mL, 2,25mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2M, 4mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,2M, 25 $\mu$ L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5M, 25mg p-nitrofenil fosfato (5 tabletes de 5mg cada, equivalente Sigma 104-105, guarde no escuro a temperatura menor que  $0^{\circ}\text{C}$ ) e complete o volume com água.

### 1.23.2.3. Padronização

#### 1.23.2.3.1 (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 antissor para obter o título do anticorpo positivo.

- Calcule o valor B, isto é, se o título for 1 em 3000, então  $B = 2 \times (1/3000) \times 50000 \mu\text{L} =$  cerca de  $30 \mu\text{L}$ .
- Teste também o anticorpo em produto cárneo padrão contendo concentração conhecida de proteína de soja e também contra materiais com potencial para reações cruzadas.

#### 1.23.2.3.2 (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  $< 0,050$ .

#### 1.23.2.3.3 (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.

### 1.23.3. Procedimento

#### 1.23.3.1. (A) Preparação do pó de acetone

- Pese, separadamente, 20g 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 sequência: 200mL clorofórmio-metanol (3 vezes), 200mL álcool acidificado (3

vezes) e 200mL 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 ( $N \times 6,25$ ), utilizando o resultado para calcular a massa da amostra de pó de acetona do item (b) do procedimento.

#### 1.23.3.2. (B) Solubilização de amostras e padrão

- Pese, separadamente, em tubos pirex graduados de 10mL, o pó de acetona da proteína de soja padrão (97-103mg de proteína) e o pó de acetona de cada amostra de produto cárneo (95-105mg de proteína).
- Adicione a cada um dos tubos na ordem: 2mL de tampão Tris-HCl, 6g de uréia, 2mL de água, 200 $\mu$ L de 2-mercaptoetanol e água para 10mL.
- Tampe, misture e aqueça imergindo até o nível de 10mL em banho de água fervente por  $(60 \pm 1)$  min.
- Resfrie por (3-5) minutos e transfira quantitativamente para um balão volumétrico de 25mL com água, assegurando a ressolubilização da ureia cristalizada. Mantenha as soluções de amostras e padrão por 16h 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.

#### 1.23.3.3. (C) Sensibilização das placas ELISA

- Utilizando pipeta multicanal, transfira 200 $\mu$ L 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  $(16 \pm 1)$  hora.

#### 1.23.3.4. (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 sequência 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).

#### 1.23.3.5. (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 $\mu$ L de cada uma dessas soluções a balões volumétricos de 10mL, dilua ao volume com TFST e misture por repetidas inversões. Encha com microtubos o suporte (8x12) e pipete 600 $\mu$ L 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 $\mu$ L de TFST; faça essa transferência utilizando pipeta multicanal (duas porções de 200 $\mu$ L).
- Conduza a diluição serial de cada amostra, em duplicata, pelo uso de pipeta multicanal para misturar alíquotas de 600 $\mu$ L (recolha 200 $\mu$ L e reponha 3 vezes) e, então, transfira 200 $\mu$ L ao tubo adjacente que já contém 400 $\mu$ L de TFST.
- Misture como descrito e repita a diluição, descartando a alíquota de 200 $\mu$ L 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).

FONTE: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

#### 1.23.3.6. (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 $\mu$ L de TFST a todos eles.
- Aos tubos BS e BC, acrescente 2 porções de 200 $\mu$ L de TFST; aos tubos BP, solução de anticorpo positivo (2 x 200 $\mu$ L); e, aos tubos BN, a solução de anticorpo negativo (2 x 200 $\mu$ L).
- 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.

#### 1.23.3.7. (G) Pré-incubação com soro anti-proteína de soja

- Utilizando pipeta multicanal, adicione solução de anticorpo positivo (2x200 $\mu$ L) aos tubos de amostras e padrões.
- Coloque TFST (2x200 $\mu$ L) 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 37°C por (30 $\pm$ 1) minutos.

#### 1.23.3.8. (H) Etapa anticorpo

- Nos últimos 10min 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 $\mu$ L 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 $\pm$ 2) min a 37 °C.

#### 1.23.3.9. (I) Etapa conjugado

- Remova a placa ELISA da estufa, lave 10 vezes e enxugue como em (d).
- Adicione 200 $\mu$ L 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 $\pm$ 2) minutos a 37 °C.

#### 1.23.3.10.(J) Etapa substrato

- Remova a placa da estufa, lave 10 vezes e enxugue.
- Utilizando multicanal, adicione 200 $\mu$ L 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 $\pm$ 0,25) minutos a 37 °C.

#### 1.23.3.11.(k) Reação enzimática e medição da cor

- Remova a placa ELISA da estufa e com ajuda da multicanal

adicione alíquotas de 50µL de solução de 0,2M de NaOH a todas as cavidades da placa, na mesma ordem da etapa do anticorpo.

- Proceda à leitura da absorvância 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.

### 1.23.3.12. Cálculos

Para cada placa, construa uma curva-padrão do log da concentração de proteína de soja padrão como pó de acetona (Nx6,25) nas 7 diluições seriais versus a correspondente absorvância (média de 3 leituras). Calcule a concentração de proteína total (Nx6,25) em cada diluição de cada solução de amostra. De cada média de absorvância, leia na curva a concentração de proteína de soja correspondente em cada diluição da amostra. Calcule a massa de proteína de soja por 100g 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,  $S_2$  a  $S_6$ ), utilize a média como resultado final. As absorvâncias 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 100g 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 100g 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.

O limite de quantificação do método é de 0,41µg/mL de proteína de soja na alíquota de análise (com desvio-padrão relativo de

---

2,4%) e de 0,14g/100g de proteína de soja na amostra. A curva padrão abrange de 0,41µg/mL a 300 µg/mL de proteína de soja, limite superior com desvio padrão relativo de 5,8% (DELLA TORRE et al., 2003).

## 1.24. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 20, de 21/07/1999. Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes, sal e salmoura. Instrução Normativa nº. 20, de 21 de julho de 1999. Brasília: Diário Oficial da União, Seção 1, de 27 de julho de 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referencia Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Metodos físicos e químicos. Brasília (DF), 1981. cap. I, p. 2. CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY – ICoMST, 2003. Campinas: CTC-ITAL, 2003. p. 405-406.

DELLA TORRE; J. C. M.; BARBOSA, S.F.C.; FERRACIOLI, V. R.; ZENEBO, O.; 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

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 LICHTIG, J.; BERQUET, N. J. Quantitative determination of commercial soy proteins in emulsion -type meat products by official ELISA procedure. In: 49th INTERNATIONAL.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tíglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

MAPA/SDA/CGAL Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal/SLAV Método de Ensaio - MET Código: MET POA/SLAV/50/02/01. Página 1 de 6 Emissão: 25/07/2014. Determinação gravimétrica da gordura total de carnes, pescados e produtos derivados.

MAPA/SDA/CGAL Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal/SLAV. Método de Ensaio – MET. Código: MET. POA/SLAV/24/03/03. Página 1 de 4. Emissão: 18/07/2014. Determinação do pH de produtos de origem animal por potenciometria.

MAPA/SDA/CGAL Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal/SLAV Método de Ensaio - MET Código: MET POA/SLAV/27/03/01. Página 1 de 7. Emissão: 23/07/2014. Determinação de umidade em produtos de origem animal por gravimetria.

MAPA/SDA/CGAL Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal/SLAV. Método de Ensaio - MET Código: MET POA/SLAV/35/03/01. Página 1 de 9. Emissão: 28/07/2014. Determinação de cloretos em produtos de origem animal por argentometria

MAPA/SDA/CGAL Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal Método de Ensaio - MET Código: MET POA/25/01/02. Página 1 de 5 Emissão: 19/12/2013. Determinação de umidade e voláteis e de proteína em cortes de aves por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) – MAPA, 2013.

MAPA/SDA/CGAL Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal/SLAV Método de Ensaio - MET Código: MET POA/SLAV/29/02/01.

---

Página 1 de 10. Emissão: 25/07/2014. Determinação do índice de peróxidos em produtos de origem animal por oxidimetria

TAKEMOTO, E.; DELLA TORRE, J. C. de M.; LICHTIG, J. Nitrato em espinafre: validações de métodos colorimétricos. In: III SIMPOSIO LATINO AMERICANO DE CIENCIA DE ALIMENTOS (SLACA), 1999. Resumos... Campinas: FEA-UNICAMP, 1999. p. 5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Brasília: Diário Oficial da União, 14/12/2006.

---

**CAPÍTULO 2**  
**PRODUTOS DE SALSICHARIA EMBUTIDOS E**  
**NÃO EMBUTIDOS**

---

## 2. PRODUTOS DE SALSICHARIA EMBUTIDOS E NÃO EMBUTIDOS

### 2.1. DEFINIÇÃO

Produtos de salsicharia são aqueles obtidos de carnes, de miúdos e de partes comestíveis das diferentes espécies animais, com as propriedades originais das matérias-primas modificadas por meio de tratamento físico, químico ou biológico, ou ainda pela combinação destes métodos em processos que podem envolver a adição de ingredientes, aditivos ou coadjuvantes de tecnologia.

Embutidos são os produtos cárneos elaborados com carne ou com órgãos comestíveis, curados ou não, condimentados, cozidos ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório a tripa, a bexiga ou outra membrana animal (BRASIL, 1989).

#### 2.1.1. Características Organolépticas

##### 2.1.1.1. Aspecto

Próprio de cada produto e a superfície não deve apresentar-se úmida, limosa ou viscosa. O invólucro não deve estar danificado ou com presença de parasitas que tenham atingido a massa. Deve traduzir a utilização de tecnologia adequada para sua elaboração.

##### 2.1.1.2. Coloração

Rósea nos produtos cozidos e avermelhada nos curados, sem manchas esverdeadas ou pardacentas.

##### 2.1.1.3. Consistência

Deve ser própria e com maior ou menor firmeza, conforme o tipo de produto.

##### 2.1.1.4. Odor e Sabor

Devem ser próprios de cada produto.

#### 2.1.1.5. Preparo da amostra

Retirar os invólucros, quando necessário, cortar em pedaços, passar em máquina de moer carne com discos de 3mm de diâmetro por 2 ou 3 vezes ou processador até que a amostra fique uma massa homogênea. Reservar os invólucros finamente divididos para análise de ácido sórbico, seus sais e corantes.

As determinações cinzas 1.4, proteína 1.5. pH 1.6, peróxidos 1.11, reação para amônia 1.16, gordura total 1.17 e umidade 1.19.

## 2.2. AMIDO

### 2.2.1. DEFINIÇÃO

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 (IAL 2008).

### 2.2.2. Princípio

Baseia-se na reação do amido com o iodo dando um composto de absorção de coloração azul (BRASIL, 1981).

### 2.2.3. Material

- l. Béquer de 150mL

---

II. Placa aquecedora ou bico de Bunsen

### 2.2.3.1. Reagentes

I. Solução de lugol ou iodo

### 2.2.4. Procedimento

- Em Béquer de 150mL colocar cerca de 5g de amostra.
- Adicionar água destilada (cerca de 20mL). Aquecer em placa aquecedora ou bico Bunsen até fervura e deixar 5 minutos.
- Esfriar.
- Adicionar gotas de solução de lugol ou iodo.
- Em presença de amido desenvolve-se coloração azul.

## 2.3. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA

### 2.3.1. Princípio

O amido é um polissacarídeo de elevado peso molecular que não apresenta reação redutora. Uma hidrólise enérgica em meio fortemente ácido produz exclusivamente glicose, que é determinado pelo método de Lane-Eynon (BRASIL, 1981).

### 2.3.2. Preparo da amostra

### 2.3.3. Material

- I. Balança analítica
- II. Béquer ou Erlenmeyer de 250mL
- III. Funil
- IV. Banho-maria ou autoclave

V. Papel de filtro de porosidade média

VI. Balão volumétrico de 250mL

VII. Pipetas graduadas de 1 e 10mL

#### 2.3.3.1. Reagentes

I. Ácido clorídrico concentrado

II. Solução de hidróxido de sódio a 10%

III. Solução de ferrocianeto de potássio a 15%

IV. Solução de acetato ou sulfato de zinco a 30%

#### 2.3.4. Procedimento

- Pesar 10g de amostra homogeneizada, adicionar 75mL de água destilada e misturar.
- Adicionar 10mL de ácido clorídrico concentrado.
- Deixar em banho-maria fervente, cobrindo o frasco com vidro de relógio ou em refluxo, por 2 horas no mínimo ou em autoclave a 120°C, por 20 minutos.
- Esfriar.
- Transferir para balão volumétrico de 250mL, lavando bem o béquer ou Erlenmeyer em que foi feita a hidrólise. Neutralizar com hidróxido de sódio a 40%, usando papel de tornassol como indicador.
- Adicionar 2mL de ferrocianeto de potássio a 15% e 2mL de acetato ou sulfato de zinco a 30%.
- Agitar, completar o volume a 250mL com água destilada e agitar.
- Filtrar em papel de filtro seco para frasco seco.
- Determinar a glicose pelo método de Lane-Eynon.

---

### 2.3.5. Material

- I. Balança analítica
- II. Erlenmeyer de 250mL
- III. Bureta de 25mL
- IV. Pipetas volumétricas de 5mL
- V. Pipeta graduada de 1mL
- VI. Bico de Bunsen ou placa aquecedora

#### 2.3.5.1. Reagentes

- I. Solução de Fehling A
- II. Sulfato de cobre
- III. Solução de Fehling 8
- IV. Tartarato duplo de sódio e potássio
- V. Hidróxido de sódio
- VI. Solução de azul de metileno a 1 %
- VII. Solução padrão de açúcar invertido

### 2.3.6. Procedimento

- Colocar na bureta o filtrado obtido em 2.3.4, e pipetar volumetricamente 5mL de Fehling A e 5mL de Fehling B (em vista da pequena quantidade de glicose presente) para um Erlenmeyer de 125mL.
- Adicionar mais 40mL de água destilada.
- Aquecer até ebulição e gotejar a solução da amostra até que o líquido sobrenadante fique levemente azulado. Mantendo a ebulição, adicionar 1 gota de solução de azul de metileno a 1% e continuar a titulação até descoloração do indicador.

### 2.3.6.1. Cálculo

$$\% \text{ açúcares totais} = \frac{250 \times 100 \times T}{V \times P}$$

Onde:

**T** = Título da solução de Fehling

**V** = Mililitros da amostra gastos na titulação

**P** = Peso da amostra em gramas

Quando a amostra só contém amido, multiplicar o resultado por 0,90 que é o fator de transformação de glicose, em amido.

Se a amostra contém sacarose o cálculo será:

$$\% \text{ amido} = (\text{açúcares totais} - \text{sacarose}) \times 0,90$$

Se a amostra contém sacarose e glicose o cálculo será:

$$\% \text{ amido} = [\text{açúcares totais} - (\text{sacarose} + \text{glicose})] \times 0,90$$

## 2.4. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AMIDO

Proceder conforme item 1.19.

## 2.5. CLORETOS

Proceder conforme item 1.12 ou conforme o método a seguir:

### 2.5.1. Método de Mohr

### 2.5.2. Princípio

Fundamenta-se na precipitação dos cloretos sob a forma de cloreto de prata, em pH 8,3, em presença de cromato de potássio como indicador. O final da reação é dado pela formação do precipitado vermelho tijolo de cromato de potássio (BRASIL,1981).

### 2.5.3. Material

- I. Béquero de 250mL e Funil
- II. Pape de filtro
- III. Pipeta graduada de 5mL
- IV. Bureta de 25mL

#### 2.5.3.1. Reagentes

- I. Acido nítrico 1:9
- II. Solução de nitrato de prata 0,1N
- III. Solução de cromato de potássio a 5%
- IV. Carbonato de cálcio

#### 2.5.4. Procedimento

- Nas cinzas obtidas em 1.14., adicionar 2 a 3 gotas de ácido nítrico 1:9 e 10mL de água destilada à quente.
- Agitar com bastão de vidro e filtrar, recebendo o filtrado em béquer de 250mL.
- Lavar bem o cadinho e o papel de filtro com água quente até que a água de lavagem dê reação negativa para cloretos.
- Neutralizar o filtrado com carbonato de cálcio e adicionar mais 0,5g. Aquecer em banho-maria até não haver mais desprendimento de dióxido de carbono.
- Esfriar e adicionar 1mL de cromato de potássio.
- Titular com solução de nitrato de prata 0,1N até o aparecimento de coloração vermelho tijolo.

#### 2.5.4.1. Cálculo

$$\% \text{ cloretos em cloreto de sódio} = \frac{V \times f \times 0,585}{P}$$

Onde:

**V** = mililitros de solução de  $\text{AgNO}_3$  0,1N gastos na titulação

**f** = fator de solução de  $\text{AgNO}_3$  0,1N

**p** = peso da amostra em gramas

## 2.6. MÉTODO MERCUROMÉTRICO

### 2.6.1. Princípio

O nitrato mercúrico diante de anions cloretos forma o cloreto mercúrico, pouco ionizável. O excesso de íons  $\text{Hg}^{+2}$  produz com o indicador difenilcarbazona um complexo de coloração azul violácea. A função do ácido nítrico é acidificar o meio a pH 2,3-2,8 que permite uma visualização fácil do ponto final da reação (BRASIL, 1981).

### 2.6.2. Material

O mesmo de 2.5.3.

#### 2.6.2.1. Reagentes

- I. Solução de nitrato mercúrico 0,1N
- II. Ácido nítrico 1:4
- III. Solução alcoólica de difenilcarbazona a 0,1% (estocar em refrigerador)

### 2.6.3. Procedimento

- Nas cinzas obtidas em 1.14., adicionar 10mL de água quente.
- Agitar e filtrar.
- Lavar o cadinho e o filtro com 50mL de água, recebendo as águas de lavagem em Erlenmeyer de 250mL.
- Acidular com solução de ácido nítrico 1:4 e juntar 1mL de difenilcarbazona.

- Titular com nitrato mercúrico 0,1N até coloração azul violácea.

#### 2.6.3.1. Cálculo

$$\% \text{ cloretos em cloreto de sódio} = \frac{V \times f \times 0,585}{p}$$

Onde:

**V** = mililitros de nitrato mercúrico 0,1N gastos na titulação

**f** = fator da solução de nitrato mercúrico 0,1N

**p** = peso da amostra em gramas

### 2.7. NITRITOS

Proceder conforme item 1.21.

### 2.8. NITRATOS

Proceder conforme item 1.22.

### 2.9. ÁCIDO SÓRBICO E SEUS SAIS

#### 2.9.1. Princípio

Fundamenta-se na oxidação do ácido sórbico a aldeído malônico que forma um composto de coloração vermelha, resultante da condensação de 2 moles de ácido 2- tiobarbitúrico com 1mol de aldeído malônico (BRASIL, 1981).

#### 2.9.2. Material

- I. Balança analítica
- II. Balão de fundo chato de 1000mL
- III. Balão de fundo redondo de 500mL para destilação por arraste de vapor

- IV. Condensador de Liebig
- V. Balão volumétrico de 100 e 500mL
- VI. Pipetas graduadas de 1, 2 e 5mL (3)
- VII. Pipetas volumétricas de 2, 5, 10, 15 e 20mL
- VIII. Banho-maria fervente
- IX. Tubos de ensaio de 25mL

#### 2.9.2.1. Reagentes

- I. Sulfato de magnésio
- II. Solução de ácido sulfúrico 2N e 0,3N
- III. Solução de bicromato de potássio 0,01N
- IV. Ácido acético glacial
- V. Ácido bio barbitúrico
- VI. Solução de hidróxido de sódio 1N
- VII. Solução de hidróxido de sódio a 10%

#### 2.9.2.2. Preparo das soluções

##### 2.9.2.2.1 Solução de ácido tiobarbitúrico

- Dissolver 0,5g de ácido tiobarbitúrico em 20mL de água destilada e 10mL de NaOH 1N.
- Adicionar 11mL de ácido acético e completar até 100mL em balão volumétrico. A solução poderá ser usada durante 3 dias, sendo necessário preparar uma solução nova, após este período.

##### 2.9.2.2.2 Solução padrão de ácido sórbico

- Pesar 0,1g de ácido sórbico, dissolver em 20mL de água destilada.
- Adicionar solução de hidróxido de sódio a 10% para solubilizar

---

o ácido sórbico e completar o volume para 1000mL com água destilada.

- A solução é estável por alguns dias quando guardada em refrigerador.
- O padrão também poderá ser feito pesando 0,134g de sorbato de potássio e completando o volume para 1000mL com água destilada.

#### 2.9.2.2.3 Preparo da curva padrão

- Pipetar volumetricamente 5, 10, 15 e 20mL de solução padrão de ácido sórbico para balões volumétricos de 500ml. Completar os volumes com água destilada e misturar bem.
- Pipetar 2mL de cada solução para tubos de ensaio. Para o branco usar 2mL de água destilada. Em todos os tubos acrescentar 1mL de bicromato de potássio 0,01N e 1mL de ácido sulfúrico 0,3N.
- A mistura é aquecida em banho-maria fervente durante exatamente 5 minutos.
- Esfriar em banho de gelo.
- Acrescentar 4mL de solução de ácido tiobarbitúrico e deixar em banho-maria fervente por 10 minutos.
- Esfriar em água corrente.
- Medir a coloração vermelha em espectrofotômetro a 532nm e estabelecer a curva padrão.

#### 2.9.3. Preparo da amostra

- Como o ácido sórbico e seus sais são permitidos somente no revestimento dos embutidos, deve-se usar para a sua determinação a região externa do produto, finamente dividido, pois ali estarão em maior concentração.

#### 2.9.4. Procedimento

- Para a determinação quantitativa deve-se isolar o ácido sórbico do alimento fazendo uma destilação por arraste de vapor.
- Pesar em balança analítica cerca de 5g de amostra e passar para balão redondo de destilação com auxílio de 20mL de água destilada.
- Adicionar 10mL de ácido sulfúrico 2N e 10g de sulfato de magnésio.
- Proceder a destilação por arraste de vapor, recebendo 100mL, em 45 minutos.
- Retirar 2mL do destilado; passar para tubo de ensaio.
- Adicionar 1mL de solução de bicromato de potássio 0,01N e 1mL de solução de ácido sulfúrico 0,3N.
- Aquecer em banho-maria fervente durante 5 minutos exatamente. Esfriar em banho de gelo.
- Acrescentar 4 mL de solução de ácido tiobarbitúrico a 0,5% e deixar o tubo de ensaio por mais 10 minutos em banho-maria fervente.
- Em presença de ácido sórbico desenvolve-se uma coloração vermelha.
- Esfriar a solução sob água corrente e medir a cor vermelha em espectrofotômetro a 532nm, comparando-se com a curva padrão previamente estabelecida.

### 2.10. PROVAS PARA FORMOL

#### 2.10.1. Preparo da amostra

#### 2.10.2. Material

- I. Balão de fundo chato de 1000mL
- II. Provetas de 25 a 200mL

III. Condensador de Liebig

IV. Tubos de ensaio de 100mL

#### 2.10.2.1. Reagentes

I. Ácido fosfórico concentrado

#### 2.10.3. Procedimento

- Pesar 100g de amostra homogeneizada e passar para balão de destilação juntamente com 100-150mL de água destilada.
- Acidificar com ácido fosfórico concentrado e adicionar mais 1mL em excesso.
- Destilar lentamente, recolhendo aproximadamente 50mL de destilado.
- Pesquisar formol pelos seguintes métodos:

### 2.11. COM ÁCIDO CROMOTRÓPICO

#### 2.11.1. Princípio

Quando o formaldeído é aquecido com ácido cromotrópico em solução concentrada de ácido sulfúrico há uma reação de condensação seguida de oxidação a um composto p-quinoidal de coloração violeta (BRASIL, 1981).

#### 2.11.2. Material

- I. Tubo de ensaio de 25mL, em banho-maria
- II. Pipetas graduadas de 5mL

#### 2.11.2.1. Reagentes

I. Ácido sulfúrico concentrado

## II. Ácido cromotrópico

### III. Solução de formol a 35%

#### 2.11.2.2. Preparo das soluções

#### 2.11.2.3. Ácido sulfúrico a 72%

- Com o devido cuidado misturar 100mL de água com 150mL de ácido sulfúrico concentrado.

##### 2.11.2.3.1 Ácido cromotrópico

- Dissolver 0,500g de ácido cromotrópico em 100mL de ácido sulfúrico a 72%.

##### 2.11.2.3.2 Solução de referência

- Preparar uma solução de formalina na diluição de 1:10000 (v/v).
- Para uma determinação quantitativa fazer uma curva padrão para comparar a coloração desenvolvida na amostra.

#### 2.11.3. Procedimento

- Em tubo de ensaio colocar 5mL de ácido cromotrópico e 1mL do destilado, obtido em 2.28.
- Colocar em banho-maria fervente durante 15 minutos.
- Na presença de formol aparecerá coloração violeta.

## 2.12. COM FENILHIDRAZINA

### 2.12.1. Princípio

O formaldeído reage com a fenilhidrazina formando fenilhidrazona. Em meio ácido, e em presença de ferricianeto de potássio forma um complexo de coloração róseo-avermelhada (BRASIL, 1981).

### 2.12.2. Material

III. Cápsula de porcelana de 100mL

IV. Pipetas graduadas de 5mL

#### 2.12.2.1. Reagentes

I. Solução de cloridrato de fenilhidrazina a 1%

II. Solução de ferricianeto de potássio a 5%

III. Ácido clorídrico concentrado

#### 2.12.3. Procedimento

- Transferir 30mL de destilado para cápsula de porcelana de 100mL
- Adicionar 2mL de solução recente de cloridrato de fenilhidrazina a 1% e agitar.
- Deixar em repouso por 3 minutos.
- Adicionar 1mL de solução de ferricianeto de potássio e agitar.
- Deixar em repouso por 3 minutos.
- Adicionar 4mL de ácido clorídrico concentrado e agitar.
- Deixar em repouso por 3 minutos.
- Na presença de formaldeído aparecerá uma coloração róseo-avermelhada.

## 2.13. PROVA PARA ÁCIDO BÓRICO

### 2.13.1. Preparo da amostra

#### 2.13.2. Material

I. Balança de precisão

II. Cápsula de porcelana de 50mL

III. Bastão de vidro

#### 2.13.2.1. Reagentes

I. Solução de hidróxido de cálcio ou carbonato de sódio a 10%

#### 2.13.3. Procedimento

- Pesar 10g de amostra finamente homogeneizada em cápsula de porcelana.
- Alcalinizar com uma solução de hidróxido de cálcio ou carbonato de sódio a 10% para fixar o ácido bórico sob a forma de borato.
- Evaporar até secura. Incinerar a 550°C até destruição da totalidade da matéria orgânica.
- Esfriar.

### 2.14. MÉTODO COM PAPEL DE CÚRCUMA

#### 2.14.1. Princípio

O ácido bórico transforma a cúrcuma amarela em uma rosocianina isomérica de coloração vermelha, que se torna esverdeada em meio alcalino (BRASIL 1981).

#### 2.14.2. Material

I. Erlenmeyer de 250 mL

II. Papel Whatmann n°. 02

#### 2.14.2.1. Reagentes

I. Ácido clorídrico 1:4

---

II. Papel de cúrcuma

III. Álcool etílico 80%

IV. Hidróxido de amônio concentrado

#### 2.14.2.2. Preparo da solução

- Em Erlenmeyer de 250mL colocar 1,5 a 2g de pó de cúrcuma e adicionar 100mL de álcool a 80%.
- Agitar por 5 minutos e filtrar.
- Mergulhar tiras de papel Whatmann n°.02 na solução límpida e deixar secar espontaneamente.
- Guardar em frascos bem fechados e ao abrigo da luz.

#### 2.14.3. Procedimento

- Acidificar as cinzas com HCl 1:4.
- Mergulhar uma tira de papel de cúrcuma, deixando o papel secar espontaneamente.
- Na presença de ácido bórico ou boratos aparece uma coloração vermelha que se torna esverdeada se for colocada em presença de vapores de amônia.

### 2.15. MÉTODO COM GLICEROL OU MANITOL

#### 2.15.1. Princípio

O glicerol ou manitol com o ácido bórico forma um éster complexo do ácido ortobórico no qual o grupo OH do glicol torna-se fortemente ácido, o que é indicado pela fenolftaleína (BRASIL, 1981).

#### 2.15.2. Material

I. Tubo de ensaio

II. Pipeta graduada de 2 e 10mL

### 2.15.2.1. Reagentes

I. Solução alcoólica de fenolftaleína a 1%

II. Solução de hidróxido de sódio 0,1N

III. Glicerol neutralizado ou manitol

### 2.15.3. Procedimento

- Em tubo de ensaio colocar 10mL do filtrado obtido em 1.21.3. Adicionar 5 gotas de fenolftaleína e gotejar solução de NaOH 0,1N até leve coloração rósea.
- Acrescentar 2mL de glicerol neutralizado ou alguns cristais de manitol.
- Na presença de ácido bórico ou boratos a coloração rósea desaparece.
- Se permanecer a coloração indica a ausência de ácido bórico ou boratos.

## 2.16. PROVA PARA ÁCIDOS SALICÍLICO

### 2.16.1. Princípio

Na reação entre o ácido salicílico e o cloreto férrico forma-se um quelato solúvel de coloração violeta intensa. (BRASIL, 1981).

### 2.16.2. Material

I. Gral

II. Funil de separação de 125 e 500mL

III. Cápsula de porcelana de 100mL

IV. Proveta de 10 e 100mL

V. Banho-maria

VI. Pipeta graduada de 1mL

#### 2.16.2.1. Reagentes

I. Solução de hidróxido de sódio a 10%

II. Ácido clorídrico 1:3

III. Éter etílico

IV. Solução de cloreto férrico a 0,5%

#### 2.16.2.2. Preparo da amostra

- Tomar 50g de amostra em um Gral de Pistilo e adicionar 80mL de água alcalinizada.
- Triturar bem e filtrar.
- Repetir a operação mais 2 vezes, reunindo os líquidos de extração aquosa em funil de separação de 500mL.
- Acidular com ácido clorídrico 1:3.
- Adicionar 100mL de éter etílico.
- Agitar com cuidado para evitar emulsionamento.
- Retirar a camada aquosa.
- Lavar o extrato etéreo com 3 porções de 25mL de água e transferir 50mL da camada etérea para cápsula de porcelana de 100mL, reservar o restante para a pesquisa do ácido benzóico.

#### 2.16.3. Procedimento

- Evaporar os 50mL da solução etérea obtida em 2.16.2.2, em banho-maria até secura. Quando o resíduo apresentar coloração devido a presença de corantes, dissolver em 25mL de éter,

transferir para funil de separação de 125mL.

- Adicionar gotas de hidróxido de amônio a 10% e 25mL de água.
- Esperar que se separem as camadas e filtrar a camada aquosa em papel de filtro úmido, recebendo o filtrado em cápsula de porcelana.
- Evaporar até quase a secura.
- Se persistir a coloração deve ser pela presença de corantes lipossolúveis.
- Esfriar. Se a quantidade de ácido salicílico for considerável, os cristais já aparecerão no resíduo.
- Adicionar 1 gota de cloreto férrico a 0,5%. Na presença de ácido salicílico aparecerá uma coloração violeta.

## **2.17. PROVA PARA ÁCIDO BENZÓICO**

### **2.17.1. Princípio**

Fundamenta-se na transformação do ácido benzóico em ácido salicílico e posteriormente sua reação com o cloreto férrico, formando-se um quelato solúvel de coloração violeta intensa (BRASIL, 1981).

### **2.17.2. Material**

- I. Tubos de ensaio de 25mL
- II. Pipetas graduadas de 1 e 5mL
- III. Banho-maria

#### **2.17.2.1. Reagentes**

- I. Solução de ácido sulfúrico 0,1N
- II. Água oxigenada 20 volumes

---

III. Solução de sulfato de cobre a 1%

IV. Solução de cloreto férrico a 10%

### 2.17.3. Procedimento

- Evaporar os 50mL restantes obtidos em 2.16.2.2 até a secura e dissolver em 1mL de água destilada. Colocar em tubo de ensaio 0,5mL da solução. Adicionar 0,5mL de ácido sulfúrico 0,1N, 3mL de água oxigenada 20 volumes e 1 gota de solução de sulfato de cobre a 1 %.
- Aquecer até ebulição, por 2 minutos.
- Adicionar 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10%.
- Na presença de ácido benzóico aparecerá coloração violeta.

## 2.18. PROVA PARA ANÍDRIDO SULFUROSO E SULFITOS - MÉTODO COM PAPEL IODATADO AMIDONADO

### 2.18.1. Princípio

A ação oxidante de  $\text{SO}_2$  sobre o iodato, em meio ácido, libera iodo que reage com o amido dando um composto de absorção de coloração azul (BRASIL, 1981).

### 2.18.2. Material

- I. Balança de precisão
- II. Erlenmeyer de 250mL com rolha esmerilhada
- III. Banho-maria
- IV. Proveta de 25mL

### 2.18.2.1. Reagentes

- I. Solução de ácido fosfórico a 10%
- II. Papel iodatado amidonado
- III. Solução de iodato de potássio a 0,3%
- IV. Solução de amido a 1%

### 2.18.2.2. Preparo do papel iodatado amidonado

- Molhar tiras de papel de filtro em solução aquosa de iodato de potássio a 0,3%.
- Secar. Molhar depois em solução de amido a 1 % e secar.
- Guardar em vidro âmbar bem fechado e no escuro. No momento de usar a tira pode-se umedecê-la de leve.

### 2.18.3. Procedimento

- Pesar 10g de amostra em Erlenmeyer de rolha esmerilhada.
- Juntar 5mL de solução de ácido fosfórico a 10%.
- Fechar o Erlenmeyer prendendo na rolha a tira de papel iodatado amidonado.
- Aquecer em banho-maria.
- Em presença de anidrido sulfuroso ou sulfito o papel tomará a coloração azul.
- Fazer em paralelo uma prova em branco e um teste positivo.

## 2.19. MÉTODO COM VERDE MALAQUITA

### 2.19.1. Princípio

O anidrido sulfuroso ou os sulfitos descoram a solução de corantes orgânicos como o verde malaquita (BRASIL, 1981).

---

### 2.19.2. Material

- I. Tubo de ensaio
- II. Pipetas graduadas de 5mL

#### 2.19.2.1. Reagentes

- I. Verde malaquita
- II. Bicarbonato de sódio

Nota: Verde malaquita: dissolver 25mg de verde malaquita em 100mL de água destilada.

#### 2.19.3. Procedimento

- Em tubo de ensaio, colocar 5mL do filtrado obtido em 1.53.
- Se estiver ácido, neutralizar com bicarbonato de sódio.
- Adicionar 5mL do reagente.
- Em presença de sulfitos há descoloramento do reagente.

## 2.20. ACIDEZ DA GORDURA

### 2.20.1. Preparo da amostra (extração da gordura)

#### 2.20.2. Material

- I. Balança de precisão
- II. Erlenmeyer de 500mL com rolha esmerilhada
- III. Proveta de 100mL
- IV. Béquers de 50 e 500mL
- V. Funil

VI. Papel de filtro

VII. Estufa

VIII. Banho-maria

#### 2.20.2.1. Reagentes

I. Éter de petróleo

II. Éter etílico

III. Sulfato de sódio anidro

#### 2.20.3. Procedimento

- Pesar 100g de amostra homogeneizada em Erlenmeyer de 500mL.
- Adicionar 30g de sulfato de sódio anidro.
- Acrescentar 100mL de éter de petróleo e 50mL de éter etílico neutro.
- Agitar o frasco ocasionalmente por 30 minutos e deixar em repouso.
- Filtrar a camada etérea para um béquer de 500mL.
- Fazer uma segunda extração com a mesma quantidade de solventes, reunindo todos os extratos no mesmo béquer.
- Evaporar em banho-maria e secar rapidamente a gordura extraída em estufa.

### 2.21. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ

#### 2.21.1. Princípio

Fundamenta-se na neutralização, até o ponto de equivalência, pelo hidróxido de sódio, na presença de indicador fenolftaleína

(BRASIL, 1981).

### 2.21.2. Material

- I. Erlenmeyer ou béquer de 150mL
- II. Bureta de 10mL
- III. Pipeta graduada de 10mL

#### 2.21.2.1. Reagentes

- I. Solução álcool-éter etílico 1: 2 neutralizada
- II. Solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %
- III. Solução de hidróxido de sódio 0,1N

#### 2.21.2.2. Preparo das soluções

- A solução álcool-éter 1:2 deve ser previamente neutralizada, adicionando-se a esta algumas gotas de fenolftaleína e gotejando hidróxido de sódio 0,1N até leve coloração rósea persistente.

#### 2.21.3. Titulação

- Pesar em balança analítica cerca de 5g de gordura extraída em 2.20.3, em Erlenmeyer ou béquer de 150mL.
- Adicionar 40mL de solução de álcool-éter neutralizado e algumas gotas de fenolftaleína. Titular com solução de hidróxido de sódio 0,1N até aparecimento de coloração rósea persistente.

##### 2.21.3.1. Cálculo

Onde:

**V** = mililitros de solução de NaOH 0,1N gastos na titulação

**f** = fator de solução de NaOH 0,1N

**N** = normalidade da solução de NaOH 0,1N

**p** = peso da amostra, em gramas

## 2.22. ÍNDICE DE PERÓXIDO

Proceder conforme item 1.11.

## 2.23. RANÇO NA GORDURA - PROVA DE KREISS

### 2.23.1. Princípio

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 de condensação coloração rósea ou vermelha, cuja intensidade é proporcional à oxidação (IAL, 2008).

### 2.23.2. Material

- I. Rotavapor
- II. Balança semi-analítica
- III. Papel de filtro
- IV. Frasco Erlenmeyer de 500mL com boca esmerilhada e tampa
- V. Balão de fundo chato de 300mL com boca esmerilhada
- VI. Proveta de 150mL
- VII. Proveta de 50mL com boca esmerilhada e tampa
- VIII. Pipeta de 5mL
- IX. Funil e papel de filtro qualitativo.

#### 2.23.2.1. Reagentes

- I. Éter

---

II. Ácido clorídrico

III. Solução de floroglucina em éter a 0,1%*m/v*

### 2.23.3. Procedimento

- Separe cerca de 30g das partes gordurosas da carne ou 100g do produto cárneo, previamente triturado. Transfira para um frasco Erlenmeyer de 500mL.
- Adicione de 100 a 150mL 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 300mL.
- Evapore o filtrado em rotavapor sob vácuo à temperatura máxima de 40°C.
- Transfira, com auxílio de uma pipeta, 5mL da gordura fundida (resíduo do balão) para uma proveta de 50mL.
- Adicione 5mL de ácido clorídrico, tampe e agite por 30 segundos.
- Adicione 5mL 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% (3,8mL de uma solução 0,002M diluída para 100mL). 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.

---

## 2.24. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (T.B.A.)

### 2.24.1. Princípio

Fundamenta-se na formação de um composto de coloração vermelha resultante da condensação de 2 moles de ácido 2-tiobarbitúrico com 1 mol de aldeído malônico ou de seus tautômeros, originados na oxidação dos lipídios (BRASIL, 1981).

### 2.24.2. Material

- I. Balança analítica
- II. Balão de destilação de 250mL
- III. Placa aquecedora ou bico de Bunsen
- IV. Condensador de Liebig
- V. Proveta de 50mL
- VI. Pipetas graduadas de 5 e 50mL
- VII. Tubos de ensaio de 25mL
- VIII. Pérolas de vidro I
- IX. Banho-maria
- X. Espectrofotômetro

#### 2.24.2.1. Reagentes

- I. Ácido tiobarbitúrico
- II. Solução de ácido acético a 90%
- III. Solução de ácido clorídrico 4N
- IV. Anti-espumante (Silicona ou outro)

## 2.24.2.2. Preparo da solução

### 2.24.2.2.1 Ácido tiobarbitúrico

- Dissolver 0,2883g de ácido tiobarbitúrico com solução de ácido acético a 90% com ligeiro aquecimento e levar a volume a 100mL com a solução do ácido acético.

## 2.24.3. Procedimento

- Misturar 10g de embutido homogeneizado com 50mL de água destilada e transferir para balão de destilação de 250mL com auxílio de 50mL de água destilada.
- Adicionar 2,5mL de solução de ácido clorídrico 4N para levar o pH a 1,5.
- Adicionar um antiespumante, algumas pérolas de vidro e conectar com o condensador.
- Aquecer em placa aquecedora ou bico de Bunsen de maneira que se obtenha 50mL de destilado após 10 minutos do começo da ebulição.
- Colocar 5mL do destilado em tubo de ensaio, adicionar 5mL do reativo do tiobarbitúrico.
- Tapar o tubo, agitar e colocar em banho-maria fervente durante 35 minutos exatamente. Esfriar o tubo em água durante 10 minutos, ler em espectrofotômetro a 538nm e comparar com uma curva padrão.

### 2.24.3.1. Preparo da curva padrão

- Para preparar a curva padrão usar uma solu 0,00005M de trimetoxietóxipropano (ou dialdeidomalônico-trimetil-etil-acetal), em etanol a 40%, composto que por hidrólise ácida gera o aldeído malônico.
- Fazer urna bateria de tubos usando 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 e 0,8mL da solução padrão.
- Adicionar água destilada para completar 4mL.

- Acrescentar 5mL do reativo de tiobarbitúrico e 1mL de ácido clorídrico 4N.
- Agitar e colocar em banho-maria fervente durante 35 minutos exatamente.
- Esfriar durante 10 minutos, ler em espectrofotômetro a 538nm e estabelecer uma curva padrão.
- Fazer um branco para zerar o aparelho.

#### 2.24.3.2. Cálculo do Número de ácido tiobarbitúrico (ATB)

$$N^{\circ} \text{ de ATB} = \text{mg de aldeído malônico} / \text{Kg}$$

### 2.25. FOSFATOS

Proceder conforme item 1.13 ou conforme o método a seguir:

#### 2.25.1. Preparo da amostra

#### 2.25.2. Material

- I. Balança analítica
- II. Cadinho de porcelana
- III. Banho-maria
- IV. Forno-mufla
- V. Balão volumétrico de 250mL
- VI. Bastão de vidro

#### 2.25.2.1. Reagentes

- I. Óxido de magnésio
- II. Ácido clorídrico 1:1

### 2.25.3. Procedimento

- Pesar 2g de amostra homogeneizada em cadinho de porcelana de 25mL.
- Adicionar 2g de óxido de magnésio e 10mL de água destilada.
- Secar em banho-maria, carbonizar em bico de Bunsen incinerar em forno mufla a 550°C.
- Esfriar.
- Dissolver as cinzas com 10mL de ácido clorídrico 1:1.
- Filtrar para balão volumétrico de 250mL, lavando bem o cadinho e o funil.
- Completar o volume até 250mL com água destilada.

## 2.26. MÉTODO PELO VANADO-MOLIBDATO DE AMÔNIO

### 2.26.1. Princípio

Fundamenta-se na reação de Misson. A solução ácida contendo ortofosfato é tratada com o reagente vanadomolibdato em meio ácido. Forma-se o complexo estável amarelo de ácido vanadimolibdofosfórico que é dosado colorimetricamente (BRASIL, 1981).

### 2.26.2. Material

- I. Pipeta volumétrica de 5mL
- II. Balões volumétricos de 50, 100 e 500mL
- III. Pipetas graduadas de 5, 10 e 20mL
- IV. Espectrofotômetro
- V. Tubos de ensaio de 25mL

### 2.26.2.1. Reagentes

- I. Solução de molibdato de amônio a 5%
- II. Solução de vanadato de amônia a 0,25%
- III. Solução padrão de fosfato
- IV. Ácido nítrico concentrado

### 2.26.2.2. Preparo das soluções

#### 2.26.2.2.1 Solução de vanadato de amônia

- Dissolver 2,5g de vanadato de amônia em 500mL de água destilada fervente.
- Esfriar e adicionar 350mL de ácido nítrico concentrado e diluir a 1000mL com água destilada.

#### 2.26.2.2.2 Solução de vanado-molibdato de amônio

- Misturar em volumes iguais as soluções de vanadato de amônio (2.26.2.2.1.) e molibdato de amônio a 5%.
- A mistura deve ser preparada em quantidade suficiente para uso imediato, desprezando-se o restante devido a sua instabilidade.

#### 2.26.2.2.3 Solução de ácido sulfúrico 10N

- Com o devido cuidado, misturar 265mL de ácido sulfúrico concentrado com água destilada para completar o volume a 1000mL.

#### 2.26.2.2.4 Solução estoque de fosfato

- Dissolver 0,350g de fosfato diácido de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), seco em estufa a 105°C por 24 h, em 300mL de água destilada.
- Adicionar 10mL de ácido sulfúrico 10N.
- Diluir para 1000mL com água destilada em balão volumétrico.

- 1mL = 0,080mg de fósforo (P).

#### 2.26.2.2.5 Preparo da curva padrão

- Pipetar para balões volumétricos de 100mL os seguintes volumes de solução estoque de fosfato: 2 – 5 – 7 – 10 – 12 – 15 e 20mL.
- Adicionar a cada balão 4 mL de ácido sulfúrico 10N e completar o volume com água destilada.
- Estas soluções têm respectivamente as seguintes concentrações: 1,6 – 4 – 5,6 – 8 – 9,6 – 12 e 16mg de fósforo/mL. Destes balões, pipetar volumetricamente 5mL e transferir para tubo de ensaio, limpo e seco.
- Adicionar 2mL do reagente vanadomolibdato em cada tubo. Deixar em repouso por 5 minutos e transferir para célula de quartzo.
- Determinar a absorbância em espectrofotômetro a 420nm, utilizando como branco, uma mistura de 2mL do reagente com 5mL de água destilada.
- Montar um gráfico com as leituras dos padrões, colocando no eixo das abcissas a concentração de fósforo ( $\mu\text{g/mL}$ ) e no eixo das ordenadas os valores de absorbância.

#### 2.26.3. Procedimento

- Pipetar uma alíquota de 25mL da solução obtida em 2.25.3 (que deve ser proporcional a quantidade de fosfatos na amostra) e diluir com água destilada em balão volumétrico de 100mL.
- Transferir com pipeta volumétrica 5mL da amostra para tubo de ensaio.
- Adicionar 2mL do reagente vanado-molibdato e deixar em repouso 5 minutos.
- Fazer a leitura em espectrofotômetro, a 420nm, e comparar com a curva padrão previamente estabelecida. Expressar o resultado em fosfatos, como P (fósforo).

- Se a amostra desenvolver coloração acima ou abaixo da curva padrão, usar uma alíquota menor ou maior que 25mL.

## 2.27. CORANTES ARTIFICIAIS

Proceder conforme item 1.8 ou conforme os métodos a seguir:

### 2.27.1. Prova preliminar

### 2.27.2. Princípio

Fundamenta-se na solubilidade da maioria dos corantes naturais em álcool e éter e dos corantes artificiais, em meio aquoso.

### 2.27.3. Material

- I. Béquero de 100mL (2)
- II. Banho-maria
- III. Placa de toque
- IV. Pipetas graduadas de 1mL (3)
- V. Tubos de ensaio de 25mL

#### 2.27.3.1. Reagentes

- I. Éter etílico
- II. Álcool etílico
- III. Hidróxido de amônio concentrado
- IV. Solução de ácido acético a 10%

### 2.27.4. Procedimento

- Em um béquero de 100mL colocar pedaços da película e da superfície do embutido (com cerca de 0,5cm de espessura) com

---

$\pm$  40mL de uma mistura de água-álcool alcalinizado com 3-4 gotas de hidróxido de amônio.

- Deixar em repouso por 1 hora, agitando ocasionalmente, para extrair o corante. Decantar a mistura água-álcool para outro béquer de 100mL.
- Usar cerca de 30mL e acidificar com ácido tacético a 10% ( $\pm$  10ml). Se o corante estiver muito concentrado diluir antes com água destilada. Misturar bem e evaporar o álcool.
- Quando o volume estiver em 25-20mL é garantido que todo o álcool foi evaporado. Transferir para tubo de ensaio cerca de 5mL do extrato e adicionar igual volume de éter etílico, agitando bem.
- Deixar em repouso para separar as duas camadas.
- Corante natural: passa para o éter. Corante artificial fica na camada aquosa.

## 2.28. MÉTODO DE ARATA

### 2.28.1. Material

- I. Balança de precisão
- II. Béquer de 250mL (3) e 600mL (2) (graduados)
- III. Provetas de 50 e 200mL (2)
- IV. Pipetas graduadas de 1, 2 e 5mL
- V. Banho-maria
- VI. Placa aquecedora
- VII. Vidro de relógio
- VIII. Papel indicador de pH.

### 2.28.1.1. Reagentes

- I. Álcool etílico a 80%
- II. Álcool etílico a 70%
- III. Hidróxido de amônio concentrado
- IV. Solução de hidróxido de sódio a 0,5%

### 2.28.2. Procedimento

- Pesar 50g de amostra homogeneizada em béquer de 600mL.
- Adicionar 200mL de álcool etílico a 80%.
- Deixar em repouso durante 2 horas, agitando ocasionalmente.
- Deixar sedimentar e passar o sobrenadante para outro béquer de 600mL, tapando-o com vidro de relógio.
- Juntar ao resíduo 200mL de álcool etílico a 70% alcalinizado com 2mL de hidróxido de amônio.
- Deixar em repouso durante 2 horas, agitando ocasionalmente.
- Deixar sedimentar, passando em seguida o extrato para o béquer que contém o primeiro extrato.
- Evaporar em banho-maria até que todo o álcool e toda amônia tenham sido eliminados. Esfriar, completar o volume com água destilada para 100mL.
- Reservar 50mL para a determinação de corantes básicos.

#### 2.28.2.1. Pesquisa de corantes ácidos

- Passar para um béquer de 250mL uma alíquota de 50mL da solução de corantes obtida em 2.28.2.
- Adicionar 5mL de ácido clorídrico 1:9.
- Juntar 30cm de lã branca desengordurada. Ferver durante 10 minutos.

- Em presença de corante ácido a lã ficará colorida.
- Retirar a lã, lavar em água corrente, passar para outro béquer de 250mL e juntar água destilada até 100mL.
- Acrescentar 1mL de hidróxido de amônio.
- Ferver novamente por 10 minutos. Com este tratamento, o corante passará para a solução. Retirar a lã, evaporar toda a amônia (em placa aquecedora).
- Juntar água destilada até completar 100mL e colocar outro pedaço de lã na solução. Adicionar 5mL de ácido clorídrico 1:9.
- Deixar ferver por 10 minutos. Na presença de corante ácido a lã ficará colorida.
- Lavar a lã com água corrente, secar e reservar para identificação do corante.

#### 2.28.2.2. Pesquisa de corantes básicos

- Transferir para um béquer de 250mL os 50mL restantes da solução de corantes obtida em 2.28.2. Alcalinizar levemente com hidróxido de amônio.
- Juntar hidróxido de sódio até pH 9-10 (um excesso dissolveria a lã).
- Colocar 30cm de lã e ferver durante 10 minutos. Se o corante for básico, a lã ficará colorida.
- Lavar a lã com água corrente, secar e reservar para identificação do corante.

#### 2.28.3. Identificação dos corantes artificiais

##### 2.28.3.1. Por adição de ácidos ou alcalis

Podemos comparar as reações de fragmentos de lã tingidos pela amostra, com outros tingidos por soluções de corantes conhecidos, tratando-se todos eles com ácidos ou alcalis concentrados ou

diluídos, conforme o Quadro 1.

**Quadro 1:** Cores produzidas na lã tingida com corante

Corante	HCl	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.	NaOH 10%	NH <sub>4</sub> OH 12%
Amaranto	Escurece um pouco	Violeta à marrom	Marrom pálido a laranja avermelhado	Muda pouco
Eritrosina	Laranja amarelado	Laranja amarelado	Não muda	Não muda
Ponceau 3R	Muda pouco	Muda pouco	Laranja pálido	Muda pouco
Ponceau 4R (cochineal)	Muda pouco	Muda pouco	Violeta avermelhado	Violeta avermelhado
Amarelo ácido	Vermelho	Laranja	Muda pouco	Não muda
Tartrazina	Escurece um pouco	Escurece um pouco	Muda pouco	Muda pouco
Amarelo crepúsculo	Avermelhado	Avermelhado	castanho	Não muda
Amarelo naftol	Quase descora	Marrom pálido	Não muda	Não muda
Vermelho sólido	Não muda	violáceo	Pardo	-
Indizotina	Escurece um pouco	Mais escuro	Vermelho pálido	Quase descora

Fonte: Brasil, 1981.

### 2.28.3.2. Por cromatografia em papel

### 2.28.4. Material

- I. Cuba cromatográfica, com tampa
- II. Papel Whatmann n° 1

#### 2.28.4.1. Reagentes

- 
- I. Citrato de sódio
  - II. Hidróxido de amônio a 5%
  - III. Solução de corantes padrões

#### 2.28.5. Procedimento

- Cortar uma folha de papel Whatmann nº 1 de tamanho apropriado para não tocar nos lados da cuba cromatográfica.
- Traçar uma paralela a 2cm da borda do papel e outra a 15cm desta. Colocar sobre a linha de partida, em pontos distantes, 2cm uns dos outros, diferentes soluções de corantes conhecidos e a solução concentrada da amostra obtida em 2.28.2.1 antes da 2ª montagem na lâ.
- Secar as manchas ao ar. Colocar o papel na cuba contendo uma camada de 1cm de solvente citrato de sódio a 0,7%, em hidróxido de amônio, a 5%.
- Cobrir a cuba e deixar correr o cromatograma até o solvente percorrer 15cm.
- Retirar e secar.
- Identificar o corante por comparação com os Rf dos corantes padrões.

#### 2.29. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE HIDROXIPROLINA

Proceder conforme item 1.20.

## 2.30. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, (method 990.26). Arlington: A.O.A.C.,1995. chapter 39. p.13-5.

AUED, S.; CARVALHO, J. B. de; TAVARES, 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.

BRASIL. Instrução Normativa n. 20, de 21 jul. 1999. Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Oficializa os Métodos Analíticos Físicoquímicos 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Portaria nº 01, de 07 de outubro de 1981. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes: métodos físicos e químicos. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 13 de outubro de 1981.

DELLA TORRE, LICHTIG, J.; BERAQUET, N.J. Validação do método espectrofométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 63(1), 2004 (no prelo).

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.

---

TAKEMOTO, E.; DELLA TORRE, J. C. de M.; LICHTIG, J. Nitro em espinafre: validações de métodos colorimétricos. In: III SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS (SLACA), 1999. Resumos... Campinas: FEA-UNICAMP, 1999.

REGULAMENTO DE INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL (RIISPOA) MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Disponível em: <<https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=NzU2NQ%2C%2C>> .

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. v. 4, 1. Ed. São Paulo. 2008.

---

**CAPÍTULO 3**  
**EXTRATO DE CARNE**

---

## 3. EXTRATO DE CARNE

### 3.1. Preparo da amostra e da solução estoque

#### 3.1.1. Material

- I. Balança analítica;
- II. Béquer de 150mL;
- III. Bastão de vidro;
- IV. Balão volumétrico de 100mL;
- V. Funil.

#### 3.1.2. Procedimento

- Preparar uma amostra homogênea, misturando bem o conteúdo do recipiente com bastão de vidro. Para as diversas determinações usa-se com mais facilidade uma solução estoque de extrato de carne.
- Em béquer de 150mL pesar exatamente 20g de amostra.
- Adicionar 30mL de água destilada levemente aquecida, homogeneizando bem. Transferir, com auxílio de um funil, para balão volumétrico de 100mL.
- Lavar perfeitamente o copo e o funil e completar o volume com água destilada. No caso de formação de espuma adicionar 2-3 gotas de álcool etílico.
- Para as análises de umidade e voláteis.

## 3.2. UMIDADE E VOLÁTEIS

### 3.2.1. Princípio

Fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis a 105°C (BRASIL, 1981).

### 3.2.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Cápsula de fundo chato ou pesa filtro;
- III. Estufa;
- IV. Banho-maria;
- V. Dessecador com sílica gelou cloreto de cálcio;
- VI. Areia previamente tratada;
- VII. Pipeta volumétrica de 10mL.

### 3.2.3. Preparo da areia

- Secar a areia em estufa e calcinar em forno mufla a 500 °C.
- Esfriar. Tratar com ácido clorídrico a 25%.
- Lavar com água destilada até ausência de reação ácida. Secar em estufa a 105 °C e guardar em frascos fechados.

### 3.2.4. Procedimento

Colocar uma cápsula de fundo chato contendo cerca de 10g de areia tratada e uniformemente distribuída, em estufa a 105 °C por 1 hora. Esfriar em dessecador e pesar. Pipetar 10mL (2g) de solução preparada em 3.2 distribuindo a solução em toda a superfície da areia. Levar ao banho-maria até secura.

Colocar em estufa a 105°C durante pelo menos 8 horas, ou em estufa a vácuo a 70°C com pressão de 100mm de Hg durante 5 horas. Esfriar em dessecador e pesar. Repetir as operações de aquecer, esfriar e pesar cada 1 hora até obter peso constante ou peso mínimo.

#### 3.2.4.1. Cálculo

$$\% \text{ umidade a } 105 \text{ } ^\circ\text{C} = \frac{100 \times p}{p'}$$

$p$  = perda de peso em gramas

$p'$  = peso da amostra em gramas

### 3.3. RESÍDUO MINERAL FIXO

#### 3.3.1. Princípio

Fundamenta-se na perda de peso que ocorre quando o produto é incinerado a 500-550°C, com destruição da matéria orgânica, sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (BRASIL,1981).

#### 3.3.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Cadinho de porcelana de 60mL;
- III. Forno mufla a 550°C;
- IV. Dessecador com sílica gelou cloreto de cálcio;
- V. Pipeta volumétrica de 10mL;
- VI. Banho-maria;
- VII. Bico de Bunsen.

#### 3.3.3. Procedimento

- Pipetar volumetricamente 10mL de solução preparada em 3.1.2, e transferir para um cadinho de porcelana, previamente aquecido em forno mufla a 550°C durante 30 minutos, esfriado em dessecador e pesado. Levar ao banho-maria até a secagem.
- Carbonizar cuidadosamente em bico de Bunsen e incinerar em forno mufla a 550°C, até obtenção de cinzas brancas.
- Esfriar em dessecador e pesar.
- No caso do não branqueamento das cinzas, adicionar gotas de água destilada, secar em banho-maria e levar novamente ao forno mufla.

### 3.3.3.1. Cálculo

$$\% \text{resíduos mineral fixo} = \frac{100 \times p}{p'}$$

p = peso do resíduo mineral em gramas

p' = peso da amostra em gramas

## 3.4. CLORETOS MÉTODO DE MOHR

Proceder conforme item 1.12. ou conforme o método a seguir:

### 3.4.1. Princípio

O mesmo que 2.5.2.

#### 3.4.1.1. Preparo da amostra

- No resíduo mineral obtido em 3.1.2 adicionar 2 a 3 gotas de ácido nítrico 1: 9 e 10mL de água destilada quente.
- Agitar e filtrar.
- Lavar o cadinho e o filtro com 50mL de água quente, em várias porções, recebendo o filtrado e as águas de lavagem em balão volumétrico de 100mL.
- Esfriar e completar o volume com água destilada.

#### 3.4.2. Material

- I. Pipeta volumétrica de 25mL;
- II. Erlenmeyer ou béquer de 250mL;
- III. Bureta de 25mL.

##### 3.4.2.1. Reagentes

- I. Solução de nitrato de prata 0,1N;
- II. Solução de cromato de potássio a 5%;
- III. Carbonato de cálcio.

### 3.4.3. Procedimento

- Tomar uma alíquota de 25mL do filtrado obtido em 3.4.2. e transferir para Erlenmeyer ou béquer de 250mL. Neutralizar com carbonato de cálcio, adicionando mais 0,5g. Aquecer em banho-maria até não haver mais desprendimento de CO<sub>2</sub>.
- Esfriar.
- Adicionar 1ml de cromato de potássio e titular com solução do nitrato de prata 0,1N até aparecimento de coloração vermelho tijolo.

#### 3.4.3.1. Cálculo

$$\% \text{ cloretos em cloreto de sódio} = \frac{V \times f \times 0,585}{P}$$

V = mililitros de solução de AgNO<sub>3</sub> 0,1N gastos na titulação

f = fator da solução de AgNO<sub>3</sub> 0,1N

P = peso da amostra, em gramas, na alíquota

## 3.5. MÉTODO MERCUROMÉTRICO

### 3.5.1. Princípio

O nitrato mercúrico diante de anions cloretos forma o cloreto mercúrico, pouco ionizável. O excesso de íons Hg<sup>+2</sup> produz com o indicador difenilcarbazona um complexo de coloração azul violácea. A função do ácido nítrico é acidificar o meio a pH 2,3-2,8 que permite uma visualização fácil do ponto final da reação (BRASI, 1981).

#### 3.5.1.1. Preparo da amostra

No resíduo mineral obtido em 3.2 adicionar 2 a 3 gotas de ácido nítrico 1:9 e 10mL de água destilada quente. Agitar e filtrar. Lavar o cadinho e o filtro com 50mL de água quente, em várias porções, recebendo o filtrado e as águas de lavagem em balão volumétrico de

100mL. Esfriar e completar o volume com água destilada.

### 3.5.2. Material

- I. Pipeta volumétrica de 25mL;
- II. Erlenmeyer ou béquer de 250mL;
- III. Bureta de 25mL.

#### 3.5.2.1. Reagentes

- I. Solução de nitrato mercúrico 0,1N;
- II. Ácido nítrico 1:4;
- III. Solução alcoólica de difenilcarbazona a 0,1% (estocar em refrigerador).

### 3.5.3. Procedimento

- Tomar uma alíquota de 25mL do filtrado obtido em 3.5.2 e transferir para Erlenmeyer de 50mL. Acidular com solução de ácido nítrico 1:4 e juntar 1mL de solução de difenilcarbazona.
- Titular com solução de nitrato mercúrico 0,1N até aparecimento de coloração azul violácea.

#### 3.5.3.1. Cálculo

$$\% \text{ cloretos em cloreto de sódio} = \frac{V \times f \times 0,585}{p}$$

V = mililitros de solução de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  0,1N gastos na titulação

f = fator da solução de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  0,1N

p = peso da amostra em gramas na alíquota

## 3.6. CREATININA- MÉTODO DE HADORN

### 3.6.1. Princípio

A creatinina, em meio alcalino, com o ácido pícrico forma o

picrato de creatinina de coloração amarela pálida (BRASIL, 1981).

### 3.6.2. Material

- I. Colunas cromatográficas de 21mm de diâmetro interno e 400mm de comprimento;
- II. Balança analítica;
- III. Dessecador com sílica gelou cloreto de cálcio;
- IV. Estufa;
- V. Béquer de 50 e 600mL;
- VI. Balões volumétricos de 10, 50(7), 100, 200 e 1000mL;
- VII. Pipetas volumétricas de 5 (2), e 20mL (2);
- VIII. Pipetas graduadas 1, 2, 5 (2) e 25mL;
- IX. Cápsula de porcelana de 50mL;
- X. Bastão de vidro;
- XI. Lã de vidro;
- XII. Papel de filtro de filtragem rápida;
- XIII. Espectrofotômetro.

#### 3.6.2.1. Reagentes

- I. Ácido clorídrico concentrado;
- II. Solução de ácido clorídrico 2N;
- III. Solução saturada de ácido pícrico (a 20 °C);
- IV. Solução de hidróxido de sódio a 10%;
- V. Óxido de alumínio 90, estandarizado para cromatografia por absorção segundo Brochmann, atividade II e III (70-230 mesh);
- VI. Éter etílico livre de peróxidos.

#### 3.6.2.2. Preparo das soluções

##### 3.6.2.2.1 Solução saturada de ácido pícrico

- Preparar em temperatura superior a 20°C a solução saturada. Levar a 20°C e filtrar em papel de filtro de filtragem rápida.

#### 3.6.2.2.2 Solução padrão de creatinina

- Pesar exatamente 1g de creatinina tratada por 30 minutos a 100°C e esfriada 1 hora em dessecador. Dissolver em água destilada e passar para balão volumétrico de 1000mL, levando o volume até aproximadamente 500mL. Adicionar 100mL de ácido clorídrico concentrado. Esperar completa dissolução e completar o volume com água destilada.
- 1ml = 1mg de creatinina.
- Pipetar exatamente 25mL para balão volumétrico de 250mL e completar o volume com água destilada.
- 1ml = 0,1mg de creatinina.

#### 3.6.2.2.3 Preparo da curva padrão

- Pipetar 0,9 -1,0 -1,1 -1,2 -1,3 -1,4mL desta solução para balão volumétrico de 50mL. Estas soluções equivalem a 0,09 - 0,10 - 0,11 - 0,12 - 0,13 e 0,14mg de creatinina. Completar o volume até 2mL com água destilada. Fazer um branco usando 2mL de água destilada. Adicionar em todos os balões 1,5mL de solução de ácido pícrico e 1mL de solução de NaOH a 10%.
- Deixar reagir por 5 minutos exatos e completar os volumes com água destilada. Fazer a leitura imediatamente em espectrofotômetro a 500nm e estabelecer a curva em função da absorbância.

#### 3.6.3. Procedimento

- Pesar exatamente 8g de extrato de carne bem homogeneizado. Transferir para béquer de 600mL com aproximadamente 300mL de água destilada a 50°C. Filtrar em funil com lã de vidro para balão volumétrico de 1000mL.
- Lavar a lã com água destilada até desaparecer a coloração

---

escura. Esfriar a solução a 20°C e completar o volume com água destilada.

- Agitar.
- Pipetar 20mL para balão volumétrico de 100mL. Completar o volume a 20°C.
- Pipetar 5mL desta solução para cápsula de porcelana.
- Adicionar 10mL de ácido clorídrico 2N e levar a secura em banho-maria.
- Pipetar sobre a cápsula 25mL de água destilada e agitar com bastão de vidro.
- Passar os 25mL através de uma camada de óxido de alumínio com 4cm de altura, com lâ de vidro na extremidade inferior para segurar a alumina na coluna.
- Do filtrado pipetar volumetricamente 5mL e transferir para cápsula de porcelana.
- Adicionar 2 gotas de ácido clorídrico concentrado. Evaporar à secura em banho-maria.
- Esfriar e transferir para balão volumétrico de 10mL, usando 6 vezes 0,5mL de água.
- Lavar 4 vezes com 5ml de éter etílico, usando capilar de vidro. Esta extração deve ser cuidadosa para evitar perda de amostra.
- Transferir a fase aquosa para cápsula de porcelana. Lavando o balão 4 vezes com 1mL de água. Evaporar à secura.
- Esfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar 2mL de água destilada, dissolvendo o resíduo.
- Adicionar 1,5mL de solução saturada de ácido pícrico e 1mL de solução de hidróxido de sódio a 10%.
- Deixar reagir exatamente 5 minutos.
- Transferir para balão volumétrico de 50mL, usando água destilada para completar o volume.

- 
- Fazer a leitura imediatamente em espectrofotômetro a 500nm.
  - Converter a leitura de absorbância em mg de creatinina, usando a curva padrão previamente estabelecida.

#### 3.6.3.1. Cálculo

$$\% \text{ creatinina} = 62,5 \times w$$

w = mg de creatinina encontrada na curva padrão.

---

### 3.7. 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: 1. 3. 1. 1. 3. 1. 3. 1. II- Métodos físicos e químicos Brasília 1981, Cap. 2, p.15: Salsicharia.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos oficiais analíticos para controle de produtos para animais e seus ingredientes: II Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981. Cap.2,p. 15-17: Salsicharia.

HADORN H. Beitrag zur kreatininbestimmung in suppuwürteu-  
wurteu und bouillonpraparet eu. Mitt. Lebeus mettelunters, lv.37, p  
342-362. 1946.

MERCK Reativos. Diagnostica. Produtos químicos, 1992/1993.  
[S.I.] 1993. 1584 p.

MÜLLER, H. Beitrag zur kreatininbestimmung in fleischextrakt  
und fleshentrakthaltigen erzeugnisseu erzeugnisseu. Z. Analyt. Che-  
mie 212 Wisbaden, p 37-46. 1965. DRIPPING-TEST - Teor de Lí-  
quido Perdido por Degelo de Aves.

---

**CAPÍTULO 4**  
**PRODUTOS CÁRNEOS ENLATADOS OU**  
**ENVASADOS**

---

## 4. PRODUTOS CÁRNEOS ENLATADOS OU ENVASADOS

### 4.1. DEFINIÇÃO

Entende-se por todo produto em que a matéria-prima foi ou não curada, condimentada, embalada em recipiente metálico hermeticamente fechado, submetido a vácuo direto ou indireto e afinal convenientemente esterilizado pelo calor úmido e imediatamente esfriado, respeitada a peculiaridade do produto, no qual a esterilização dos enlatados obedecerá a diferentes graduações de temperatura, segundo a capacidade da lata e a natureza do produto (RIISPOA 1952).

#### 4.1.1. Preparo da amostra

- Nos enlatados em bloco passar todo o conteúdo da lata em máquina de moer carne com discos de 3mm de diâmetro, 2 ou 3 vezes até obter uma amostra homogênea. E nos enlatados com líquido, depois deste escorrido por 2 minutos, proceder como acima descrito, usando a parte sólida.
- Devem ser acondicionados em vidro com tampa e analisados o mais rápido possível ou mantidos sob refrigeração.

### 4.2. UMIDADE E VOLÁTEIS

Proceder conforme item 1.9 ou conforme o método a seguir:

#### 4.2.1. Princípio

Fundamenta-se na destilação sob refluxo da amostra com um líquido imiscível com a água, menos denso que esta e normalmente com ponto de ebulição mais elevado. A água e o líquido imiscível volatilizam no balão, condensam no condensador e são recebidos no coletor, no qual a água sendo mais densa cai na parte inferior do coletor graduado, onde é medido o volume (BRASIL, 1981).

#### 4.2.2. Material

- I. Conjunto para determinação de umidade consistindo de balão de vidro;
- II. Receptor graduado (Bidwell-Stirling) e condensador de reflux;
- III. Balança analítica;
- IV. Proveta de 100mL.

##### 4.2.2.1. Reagente

- I. Tolueno

#### 4.2.3. Procedimento

- Pesar exatamente 10g de amostra no balão do conjunto;
- Adicionar em volta de 100mL de tolueno e aquecer brandamente por 15 minutos;
- Quando o tolueno começar a ferver destilar em volta de 2 gotas por segundo até que a maior parte da água tenha passado para o receptor graduado;
- Aumentar então a velocidade da destilação para em volta de 4 gotas por segundo;
- Quando aparentemente toda a água foi destilada, lavar o condensador com tolueno;
- Continuar a destilação por 5 minutos e remover então o aquecimento, deixando esfriar até temperatura ambiente;
- Assim que a água e o tolueno estiverem separados completamente ler o volume de água e calcular a percentagem que está presente na amostra.

##### 4.2.3.1. Cálculo

$$\%umidade=V$$

Onde:

V = volume lido no receptor graduado

---

### 4.3. RESÍDUO MINERAL FIXO

#### 4.3.1. Princípio

O mesmo que 3.3.1

#### 4.3.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Cadinho de porcelana de 60mL;
- III. Forno mufla a 550°C;
- IV. Dessecador com sílica;
- V. Bico de Bunsen;
- VI. Pinça de metal.

#### 4.3.3. Procedimento

- Aquecer o cadinho de porcelana em forno mufla a 550°C durante 30 minutos.
- Esfriar em dessecador e tarar.
- Pesar em balança analítica, em torno de 2g de amostra homogeneizada.
- Levar o conjunto ao bico de Bunsen até carbonização completa e a seguir ao forno mufla a 550°C no máximo para evitar perda de cloretos.
- Deixar incinerar até obter cinzas brancas.
- Esfriar em dessecador e pesar.
- No caso do não branqueamento das cinzas adicionar gotas de água destilada, secar em banho-maria e levar ao forno mufla.
- Esfriar e pesar.

#### 4.3.3.1. Cálculo

$$\% \text{cinzas} = \frac{100 \times P}{P'}$$

Onde:

P = peso das cinzas, em gramas

P' = peso da amostra, em gramas

### 4.4. PROTÍDIOS

Proceder conforme item 1.5 ou conforme o método a seguir:

#### 4.4.1. Princípio

O método de Kjeldal baseia-se na determinação do nitrogênio total. Na digestão, pela ação do ácido sulfúrico, o carbono é liberado como gás carbônico e o hidrogênio como água. O nitrogênio é transformado em  $\text{NH}_3$  e fixado sob a forma de sal amoniacal (sulfato de amônia). Na mistura catalítica o sulfato de cobre age como catalizador oxidante e o sulfato de potássio para aumentar a temperatura da ebulição. Na destilação a solução concentrada de hidróxido de sódio libera a amônia que é destilada e recebida em solução de ácido sulfúrico de título conhecido ou em ácido bórico com indicador adequado e posteriormente titulada com solução alcalina ou ácida, dependendo do método empregado (BRASIL, 1981).

#### 4.4.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Aparelho digestor e destilador macro-Kjeldahl;
- III. Balão de Kjeldahl de 500 ou 800mL;
- IV. Bureta de 25 ou 50mL;
- V. Provetas de 50, 100 e 250mL;
- VI. Pipeta graduada de 1mL;

VII. Pipeta volumétrica de 25mL;

VIII. Erlenmeyer de 250mL.

#### 4.4.2.1. Reagente

I. Mistura catalítica:

- a) sulfato de potássio, sulfato de sódio ou bissulfato de potássio;
- b) sulfato de cobre;
- c) misturar (a) e (b) na proporção de 10:1, triturando em gral até pó fino.

II. Ácido sulfúrico concentrado;

III. Hidróxido de sódio a 40%;

IV. Pérolas de vidro;

V. Zinco metálico granulado;

VI. Talco de parafina;

VII. Solução de ácido sulfúrico 0,1N;

VIII. Solução de hidróxido de sódio 0,1N;

IX. Vermelho de metila;

X. Solução de ácido bórico a 4%;

XI. Solução de ácido clorídrico 0,1N;

XII. Azul de metileno;

#### 4.4.3. Procedimento

##### 4.4.3.1. Digestão

- Pesar cerca de 1g de amostra homogeneizada e transferir para balão de Kjeldahl;
- Juntar 10g de mistura catalítica, 20mL de ácido sulfúrico concentrado e algumas pérolas de vidro;
- Aquecer no digestor, a princípio lentamente e depois fortemente até obter vapores brancos;

- Quando o líquido estiver límpido deixar por mais 30 minutos;
- Retirar do aquecimento, esfriar e juntar 170 ou 250mL de água destilada, conforme a capacidade do balão usado.

#### 4.4.4. Destilação em solução de ácido sulfúrico a 0,1N

- Colocar no balão de Kjeldahl 3 a 4 grânulos de zinco metálico, e cerca de 0,5g de talco ou parafina;
- Acrescentar excesso de solução de hidróxido de sódio a 40% (100mL) e ligar o balão imediatamente ao destilador, cuja ponta deve estar mergulhada em um Erlenmeyer contendo 25mL de solução de ácido sulfúrico 0,1N, com 0,4mL de vermelho de metila;
- Destilar até que toda a amônia seja recolhida (cerca de 75mL), testando uma gota do destilado com papel de tornassol vermelho ou recebendo uma gota do destilado em tubo de ensaio contendo o reativo de Nessler.

#### 4.4.5. Destilação em solução de ácido bórico a 4%

- Proceder como o anterior recebendo o destilado em solução de ácido bórico a 4% com 3 a 4 gotas de indicador misto;
- Deve-se ter o cuidado de que a solução de ácido bórico no Erlenmeyer não sofra aquecimento para evitar perda de amônia;
- Destilar até que toda a amônia seja recolhida procedendo como o item anterior.

#### 4.4.6. Titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1N

- Titular o destilado obtido em 4.5.2.1. com uma solução de hidróxido de sódio 0,1N;
- A solução que inicialmente era vermelha torna-se amarela quando o excesso de ácido sulfúrico 0,1N foi neutralizado.

#### 4.4.7. Titulação com solução de ácido clorídrico 0,1N

- Titular o destilado obtido da solução de ácido bórico a 4%, com uma solução de ácido clorídrico 0,1N;
- A solução que inicialmente era verde, torna-se cinza azulada quando toda a amônia foi neutralizada pela solução de ácido.

**Nota:** Fazer uma prova em branco usando todos os reagentes menos a amostra.

#### 4.4.8. Cálculos

Titulando com solução de NaOH 0,1N:

$$\begin{aligned} \% \text{protídeos} &= \frac{V \times f \times 0,0014 \times 6,25 \times 100}{p} \\ &= \frac{V \times f \times 0,875}{p} \end{aligned}$$

Onde:

V = diferença entre os mililitros de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1N colocados no Erlenmeyer e os mililitros de NaOH 0,1N gastos na titulação, já feita a correção do branco.

f = fator de solução de NaOH 0,1N 1mL de NaOH 0,1N = 0,0014g de N

p = peso da amostra em gramas

6,25 = admitindo-se que a proteína da carne tem em média 16% de seu peso em nitrogênio, usa-se a relação 100/16 (6,25) como fator de transformação de nitrogênio para proteína.

Titulando com solução de HCl 0,1N:

$$\begin{aligned} \% \text{protídeos} &= \frac{V \times f \times 0,0014 \times 6,25 \times 100}{p} \\ &= \frac{V \times f \times 0,875}{p} \end{aligned}$$

Onde:

V= mililitros de HCl 0,1N gastos na titulação já feita a correção do branco

f= fator da solução de HCl 0,1N

p= peso da amostra em gramas

## 4.5. LIPÍDIOS

### 4.5.1. Princípio

Fundamenta-se na ação preliminar do hidróxido de amônio para dissolver os protídeos do ácido clorídrico também para dissolver os protídeos e liberar os lipídios da mistura de éter etílico e éter de petróleo para dissolver os lipídios. O éter de petróleo reduz a solubilidade das substâncias não lipídicas solúveis no éter etílico. Os lipídios extraídos são determinados gravimetricamente (BRASIL, 1981).

### 4.5.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Tubos de Monjonier;
- III. Béquer de 50 e 250mL;
- IV. Provetas de 10 e 25mL;
- V. Pipetas graduadas de 5mL (2);
- VI. Placa aquecedora;
- VII. Banho-maria;
- VIII. Estufa.

#### 4.5.2.1. Reagentes

- I. Hidróxido de amônio;
- II. Ácido clorídrico concentrado;

III. Éter etílico;

IV. Éter de petróleo.

#### 4.5.3. Procedimentos

- Pesar em balança analítica cerca de 1g de amostra em béquer de 50mL.
- Adicionar 8 a 10mL de água destilada e 1mL de hidróxido de amônio.
- Aquecer em baixa temperatura. Agitar para homogeneizar. Adicionar 0,5mL de HCl concentrado e agitar. Adicionar mais 10mL de HCl concentrado e cobrir com vidro de relógio.
- Aquecer em placa aquecedora por 10 minutos ou até que toda a amostra esteja dissolvida.
- Esfriar.
- Transferir quantitativamente para tubo de Monjonier.
- Juntar 25mL de éter etílico e agitar.
- Adicionar mais 25mL de éter de petróleo e agitar novamente.
- Estes solventes devem ser usados para lavar o béquer em que foi feita a dissolução a fim de arrastar totalmente a gordura da amostra.
- Deixar em repouso 15 minutos para separar as camadas ou centrifugar (em centrífuga para tubos de Monjonier) por 5 minutos.
- Passar a camada etérea cuidadosamente para um béquer de 250mL previamente seco em estufa a 105°C por 1 hora, esfriado em dessecador e pesado.
- Repetir a extração mais 2 vezes com 15mL de cada solvente, juntando os 2 extratos no mesmo béquer.
- Evaporar o éter em banho-maria ou placa aquecedora controlada, secar em estufa por 30 minutos, esfriar em dessecador e pesar.
- Levar novamente a estufa por 20 minutos, esfriar em dessecador e pesar.

#### 4.5.3.1. Cálculo

$$\% \text{ lipídios} = \frac{100 \times P}{P'}$$

Onde:

P = peso dos lipídios em gramas

P' = peso da amostra em gramas

### 4.6. GLICÍDIOS REDUTORES

#### 4.6.1. Princípio

O método de Lane-Eynon baseia-se na redução de um volume conhecido do reagente de cobre alcalino (Fehling) a óxido cuproso. O ponto final é indicado pelo azul de metileno, que é reduzido a sua forma leuco por um pequeno excesso do açúcar redutor (BRASIL, 1981).

#### 4.6.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Erlenmeyer de 250mL;
- III. Bureta de 25mL;
- IV. Pipetas volumétricas de 5mL;
- V. Pipeta graduada de 1mL;
- VI. Bico de Bunsen ou placa aquecedora.

##### 4.6.2.1. Reagentes

- I. Solução de Fehling A;
- II. Sulfato de cobre;
- III. Solução de Fehling B;
- IV. Tartarato duplo de sódio e potássio;
- V. Hidróxido de sódio;

- VI. Solução de azul de metileno a 1 %;
- VII. Solução padrão de açúcar invertido.

#### 4.6.2.2. Preparo dos reagentes

##### 4.6.2.2.1 Solução de Fehling A:

- Dissolver 34,639g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) em água e diluir a 1000mL em balão volumétrico;

##### 4.6.2.2.2 Solução de Fehling B:

- Dissolver 173 g de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochelle) e 50g de hidróxido de sódio em água destilada e diluir a 1000mL;

##### 4.6.2.2.3 Solução padrão de glicose:

- Pesar exatamente 0,500 g de glicose, previamente seca em estufa a vácuo ou regulada em  $70^\circ\text{C}$ , durante 1 hora;
- Transferir para balão volumétrico de 100mL com auxílio de água destilada, dissolver bem e completar o volume;
- A solução padrão de glicose para titular a solução de Fehling tem que ser recentemente preparada.

##### 4.6.2.2.4 Titulação da solução de Fehling:

- Colocar na bureta a solução padrão de glicose;
- Transferir, com pipeta volumétrica, 10mL de cada uma das soluções de Fehling A e B para Erlenmeyer;
- Adicionar 40mL de água destilada e aquecer até ebulição;
- Gotejar a solução padrão, sem agitação até quase o final da titulação;
- Mantendo a ebulição, adicionar 1 gota de azul de metileno a 1 % e completar a titulação até descoramento do indicador;
- O final da titulação será em torno de 10mL de glicose;

- O título será obtido pelo cálculo:

$$\text{Título da sol. de Fehling} = \frac{\text{mL gasto de glicose} \times 0,5}{100}$$

**Observação:** O tempo da titulação, não deve ultrapassar a 3 minutos.

#### 4.6.2.2.5 Solução padrão de açúcar invertido:

- Pesar exatamente 0,950g de sacarose, secar em estufa a vácuo ou regulada em 70°C por 1 hora;
- Passar para Erlenmeyer de 150mL usando cerca de 50mL de água destilada;
- Acidular com 0,5mL de ácido clorídrico concentrado e levar ao banho-maria a 60°C por 20 minutos;
- Esfriar, neutralizar com solução de hidróxido de sódio 1N, usando papel de tornassol como indicador;
- Transferir para balão volumétrico de 100mL e completar o volume.

#### 4.6.2.2.6 Titulação da solução de Fehling:

- Colocar na bureta a solução padrão de açúcar invertido;
- Transferir, com pipeta volumétrica, 10mL de cada uma das soluções de Fehling A e B para Erlenmeyer e proceder como na Titulação da solução de Fehling;
- O final da titulação será em torno de 5mL de açúcar invertido;
- O título será igual ao número de mililitros gastos dividido por 100 ( $\pm 0,05$ ).

#### 4.6.3. Determinação de glicose

- Colocar na bureta o filtrado obtido no preparo da amostra da análise dos glicídios redutores;
- Pipetar volumetricamente 5mL de Fehling A e 5mL de Fehling B (em vista da pequena quantidade de glicose presente) para um

Erlenmeyer de 125mL;

- Adicionar mais 40mL de água destilada;
- Aquecer até ebulição e gotejar a solução da amostra até que o líquido sobrenadante fique levemente azulado;
- Mantendo a ebulição, adicionar 1 gota de solução de azul de metileno a 1% e continuar a titulação até descoloração do indicador.

#### 4.6.3.1. Cálculo

$$\% \text{glicose} = \frac{250 \times 100 \times T / 2}{V \times P}$$

Onde:

250= volume da solução

100= percentagem

T /2= título do Fehling dividido por 2 (foi usada a metade do volume)

V= mililitros da amostra gastos na titulação

P= peso da amostra em gramas

## 4.7. GLICÍDIOS NÃO REDUTORES

### 4.7.1. Princípio

Como os grupos redutores aldeído e cetona não se encontram livres na sacarose, efetua-se uma hidrólise ácida, tendo como resultado duas moléculas de açúcares redutores, uma de glicose e uma de frutose que serão determinadas quantitativamente pelo método de Lane Eynon (BRASIL, 1981).

#### 4.7.2. Material

- I. Erlenmeyer ou béquer de 250mL;
- II. Funil de vidro;
- III. Pipetas graduadas de 5mL;
- IV. Balão volumétrico de 250mL;
- V. Provetas de 10 e 50mL;
- VI. Banho-maria a 60 C;
- VII. Funil;
- VIII. Papel de filtro de porosidade média.

##### 4.7.2.1. Reagentes

- I.  cido clorídrico concentrado;
- II. Solu o de hidróxido de sódio a 10% Solu o de ferrocianeto de potássio a 15% Solu o de acetato ou sulfato de zinco a 30%.

#### 4.7.3. Procedimento

- Pesar 25g de amostra homogeneizada em Erlenmeyer ou béquer de 250mL;
- Adicionar 50mL de água destilada e aquecer em banho-maria por 10 minutos agitando ocasionalmente;
- Adicionar 2mL de ácido clorídrico concentrado e levar ao banho-maria a 60 C por 60 minutos;
- Transferir para balão volumétrico de 250mL todo o cont do do béquer;
- Esfriar e neutralizar com hidróxido de sódio a 10%, usando papel tornassol como indicador;
- Acrescentar 2mL de ferrocianeto de potássio a 15% e 2mL de acetato ou sulfato de zinco;
- Agitar, esfriar e completar o volume a 250mL;
- Filtrar em filtro seco para frasco seco e determinar os a c ares

redutores pelo método Lane-Aynon.

## 4.8. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA

### 4.8.1. Material

O mesmo utilizado na análise de glicídios redutores item 4.6.2.

#### 4.8.1.1. Reagentes

O mesmo utilizado na análise de glicídios redutores item 4.6.2.1.

### 4.8.2. Preparo dos reagentes

O mesmo utilizado na análise de glicídios redutores 4.6.3.

### 4.8.3. Procedimento

- Colocar na bureta o filtrado obtido no procedimento da análise dos glicídios não redutores, e proceder como na determinação de glicose da análise dos glicídios redutores.

#### 4.8.3.1. Cálculo

$$\% \text{ açúcares solúveis} = \frac{250 \times 100 \times T / 2}{V \times P}$$

Onde:

(glicose:sacarose)

Se a amostra só contém sacarose, multiplicar o resultado por 0,95 que é o fator de transformação das hexoses para sacarose.

Se a amostra contém também glicose o cálculo será:

$$\% \text{ sacarose} = (\text{açúcares solúveis-glicose}) \times 0,95$$

---

## 4.9. AMIDO

Proceder conforme item 1.19, ou conforme metodologia a seguir:

### 4.9.1. Princípio.

O mesmo que 2.3.1.

### 4.9.2. Material

O mesmo que 3.3.3.

#### 4.9.2.1. Reagentes

O mesmo que 3.3.3.1.

### 4.9.3. Procedimento

- Colocar na bureta o filtrado obtido no processo acima, e proceder como na determinação de glicose na análise de glicídios redutores item 4.6.3.

#### 4.9.3.1. Cálculo

O mesmo que 2.3.6.1.

## 4.10. CLORETOS - MÉTODO DE MOHR

Proceder conforme item 2.5.

## 4.11. NITRITOS

Proceder conforme item 1.21.

## 4.12. NITRATOS

Proceder conforme item 1.22.

## 4.13. ÁCIDO SÓRBICO E SEUS SAIS

Proceder conforme item 2.9.

---

#### 4.14. PROVA PARA FORMOL

Proceder conforme item 2.10.

#### 4.15. PROVAS PARA ACIDO BÓRICO

##### 4.15.1. Princípio

O glicerol ou manitol com o ácido bórico forma um éster complexo do ácido ortobórico no qual o grupo OH do glicol torna-se fortemente ácido, o que é indicado pela fenolftaleína (BRASIL, 1981).

##### 4.15.2. Material

- I. Balança de precisão;
- II. Cápsula de porcelana de 50mL;
- III. Bastão de vidro.

##### 4.15.2.1. Reagentes

- I. Solução de hidróxido de cálcio ou carbonato de sódio a 10%.

##### 4.15.3. Procedimento

- Pesar 10g de amostra finamente homogeneizada em cápsula de porcelana;
- Alcalinizar com uma solução de hidróxido de cálcio ou carbonato de sódio a 10% para fixar o ácido bórico sob a forma de borato;
- Evaporar a secura;
- Incinerar a 550°C até destruição da totalidade da matéria orgânica;
- Esfriar;
- Utilizar o seguinte método: 4.14.

#### **4.16. MÉTODO COM GLICEROL OU MANITOL**

Proceder conforme item 2.15.

#### **4.17. PROVA PARA ACIDO SALICÍLICO**

Proceder conforme item 2.16.

#### **4.18. PROVA PARA ACIDO BENZÓICO**

Proceder conforme item 2.17.

#### **4.19. PROVAS PARA ANÍDRIDO SUIFUROSO E SUIFITOS - MÉTODO COM VERDE MALAQUITA**

Proceder conforme item 2.18.

#### **4.20. ACIDEZ DA GORDURA**

Proceder conforme itens 2.20 e/ou 2.21.

#### **4.21. ÍNDICE DE PERÓXIDOS**

Proceder conforme item 1.11.

#### **4.22. RANÇO NA GORDURA - PROVA DE KREISS**

Proceder conforme item 2.23, ou conforme o método a seguir.

##### **4.22.1. Princípio**

Fundamenta-se na reação do aldeído epihidrílico (formado na rancificação das gorduras) com a floroglucina em presença de ácido clorídrico dando um composto de condensação de coloração vermelha (BRASIL, 1981).

##### **4.22.2. Material**

- I. Tubos de ensaio de 25mL;
- II. Agitador de tubos de ensaio;

III. Pipetas graduadas de 5mL (3);

IV. Proveta de 10mL.

#### 4.22.2.1. Reagentes

I. Ácido clorídrico concentrado;

II. Solução de floroglucina a 0,1% em éter etílico.

#### 4.22.3. Procedimento

- Transferir 2mL de gordura obtida no procedimento da análise da acidez da gordura para tubo de ensaio de 25mL;
- Adicionar 2mL de ácido clorídrico conc. e agitar por 30 segundos em agitador de tubos de ensaio;
- Acrescentar 2mL de solução de floroglucina a 0,1% em éter etílico, recentemente preparada;
- Agitar novamente por 30 segundos e deixar em repouso por 10 segundos para separar as camadas;
- Na presença de ranço a camada inferior apresentará coloração rósea ou vermelha.

**OBS:** Se a coloração for menos intensa que uma solução de permanganato de potássio a 0,0012%, o resultado não deve ser levado em consideração se os caracteres organolépticos da amostra forem normais.

### 4.23. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ÁCIDO TIOPARBITÚRICO (T.B.A.)

Proceder conforme item 2.24.

### 4.24. FOSFATOS

Proceder conforme o item 1.13.

### 4.25. CORANTES

Proceder conforme item 1.8. ou conforme 2.27.

---

## REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PORTARIA N° 1, DE 07 DE OUTUBRO DE 1981: Aprovar os Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, constituindo-se em Métodos Microbiológicos e Métodos Físicos e Químicos. **Diário Oficial da União**, 1981.

Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA Decreto n° 30.691, de 29 de março de 1952.

---

**CAPÍTULO 5**  
**GELATINA**

---

## 5. GELATINA

### 5.1. Definição

Entende-se por “gelatina comestível” o produto da hidrólise em água fervente de tecidos ricos em substâncias colágenas (cartilagens, tendões, ossos, aparas de couro), concentrado e secado (RIIS-POA 1952).

#### 5.1.1. Preparo da amostra

- Se a gelatina for em pó, basta homogeneizar bem a amostra. Se for em folhas, cortar em quadrados com cerca de 1cm com uma tesoura.

### 5.2. UMIDADE E VOLÁTEIS

#### 5.2.1. Princípio

Fundamenta-se na destilação sob refluxo da amostra com um líquido imiscível com a água, menos denso que está e normalmente com ponto de ebulição mais elevado. A água e o líquido imiscível volatilizam no balão, condensam no condensador e são recebidos no coletor, no qual a água, sendo mais densa, cai na parte inferior do coletor graduado, onde é medido o volume (BRASIL, 1981).

#### 5.2.2. Material

1. Conjunto para determinação de umidade consistindo de balão de vidro;
2. Receptor graduado (Bidwell-Stirling) e condensador de reflux;
3. Balança analítica;
4. Proveta de 100mL.

### 5.2.2.1. Reagente

II. Tolueno

### 5.2.3. Procedimento

- Pesar exatamente 10g de amostra no balão do conjunto;
- Adicionar em volta de 100mL de tolueno e aquecer brandamente por 15 minutos;
- Quando o tolueno começar a ferver destilar em volta de 2 gotas por segundo até que a maior parte da água tenha passado para o receptor graduado;
- Aumentar então a velocidade da destilação para em volta de 4 gotas por segundo;
- Quando aparentemente toda a água foi destilada, lavar o condensador com tolueno;
- Continuar a destilação por 5 minutos e remover então o aquecimento, deixando esfriar até temperatura ambiente;
- Assim que a água e o tolueno estiverem separados completamente ler o volume de água e calcular a percentagem que está presente na amostra.

#### 5.2.3.1. Cálculo

$$\% \text{ umidade} = V$$

Onde:

V = volume lido no receptor graduado

## 5.3. RESÍDUO MINERAL FIXO

Proceder conforme item 3.3.

## 5.4. NITROGÊNIO TOTAL

Proceder conforme item 1.5 ou conforme metodologia a seguir:

### 5.4.1. Princípio

O método de Kjeldal baseia-se na determinação do nitrogênio total. Na digestão, pela ação do ácido sulfúrico, o carbono é liberado como gás carbônico e o hidrogênio como água. O nitrogênio é transformado em  $\text{NH}_3$  e fixado sob a forma de sal amoniacal (sulfato de amônia). Na mistura catalítica o sulfato de cobre age como catalizador oxidante e o sulfato de potássio para aumentar a temperatura da ebulição. Na destilação a solução concentrada de hidróxido de sódio libera a amônia que é destilada e recebida em solução de ácido sulfúrico de título conhecido ou em ácido bórico com indicador adequado e posteriormente titulada com solução alcalina ou ácida, dependendo do método empregado (BRASIL, 1981).

### 5.4.2. Material

- IV. Balança analítica;
- V. Aparelho digestor e destilador macro-Kjeldahl;
- VI. Balão de Kjeldahl de 500 ou 800mL;
- VII. Bureta de 25 ou 50mL;
- VIII. Provetas de 50, 100 e 250mL;
- IX. Pipeta graduada de 1mL;
- X. Pipeta volumétrica de 25mL;
- XI. Erlenmeyer de 250mL.

#### 5.4.2.1. Reagente

- I. Mistura catalítica:
  - d) sulfato de potássio, sulfato de sódio ou bissulfato de potássio;
  - e) sulfato de cobre;
  - f) misturar (a) e (b) na proporção de 10:1, triturando em gral até pó fino.
- I. Ácido sulfúrico concentrado;

- II. Hidróxido de sódio a 40%;
- III. Pérolas de vidro;
- IV. Zinco metálico granulado;
- V. Talco de parafina;
- VI. Solução de ácido sulfúrico 0,1N;
- VII. Solução de hidróxido de sódio 0,1N;
- VIII. Vermelho de metila;
- IX. Solução de ácido bórico a 4%;
- X. Solução de ácido clorídrico 0,1N;
- XI. Azul de metileno

#### 5.4.2.2. Indicador misto segundo Tashiro

- Misturar quantidades iguais de solução de vermelho de metila a 0,2% em álcool etílico e solução aquosa de azul de metileno a 0,1%.

#### 5.4.2.3. Vermelho de metila

- Dissolver 0,2g de vermelho de metila em 100mL de álcool etílico neutralizado.

### 5.4.3. Procedimento

#### 5.4.3.1. Digestão ou mineralização

- Pesar cerca de 1g de amostra homogeneizada e transferir para balão de Kjeldahl.
- Juntar 10g de mistura catalítica, 20mL de ácido sulfúrico concentrado e algumas pérolas de vidro. A
- Aquecer no digestor, a princípio lentamente e depois fortemente, até vapores brancos.
- Quando o líquido estiver límpido deixar por mais 30 minutos.
- Retirar do aquecimento, esfriar e juntar 170 ou 250mL de água destilada, conforme a capacidade do balão usado.

### 5.4.3.2. Destilação

#### 5.4.3.2.1 Em solução de ácido sulfúrico a 0,1N

- Colocar no balão de Kjeldahl 3 a 4 grânulos de zinco metálico, e cerca de 0,5g de talco ou parafina;
- Acrescentar excesso de solução de hidróxido de sódio a 40% (100mL) e ligar o balão imediatamente ao destilador, cuja ponta deve estar mergulhada em um Erlenmeyer contendo 25mL de solução de ácido sulfúrico 0,1N, com 0,4mL de vermelho de metila;
- Destilar até que toda a amônia seja recolhida (cerca de 75mL), testando uma gota do destilado com papel de tornassol vermelho ou recebendo uma gota do destilado em tubo de ensaio contendo o reativo de Nessler.

#### 5.4.3.2.2 Destilação em solução de ácido bórico a 4%

- Proceder como o anterior recebendo o destilado em solução de ácido bórico a 4% com 3 a 4 gotas de indicador misto;
- Deve-se ter o cuidado de que a solução de ácido bórico no Erlenmeyer não sofra aquecimento para evitar perda de amônia;
- Destilar até que toda a amônia seja recolhida procedendo como o item anterior.

### 5.4.3.3. Titulação

#### 5.4.3.3.1 Com solução de hidróxido de sódio 0,1N:

- Titular o destilado obtido em 5.4.4.2.1. com uma solução de hidróxido de sódio 0,1N;
- A solução que inicialmente era vermelha torna-se amarela quando o excesso de ácido sulfúrico 0,1N foi neutralizado.

#### 5.4.3.3.2 Titulação com solução de ácido clorídrico 0,1N:

- Titular o destilado obtido da solução de ácido bórico a 4%, com

uma solução de ácido clorídrico 0,1N;

- A solução que inicialmente era verde, torna-se cinza azulada quando toda a amônia foi neutralizada pela solução de ácido.

**Nota:** Fazer uma prova em branco usando todos os reagentes menos a amostra.

#### 5.4.3.4. Cálculos

Titulando com solução de NaOH 0,1N:

$$\begin{aligned} \% \text{protídeos} &= \frac{V \times f \times 0,0014 \times 6,25 \times 100}{p} \\ &= \frac{V \times f \times 0,875}{p} \end{aligned}$$

Onde:

V = diferença entre os mililitros de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1N colocados no Erlenmeyer e os mililitros de NaOH 0,1N gastos na titulação, já feita a correção do branco.

f = fator de solução de NaOH 0,1N 1mL de NaOH 0,1N = 0,0014g de N

p = peso da amostra em gramas

6,25 = admitindo-se que a proteína da carne tem em média 16% de seu peso em nitrogênio, usa-se a relação 100/16 (6,25) como fator de transformação de nitrogênio para proteína.

Titulando com solução de HCl 0,1N:

$$\begin{aligned} \% \text{ protídeos} &= \frac{V \times f \times 0,0014 \times 6,25 \times 100}{p} \\ &= \frac{V \times f \times 0,875}{p} \end{aligned}$$

Onde:

V = mililitros de HCl 0,1N gastos na titulação já feita a correção do branco

f = fator da solução de HCl 0,1N

p = peso da amostra em gramas

**OBS.:** O resultado é dado em % Nitrogênio.

## 5.5. ANIDRIDO SULFUROSO E SULFITO

### 5.5.1. Princípio

Este quando recebido em solução alcalina forma sulfito que é titulado com solução de iodo 0,1N, em presença de amido como indicador, no qual por destilação em meio ácido libere-se SO<sub>2</sub> (BRASIL, 1981).

### 5.5.2. Material

- I. Balança analítica;
- II. Funil de separação;
- III. Balão de fundo chato de 1000mL;
- IV. Condensador de Liebig;
- V. Erlenmeyer de 250mL;
- VI. Provetas de 100 e 250mL;
- VII. Pipeta graduada de 1mL;
- VIII. Pérolas de vidro;
- IX. Bureta de 25mL.

#### 5.5.2.1. Reagentes

- I. Corrente de dióxido de carbono;
- II. Ácido fosfórico xaroposo;
- III. Solução de hidróxido de sódio a 0,4%;

- 
- IV. Solução de iodo 0,1N;
  - V. Solução de amido a 0,5%;
  - VI. Ácido sulfúrico concentrado;
  - VII. Papel iodatado amidonado;
  - VIII. Ácido clorídrico concentrado.

#### 5.5.2.2. Preparo dos reagentes

##### 5.5.2.2.1 Corrente de dióxido de carbono

- Obtém-se usando algumas gramas de mármore ou óxido de cálcio e adicionando-se ácido clorídrico concentrado.

##### 5.5.2.2.2 Papel iodatado amidonado

- Proceder conforme item 2.18.

#### 5.5.3. Procedimento

- Pesar 25g de amostra e transferir para balão de fundo chato de 1000mL;
- Adicionar 300mL de água destilada e 5mL de ácido fosfórico xaroposo (através de funil de separação);
- O balão é ligado a um condensador de Liebig e a um tubo por onde entra uma corrente de  $\text{CO}_2$  e que mergulha na solução da amostra;
- Aquecer à ebulição;
- Receber o destilado em uma solução de NaOH a 0,4% contida em Erlenmeyer de 250mL;
- Verificar o final da destilação do  $\text{SO}_2$ , encostando uma tira de papel iodatado amidonado numa gota do destilado;
- Se houver liberação de  $\text{SO}_2$ , o papel ficará azul;
- Adicionar ao destilado 1,5mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,5mL de solução de amido a 0,5%;

- Titular com solução de iodo 0,1N até aparecimento de coloração azul.

#### 5.5.3.1. Cálculo

$$\% \text{dióxido de enxofre} = \frac{V \times f \times 0,32}{p}$$

Onde:

V = mililitros de solução de iodo 0,1N gastos na titulação

f = fator de solução de iodo 0,1N

p = peso da amostra em gramas

---

## 5.6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PORTARIA Nº 1, DE 07 DE OUTUBRO DE 1981: Aprovar os Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, constituindo-se em Métodos Microbiológicos e Métodos Físicos e Químicos. **Diário Oficial da União**, 1981.

Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.

### AUTORES

#### **Otiniel Moreira do Nascimento**

Graduado em Tecnologia de Alimentos pela Universidade do Estado do Pará – UEPA (2017). Graduando em Nutrição pela Universidade Norte do Paraná – Unopar.

#### **Laira Lima da Silva**

Graduada em Tecnologia de Alimentos pela Universidade do Estado do Pará – UEPA (2017).

#### **Izabel Bastos Pereira Neta**

Graduada em Tecnologia de Alimentos pela Universidade do Estado do Pará – UEPA (2016).

#### **Douglas Wellington Ferreira e Ferreira**

Graduado em Tecnologia de Alimentos pela Universidade do Estado do Pará – UEPA (2017).

---

Rosemary Maria Pimentel Coutinho

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa – UFV. Mestre em Química Orgânica pela Universidade Federal do Pará. Graduada em Química Industrial pela Universidade Federal do Pará. Atualmente é professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará – Campus Marabá Industrial e Coordenador de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação Tecnológica (Portaria n.3347/2017/GAB).

**Vitória Nazaré Costa Seixas**

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa – UFV. Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal do Pará – UFPA e Especialista em Procedimento e Controle de qualidade em carne, leite e ovos pela Universidade de Lavras. Atualmente é professora da Universidade do Estado do Pará (UEPA) e médica veterinária da Secretaria Executiva de Saúde Pública (SESPA), atuando em vigilância sanitária de alimentos.

