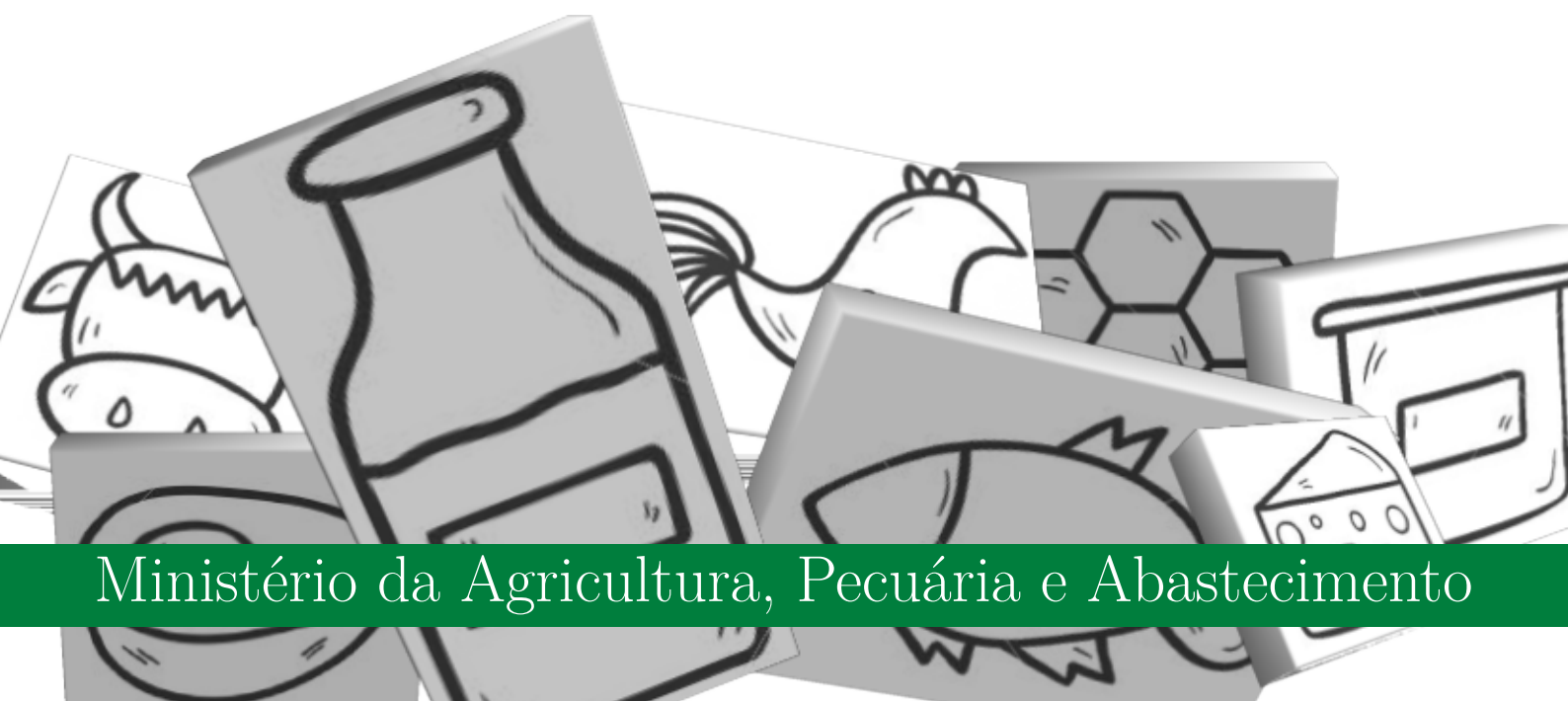


# Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal



Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
Secretaria de Defesa Agropecuária

# Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal

**Missão do Mapa:**

“Promover o desenvolvimento sustentável da agropecuária e a segurança e competitividade de seus produtos.”

© 2022 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é do autor.

1ª ed. Ano 2022.

*Elaboração, distribuição, informações:*

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA

Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários - CGAL

Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo B, 4º andar, sala 430

CEP: 70043-900, Brasília - DF

Tel.: (61) 3225-5098

www.agricultura.gov.br

e-mail: cgal@agro.gov.br

Central de Relacionamento: 0800 704 1995

*Equipe Técnica*

Bruno Parente Lima – LFDA/PA (org.)

Érico Silva Pires – LFDA/GO

Heitor Daguer – SLAV/LFDA/RS

Juliana Ferreira Ladeira – UTVDA/CQL/CGAL

Livia Cavaletti Corrêa da Silva – LFDA/SP

Luís Henrique Simões – LFDA/SP

Marcelo Farias de Andrade – LFDA/PE

Michele Fabiane de Oliveira – LFDA/MG

Ricardo Pimenta – SLAV/LFDA/RS

Tiago Souza da Cunha – LFDA/RS

Wanderson Clay Porcino Silva – UTVDA/CQL/CGAL

## **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

Biblioteca Nacional de Agricultura - BINAGRI

---

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal /  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de  
Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA, 2022.

Recurso: Digital

Formato: PDF

Modo de acesso: World Wide Web

ISBN 978-85-7991-155-2

1. Controle de qualidade. 2. Inspeção sanitária. I. Defesa Agropecuária. II. Título.

---

AGRIS Q04

Kelly Lemos da Silva CRB1 - 1880

# Apresentação

\*\*\*

*Métodos Oficiais para a Análise de Produtos de Origem Animal* é a continuação do trabalho desenvolvido no *Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal* pela equipe técnica dos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA). Além de correções nos métodos já publicados, esta edição contém novos ensaios desenvolvidos pelos LFDAs, cobrindo uma maior gama de produtos cuja fiscalização é competência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Também foram listados os métodos oficiais para análises microbiológicas de produtos de origem animal normatizados por outras entidades, complementando os métodos já descritos nas edições anteriores.

Nosso objetivo permanece o mesmo: estabelecer e padronizar os métodos oficiais para análise de produtos de origem animal para uso na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, estabelecendo uma base sólida não apenas para as ações fiscalizatórias do MAPA, mas também para que a sociedade possua ferramentas adequadas para o acompanhamento e garantia da qualidade dos produtos de origem animal consumidos no Brasil.

Bruno Parente



# Sumário

\*\*\*

<b>I</b>	<b>Métodos químicos</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Carnes e produtos cárneos</b>	<b>3</b>
1.1	Preparo de amostras . . . . .	3
1.2	Ácido benzóico e/ou benzoatos . . . . .	4
1.3	Ácido sórbico e/ou sorbatos . . . . .	5
1.4	Amido - qualitativo . . . . .	5
1.5	Amido - quantitativo . . . . .	6
1.6	Amido e carboidratos totais . . . . .	6
1.7	Anidrido sulfuroso e sulfitos . . . . .	9
1.8	Atividade de água . . . . .	10
1.9	Cálcio em base seca . . . . .	10
1.10	Cloreto de sódio (NaCl) . . . . .	10
1.11	Colágeno . . . . .	10
1.12	Corantes artificiais . . . . .	10
1.13	Detecção de formaldeído . . . . .	10
1.14	Detecção de polifosfatos . . . . .	11
1.15	Detecção de tecidos não permitidos por microscopia . . . . .	11
1.16	Determinação da Relação U/P em aves . . . . .	12
1.17	Determinação de conservantes por cromatografia líquida acoplada à espec- trometria de massas . . . . .	14
1.18	Índice de peróxidos . . . . .	18
1.19	Lipídios totais . . . . .	18
1.20	Nitritos e nitratos . . . . .	18
1.21	Nitritos e nitratos por eletroforese capilar de zona . . . . .	19
1.22	Nitrogênio total . . . . .	22
1.23	pH . . . . .	22
1.24	Proteína . . . . .	22
1.25	Relação Umidade/Proteína . . . . .	22
1.26	Resíduo mineral fixo (Cinzas) . . . . .	22
1.27	Teor de ossos . . . . .	22
1.28	Teste de gotejamento ( <i>dripping test</i> ) . . . . .	24
1.29	Umidade . . . . .	26

<b>2</b>	<b>Leite e produtos lácteos</b>	<b>27</b>
2.1	Acidez . . . . .	27
2.2	Acidez em manteiga da terra e manteiga comum . . . . .	27
2.3	Ácido benzoico e/ou benzoatos . . . . .	29
2.4	Ácido sórbico e/ou sorbatos . . . . .	29
2.5	Açúcares em leite condensado . . . . .	30
2.6	Amido – qualitativo . . . . .	30
2.7	Cinzas . . . . .	32
2.8	Cloreto de sódio em manteiga . . . . .	32
2.9	Cloretos em leite fluido – qualitativo . . . . .	32
2.10	Corantes artificiais . . . . .	33
2.11	Densidade relativa a 15°C . . . . .	34
2.12	Detecção de gordura vegetal em produtos lácteos . . . . .	34
2.13	Detecção de formaldeído . . . . .	37
2.14	Detecção de peróxido de hidrogênio . . . . .	37
2.15	Detecção de sacarose em leite . . . . .	39
2.16	Determinação de conservantes por cromatografia líquida acoplada à espec- trometria de massas . . . . .	40
2.17	Dispersabilidade . . . . .	45
2.18	Etanol em leites fermentados . . . . .	45
2.19	Extrato seco desengordurado (ESD), sólidos não gordurosos (SNG) . . . .	45
2.20	Extrato seco total (EST)/Sólidos totais . . . . .	46
2.21	Fosfatase alcalina . . . . .	46
2.22	Gordura, matéria gorda, matéria gorda no extrato seco, lipídeos totais . . .	48
2.23	Índice crioscópico . . . . .	50
2.24	Índice de CMP . . . . .	50
2.25	Índice de CMP em leite condensado . . . . .	52
2.26	Índice de peróxidos . . . . .	55
2.27	Índice de solubilidade . . . . .	55
2.28	Lactose . . . . .	55
2.29	Lactose, glicose, frutose e sacarose por cromatografia iônica . . . . .	56
2.30	Maltodextrina . . . . .	58
2.31	Natamicina . . . . .	61
2.32	Nitritos e nitratos em queijos . . . . .	61
2.33	Nisina . . . . .	62
2.34	Partículas queimadas . . . . .	62
2.35	Peroxidase . . . . .	62
2.36	pH . . . . .	64
2.37	Proteína . . . . .	65
2.38	Substâncias redutoras voláteis (álcool etílico) . . . . .	65
2.39	Umectabilidade . . . . .	67
2.40	Umidade . . . . .	67
2.41	Umidade e lipídios em leite e produtos lácteos por microondas e ressonância magnética nuclear - método de rotina . . . . .	68

<b>3</b>	<b>Mel e produtos apícolas</b>	<b>69</b>
3.1	Preparo de amostras . . . . .	69
3.2	Acidez livre . . . . .	69
3.3	Açúcares redutores . . . . .	69
3.4	Atividade diastásica . . . . .	69
3.5	Compostos fenólicos em própolis . . . . .	69
3.6	Compostos fenólicos em extrato de própolis . . . . .	69
3.7	Compostos flavonoides em própolis . . . . .	71
3.8	Compostos flavonoides em extrato de própolis . . . . .	71
3.9	Hidroximetilfurfural . . . . .	73
3.10	Índice de acidez, ésteres e de relação . . . . .	73
3.11	Insolúveis . . . . .	75
3.12	Massa mecânica (insolúveis no etanol), cera e solúveis no etanol . . . . .	75
3.13	Perda por dessecação em própolis . . . . .	75
3.14	Extrato seco . . . . .	75
3.15	Ponto de fusão . . . . .	77
3.16	Ponto de saponificação turva . . . . .	78
3.17	Resíduo mineral fixo/Cinzas . . . . .	79
3.18	Sacarose . . . . .	79
3.19	Teor alcoólico em extrato de própolis . . . . .	79
3.20	Teste para adulteração por açúcares C-4 . . . . .	80
3.21	Teste para cera de carnaúba . . . . .	80
3.22	Teste para cera japonesa, resinas e gorduras . . . . .	81
3.23	Umidade em mel . . . . .	82
<b>4</b>	<b>Ovos e derivados</b>	<b>83</b>
4.1	Lipídios . . . . .	83
4.2	pH . . . . .	83
4.3	Proteína . . . . .	83
4.4	Resíduo mineral fixo . . . . .	83
4.5	Sólidos totais . . . . .	84
<b>5</b>	<b>Pescados e subprodutos da pesca</b>	<b>85</b>
5.1	Preparo de amostras . . . . .	85
5.2	Acidez em óleo de pescado . . . . .	86
5.3	Amido . . . . .	86
5.4	Anidrido sulfuroso e sulfitos . . . . .	86
5.5	Bases voláteis totais . . . . .	86
5.6	Cloreto de sódio (NaCl) . . . . .	89
5.7	Corantes artificiais . . . . .	91
5.8	Desglaciamento . . . . .	91
5.9	Deteção de formaldeído . . . . .	93
5.10	Deteção de polifosfatos . . . . .	93
5.11	Determinação de conservantes . . . . .	96
5.12	Determinação de sulfito por eletroforese capilar de zona . . . . .	97
5.13	Determinação do teor de fósforo total . . . . .	101
5.14	Histamina . . . . .	101
5.15	Histamina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas .	101
5.16	Índice de peróxidos . . . . .	104



5.17	Lipídios totais . . . . .	104
5.18	Nitritos e Nitratos . . . . .	104
5.19	pH . . . . .	104
5.20	Potássio . . . . .	105
5.21	Proteína . . . . .	105
5.22	Relação Umidade/Proteína . . . . .	105
5.23	Resíduo mineral fixo (Cinzas) . . . . .	105
5.24	Sódio . . . . .	105
5.25	Umidade . . . . .	105

## **II Métodos microbiológicos 107**

### **6 Métodos normalizados 109**

6.1	Água de abastecimento industrial e gelo . . . . .	109
6.2	Carnes e produtos cárneos . . . . .	110
6.3	Leite e produtos lácteos . . . . .	113
6.4	Mel e produtos apícolas . . . . .	116
6.5	Ovos e derivados . . . . .	117
6.6	Pescados e produtos da pesca . . . . .	119

### **7 Contagem de Coliformes Termotolerantes e Coliformes Totais em alimentos 121**

### **8 Número Mais Provável de *Vibrio parahaemolyticus* 125**

### **9 Teste de Esterilidade Comercial para Alimentos de Baixa Acidez - pH > 4,6 133**

### **10 Pesquisa de *Paenibacillus larvae subsp. Larvae* 141**

### **11 Procedimentos de Coloração 147**

### **12 Meios de Cultura, Reagentes e Soluções 155**

# Parte I

## Métodos químicos



# Carnes e produtos cárneos

\*\*\*

## 1.1 Preparo de amostras

Instruções específicas, requeridas e descritas nos métodos, também devem ser observadas. Caso a análise não se inicie imediatamente, manter a amostra preparada sob refrigeração em recipiente hermeticamente fechado. Para prevenir perda de água durante o preparo, utilizar porções tão grandes quanto possível.

### 1.1.1 Carnes *in natura* e produtos cárneos secos, curados ou defumados

**Em moinho:** Moer rapidamente por três vezes em moedor com abertura de 3 mm, misturando após cada moagem.

**Em processador de alimentos:** Cortar a amostra em pedaços de aproximadamente 5 cm e transferir, juntamente com qualquer líquido, para o recipiente do equipamento. Processar por 30 s, raspar as laterais do recipiente com espátula e reincorporar à porção principal da amostra, assim como qualquer material preso nas lâminas. Processar por 30 s adicionais. Repetir este processo por 2 vezes. Equipamentos que realizem a raspagem simultaneamente ao processamento podem efetuar o preparo em uma única etapa de aproximadamente 1 min.

Para análise de conservantes permitidos apenas como tratamento de superfície, retirar o produto da embalagem original e cortar toda a porção superficial, de forma que as partes obtidas tenham profundidade de aproximadamente 5 mm. Se necessário reportar o resultado do ensaio por área, cortar as porções obtidas em quadrados de áreas de aproximadamente  $0,2 \text{ dm}^2$ . Com um paquímetro, determinar a área superficial (em  $\text{dm}^2$ ) de cada porção. Em seguida, pesar cada porção, obtendo a massa (em kg). Moer e analisar individualmente as porções superficiais previamente medidas e pesadas. Limpar todos os utensílios que entraram em contato com a porção superficial do embutido usando etanol e água quente.

### 1.1.2 Produtos enlatados

Preparar todo o conteúdo da lata como em 1.1.1.

### 1.1.3 Conservas

Remover o líquido da conserva e preparar todo o conteúdo do recipiente como em 1.1.1.

### 1.1.4 Embutidos

Remover os envoltórios não comestíveis e preparar como em 1.1.1. Para análise de conservantes permitidos apenas como tratamento de superfície, retirar o produto da embalagem original e cortar toda a porção superficial do embutido (envoltório), de forma que as partes obtidas tenham profundidade de aproximadamente 5 mm. Se necessário reportar o resultado do ensaio por área, cortar as porções obtidas em quadrados de áreas de aproximadamente  $0,2 \text{ dm}^2$ . Com um paquímetro, determinar a área superficial (em  $\text{dm}^2$ ) de cada porção. Em seguida, pesar cada porção, obtendo a massa (em kg). Moer e analisar individualmente as porções superficiais previamente medidas e pesadas. Limpar todos os utensílios que entraram em contato com a porção superficial do embutido usando etanol e água quente.

### 1.1.5 Produtos salgados

Remover o sal aderido à superfície e preparar como em 1.1.1.

### 1.1.6 Gelatina

Se em folhas, quebrar em pequenos pedaços e homogeneizar. Demais apresentações não necessitam de tratamento adicional.

### 1.1.7 Carne mecanicamente separada

Homogeneizar e analisar como recebido. Para o ensaio “Índice de Peróxidos”, separar uma porção da amostra e secar sob vácuo a temperatura inferior a  $60^\circ\text{C}$  ou evaporar em banho-maria adicionando duas a três porções de álcool etílico. Extrair a gordura com éter de petróleo e deixar o éter evaporar espontaneamente, removendo os últimos traços sob aquecimento rápido no banho-maria. Não aquecer excessivamente a gordura extraída, evitando-se sua oxidação. Utilizar a gordura para a determinação do Índice de Peróxidos.

### 1.1.8 Bibliografia

AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Official Method 935.46. 21 ed. Rockville: 2019.

AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Official Method 983.18. 21 ed. Rockville: 2019.

## 1.2 Ácido benzóico e/ou benzoatos

Utilizar o método descrito na norma NMKL 124, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com três casas decimais. Sempre que a legislação permitir a adição de conser-

vantes apenas na parte externa para tratamento de superfície, analisar a parte interna (massa) e o envoltório separadamente e reportar ambos os resultados.

- Resultados inferiores a 0,001 g/100 g devem ser expressos como “não detectado”;
- Resultados entre 0,001 e 0,002 g/100 g devem ser expressos como “detectado”;
- Resultados maiores ou iguais a 0,002 g/100 g devem ser expressos como obtidos.

### 1.3 Ácido sórbico e/ou sorbatos

Utilizar o método descrito na norma NMKL 124, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com três casas decimais. Sempre que a legislação permitir a adição de conservantes apenas na parte externa para tratamento de superfície, analisar a parte interna (massa) e o envoltório separadamente e reportar ambos os resultados.

- Resultados inferiores a 0,001 g/100 g devem ser expressos como “não detectado”;
- Resultados entre 0,001 e 0,002 g/100 g devem ser expressos como “detectado”;
- Resultados maiores ou iguais a 0,002 g/100 g devem ser expressos como obtidos.

## 1.4 Amido - qualitativo

### 1.4.1 Princípio

A interação entre o íon triiodeto ( $I_3^-$ ) e a amilose presente nos amidos forma um composto de forte coloração azul, tendendo para o preto de acordo com a concentração dos reagentes empregados.

### 1.4.2 Campo de aplicação

Produtos cárneos.

### 1.4.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Béquer de 150 mL;
- Pipetas graduadas de 1 e 20 mL;
- Placa aquecedora;
- Processador de alimentos ou moinho;
- Proveta de 50 mL;
- Tubo de ensaio de 25 mL.

#### 1.4.4 Reagentes e soluções

- Solução de Lugol:

Dissolver 1,25 g de iodo ( $I_2$ ) e 2,5 g de iodeto de potássio (KI) em uma pequena porção de água e diluir para 25 mL.

#### 1.4.5 Preparo da amostra

Cortar a amostra em pedaços (exceto o invólucro, quando presente em produtos embutidos), passar em moinho ou processador de alimentos até obtenção de uma massa homogênea. Em béquer de 150 mL, colocar entre 5 e 6 g de amostra, adicionar 30 mL de água e aquecer em placa aquecedora até fervura por 5 min. Filtrar, esfriar e transferir uma alíquota de aproximadamente 15 mL do filtrado para o tubo de ensaio.

#### 1.4.6 Procedimento de análise

Adicionar duas a três gotas de solução de Lugol à amostra preparada conforme 1.4.5 e observar imediatamente a presença ou ausência de coloração azul. Caso observe-se um coloração enegrecida, repetir o ensaio com uma quantidade menor de Lugol. A coloração pode esvanecer na presença de luz.

#### 1.4.7 Expressão dos resultados

Reportar positivo caso se observe o aparecimento de coloração entre azul acinzentado (●) e azul (●) ou verde, tanto mais escura quanto maior a concentração de amido na amostra. A cor pode esvanecer com o tempo.

#### 1.4.8 Bibliografia

AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Official Method 935.49. 20 ed. Rockville: 2016.

### 1.5 Amido - quantitativo

Utilizar o método descrito na seção 1.6 ou nas normas ISO 5554 ou ISO 10520, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 1.6 Amido e carboidratos totais

### 1.6.1 Princípio

Baseia-se na hidrólise ácida do amido e outros açúcares da amostra, produzindo glicose que depois é convertida em furfuralis, os quais reagem com a antrona formando um complexo de coloração esverdeada. A quantificação é feita espectrofotometricamente em 620 nm.

### 1.6.2 Campo de aplicação

Derivados de pescado, carnes e produtos cárneos.

### 1.6.3 Materiais e equipamentos

- Agitador vórtex;
- Balança analítica com resolução mínima de 0,0001 g;
- Banho-maria;
- Balões volumétricos de 250 mL e 500 mL;
- Centrífuga capaz de gerar uma RCF de  $1000\times g$  ou superior;
- Cubeta de vidro ou quartzo;
- Espectrofotômetro UV/Vis;
- Estufa;
- Micropipetas de 50 a 2000  $\mu\text{L}$ ;
- Pipetas volumétricas de 2 e 10 mL;
- Processador de alimentos ou moinho;
- Tubo de centrífuga de fundo cônico de 15, 25 ou 50 mL;
- Tubos de ensaio.

### 1.6.4 Reagentes e soluções

- Solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 76:24 (v/v):  
Adicionar a 760 mL de ácido sulfúrico 98%, 240 mL de água Tipo I.
- Solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução de álcool etílico ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) 80% (v/v);
- Éter etílico p.a;
- Solução de Antrona ( $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$ ):  
Dissolver 0,1 g de antrona em 100 mL de solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 76:24 (v/v). A solução é estável a  $4^\circ\text{C}$ , devendo ser descartada quando se tornar verde. Uma vez que a antrona reage com celulose e outros contaminantes, é essencial lavar com álcool etílico todos os frascos de vidro que serão postos em contato com ela.
- Solução de D-glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) 0,01%:  
Esta solução deve ser preparada diariamente por diluição de solução estoque a 1% (m/v) de D-glicose. A solução estoque pode ser mantida refrigerada por até uma semana.



### 1.6.5 Preparo da amostra

- (a) Produtos de salsicharia:

Retirar os invólucros, cortar em pedaços, passar em moinho ou processador até obtenção de uma massa homogênea.

- (b) Carne de aves, bovina e suína:

Retirar porções de várias regiões da amostra. Cortar em pedaços menores e homogeneizar em moinho ou processador.

### 1.6.6 Procedimento de análise

- (a) Preparo da curva de calibração:

Pipetar alíquotas de 250, 500, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{L}$  da solução de D-glicose a 0,01% para tubo de ensaio e adicionar água Tipo I de modo que todos eles venham a conter um volume final de 2 mL, obtendo-se assim as soluções padrões. Seguir conforme o item k do procedimento. Zerar o equipamento com o branco de reagentes utilizando 2 mL de água Tipo I. Deve-se utilizar uma curva de calibração recém preparada a cada nova batelada de amostras.

- (b) Para análise de carboidratos totais e amido, pesar porções independentes de aproximadamente 0,5 g de amostra perfeitamente homogeneizada, diretamente em tubo de centrífuga.

- (c) Lavar com 5 mL de éter etílico, agitar em vórtex e centrifugar por 5 min, retendo o resíduo centrifugado. Repetir este procedimento por mais duas vezes;

- (d) Na amostra destinada à análise de amido, lavar o resíduo centrifugado da etapa anterior com 5 mL de solução a 80% (v/v) de álcool etílico a quente (entre 60 a 70 °C), agitar em vórtex e centrifugar por 5 min, retendo o resíduo centrifugado. Repetir este procedimento duas vezes mais;

- (e) Secar o resíduo centrifugado em estufa a  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 1 h;

- (f) Adicionar 10 mL de solução de ácido sulfúrico  $0,25\text{ mol L}^{-1}$  e colocar o tubo em banho-maria em temperatura igual ou superior a 90 °C, tendo o cuidado de manter o nível da solução contida no tubo abaixo do nível de água do banho;

- (g) Aquecer por 1 h, mantendo o nível da água do banho acima do nível da solução no tubo, agitando o conteúdo do tubo ocasionalmente;

- (h) Decorrido o tempo estabelecido, transferir quantitativamente o conteúdo do tubo para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água. Para amostras com limite legal igual ou inferior a 4% de amido e/ou carboidratos totais, transferir quantitativamente o conteúdo do tubo para balão volumétrico de 250 mL;

- (i) Homogeneizar e deixar decantar;

- (j) Pipetar 2 mL do sobrenadante para tubo de ensaio previamente lavado com álcool etílico (a presença de contaminantes ou poeira no tubo pode produzir resultados errôneos);

Obs. Para amostras que contenham acima de 10% de carboidratos totais ou amido, efetuar a diluição apropriada.

- (k) Adicionar 10 mL de solução de antrona ao tubo referente à amostra e tubos da curva padrão, levando-os ao banho-maria com água em ebulição por 10 min;
- (l) Retirar do banho e deixar esfriar;
- (m) Zerar o equipamento com o branco de reagentes e proceder à leitura da absorbância em comprimento de onda de 620 nm;
- (n) Construir a curva de calibração lançando no eixo das ordenadas os valores de absorbância e no eixo das abscissas as concentrações finais de glicose em 25, 50, 100, 150 e 200 µg de glicose/2 mL.

### 1.6.7 Cálculo e expressão dos resultados

Para cálculo de amido:

$$\text{Teor de amido, em g/100 g} = \frac{C \cdot D \cdot 0,90}{V \cdot m \cdot 10.000}$$

Para cálculo de carboidratos totais:

$$\text{Teor de carboidratos totais, em g/100 g} = \frac{C \cdot D}{V \cdot m \cdot 10.000}$$

onde:

C = Concentração na alíquota, obtida da curva padrão, em µg de glicose/2 mL;

D = volume do balão volumétrico utilizado na diluição final (250 ou 500 mL), em mL;

m = massa da amostra, em g;

V = volume da alíquota tomada do balão de 250 ou 500 mL, em mL;

0,9 = fator de conversão glicose/amido;

10.000 = fator de conversão µg g<sup>-1</sup> para g/100 g.

Expressar os resultados obtidos em “g/100 g” com uma casa decimal.

### 1.6.8 Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999: Oficializa os Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Sal e Salmoura*. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 de julho de 1999. Seção 1, p. 10.

ESPAÑA. Ministério de Agricultura y Alimentación. Secretaria General de Alimentación. *Métodos oficiales de analysis*. v.4, 1990. p. 293-295.

Moraes, O.M.G. e Chaves, M.B. *Método espectrofotométrico para determinação de amido em produtos cárneos*. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 1988, Belo Horizonte. Resumos. Belo Horizonte, 1988.

## 1.7 Anidrido sulfuroso e sulfitos

Utilizando o método descrito na norma AOAC 990.28, determinar o teor de sulfitos na amostra, expressando o resultado em “g de SO<sub>2</sub>/100 g” com três casas decimais.

## 1.8 Atividade de água

Determinar, utilizando um dos métodos descritos na norma ISO 18787 e em acordo com as instruções do fabricante do instrumento utilizado, o valor da atividade de água, reportando o resultado obtido com três casas decimais. Utilizar uma porção da amostra preparada imediatamente antes da análise.

## 1.9 Cálcio em base seca

Determinar o teor de cálcio na amostra utilizando o método descrito nas normas AOAC 983.19 ou NMKL 153. Com o auxílio do teor de umidade na amostra, determinado conforme este Manual, expressar o teor de cálcio em base seca em “g/100 g de base seca” com uma casa decimal:

$$\text{Cálcio, em g/100 g de base seca} = \frac{100 \cdot C}{100 - U}$$

onde:

$C$  = Teor de cálcio na amostra, em g/100 g;

$U$  = Teor de umidade na amostra, em g/100 g.

## 1.10 Cloreto de sódio (NaCl)

Determinar o teor de cloreto de sódio, NaCl, utilizando o método descrito na seção 5.6. Reportar o resultado obtido em “g de NaCl/100 g” com uma casa decimal.

## 1.11 Colágeno

Determinar o teor de hidroxiprolina na amostra de acordo com o método AOAC 990.26, convertendo-o em colágeno pela equação:

$$\text{Teor de colágeno, em g/100 g} = H \cdot 8$$

onde  $H$  é o teor de hidroxiprolina. Reportar o resultado em “g/100 g” com duas casas decimais.

## 1.12 Corantes artificiais

Utilizando a metodologia descrita na norma NMKL 130, reportar “presença de *nome comum (código INS)*” para cada corante identificado. Reportar “presença de corante hidrossolúvel não identificado” caso seja detectado um corante sem correlação com os corantes testados no método. Deve-se testar, em adição aos corantes descritos na norma, a presença do corante carmoisina (INS 122).

## 1.13 Detecção de formaldeído

Utilizar o método B da norma AOAC 931.08. Reportar “positivo” caso seja detectada a presença de formaldeído na amostra e “negativo” em caso contrário.

## 1.14 Detecção de polifosfatos

Utilizar o método descrito no Capítulo 5, Seção 5.10.

## 1.15 Detecção de tecidos não permitidos por microscopia

### 1.15.1 Princípio

Este método tem por objetivo a detecção visual de tecidos inferiores (ossos, tendões e aponeuroses, coágulos, cartilagens, linfonodos, entre outros) em amostras de carne moída por observação direta e com auxílio de microscópio estereoscópio para confirmação.

### 1.15.2 Campo de aplicação

Carne moída.

### 1.15.3 Materiais e equipamentos

- Bandejas;
- Estiletes;
- Luminária;
- Microscópio estereoscópio, com aumento mínimo de 40 vezes;
- Placas de Petri;
- Pinças pontiagudas;
- Tábuas para corte de carne;

### 1.15.4 Reagentes e soluções

Não aplicável.

### 1.15.5 Preparo da amostra

Homogeneizar a amostra e separar aproximadamente 100 g de carne moída em uma bandeja.

### 1.15.6 Procedimento de análise

- (a) Análise macroscópica: espalhar na bandeja a amostra homogeneizada formando uma camada fina. Analisar meticulosamente, sob iluminação direta, toda a porção por meio da visualização e do tato objetivando encontrar tecidos inferiores. Os tecidos suspeitos devem ser separados em placa de Petri para, caso necessário, posterior confirmação através de microscopia.

- (b) Análise microscópica: levar ao microscópio estereoscópio as porções contidas nas placas de Petri. Com auxílio de pinça, separar o fragmento e identificá-lo com base no seu tamanho, forma, cor, textura, dureza, brilho e outras características morfológicas, comparando-os com as amostras de referência caso necessário.

### 1.15.7 Expressão dos resultados

Quando não são detectados tecidos inferiores, os resultados são expressos como “Não detectados”. Quando são detectados tecidos inferiores, os resultados são expressos como “Detectados”, citando os achados. Em ambos os casos, devem ser citados os limites de detecção obtidos em procedimentos de validação para os analitos pesquisados.

### 1.15.8 Bibliografia

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº 14, de 28/03/2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial União, 31/03/2014.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 83, de 21/11/2003. Regulamento técnico de identidade e qualidade de carne bovina em conserva (corned beef) e carne moída de bovino. Brasília: Diário Oficial União: 03/12/2003.

EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics*. 61 p. 1998.

## 1.16 Determinação da Relação U/P em aves

### 1.16.1 Princípio

Fundamenta-se na determinação do teor de umidade, proteína e sua relação em cortes de aves resfriados ou congelados e carcaças de aves resfriadas, incluindo-se líquidos agregados à embalagem do produto.

### 1.16.2 Campo de aplicação

Cortes de aves resfriados ou congelados e carcaças de aves resfriadas.

### 1.16.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Moinho ou processador para triturar e homogenizar a amostra até obtenção de uma massa homogênea, capaz de homogeneizar amostras com osso;
- Papel toalha;
- Sacos plásticos impermeáveis, com capacidade mínima de quatro litros.

#### 1.16.4 Reagentes e soluções

Não aplicável.

#### 1.16.5 Preparo da amostra

Manter as amostras sob refrigeração ou congelamento, de acordo com sua exigência de armazenamento até o momento do ensaio;

#### 1.16.6 Procedimento de análise

O ensaio consiste na análise de três amostras individuais ( $n = 3$ ), não sendo permitida a formação de uma única amostra analítica a partir das três unidades amostrais. Para cada unidade amostral:

- Verificar se a embalagem primária está intacta, não realizando a análise caso a mesma esteja danificada;
- Limpar e enxugar o exterior da embalagem;
- Pesar o produto em sua embalagem original e obter a massa ( $m_0$ );
- Pesar um saco plástico impermeável ( $m_1$ );
- Abrir a embalagem, transferir a amostra para o saco plástico impermeável, tomando cuidado para que não haja perda de amostra, líquido ou gelo. Pesar o conjunto ( $m_2$ );
- Secar a embalagem original do produto e pesar ( $m_3$ );
- Transferir o conteúdo do saco plástico (item e) para o moinho/processador e triturar até obter uma massa homogênea;
- Determinar o teor de umidade ( $\%U$ ) da amostra de acordo com a norma ISO 1442 ou AOAC 2008.06;
- Determinar o teor de proteína ( $\%P$ ) da amostra de acordo com a norma ISO 1871 ou AOAC 992.15, utilizando fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25.

#### 1.16.7 Cálculo e expressão dos resultados

Determinar a massa do líquido residual na embalagem ( $M_l$ ) de cada amostra, em gramas:

$$M_l = m_0 - (m_2 - m_1) - m_3$$

Calcular o percentual total de umidade nas amostras,  $\%U_t$ , em “g/100 g”:

$$\%U_t = \frac{(m_2 - m_1) \cdot \%U + 100 \cdot M_l}{m_0 - m_3}$$

Calcular o percentual total de proteína nas amostras,  $\%P_t$ , em “g/100 g”:

$$\%P_t = \frac{(m_2 - m_1) \cdot \%P}{m_0 - m_3}$$

Calcular a relação umidade/proteína das amostras ( $U/P$ ):

$$U/P = \frac{\%U_t}{\%P_t}$$

Reportar a média dos valores da Relação  $U/P$  das três amostras com duas casas decimais.

### 1.16.8 Bibliografia

COMUNIDADE EUROPEIA. *Regulamento (CE) N.º543/2008 da Comissão de 16 de junho de 2008*. Estabelece regras de execução do Regulamento (CE) n.º1234/2007. Jornal Oficial da União Europeia, [s.l.]:2008.

## 1.17 Determinação de conservantes por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

### 1.17.1 Princípio

O método se baseia na extração sólido-líquido com partição dos analitos em baixa temperatura, utilizando mistura de solventes orgânicos com baixa proporção de água e acidificados com ácido acético. A separação dos analitos é realizada através da cromatografia líquida em fase reversa utilizando fase estacionária cianopropil. A quantificação é realizada por espectrometria de massas, utilizando fonte de ionização por electrospray e padronização interna. O escopo do método abrange os analitos: ácido benzoico (BEN), ácido sórbico (SOR), butilparabeno (BuP), etilparabeno (EtP), hexametilenotetramina (HMT), metilparabeno (MtP), natamicina (NAT), nisina (NIS) e propilparabeno (PrP).

### 1.17.2 Campo de aplicação

Produtos cárneos e pescados.

### 1.17.3 Materiais e equipamentos

- Agitador de tubos tipo vortex;
- Agitador orbital;
- Balança analítica;
- Balões volumétricos de 10 mL;
- Banho de ultrassom;
- Centrífuga refrigerada para tubos de 15 e 50 mL;
- Centrífuga refrigerada para microtubos;
- Coluna para cromatografia líquida com fase estacionária di-isopropil-3-cianopropil silano ligado à sílica hidroxilada, com partículas de diâmetro nominal de no mínimo 3,5 µm (Zorbax-Agilent SB-CN, ou similar);

- Dispensador automático (volume mínimo 10 mL);
- Homogeneizador/disruptor de amostras (Ultra Turrax ou similar);
- Micropipetadores e ponteiros para volumes de 2-20  $\mu\text{L}$ ; 10-100  $\mu\text{L}$ ; 100-1000  $\mu\text{L}$  e 5000-10 000  $\mu\text{L}$ ;
- Microtubos de polipropileno, com capacidade para 1,5 mL;
- Provetas de 250 e 500 mL;
- Sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas em modo tandem, com fonte de ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS);
- Tubos de polipropileno, com capacidade para 15 e 50 mL (tipo falcon);
- Vials de borossilicato para HPLC com capacidade de 1,5 mL.

#### 1.17.4 Reagentes e soluções

- Solução extratora de acetonitrila:metanol:água (45:45:10 v/v/v) acidificada com 0,1% ácido acético.
- Fase móvel A (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%).
- Fase móvel B (solução de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico).
- Fase móvel de diluição (fase móvel A:fase móvel B 90:10 v/v).
- Soluções-estoque de conservantes: NIS 1000  $\text{mg L}^{-1}$ , preparada em água:acetonitrila (50:50 v/v), acidificada com ácido fórmico em 0,1%; BEN (10 000  $\text{mg L}^{-1}$ ), preparada em metanol com baixa proporção de água para dissolução; HMT (10 000  $\text{mg L}^{-1}$ ), SOR (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ), NAT (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ), MtP (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ), EtP (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ), PrP (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ), BuP (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ), todos preparados em metanol.
- Soluções-estoque do padrão interno ácido 3,5-dinitrobenzóico (3,5-DNB, 1000  $\text{mg L}^{-1}$ ), preparada em metanol.
- Solução-mix de fortificação do padrão interno 3,5-DNB (10  $\text{mg L}^{-1}$ ), preparada em metanol.
- Solução-mix de fortificação de conservantes, preparada em metanol de forma que a concentração final de cada analito seja: 50  $\text{mg L}^{-1}$  para MtP, EtP, PrP, BuP e NAT; 100  $\text{mg L}^{-1}$  para NIS e SOR e 1000  $\text{mg L}^{-1}$  para BEN.

Obs.: Os solventes orgânicos devem ser de grau LC-MS e a água deve ser de grau ultrapuro. Utilizar banho de ultrassom para dissolução dos padrões. As soluções de fortificação preparadas conforme este método são estáveis por no mínimo 30 dias quando estocadas a  $-30 \pm 10^\circ\text{C}$ .



### 1.17.5 Preparo da amostra

- (a) Produtos cárneos salgados, secos curados e/ou maturados (não embutidos):

As amostras devem ser preparadas em duas porções, uma contendo somente a superfície e outra contendo a porção interna do produto.
- (b) Produtos cárneos secos curados e/ou maturados embutidos:

Retirar os envoltórios, que serão processados para análise. Para os produtos em que são permitidos conservantes apenas na superfície, preparar conforme Seção 1.1.1. As demais amostras devem ser processadas homogeneizando-se todo o seu conteúdo
- (c) Pescado *in natura* e salgado:

Limpar o pescado retirando a pele e escamas, espinha, gordura e vísceras. Retirar porções da musculatura de várias regiões do pescado e cortar as amostras em pedaços menores para processar e homogeneizar em processador.
- (d) Conservas de pescado:

Processar e homogeneizar todo o conteúdo da lata (líquido + parte sólida) em processador.

### 1.17.6 Procedimento de análise

- (a) Utilizando balança analítica, pesar  $2,0 \pm 0,1$  g de amostra em tubos de polipropileno de capacidade 50 mL.
- (b) Fortificar as amostras com 200  $\mu$ L do mix de padrão interno.
- (c) Adicionar 10 mL de solução de extração aos tubos com amostra.
- (d) Homogeneizar o conteúdo de cada tubo por volta de cinco segundos no homogeneizador/disruptor.
- (e) Agitar em mesa agitadora orbital durante 20 min.
- (f) Centrifugar por 10 min à rotação de 3488 *g*, sob refrigeração.
- (g) Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade e levar ao freezer (à temperatura inferior a  $-18^{\circ}\text{C}$ ) por no mínimo 1 h.
- (h) Centrifugar novamente por 10 min à rotação de 3488 *g*, sob refrigeração.
- (i) Transferir uma alíquota ( $\mu$ L) do sobrenadante do extrato para microtubos de polipropileno 1,5 mL e diluir de acordo com a sensibilidade do sistema LC-ESI-MS/MS, utilizando fase móvel de diluição. Homogeneizar e centrifugar a 13.000 *g*, sob refrigeração. Por fim, transferir o sobrenadante límpido para vials e injetar no sistema LC-ESI-MS/MS.
- (j) Preparar uma curva analítica em matriz, pesando-se  $2,0 \pm 0,1$  g de amostra “branca” para cada ponto e fortificando as amostras com 200  $\mu$ L do mix de padrões internos. Estabelecer um gradiente de concentração de acordo com as faixas

de trabalho: BEN, HMT, 25 a 200 mg kg<sup>-1</sup>; NAT, BuP, EtP, MtP e PrP, 1,25 a 10,0 mg kg<sup>-1</sup>; SOR e NIS, 2,5 a 20,0 mg kg<sup>-1</sup>. Para isso, adicionar volumes crescentes de 50, 100, 200, 300 e 400 µL de cada solução-mix de fortificação e completar o volume com solução de extração q.s.p. 10 mL. Amostras, brancos analíticos, curvas analíticas e demais controles devem estar sujeitos aos mesmos procedimentos analíticos descritos.

(k) Parâmetros instrumentais sugeridos:

- temperatura do forno de coluna: 40 °C;
- volume de injeção: 10 µL;
- fluxo da fase móvel: 500 µL min<sup>-1</sup>;
- gradiente de eluição: 0-1 min, 90% A; 2-3 min, 80% A; 4 min, 70% A, 5-6 min, 50% A; 7-8 min, 10% A; 9 min, 50% A; 10 min, 90% A; mais 4 min para auto equilíbrio do sistema.

(l) Parâmetros MS/MS:

Analitos (sigla)	Padrão interno	Íon Precursor (ESI) m/z	Transição de quantificação m/z (EC, V)	Transição de confirmação m/z (EC, V)	DP(V)
Ácido sórbico (SOR)	3,5-DNB	112,9 (+)	67,0 (19)	65,0 (25)	56
Ácido benzoico (BEN)	3,5-DNB	122,9 (+)	79,0 (17)	51,0 (51)	36
Hexametileno-tetramina (HMT)	3,5-DNB	141,1 (+)	112,0 (11)	98,0 (21)	51
Nisina (NIS)	—	672,1 (5+)	811,3 (23)	649,3 (23)	56
Natamicina (NAT)	3,5-DNB	666,2 (+)	503,2 (17)	485,2 (21)	56
Metilparabeno (MtP)	3,5-DNB	151,0 (-)	91,9 (-24)	135,9 (-18)	-50
Etilparabeno (EtP)	3,5-DNB	165,0 (-)	137,0 (-18)	93,0 (-26)	-10
Propilparabeno (PrP)	3,5-DNB	179,0 (-)	92,9 (-16)	108,0 (-30)	-40
Butilparabeno (BuP)	3,5-DNB	193,0 (-)	136,9 (-20)	92,9 (-26)	-105
3,5-Ácido di-nitrobenzoico (3,5-DNB)	—	210,9 (-)	166,9 (-14)	—	-45

### 1.17.7 Expressão dos resultados

A identificação de cada espécie química é feita pelo tempo de retenção (min) e o perfil de fragmentação molecular, através da razão iônica que deve ser de no mínimo 20% entre as transições (quantificação/confirmação). A quantificação é realizada através da padronização interna, utilizando relação funcional linear de razão das concentrações (eixo x) dos analitos *versus* razão de áreas dos picos (eixo y), exceto para a nisina, determinada por padronização externa. Expressar separadamente o resultado de cada porção analisada da amostra. Expressar os resultados de ácido benzoico e de ácido sórbico conforme os itens 1.2 e 1.3. Os demais conservantes devem ser expressos em “mg/kg” com no máximo quatro algarismos significativos. Para os produtos em que o uso de natamicina é permitido para tratamento de superfície, os resultados da parte externa devem ser expressos em “mg/dm<sup>2</sup>”.

### 1.17.8 Bibliografia

Luciano Molognoni, Heitor Daguer, Leandro Antunes de Sá Ploêncio, Juliano de Dea Lindner. *A multi-purpose tool for food inspection: simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS*. Talanta, vol. 178, p. 1053-1066, 2018.

## 1.18 Índice de peróxidos

Utilizar o método descrito na norma ISO 3960 para determinação do índice de peróxidos na porção gordurosa da amostra, expressando o resultado final em “meq de O<sub>2</sub>/kg de gordura” com uma casa decimal.

## 1.19 Lipídios totais

Determinar o teor de lipídios totais utilizando o método descrito na norma ISO 1443 ou, opcionalmente, na norma NMKL 181 ou na norma AOAC 2008.06. Reportar o valor obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 1.20 Nitritos e nitratos

Determinar o teor de nitritos e nitratos em “g de NaNO<sub>2</sub>/100 g” com três casas decimais, utilizando o método descrito nas normas NMKL 165 (nitritos e nitratos), NMKL 194 (nitritos e nitratos) ou ISO 2918 (nitritos) e ISO 3091 (nitratos) ou, alternativamente, o método descrito na seção 1.21. Reportar o resultado conforme descrito abaixo:

### Nitritos

- Resultados inferiores a 0,001 g de NaNO<sub>2</sub>/100 g devem ser expressos como “não detectado”;
- Resultados entre 0,001 e 0,002 g de NaNO<sub>2</sub>/100 g devem ser expressos como “detectado”;

- Resultados maiores ou iguais a 0,002 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como obtidos.

### Nitratos

- Resultados inferiores a 0,001 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como “não detectado”;
- Resultados entre 0,001 e 0,003 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como “detectado”;
- Resultados maiores ou iguais a 0,003 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como obtidos.

Uma nova curva de calibração deve ser obtida a cada batelada de análises, independentemente do método utilizado.

## 1.21 Nitritos e nitratos por eletroforese capilar de zona

### 1.21.1 Princípio

O método se baseia na extração dos analitos com água quente e tetraborato de sódio. A separação dos analitos é realizada através de eletroforese capilar de zona, com detecção por arranjo de diodos (CZE-DAD). A quantificação é feita por padronização interna com tiocianato de potássio.

### 1.21.2 Campo de aplicação

Carnes, pescados e produtos derivados.

### 1.21.3 Materiais e equipamentos

- Agitador de tubos (tipo vórtex);
- Balança analítica;
- Banho-maria com agitação;
- Centrífuga refrigerada para tubos de 15 e 50 mL;
- Centrífuga refrigerada para microtubos;
- Capilares de sílica fundida, com 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 48,5 cm de comprimento total;
- Funis;
- Homogeneizador/disruptor de amostras (Ultra Turrax ou similar);
- Membrana filtrante de polietileno e poros com diâmetro de 0,45  $\mu\text{m}$  (ou menor);

- Micropipetadores e ponteiros para volumes de 1000-10 000  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  e 5-200  $\mu\text{L}$ ;
- Microtubos de polipropileno, com capacidade para 1,5 mL;
- Papel de filtro qualitativo;
- Sistema automático de eletroforese capilar, com detector de arranjo de diodos, controlador de temperatura, operado por software de controle e aquisição de dados;
- Sistema de filtração de solventes;
- Tubos de polipropileno, com capacidade para 15 mL e 50 mL (tipo falcon);
- *Vials* de polipropileno para eletroforese capilar, com tampas de silicone e capacidade de 1,5 mL.

#### 1.21.4 Reagentes e soluções

- Acetonitrila de grau cromatográfico.
- Solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L<sup>-1</sup>;
- Solução de tetraborato de sódio 5% (m/v);
- Solução de  $\beta$ -alanina 100 mmol L<sup>-1</sup>;
- Solução de ácido perclórico 100 mmol L<sup>-1</sup>;
- Soluções-estoque de tiocianato 10 000 mg L<sup>-1</sup>;
- Soluções-estoque de nitrato 1000 mg L<sup>-1</sup>;
- Soluções-estoque de nitrito 1000 mg L<sup>-1</sup>;
- Solução de fortificação de tiocianato 100 mg L<sup>-1</sup>;
- Solução de fortificação de nitrato 100 mg L<sup>-1</sup>;
- Solução de fortificação de nitrito 100 mg L<sup>-1</sup>;
- Eletrólito de corrida (pH  $\approx$  3,8), preparado com  $\beta$ -alanina 100 mmol L<sup>-1</sup> (2600  $\mu\text{L}$ ), ácido perclórico 100 mmol L<sup>-1</sup> (1000  $\mu\text{L}$ ) e água ultrapura (400  $\mu\text{L}$ ). Filtrar a vácuo em membrana filtrante. Transferir para *vials*.

#### 1.21.5 Preparo da amostra

Processar e homogeneizar a amostra em processador. Quando confeccionados em material não comestível, os envoltórios deverão ser retirados e descartados. Caso contrário, processar todo o conteúdo (amostra e envoltórios).

### 1.21.6 Procedimento

- (a) Utilizando balança analítica, pesar  $2,0 \pm 0,1$  g de amostra em tubos de polipropileno de capacidade 50 mL;
- (b) Fortificar as amostras com 150  $\mu$ L da solução-estoque de tiocianato ( $10\,000\text{ mg L}^{-1}$ );
- (c) Adicionar 1 mL de solução de tetraborato de sódio 5%;
- (d) Adicionar 9 mL de água ultrapura;
- (e) Homogeneizar por aproximadamente 1 min em Ultra Turrax.
- (f) Colocar os tubos em banho-maria à temperatura de aproximadamente  $65^\circ\text{C}$ , sob agitação, por 20 min;
- (g) Centrifugar à temperatura aproximada de  $4^\circ\text{C}$  por 10 min a  $3.488g$ ;
- (h) Filtrar em papel de filtro qualitativo;
- (i) Transferir 100  $\mu$ L do filtrado para um microtubo, adicionar 200  $\mu$ L de acetonitrila e 200  $\mu$ L de água ultrapura. Agitar;
- (j) Centrifugar à temperatura aproximada de  $4^\circ\text{C}$ , por 10 min a  $17.300g$ ;
- (k) Transferir cerca de 450  $\mu$ L do sobrenadante para *vials* e injetar no sistema de eletroforese. Caso necessária, a diluição de amostras deve ser feita com solução de padrão interno preparada na mesma concentração do *vial* de injeção;
- (l) Preparar uma curva de calibração em solvente, de acordo com as faixas de trabalho: nitrato, 18,75 a  $600\text{ mg L}^{-1}$ ; nitrito, 9,375 a  $300\text{ mg L}^{-1}$ ; tiocianato,  $750\text{ mg L}^{-1}$ . Transferir para vials e injetar no sistema de eletroforese. Preparar também uma amostra de recuperação, fortificada nos limites regulatórios;
- (m) Parâmetros instrumentais recomendados: injeção hidrodinâmica da amostra pelo *outlet* ( $-50\text{ mbar } 3\text{ s}^{-1}$ ); comprimento de onda: 210 nm; voltagem de separação: 20 kV; temperatura do capilar:  $20^\circ\text{C}$ ; condicionamento do capilar: NaOH  $1\text{ mol L}^{-1}$  (20 min), água ultrapura (20 min) e eletrólito de corrida (20 min).

### 1.21.7 Cálculo e expressão dos resultados

A identificação de cada espécie química é feita pelo tempo de migração e pelo espectro de absorção. A quantificação é realizada por padronização interna ( $750\text{ mg L}^{-1}$ ), utilizando relação funcional linear de razão das concentrações (eixo x) dos analitos versus razão de áreas dos picos (eixo y). Expressar o resultado da amostra conforme descrito na Seção 1.20.

### 1.21.8 Bibliografia

Fabiana Della Betta, Lais Morilla Pereira, Mariana Araújo Siqueira, Andressa Camargo Valese, Heitor Daguer, Roseane Fett Luciano Vitali, Ana Carolina Oliveira Costa. *A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: an alternative for routine analysis*. Meat Science, vol. 119, p. 62-68, 2016.

## 1.22 Nitrogênio total

Determinar o teor de nitrogênio na amostra de acordo com a norma ISO 1871, expressando o resultado obtido em “g de N/100 g” com duas casas decimais. Alternativamente, utilizar a norma AOAC 992.15.

## 1.23 pH

Determinar o pH no extrato homogeneizado da amostra, conforme metodologia descrita na norma ISO 2917. Reportar o valor obtido com duas casas decimais.

Em amostras de gelatina e colágeno, utilizar o método descrito no Capítulo 2, Seção 2.36.

## 1.24 Proteína

Determinar o teor de nitrogênio na amostra de acordo com a norma ISO 1871. Multiplicar o valor obtido por 6,25 para obtenção do teor de proteína. Expressar o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais. Alternativamente, utilizar a norma AOAC 992.15.

## 1.25 Relação Umidade/Proteína

A partir dos resultados para o Teor de Umidade e Teor de Proteínas, obtidos utilizando-se os métodos estabelecidos neste Manual, calcular a relação U/P, expressando o resultado final com duas casas decimais.

## 1.26 Resíduo mineral fixo (Cinzas)

Determinar o teor de Resíduo Mineral Fixo (Cinzas) utilizando o método descrito na norma ISO 936, reportando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 1.27 Teor de ossos

### 1.27.1 Princípio

Baseia-se na digestão da porção orgânica da amostra por solução alcoólica de hidróxido de potássio para separação das partículas ósseas, posteriormente quantificadas por gravimetria.

### 1.27.2 Campo de aplicação

Carne mecanicamente separada.

### 1.27.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,0001 g;
- Balão volumétrico de 1000 mL;
- Béquere de 600 mL;
- Cadinho de vidro com placa porosa tipo Gooch, porosidade 3 (16  $\mu\text{m}$  – 40  $\mu\text{m}$ );
- Centrífuga;
- Chapa aquecedora;
- Peneiras com malha de 0,85 mm e 0,5 mm.

### 1.27.4 Reagentes e soluções

- Álcool etílico 95% ou superior;
- Álcool metílico, ACS;
- Solução alcoólica de hidróxido de potássio a 8% (m/v):

Em um béquer, dissolver 80 g de hidróxido de potássio em uma mistura contendo 85% de álcool etílico e 15% de álcool metílico. Transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar para o volume.

### 1.27.5 Preparo da amostra

Homogeneizar a amostra, armazenando-a em recipiente hermeticamente fechado.

### 1.27.6 Procedimento

Obs.: Efetuar o ensaio em duplicata.

- (a) Pesar, em béquer de 600 mL, 100 g da amostra;
- (b) Adicionar, sob aquecimento moderado, aproximadamente 200 mL de solução alcoólica de KOH, mantendo o aquecimento até a digestão da amostra;
- (c) Resfriar e, com auxílio de centrífuga, decantar as partículas ósseas, lavando-as em seguida com água até a solução de lavagem tornar-se límpida. Passar a água pelo cadinho de vidro previamente pesado ( $m_0$ ) de modo a prevenir perda de precipitado;
- (d) Lavar as partículas ósseas com pequenas porções de álcool etílico, transferindo-as para o cadinho;
- (e) Secar o cadinho contendo as partículas ósseas em estufa a  $(102 \pm 2)^\circ\text{C}$  por 3 h e pesar.
- (f) Por meio das peneiras de malha de 0,85 mm e 0,5 mm, particionar as partículas ósseas secas de acordo com sua granulometria;
- (g) Obter a massa da fração retida em peneira de 0,5 mm ( $m_2$ ) e em peneira de 0,85 mm ( $m_3$ ).



### 1.27.7 Cálculo e expressão dos resultados

$$\% \text{ de partículas ósseas menores que } 0,5 \text{ mm} = 100 - \frac{(m_2 + m_3) \cdot 100}{m_1 - m_0}$$

Deverão ser reportados dois resultados:

- Reportar, como número inteiro, a média do valor percentual de partículas ósseas menores que 0,5 mm obtido em cada duplicata; e
- Reportar “Presença de partículas maiores que 0,85 mm” se  $m_3$  for maior que o erro admitido na balança utilizada. Em caso contrário, reportar “Ausência de partículas maiores que 0,85 mm”.

### 1.27.8 Bibliografia

Beraquet, N. J.; Galvão, M. T. E. L.; Arima, H. K. e Silva, R. Z. M. da. *Efeito das condições de processamento e tipo de matéria-prima no rendimento e na composição de carne de frango mecanicamente separada*. Coletânea do ITAL, vol. 19(2), p. 196-203, 1989.

## 1.28 Teste de gotejamento (*dripping test*)

### 1.28.1 Princípio

Baseia-se na determinação gravimétrica do teor de líquido perdido pelas aves congeladas no degelo em condições padronizadas. O resultado final do ensaio é a média aritmética do percentual de líquido perdido de seis carcaças.

### 1.28.2 Campo de aplicação

Carcaças de aves congeladas.

### 1.28.3 Materiais e equipamentos

- Balança com resolução mínima de 0,1 g;
- Banho com circulação de água, controlada termostaticamente à temperatura de  $42^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , e volume de água não inferior a oito vezes o volume das carcaças a serem controladas;
- Barbante;
- Guias ou pesos para manter as carcaças mergulhadas verticalmente;
- Sacos plásticos, resistentes e impermeáveis com capacidade suficiente para conter a carcaça e permitir um fechamento seguro;
- Termômetro de superfície ou de infravermelho;
- Toalhas de tecido ou papel para enxugar a carcaça.

**Tabela 1:** Tempos de imersão de acordo com a massa da ave.

Massa da ave mais vísceras, em g	Tempo de imersão, em min
Até 800	65
801 a 900	72
901 a 1000	78
1001 a 1100	85
1101 a 1200	91
1201 a 1300	98
1301 a 1400	105

**Nota:** Acima de 1400 g, aumentar o tempo de permanência no banho em 7 min para cada 100 g adicionais na massa da ave.

#### 1.28.4 Reagentes e soluções

Não aplicável.

#### 1.28.5 Preparo da amostra

As carcaças não podem sofrer descongelamento desde a coleta até sua recepção no laboratório, devendo ser mantidas em estado físico congelado sólido. A análise será iniciada estando as aves a uma temperatura de  $-12^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , medida em sua superfície externa.

#### 1.28.6 Procedimento

- Enxugar o lado externo da embalagem de modo a eliminar todo o líquido e gelo aderido;
- Pesar a ave, obtendo-se  $M_0$ ;
- Retirar a carcaça congelada de dentro da embalagem (com as vísceras, se presentes), enxugar a embalagem e pesá-la, obtendo-se  $M_1$ ;
- Introduzir a carcaça, com os miúdos, num saco plástico com a cavidade abdominal voltada para o fundo do saco plástico e fechá-lo tendo o cuidado de retirar o excesso de ar por meio de pressão manual;
- Mergulhar completamente no banho a parte do saco que contém a carcaça e as vísceras, de tal maneira que a água não penetre no interior do mesmo. Os sacos individuais não devem tocar uns nos outros;
- Repetir este procedimento para as outras cinco carcaças;
- Manter os sacos no banho de água a  $42^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com circulação contínua de acordo com os tempos definidos na Tabela 1.

- (h) Após o período de imersão, retirar o saco plástico do banho, abrir um orifício na parte inferior de modo que a água liberada pelo descongelamento possa escorrer e deixar à temperatura ambiente entre 18 °C e 25 °C por no mínimo 60 min;
- (i) Retirar a carcaça descongelada do saco e as vísceras da cavidade torácica e enxugar a carcaça interna e externamente;
- (j) Perfurar o invólucro das vísceras, deixar escoar e secar o invólucro e as vísceras descongeladas;
- (k) Pesar a carcaça descongelada juntamente com as vísceras e seu invólucro, obtendo-se  $M_2$ ;
- (l) Pesar o invólucro que continha as vísceras, obtendo-se  $M_3$ .

Obs. Caso as aves não contenham vísceras,  $M_2$  será o peso da carcaça descongelada e  $M_3$  será igual a zero.

### 1.28.7 Cálculo e expressão dos resultados

$$\% \text{ de líquido perdido por carcaça} = \frac{M_0 - M_1 - M_2}{M_0 - M_1 - M_3} \cdot 100$$

Reportar o valor do “% de líquido perdido” por carcaça e a média aritmética do “% de líquido perdido” com uma casa decimal.

### 1.28.8 Bibliografia

Sônia Dedeca da Silva de Campos. *Parâmetros de qualidade de frangos congelados: caracterização e alterações decorrentes da estocagem*. Tese: Doutorado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas: 1993.

FAO. *Manual of food quality control 3*. Roma: 1979.

## 1.29 Umidade

Determinar o teor de Umidade utilizando o método descrito na norma ISO 1442, reportando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal. Alternativamente, utilizar o método descrito na norma AOAC 2008.06.

# Leite e produtos lácteos

\*\*\*

## 2.1 Acidez

### 2.1.1 Caseínas – acidez livre

Utilizar o método descrito na norma IDF 91, expressando o resultado com duas casas decimais em “mL NaOH 0,1 N/g”.

### 2.1.2 Creme de leite e leite fluido

Utilizar o método descrito na norma AOAC 947.05, expressando o resultado com duas casas decimais em “g de ác. láctico/100 g” ou “g de ác. láctico/100 mL”, conforme aplicável.

### 2.1.3 Gordura anidra do leite (*butter oil*)

Utilizar o método descrito na norma IDF 6, expressando o resultado com duas casas decimais em “g de ác. oleico/100 g de gordura”.

### 2.1.4 Leite em pó – acidez titulável

Utilizar o método descrito na norma IDF 86, expressando o resultado com uma casa decimal em “mL NaOH 0,1 N/10 g SNG”.

### 2.1.5 Leites fermentados e sobremesas lácteas fermentadas

Utilizar o método descrito na norma IDF 150, expressando o resultado com duas casas decimais em “g de ác. láctico/100 g”.

### 2.1.6 Manteiga

Utilizar o método descrito na norma IDF 6, expressando o resultado com duas casas decimais em “milimoles/100 g de matéria gorda”.

## 2.2 Acidez em manteiga da terra e manteiga comum

### 2.2.1 Princípio

Fundamenta-se na reação de neutralização pelo hidróxido de sódio em presença de fenolftaleína como indicador.

### 2.2.2 Campo de aplicação

Este método é aplicável, unicamente, a manteiga da terra (manteiga de garrafa) e manteiga comum. Este método não tem equivalência com o método descrito na norma IDF 6.

### 2.2.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,01 g;
- Bureta com resolução mínima de 0,05 mL;
- Erlenmeyer ou béquer de 100 mL;
- Estufa;
- Papel de filtro qualitativo;
- pH-metro;
- Proveta de 50 mL.

### 2.2.4 Reagentes e soluções

- Solução alcoólica de fenolftaleína a 1 % (m/v);
- Solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução de álcool etílico ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) e éter etílico ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) (1+2) (v/v).

### 2.2.5 Preparo da amostra

Transferir para um béquer cerca de 50 g de amostra e fundir em estufa entre 50 e 60 °C. Deixar repousar para separar as camadas. Decantar a camada gordurosa, filtrando através de papel de filtro seco para um béquer também seco. Utilizar esta porção para análise.

### 2.2.6 Procedimento de análise

- (a) Pesar entre 4,90 e 5,10 g da porção gordurosa em béquer de 100 mL;
- (b) Adicionar 40 mL da solução álcool-éter;
- (c) Adicionar 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1 % (m/v), para uma titulação colorimétrica, ou levar ao pH-metro, para uma titulação potenciométrica;
- (d) Titular a amostra com solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos ou pH 8,4;
- (e) Repetir o procedimento utilizando apenas 40 mL da solução álcool-éter (branco).

### 2.2.7 Cálculo e expressão dos resultados

$$\text{Acidez em solução alcalina normal \% (SAN \%)} = \frac{(V - V_{\text{branco}}) \cdot f \cdot 0,1 \cdot 100}{m}$$

onde:

$V$  = volume da solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação, em mL;

$V_{\text{branco}}$  = volume da solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação do branco, em mL;

$f$  = fator de correção da solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;

$m$  = massa da amostra, em gramas;

$0,1$  = concentração molar da solução de hidróxido de sódio.

Expressar os resultados com duas casas decimais.

### 2.2.8 Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos*. Brasília: 1981.

## 2.3 Ácido benzoico e/ou benzoatos

Utilizar o método descrito na norma IDF 139, expressando o resultado obtido em “mg/kg” como um número inteiro.

- Resultados inferiores a  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  devem ser expressos como “não detectado”;
- Resultados entre  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  devem ser expressos como “detectado”;
- Resultados maiores ou iguais a  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  devem ser expressos como obtidos.

## 2.4 Ácido sórbico e/ou sorbatos

Utilizar o método descrito na norma IDF 139, expressando o resultado obtido em “mg/kg” como um número inteiro. Se demandado pelo RTIQ do produto, expressar o resultado em “g/100 g” com três casas decimais.

- Resultados inferiores a  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $0,0005 \text{ g/100 g}$ ) devem ser expressos como “não detectado”;
- Resultados entre  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $0,0005 \text{ g/100 g}$ ) e  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $0,003 \text{ g/100 g}$ ) devem ser expressos como “detectado”;
- Resultados maiores ou iguais a  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $0,003 \text{ g/100 g}$ ) devem ser expressos como obtidos.

Uma nova curva de calibração deve ser obtida a cada batelada de análises.

## 2.5 Açúcares em leite condensado

Determinar o teor de sacarose, glicose e frutose de acordo com o método descrito na norma NMKL 148 ou pelo método descrito na Seção 2.29. Caso o produto apresente apenas os açúcares sacarose e lactose em sua formulação, pode-se utilizar o método descrito na norma IDF 35 para quantificação da sacarose. Reportar os teores dos açúcares quantificados em “g/100 g” com uma casa decimal.

Uma nova curva de calibração deve ser obtida a cada batelada de análises, independentemente do método utilizado.

## 2.6 Amido – qualitativo

### 2.6.1 Princípio

A interação entre o íon  $I_3^-$  e a amilose presente nos amidos forma um composto de forte coloração azul, tendendo para o preto de acordo com a concentração dos reagentes empregados.

### 2.6.2 Campo de aplicação

Leite fluido, condensado, fermentado e em pó, doce de leite, queijo, requeijão e ricota.

### 2.6.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Béquer de 150 mL;
- Pipetas graduadas de 1 e 20 mL;
- Placa aquecedora;
- Processador de alimentos ou moinho;
- Proveta de 50 mL;
- Tubo de ensaio de 25 mL.

### 2.6.4 Reagentes e soluções

- Amido solúvel;
- Solução de Lugol:

Dissolver 1,25 g de iodo ( $I_2$ ) e 2,5 g de iodeto de potássio (KI) em uma pequena porção de água e diluir para 25 mL.

### 2.6.5 Preparo da amostra

- (a) Leite condensado, doce de leite, queijo, requeijão e ricota:

Pesar 10 g da amostra homogeneizada em béquer de 150 mL, adicionar 50 mL de água e misturar. Aquecer em placa aquecedora, mantendo em ebulição por aproximadamente 3 min. Deixar esfriar até temperatura ambiente antes da execução do teste.

- (b) Leite fluido e leite fermentado:

Homogenizar a amostra a temperatura ambiente, agitando e invertendo o recipiente ou embalagem cinco ou seis vezes. Quando a amostra contiver grumos de creme, aquecer de 38 a 40 °C em banho-maria, esfriar até temperatura ambiente agitando ocasionalmente. Transferir 10 mL da amostra para tubo de ensaio, aquecer até ebulição em banho-maria e deixar por 3 min. Deixar esfriar até temperatura ambiente antes da execução do teste.

- (c) Leite em pó:

Homogenizar a amostra, agitando e invertendo o recipiente ou embalagem 5 ou 6 vezes. Reconstituir de acordo com as instruções do fabricante e transferir 10 mL da amostra para tubo de ensaio, aquecer até ebulição em banho-maria e deixar por 3 min. Deixar esfriar até temperatura ambiente antes da execução do teste.

### 2.6.6 Procedimento de análise

Adicionar 250 µL de solução de Lugol à amostra preparada conforme 2.6.5 e observar a ocorrência da formação de uma coloração azul ou verde. A cor pode esvanecer com o tempo.

### 2.6.7 Expressão dos resultados

Reportar positivo caso se observe o aparecimento de coloração entre azul acinzentado (●) e azul (●) ou verde.

Para amostras de leite, pode-se utilizar como referência uma amostra de leite sabidamente negativo adicionado de 0,4 g L<sup>-1</sup> de amido.

### 2.6.8 Bibliografia

Carina de Souza Gondim, Roberto Cesar Santos de Souza, Marina de Paula Penna e Palhares, Roberto Gonçalves Junqueira e Scheilla Vitorino Carvalho de Souza. *Performance improvement and single laboratory validation of classical qualitative methods for the detection of adulterants in milk: starch, chlorides and sucrose*. Analytical Methods, vol. 7(22), p. 9692-9701, 2015.

Carina de Souza Gondim, Roberto Gonçalves Junqueira e Scheilla Vitorino Carvalho de Souza. *Interlaboratory validation of modified classical qualitative methods for detection of adulterants in milk: starch, chloride, and sucrose*. Food Analytical Methods, vol. 9, p. 2509-2520, 2016.



## 2.7 Cinzas

### 2.7.1 Caseína alimentar ao ácido e láctica

Utilizar o método descrito na norma IDF 89, expressando o resultado com uma casa decimal em “g/100 g”.

### 2.7.2 Caseína alimentar ao coalho, caseinatos e soro de leite em pó

Utilizar o método descrito na norma IDF 90, expressando o resultado com uma casa decimal em “g/100 g”.

### 2.7.3 Doce de leite

Utilizar o método descrito na norma AOAC 930.30, expressando o resultado com uma casa decimal em “g/100 g”.

### 2.7.4 Leite de cabra

Utilizar o método descrito na norma AOAC 945.46, expressando o resultado com uma casa decimal em “g/100 g”.

## 2.8 Cloreto de sódio em manteiga

Utilizar o método descrito nas normas IDF 12 ou IDF 179, expressando o resultado obtido em “g de NaCl/100 g” com duas casas decimais.

Em amostras de manteiga adicionada de cristais de sal, realizar o ensaio em triplicata.

## 2.9 Cloretos em leite fluido – qualitativo

### 2.9.1 Princípio

Fundamenta-se na reação do nitrato de prata com os cloretos em presença de cromato de potássio como indicador.

### 2.9.2 Campo de aplicação

Este método é aplicável a leite fluido.

### 2.9.3 Materiais e equipamentos

- Agitador tipo vortex;
- Pipetas graduadas de 5 e 10 mL;
- Tubos de ensaio.

### 2.9.4 Reagentes e soluções

- Solução de cromato de potássio ( $K_2CrO_4$ ) a 5% (m/v);
- Solução de nitrato de prata ( $AgNO_3$ ) com concentração molar entre  $0,095\text{ mol L}^{-1}$  e  $0,105\text{ mol L}^{-1}$ .

### 2.9.5 Preparo da amostra

Homogenizar a amostra a temperatura ambiente, agitando e invertendo o recipiente ou embalagem 5 ou 6 vezes. Quando a amostra contiver grumos de creme, aquecer de 38 a 40 °C em banho-maria, esfriar até temperatura ambiente agitando ocasionalmente.

### 2.9.6 Procedimento de análise

- (a) Em tubo de ensaio colocar 10 mL da amostra;
- (b) Adicionar 4,5 mL de solução de nitrato de prata e agitar em vortex;
- (c) Adicionar 0,5 mL de solução de cromato de potássio e agitar em vortex;
- (d) Observar a coloração da solução resultante e presença de precipitado.

### 2.9.7 Expressão dos resultados

Reportar “positivo” apenas se observada coloração amarela com ausência de precipitados vermelhos.

### 2.9.8 Bibliografia

Carina de Souza Gondim, Roberto Cesar Santos de Souza, Marina de Paula Penna e Palhares, Roberto Gonçalves Junqueira e Scheilla Vitorino Carvalho de Souza. *Performance improvement and single laboratory validation of classical qualitative methods for the detection of adulterants in milk: starch, chlorides and sucrose*. Analytical Methods, vol. 7(22), p. 9692-9701, 2015.

Carina de Souza Gondim, Roberto Gonçalves Junqueira e Scheilla Vitorino Carvalho de Souza. *Interlaboratory validation of modified classical qualitative methods for detection of adulterants in milk: starch, chloride, and sucrose*. Food Analytical Methods, vol. 9, p. 2509-2520, 2016.

## 2.10 Corantes artificiais

Utilizando a metodologia descrita na norma NMKL 130, expressar o resultado como “X de nome comum (código INS)” para cada corante identificado, onde X é a quantidade encontrada em g/100 g com três casas decimais ou mg/kg como um número inteiro, de acordo com a unidade expressa no RTIQ do produto analisado. Reportar “presença de corante hidrossolúvel não identificado” caso seja detectado um corante sem correlação com os corantes testados no método. Deve-se testar, em adição aos corantes descritos na norma, a presença do corante carmoisina (INS 122).

Uma nova curva de calibração deve ser obtida a cada batelada de análises.

## 2.11 Densidade relativa a 15°C

### 2.11.1 Princípio

O tubo oscilante em forma de “U” é uma técnica para determinação da densidade de líquidos e gases baseada na medida eletrônica da frequência de oscilação, a partir da qual o valor da densidade é calculado. O princípio da medida baseia-se no modelo Massa-mola de um oscilador.

### 2.11.2 Campo de aplicação

Aplica-se a leite fluido.

### 2.11.3 Materiais e equipamentos

- Densímetro digital de acordo com a norma ISO 15212-1: Oscillation-type density meters - Part 1: Laboratory instruments.

### 2.11.4 Reagentes e soluções

Não aplicável.

### 2.11.5 Preparo da amostra

Com o auxílio de um banho-maria, aquecer a amostra a  $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , mexer gentilmente a amostra até sua homogenização, esfriar até temperatura ambiente.

### 2.11.6 Procedimento de análise

Obter a densidade relativa da amostra a  $15^{\circ}\text{C}$  de acordo com as instruções do densímetro utilizado.

### 2.11.7 Expressão dos resultados

Reportar o valor obtido com 3 casas decimais.

### 2.11.8 Bibliografia

International Organization for Standardization. *15212-1:1998: Oscillation-type density meters - Part 1: Laboratory instruments*. Genebra: 2004.

## 2.12 Detecção de gordura vegetal em produtos lácteos

### 2.12.1 Princípio

A gordura láctea é saponificada em solução metanólica de hidróxido de potássio e a matéria insaponificável extraída com uma mistura de éter etílico e éter de petróleo. Por

meio de cromatografia líquida em fase reversa e detecção no ultravioleta, detecta-se a presença/ausência do marcador  $\beta$ -sitosterol.

### 2.12.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a creme de leite de uso industrial, gordura anidra de leite (*butteroil*), manteiga, manteiga de garrafa/da terra e *ghee*.

### 2.12.3 Materiais e equipamentos

- Balança com resolução mínima de 0,1 g;
- Banho-maria;
- Béquer ou erlenmeyer de 50 mL;
- Centrífuga;
- Filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e seringa;
- Mesa agitadora ou agitador vortex;
- Micropipeta de 100  $\mu\text{L}$  – 1000  $\mu\text{L}$ ;
- Proveta de 25 mL;
- Sistema cromatográfico, equipado com detector UV a 210 nm e coluna de fase reversa C18 de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ;
- Tubos de centrífuga de 50 mL.

### 2.12.4 Reagentes e soluções

- Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ );
- Éter etílico ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ );
- Éter de petróleo, faixa de ebulição 30 °C – 60 °C;
- Fase móvel composta de uma mistura 9:1 de Acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):2-propanol ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ ), ambos grau HPLC;
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ );
- Solução de hidróxido de potássio (KOH) a 5% (m/v) em metanol;
- Solução de Vermelho Congo a 1% ou outro corante insolúvel no éter de petróleo e éter etílico;
- Solução de referência de  $\beta$ -sitosterol a 200  $\text{mg L}^{-1}$  em etanol. Esta solução tem validade de 2 meses se mantida sob refrigeração;

### 2.12.5 Preparo da amostra

- (a) Manteiga, creme de leite cru de uso industrial  
Em tubo de centrífuga de 50 mL, fundir a 50 °C quantidade suficiente da amostra para a obtenção de 1 g de gordura. Centrifugar de modo a separar a fase aquosa, obtendo-se uma fase gordurosa isenta de sólidos.
- (b) Gordura anidra de leite, *ghee* e manteiga de garrafa/da terra  
Aquecer a amostra em embalagem fechada a aproximadamente 30 °C, homogeneizando com agitação manual ou mecânica.

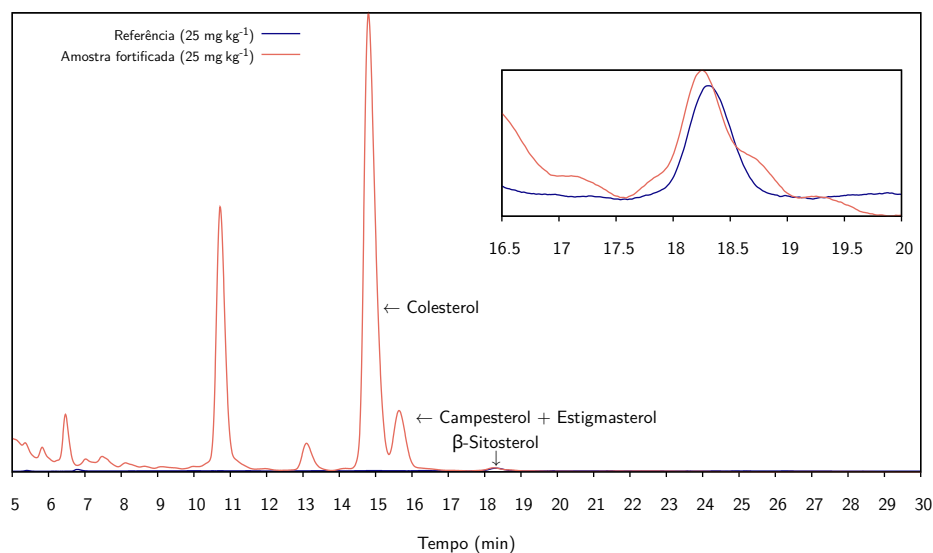
### 2.12.6 Procedimento de análise

- (a) Em tubo falcon de 50 mL, pesar ( $1,0 \pm 0,1$ ) g de gordura;
- (b) Adicionar ao tubo 15 mL de solução metanólica de KOH a 5%, fechando-o em seguida;
- (c) Levar o tubo ao banho-maria a aproximadamente 90 °C, agitando inicialmente para completa dissolução da gordura;
- (d) Manter sob aquecimento por 45 min após a dissolução da gordura;
- (e) Esfriar, adicionar 15 mL de água e duas gotas de solução de Vermelho Congo;
- (f) Adicionar ao tubo 10 mL de uma solução 1:1 de éter etílico:éter de petróleo;
- (g) Agitar por aproximadamente 1 min em mesa agitadora ou agitador vortex;
- (h) Centrifugar por 2 min a no mínimo 100 *g* para separação das fases;
- (i) Recolher, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, a fase orgânica superior em béquer ou erlenmeyer de 50 mL;
- (j) Repetir a extração (itens f a i) por duas vezes mais, recolhendo a fase orgânica em um mesmo recipiente;
- (k) Evaporar o solvente orgânico em banho-maria a 65 °C;
- (l) Dissolver a matéria insaponificável obtida em 300 µL de clorofórmio + 500 µL de metanol;
- (m) Filtrar para vial utilizando seringa e filtro de membrana de 0,45 µm;
- (n) Injetar a amostra no sistema cromatográfico nas seguintes condições: volume de injeção de 25 µL, fluxo da fase móvel de 1,2 mL min<sup>-1</sup>;
- (o) Em um vial, adicionar 100 µL da solução de referência de β-sitosterol a 200 mg L<sup>-1</sup> e 900 µL de metanol. Injetar no sistema cromatográfico para determinação do tempo de retenção do analito.

Caso seja utilizado um evaporador rotativo, as frações orgânicas poderão ser recolhidas em balão de fundo redondo ou similar. São permitidas alterações no fluxo e tamanho da coluna cromatográfica, desde que mantida a efetiva separação entre o pico do β-sitosterol e demais componentes da matéria insaponificável.

### 2.12.7 Verificação de desempenho

Deve-se comprovar a capacidade de obter-se um limite de detecção de  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\beta$ -sitosterol por meio da análise de 1 g de gordura láctea adicionada de  $125 \mu\text{L}$  da solução de referência de  $\beta$ -sitosterol a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Figura 1:** Cromatogramas do padrão de referência e de uma amostra fortificada no limite de detecção.

### 2.12.8 Expressão dos resultados

Integrar o cromatograma da amostra, determinando a altura do pico em relação à linha de base. Reportar resultado “positivo” se o pico cromatográfico na amostra possuir altura superior ao observado na solução de referência de  $\beta$ -sitosterol a  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Em caso diverso, reportar “negativo”.

### 2.12.9 Bibliografia

India. *Order dated 25th March 2019 related to Method for detection of adulteration in ghee (clarified milk fat) with vegetables oils*. Method for Determination of adulteration of Vegetable Oil in Ghee by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). New Delhi: Food Safety and Standards Authority of India, 25 de mar. de 2019. 3 pp.

## 2.13 Detecção de formaldeído

Utilizar o método B da norma AOAC 931.08. Reportar “positivo” caso seja detectada a presença de formaldeído na amostra e “negativo” em caso contrário.

## 2.14 Detecção de peróxido de hidrogênio

### 2.14.1 Princípio

A peroxidase, ao hidrolisar o peróxido de hidrogênio, libera oxigênio, o qual transformará o guaiacol da sua forma leuco para a forma corada.

### 2.14.2 Campo de aplicação

Este método é aplicável a leite fluido.

### 2.14.3 Materiais e equipamentos

- Banho-maria;
- Pipetas de 2 e 10 mL;
- Tubo de ensaio.

### 2.14.4 Reagentes e soluções

- Leite cru;
- Solução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 3% (v/v);
- Solução hidroalcoólica de guaiacol ( $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$ ) a 1% (v/v):

Em bquer de 50 mL, colocar 1 mL de guaiacol, adicionar 10 mL de álcool etílico p.a. e agitar para dissolver. Transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água. Guardar em frasco âmbar.

### 2.14.5 Preparo da amostra

Homogenizar a amostra a temperatura ambiente, agitando e invertendo o recipiente ou embalagem 5 ou 6 vezes. Quando a amostra contiver grumos de creme, aquecer de 38 a 40 °C em banho-maria, esfriar até temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.

### 2.14.6 Procedimento de análise

- (a) Transferir 10 mL da amostra e 2 mL de leite cru para um tubo de ensaio, aquecer em banho-maria a 35 °C por 5 min, para ativação da enzima peroxidase;
- (b) Acrescentar 2 mL da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1% ao tubo de ensaio, pelas suas paredes;
- (c) Agitar, aguardar 5 min e observar desenvolvimento de coloração salmão no tubo de ensaio;
- (d) Efetuar teste “positivo” adicionando 5 gotas de solução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 3% (v/v) ao tubo. Caso não ocorra a formação de coloração salmão, repetir o teste utilizando outro leite cru como fonte de peroxidase.

### 2.14.7 Expressão dos resultados

Reportar “positivo” caso observe-se o desenvolvimento de coloração salmão.

## 2.14.8 Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos*. Brasília: 1981.

## 2.15 Detecção de sacarose em leite

### 2.15.1 Princípio

Fundamenta-se na reação da sacarose com a sacarose-fosforilase. A fosfoglicomutase converte a glicose-1-fostato em glicose-6-fosfato, que é oxidada pela NAD a gliconato-6-fosfato na presença de glicose-6-fosfato-desidrogenase. O NADH formado reduz um sal de tetrazólio a uma formazan de coloração azul, que se determina reflectometricamente.

### 2.15.2 Campo de aplicação

Este método é aplicável a amostras de leite fluido e leite em pó.

### 2.15.3 Materiais e equipamentos

- Balança semi-analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Equipamento automatizado para medidas reflectométricas (Reflectoquant Merck ou equivalente);
- Outros materiais necessários para executar o procedimento descrito nas instruções específicas do fabricante do equipamento utilizado.

### 2.15.4 Reagentes e soluções

- Reagentes específicos para análise de sacarose em leite no equipamento utilizado, de acordo com as especificações do fabricante. Os reagentes utilizados devem apresentar limite de detecção para sacarose em leite fluido não superior a 0,025 % (m/v) e não devem apresentar interferência pela presença de glicose, frutose, citratos e fosfatos para a análise de leite fluido. O limite de detecção e a seletividade dos reagentes utilizados devem ser avaliados e registrados pelo laboratório;
- Sacarose de pureza conhecida;
- Matriz branca de leite fluido ou em pó.

### 2.15.5 Preparo da amostra

- (a) Preparo de amostras congeladas:

Descongelar a amostra de leite até a temperatura ambiente colocando-a em refrigerador no dia anterior da análise ou utilizando banho-maria entre 30 e 32 °C. Homogenizar a amostra, agitando e invertendo o recipiente ou embalagem 5 ou



6 vezes. Quando a amostra contiver grumos de creme, aquecer de 38 a 40 °C em banho-maria, esfriar até temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.

(b) Preparo de amostras a partir de leite em pó:

Pesar 10,0 g de leite em pó desnatado ou 13,0 g de leite em pó integral, acrescentar 100 mL de água com auxílio de uma pipeta volumétrica e agitar até a completa dissolução. Para leite parcialmente desnatado ou semidesnatado, verificar a forma de reconstituição de acordo com o fabricante.

### 2.15.6 Procedimento

Calibrar o equipamento conforme orientação do fabricante. Se for necessário clarificar a amostra antes da leitura da reflectância, deve-se garantir que o limite de detecção não seja alterado, isto é, mesmo que seja necessário o procedimento de clarificação da amostra, os reagentes utilizados devem ser capazes de detectar a presença de sacarose em leite fluido com concentração de 0,025 % (m/v).

Proceder à execução do procedimento de análise conforme as instruções do fabricante.

A cada batelada de amostras, realizar a análise de uma amostra branca, cujo resultado deve ser negativo, e de uma amostra fortificada com sacarose na concentração de 0,025 % (m/v), cujo resultado deve ser positivo.

### 2.15.7 Expressão dos resultados

Se o resultado direto da medição no equipamento for menor que o limite de detecção, expressar o resultado como “Não detectado”. Se o resultado direto da medição for maior que o limite de detecção, expressar o resultado como “Detectado”.

### 2.15.8 Bibliografia

Manual do kit Sucrose (Saccharose) – Merck 116141

## 2.16 Determinação de conservantes por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

### 2.16.1 Princípio

O método se baseia na extração sólido-líquido com partição dos analitos em baixa temperatura, utilizando mistura de solventes orgânicos com baixa proporção de água e acidificados com ácido acético. A separação dos analitos é realizada através da cromatografia líquida em fase reversa utilizando fase estacionária cianopropil. A quantificação é realizada por espectrometria de massas, utilizando fonte de ionização por *electrospray*. O escopo do método abrange os analitos: ácido benzoico (BEN), ácido sórbico (SOR), natamicina (NAT) e nisina (NIS).

### 2.16.2 Campo de aplicação

Produtos lácteos (bebidas lácteas, creme de leite, doce de leite e similares, leite condensado, leites fermentados, manteiga, margarina, nata, queijos, ricota, requeijão e sobremesas lácteas).

### 2.16.3 Materiais e equipamentos

- Agitador de tubos tipo vortex;
- Agitador orbital;
- Balança analítica;
- Balões volumétricos de 10 mL;
- Banho de ultrassom;
- Centrífuga refrigerada para tubos de 15 e 50 mL;
- Centrífuga refrigerada para microtubos;
- Coluna para cromatografia líquida com fase estacionária di-isopropil-3-cianopropil silano ligado à sílica hidroxilada, com partículas de diâmetro nominal de no mínimo 3,5  $\mu\text{m}$  (Zorbax-Agilent SB-CN, ou similar);
- Dispensador automático (volume mínimo 10 mL);
- Homogeneizador/disruptor de amostras (Ultra Turrax ou similar);
- Micropipetadores e ponteiros para volumes de 2-20  $\mu\text{L}$ ; 10-100  $\mu\text{L}$ ; 100-1000  $\mu\text{L}$  e 5000-10 000  $\mu\text{L}$ ;
- Microtubos de polipropileno, com capacidade para 1,5 mL;
- Provetas de 250 e 500 mL;
- Sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas em modo tandem, com fonte de ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS);
- Tubos de polipropileno, com capacidade para 15 e 50 mL (tipo falcon);
- Vials de borossilicato para HPLC com capacidade de 1,5 mL.

### 2.16.4 Reagentes e soluções

- Solução extratora de metanol:água (9:1 v/v) acidificada com 0,1% ácido acético.
- Fase móvel A (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%).
- Fase móvel B (solução de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico).
- Fase móvel de diluição (fase móvel A:fase móvel B 95:5 v/v).

- Soluções-estoque de conservantes: NIS 1000 mg L<sup>-1</sup>, preparada em água:acetonitrila (50:50 v/v), acidificada com ácido fórmico em 0,1%; BEN (10 000 mg L<sup>-1</sup>), preparada em metanol com baixa proporção de água para dissolução; SOR (1000 mg L<sup>-1</sup>), SOR (10 000 mg L<sup>-1</sup>), NAT (100 mg L<sup>-1</sup>) e NAT (1000 mg L<sup>-1</sup>), todos preparados em metanol.
- n-Hexano

Obs.: Os solventes orgânicos devem ser de grau LC-MS e a água deve ser de grau ultrapuro. Utilizar banho de ultrassom para dissolução dos padrões.

### 2.16.5 Preparo da amostra

As amostras de produtos nos quais é autorizado o uso da natamicina devem ser preparadas em duas porções, uma contendo somente a superfície do produto (não ultrapassar 2 mm) e outra contendo a porção interna. As demais amostras devem ser processadas homogeneizando todo o conteúdo. Para isso, utilizar um processador de alimentos e/ou ralador até a obtenção de um conteúdo homogêneo.

### 2.16.6 Procedimento de análise

#### 2.16.6.1 *Queijos, ricota, requeijão, queijo fundido, bebidas lácteas, leites fermentados, creme de leite e nata*

- Utilizando balança analítica, pesar ( $2,0 \pm 0,1$ ) g de amostra em tubos de polipropileno de capacidade 50 mL.
- Adicionar 10 mL de solução de extração aos tubos com amostra.
- Homogeneizar o conteúdo de cada tubo por volta de cinco segundos no homogeneizador/disruptor.
- Agitar em mesa agitadora orbital durante 20 min.
- Centrifugar por 10 min à rotação de 3488 *g*, sob refrigeração.
- Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade e levar ao freezer (à temperatura inferior a  $-18^{\circ}\text{C}$ ) por no mínimo 1 h.
- Centrifugar novamente por 10 min à rotação de 3488 *g*, sob refrigeração.
- Transferir uma alíquota ( $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante do extrato para microtubos de polipropileno de capacidade de 1,5 mL, aplicando-se um fator de diluição de acordo com a sensibilidade do sistema LC-ESI-MS/MS com fase móvel de diluição. Homogeneizar e centrifugar a 13.000 *g*, sob refrigeração. Por fim, transferir o sobrenadante límpido para vials e injetar no sistema LC-ESI-MS/MS.
- Preparar uma curva analítica em matriz, pesando-se ( $2,0 \pm 0,1$ ) g “branca” para cada ponto. Estabelecer um gradiente de concentração de acordo com as faixas de trabalho: BEN, 25 a 200 mg kg<sup>-1</sup>; NAT, 1,25 a 10,0 mg kg<sup>-1</sup>; SOR, 2,5 a 20,0 mg kg<sup>-1</sup> e NIS, 3,13 a 25 mg kg<sup>-1</sup>. Para isso, adicionar volumes crescentes de 50, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{L}$  de cada solução-mix de fortificação e completar o

volume com solução de extração q.s.p. 10 mL. Amostras, brancos analíticos, curvas analíticas e demais controles devem estar sujeitos aos mesmos procedimentos analíticos descritos.

#### **2.16.6.2 Manteiga e margarina**

- (a) Utilizando balança analítica, pesar ( $2,0 \pm 0,1$ ) g de amostra em tubos de polipropileno de capacidade 50 mL.
- (b) Adicionar 10 mL de solução de extração aos tubos com amostra.
- (c) Adicionar 2 mL de n-hexano aos tubos.
- (d) Agitar cada tubo até dissolver a amostra, utilizando o agitador de tubos (vórtex).
- (e) Agitar em mesa agitadora orbital durante 20 min.
- (f) Centrifugar por 10 min à rotação de 3488 *g*, sob refrigeração.
- (g) Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade e levar ao freezer (à temperatura inferior a  $-18^{\circ}\text{C}$ ) por no mínimo 1 h.
- (h) Centrifugar novamente por 10 min à rotação de 3488 *g*, sob refrigeração.
- (i) Transferir uma alíquota ( $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante do extrato para microtubos de polipropileno de capacidade de 1,5 mL, aplicando-se um fator de diluição de acordo com a sensibilidade do sistema LC-ESI-MS/MS com fase móvel de diluição. Homogeneizar e centrifugar a 13.000 *g*, sob refrigeração. Por fim, transferir o sobrenadante límpido para vials e injetar no sistema LC-ESI-MS/MS.
- (j) Preparar uma curva analítica em matriz, pesando-se ( $2,0 \pm 0,1$ ) g de amostra “branca” para cada ponto. Estabelecer um gradiente de concentração de acordo com as faixas de trabalho: BEN, 25 a 200  $\text{mg kg}^{-1}$ ; NAT, 1,25 a 10,0  $\text{mg kg}^{-1}$ ; SOR, 2,5 a 20,0  $\text{mg kg}^{-1}$  e NIS, 3,13 a 25  $\text{mg kg}^{-1}$ . Para isso, adicionar volumes crescentes de 50, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{L}$  de cada solução-mix de fortificação e completar o volume com solução de extração q.s.p. 10 mL. Amostras, brancos analíticos, curvas analíticas e demais controles devem estar sujeitos aos mesmos procedimentos analíticos descritos.

#### **2.16.6.3 Doce de leite, sobremesas lácteas e leite condensado**

- (a) Utilizando balança analítica, pesar ( $2,0 \pm 0,1$ ) g de amostra em tubos de polipropileno de capacidade 50 mL.
- (b) Adicionar 5 mL de solução de extração aos tubos com amostra.
- (c) Agitar cada tubo até dissolver a amostra, utilizando o agitador de tubos (vórtex).
- (d) Agitar em mesa agitadora orbital durante 20 min.
- (e) Centrifugar por 10 min à rotação de 3488 *g*, sob refrigeração.
- (f) Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade e levar ao freezer (à temperatura inferior a  $-18^{\circ}\text{C}$ ) por no mínimo 1 h.

- (g) Centrifugar novamente por 10 min à rotação de 3488 *g*, sob refrigeração.
- (h) Transferir uma alíquota ( $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante do extrato para microtubos de polipropileno de capacidade de 1,5 mL, aplicando-se um fator de diluição de acordo com a sensibilidade do sistema LC-ESI-MS/MS com fase móvel de diluição. Homogeneizar e centrifugar a 13.000 *g*, sob refrigeração. Por fim, transferir o sobrenadante límpido para vials e injetar no sistema LC-ESI-MS/MS.
- (i) Preparar uma curva analítica em matriz, pesando-se ( $2,0 \pm 0,1$ ) g de amostra “branca” para cada ponto. Estabelecer um gradiente de concentração de acordo com as faixas de trabalho: BEN, 25 a 200  $\text{mg kg}^{-1}$ ; NAT, 1,25 a 10,0  $\text{mg kg}^{-1}$ ; SOR, 2,5 a 20,0  $\text{mg kg}^{-1}$  e NIS, 3,13 a 25  $\text{mg kg}^{-1}$ . Para isso, adicionar volumes crescentes de 30, 60, 120, 180 e 240  $\mu\text{L}$  de solução de fortificação SOR 10 000  $\text{mg kg}^{-1}$  e 25, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{L}$  de solução de fortificação NAT 100  $\text{mg kg}^{-1}$  e completar o volume com solução de extração q.s.p. 10 mL. Amostras, brancos analíticos, curvas analíticas e demais controles devem estar sujeitos aos mesmos procedimentos analíticos descritos.

#### 2.16.6.4 Parâmetros instrumentais sugeridos

- (a) Cromatográficos:
- temperatura do forno de coluna: 35 °C;
  - volume de injeção: 10  $\mu\text{L}$ ;
  - fluxo da fase móvel: 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ;
  - gradiente de eluição: 0 min, 95% A; 2 min, 95% A; 4 min, 15% A, 7 min, 10% A; 8 min, 95% A; com mínimo de 4 min para auto equilíbrio do sistema.
- (b) Parâmetros de monitoramento múltiplo de reação e fonte de ionização por *electrospray*:

Analitos (sigla)	Íon Precursor (ESI) $m/z$	Transição de quantificação $m/z$ (EC, V)	Transição de confirmação $m/z$ (EC, V)	DP(V)
Ácido sórbico (SOR)	112,9 (+)	67,0 (19)	65,0 (25)	56
Ácido benzoico (BEN)	122,9 (+)	79,0 (17)	51,0 (51)	36
Nisina (NIS)	672,1 (5+)	811,3 (23)	649,3 (23)	56
Natamicina (NAT)	666,2 (+)	503,2 (17)	485,2 (21)	56

#### 2.16.7 Expressão dos resultados

A identificação de cada espécie química é feita pelo tempo de retenção (min) e o perfil de fragmentação molecular, através da razão iônica que deve ser de no mínimo 20% entre as transições (quantificação/confirmação). A quantificação é realizada por relação funcional linear das concentrações (eixo x) dos analitos *versus* áreas dos picos (eixo y). Expressar o resultado da amostra em “mg/kg” com máximo de quatro algarismos significativos. Para os analitos ácido benzoico e de ácido sórbico, expressar os resultados conforme os itens 2.3 e 2.4.

## 2.16.8 Bibliografia

Luciano Molognoni, Leandro Antunes de Sá Ploêncio, Andressa Camargo Valese, Juliano De Dea Lindner, Heitor Daguer. *A simple and fast method for the inspection of preservatives in cheeses and cream by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. Talanta, vol. 147, p. 370-382, 2016.

Luciano Molognoni, Andressa Camargo Valese, Angélica Lorenzetti, Heitor Daguer, Juliano de Dea Lindner. *Development of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of sorbic acid, natamycin and tylosin in Dulce de leche*. Food Chemistry, vol. 211, p. 741-747, 2018.

Jacson N. Santos, Luciano Molognoni, Thalís A. Vieira, Andressa C. Valese, Patricia Tuzimoto, Cristhiane S. O. Cattani, Heitor Daguer. *Scope extension validation of a LC-MS method for the inspection of preservatives in butter*. Food Control, vol. 67, p. 209-215, 2016.

## 2.17 Dispersabilidade

Utilizar o método descrito na norma IDF 87, expressando o resultado como um inteiro em “g/100 g”.

## 2.18 Etanol em leites fermentados

Com o auxílio do método descrito na norma AOAC 983.12, determinar o teor de etanol na amostra, expressando o resultado em “% (v/m)” com uma casa decimal.

Poderão ser utilizados equipamentos automatizados de destilação para a execução do método.

## 2.19 Extrato seco desengordurado (ESD), sólidos não gordurosos (SNG)

### 2.19.1 Leite fluido, leite condensado e leite em pó

Determinar, de acordo com o método apropriado, o teor de gordura e extrato seco total (EST) na amostra. Subtrair o teor de gordura da amostra do valor de extrato seco total, ambos expressos na mesma unidade de medida, reportando o valor encontrado com uma casa decimal. O extrato seco total de leite em pó é obtido a partir do teor de umidade.

### 2.19.2 Manteiga

Utilizar o método descrito nas normas IDF 80-2 ou IDF 191-2 para obtenção do teor de sólidos não gordurosos (chamado de “teor de insolúveis no éter etílico” para manteiga comum), expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais ou uma casa decimal, de acordo com o método utilizado.

Em amostras de manteiga adicionada de cristais de sal, realizar o ensaio em triplicata.

## 2.20 Extrato seco total (EST)/Sólidos totais

### 2.20.1 Concentrado proteico

Utilizar o método descrito na norma IDF 58 para obtenção do extrato seco total (EST), expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.20.2 Leite e soro de leite

Utilizar o método descrito na norma IDF 21 para obtenção do extrato seco total (EST)/sólidos totais, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.20.3 Leite condensado

Utilizar o método descrito na norma IDF 15 para obtenção do extrato seco total (EST). Determinar o teor de açúcares de acordo com os métodos descritos neste Manual. Subtrair do EST o teor de açúcares (exceto lactose) e reportar o resultado obtido como “Extrato seco total de origem láctea”, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

### 2.20.4 Sobrementsa láctea

Utilizar o método descrito na norma IDF 15 para obtenção do extrato seco total (EST), expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

## 2.21 Fosfatase alcalina

### 2.21.1 Princípio

A verificação da atividade enzimática é feita mediante a adição à amostra do substrato específico da enzima em condições ideais para sua atuação. A presença do indicador permite identificar a atividade enzimática pela reação colorimétrica com os produtos de degradação.

### 2.21.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a leite pasteurizado.

### 2.21.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com precisão mínima de 0,001 g;
- Banho-maria;
- Pipeta graduada de 5 mL;

- Tubo de ensaio com tampa.

Obs.: Os tubos de ensaio devem encontrar-se perfeitamente limpos e sem qualquer vestígio de detergentes, em decorrência do processo de lavagem do material.

### 2.21.4 Reagentes e soluções

- (a) Catalisador:

Dissolver 0,2 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) p.a. em 100 mL de água Tipo I.

- (b) Solução reagente:

Pesar 0,150 g de 2,6-dicloroquinona cloroimida ( $\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_3\text{NO}$ ) ou dibromoquinona bromoimida ( $\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_3\text{NO}$ ), dissolver em 50 mL de álcool etílico p.a., transferir para frasco âmbar e estocar em geladeira. A coloração da solução recentemente preparada é amarelo-citrina, passando a amarelo ouro e tendendo a escurecer, adquirindo tons amarronzados com o envelhecimento. Recomenda-se usar a solução por um período máximo de duas semanas, desde que conservada sob refrigeração e ao abrigo da luz.

- (c) Substrato:

Pesar 0,5 g de fenilfosfato dissódico dihidratado ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) p.a. em um béquer, dissolver com o tampão diluído, transferir para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com o tampão diluído. Recomenda-se usar esta solução durante um período máximo de duas semanas.

- (d) Tampão carbonato:

Pesar 46,89 g de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) p.a. e 37,17 g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) p.a., dissolver e levar ao volume de 1000 mL (solução estoque). Retirar uma alíquota de 25 mL da solução estoque, transferir para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume. O pH deste tampão diluído deverá situar-se entre 9,5 e 9,7.

### 2.21.5 Preparo da amostra

Homogenizar a amostra a temperatura ambiente, agitando e invertendo o recipiente ou embalagem 5 ou 6 vezes. Quando a amostra contiver grumos de creme, aquecer de 38 a 40 °C em banho-maria, esfriar até temperatura ambiente agitando ocasionalmente. A retirada de uma alíquota da amostra a partir da sua camada superior poderá levar a um resultado positivo ou suspeito, ainda que o leite tenha sido adequadamente pasteurizado. A fosfatase alcalina encontra-se adsorvida aos glóbulos de gordura.

### 2.21.6 Procedimento de análise

- (a) Transferir 0,5 mL da amostra a analisar para um tubo de ensaio, adicionar 5 mL do substrato, tampar com rolha de borracha, agitar ligeiramente e levar ao banho-maria mantido entre 39 e 41 °C durante 20 min;



- (b) Esfriar o tubo de ensaio em água corrente, adicionar 6 gotas de solução reagente e 2 gotas do catalisador;
- (c) Levar o tubo novamente ao banho-maria entre 39 e 41 °C por 5 min;
- (d) Repetir o mesmo procedimento acima descrito, usando, em lugar da amostra e em diferentes tubos, 0,5 mL de leite cru e 0,5 mL de leite fervido;
- (e) Observar a coloração formada.

As provas positivas devem ser repetidas cuidadosamente. A fosfatase alcalina poderá sofrer reativação após algum tempo de pasteurização do leite. Não é comum encontrar esse tipo de interferência, mas o analista deverá ter em conta a vida de prateleira do produto ao ser analisado, principalmente se o teste for conduzido depois de 24 h de o leite ter sido processado.

### 2.21.7 Expressão dos resultados

Reportar positivo caso observe-se o surgimento de coloração azul intensa no tubo contendo a amostra. O tubo contendo leite cru deve apresentar coloração azul intensa. Reportar negativo caso observe-se uma coloração cinza, equivalente à presente no tubo contendo leite fervido. A tonalidade do azul vai ficando tanto mais intensa, quanto maior for a deficiência de pasteurização.

### 2.21.8 Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos*. Brasília: 1981.

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, *Official Method 965.26*. 20 ed. Rockville: 2016.

## 2.22 Gordura, matéria gorda, matéria gorda no extrato seco, lipídeos totais

### 2.22.1 Bebida láctea e leites fermentados

Utilizar o método descrito na norma IDF 1 para obtenção do teor de matéria gorda, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.22.2 Caseínas e caseinatos

Utilizar o método descrito na norma IDF 127 para obtenção do teor de matéria gorda, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.22.3 Creme de leite e nata

Utilizar o método descrito na norma IDF 16 para obtenção do teor de matéria gorda, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.22.4 Doce de leite e leite condensado

Utilizar o método descrito na norma IDF 13 para obtenção do teor de matéria gorda, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.22.5 Leite fluido

Utilizar o método descrito na norma IDF 1 para obtenção do teor de gordura, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais. Se for necessário expressar o valor em “g/100 mL”, utilizar o valor de densidade a 15 °C para a devida conversão.

Opcionalmente, exceto para leites desnatados, utilizar o método descrito na norma NMKL 40 para obtenção do teor de gordura, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal quando utilizado 10,75 mL de amostra e em “g/100 mL” com uma casa decimal quando utilizado 11,00 mL de amostra.

### 2.22.6 Leite em pó

Utilizar o método descrito na norma IDF 9 para obtenção do teor de matéria gorda, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.22.7 Manteiga, gordura anidra do leite (*butter oil*) e margarina

Utilizar o método descrito na norma IDF 194 para obtenção do teor de matéria gorda, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais. Para margarinas, o resultado obtido refere-se ao teor de lipídeos totais.

Em amostras de manteiga adicionada de cristais de sal, realizar o ensaio em triplicata.

### 2.22.8 Queijo, requeijão e ricota por coagulação

Utilizar o método descrito na norma IDF 5 ou na norma IDF 222 para obtenção do teor de lipídeos, convertendo o valor obtido em “matéria gorda no extrato seco” a partir da equação:

$$\text{Matéria gorda no extrato seco, em g/100 g} = \frac{100 \cdot L}{ST}$$

onde:

$L$  = Teor de lipídios (matéria gorda) na amostra, em g/100 g;

$ST$  = Teor de sólidos totais na amostra obtido por meio da norma IDF 4, em g/100 g.

Expressar o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.22.9 Ricota por concentração

Utilizar o método descrito na norma IDF 59 ou na norma IDF 222 para obtenção do teor de lipídeos, convertendo o valor obtido em “matéria gorda no extrato seco” a partir da equação:

$$\text{Matéria gorda no extrato seco, em g/100 g} = \frac{100 \cdot L}{ST}$$

onde:

$L$  = Teor de lipídios (matéria gorda) na amostra, em g/100 g;

$ST$  = Teor de sólidos totais na amostra obtido por meio da norma IDF 58, em g/100 g.

Expressar o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

## 2.23 Índice crioscópico

Utilizar o método descrito na norma IDF 108 para obtenção do parâmetro depressão do ponto de congelamento, expressando o resultado obtido em “°C” com três casas decimais.

Caso o instrumento utilizado opere apenas em °H, utilizar para conversão entre as unidades a relação:  $T(^{\circ}\text{C}) = 0,9656 \cdot T(^{\circ}\text{H})$ .

## 2.24 Índice de CMP

### 2.24.1 Princípio

Este método baseia-se na detecção e quantificação de caseínomacropéptídeos (CMP) provenientes da ação proteolítica de enzimas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com separação em coluna de filtração em gel e detecção em ultravioleta (UV).

### 2.24.2 Campo de aplicação

Leite fluido e leite em pó.

### 2.24.3 Materiais e equipamentos

- Agitador magnético;
- Balança analítica com resolução mínima de 0,0001 g;
- Balões volumétricos;
- Banho-maria;
- Béqueres;
- Coluna cromatográfica hidrofílica para separação de macromoléculas por filtração em gel com as seguintes características: partículas de sílica esféricas com diâmetro nominal de 4 a 4,5  $\mu\text{m}$ , superfície modificada estabilizada com zircônio, diâmetro do poro 150 Å, área superficial 140  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ , camada hidrofílica mono molecular tipo diol, coluna com 4,6 mm ou 9,4 mm de diâmetro e 250 mm de comprimento;
- Funil de vidro;
- Micropipeta;
- Pipetas volumétricas;
- Papel de filtro qualitativo;

- Sistema cromatográfico, equipado com detector UV a 205 ou 210 nm, volume de injeção de 20 ou 30  $\mu\text{L}$  e com fluxo da fase móvel de 0,5 a 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ .

#### 2.24.4 Reagentes e soluções

- Caseínomacropeptídeo de pureza conhecida ou amostra de referência com teor de CMP certificado;
- Fase móvel tampão fosfato pH 6,0:

Dissolver 1,74 g de hidrogenofosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 12,37 g de dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 21,41 g de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) em aproximadamente 700 mL de água. Para a utilização de reagentes com molécula de hidratação, fazer as correções nas massas utilizadas. Ajustar o pH da solução para 6,0 usando solução de ácido fosfórico a  $3 \text{ mol L}^{-1}$  e solução de hidróxido de potássio a  $3 \text{ mol L}^{-1}$ . Transferir para balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume e filtrar a solução em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Antes do uso, desgaseificar.

- Amostra branca de leite fluido ou leite desidratado para a análise de leite fluido ou leite em pó.

As amostras brancas devem ser preparadas conforme descrito na Seção 2.24.5. Considera-se uma amostra branca aquela com Índice de CMP inferior a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ;

- Solução de ácido tricloroacético (TCA,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) a 24%. Preparar no dia de uso ou a partir de uma solução estoque de ácido tricloroacético a 48%.

#### 2.24.5 Preparo da amostra

- (a) Preparo de amostras congeladas:

Descongelar a amostra de leite até a temperatura ambiente colocando-a em refrigerador no dia anterior da análise ou utilizando banho-maria entre 30 e 32 °C. Homogenizar a amostra, agitando e invertendo o recipiente ou embalagem 5 ou 6 vezes. Quando a amostra contiver grumos de creme, aquecer de 38 a 40 °C em banho-maria, esfriar até temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.

- (b) Preparo de amostras de leite em pó:

Pesar 10,0 g de leite em pó desnatado ou 13,0 g de leite em pó integral, acrescentar 100 mL de água com auxílio de uma pipeta volumétrica e agitar até a completa dissolução. Para leite parcialmente desnatado ou semidesnatado, verificar a forma de reconstituição de acordo com o fabricante.

#### 2.24.6 Procedimento de análise

- (a) Na ausência de amostras com teor certificado de CMP, preparar cinco soluções padrão de CMP contemplando, no mínimo, um ponto abaixo de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  e um ponto acima de  $75 \text{ mg L}^{-1}$  por adição do padrão de CMP à amostra branca;
- (b) A uma alíquota de 20 mL das amostras preparadas e de cada solução padrão, adicionar 10 mL de ácido tricloroacético a 24% lentamente e sob agitação constante;

- (c) Deixar em repouso por 60 min à temperatura ambiente e filtrar em papel qualitativo, descartando as primeiras gotas do filtrado. Caso obtenha-se filtrados turvos, filtrar em unidade filtrante com 0,45 µm antes da injeção;
- (d) Injetar cada solução no sistema cromatográfico, monitorando a 205 ou 210 nm.

Devido à degradação do CMP em solução a 8% de TCA (0,2%/h a 30 °C), deverão ser preparadas curvas de calibração a cada batelada de análises.

Obs.: As amostras de referência com teor de CMP certificado utilizadas para a confecção da curva de calibração deverão ser preparadas conforme instruções do fornecedor. Na ausência destas, utilizar os procedimentos descritos na Seção 2.24.5.

### 2.24.7 Cálculo e expressão dos resultados

Utilizando o método dos mínimos quadrados, obter, a partir dos cromatogramas dos padrões, uma curva de calibração usando a concentração de CMP em miligramas por litro *versus* a área do pico cromatográfico. Aceitar a curva para valores de R maiores que 0,95.

Identificar no cromatograma da amostra o pico com o mesmo tempo de retenção dos padrões de CMP e calcular a concentração do analito em miligramas por litro utilizando a equação da curva de calibração.

Expressar o resultado da amostra em “mg/L” como um número inteiro.

### 2.24.8 Bibliografia

Kees Olieman e J. W. van den Bedem. *A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder*. Netherlands Milk and Dairy Journal, vol. 37, p. 27-36, 1983.

Kees Olieman e Jan A. M. van Riel. *Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed phase HPLC*. Netherlands Milk and Dairy Journal, vol. 43, p. 171-184, 1989.

Tarso da Costa Alvim. *Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho - filtração gélida (GF-HPLC)*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa: 1992.

## 2.25 Índice de CMP em leite condensado

### 2.25.1 Princípio

Este método baseia-se na detecção e quantificação de caseínomacropeptídeos (CMP) provenientes da ação proteolítica de enzimas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com separação em coluna de filtração em gel e detecção em ultravioleta (UV).

### 2.25.2 Campo de aplicação

Leite condensado.

### 2.25.3 Materiais e equipamentos

- Agitador magnético;
- Balança analítica com resolução mínima de 0,0001 g;
- Balões volumétricos;
- Banho-maria;
- Béqueres;
- Coluna cromatográfica hidrofílica para separação de macromoléculas por filtração em gel com as seguintes características: partículas de sílica esféricas com diâmetro nominal de 4 a 4,5  $\mu\text{m}$ , superfície modificada estabilizada com zircônio, diâmetro do poro 150 Å, área superficial 140  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ , camada hidrofílica mono molecular tipo diol, coluna com 4,6 mm ou 9,4 mm de diâmetro e 250 mm de comprimento;
- Funil de vidro;
- Micropipeta;
- Pipetas volumétricas;
- Papel de filtro qualitativo;
- Sistema cromatográfico, equipado com detector UV a 205 ou 210 nm, volume de injeção de 20 ou 30  $\mu\text{L}$  e com fluxo da fase móvel de 0,5 a 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ .

### 2.25.4 Reagentes e soluções

- Solução padrão de Caseínomacropeptídeo a 2  $\text{g L}^{-1}$ ;  
Pesar, diretamente em balão volumétrico de 50 mL, 0,100 g de caseínomacropeptídeo, corrigido pela pureza do reagente. Adicionar aproximadamente 10 mL de água Tipo I, dissolver e completar o volume. Esta solução pode ser armazenada sob refrigeração por um período máximo de 30 dias.
- Fase móvel tampão fosfato pH 6,0:  
Dissolver 1,74 g de hidrogenofosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 12,37 g de dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 21,41 g de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) em aproximadamente 700 mL de água. Para a utilização de reagentes com molécula de hidratação, fazer as correções nas massas utilizadas. Ajustar o pH da solução para 6,0 usando solução de ácido fosfórico a 3  $\text{mol L}^{-1}$  e solução de hidróxido de potássio a 3  $\text{mol L}^{-1}$ . Transferir para balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume e filtrar a solução em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Antes do uso, desgaseificar.
- Solução de ácido tricloroacético (TCA,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) a 24%. Preparar no dia de uso ou a partir de uma solução estoque de ácido tricloroacético a 48%.

### 2.25.5 Preparo da amostra

- (a) Leite condensado desnatado:

Reconstituir a amostra utilizando uma parte de leite condensado para 1,73 partes de água, em massa.

- (b) Leite condensado de alto teor de gordura, integral e semidesnatado:

Reconstituir a amostra utilizando uma parte de leite condensado para 1,38 partes de água, em massa.

### 2.25.6 Procedimento de análise

- (a) Adicionar a quatro balões volumétricos de 25 mL, 20 mL da amostra e 0, 1, 2 e 3 mL da solução padrão de CMP. Completar para o volume com água;
- (b) Transferir 20 mL das soluções para béquer de 50 mL e adicionar 10 mL de ácido tricloroacético a 24% lentamente e sob agitação constante;
- (c) Deixar em repouso por 60 min à temperatura ambiente e filtrar em papel qualitativo, descartando as primeiras gotas do filtrado. Caso obtenha-se filtrados turvos, filtrar em unidade filtrante com 0,45 µm antes da injeção;
- (d) Injetar cada solução no sistema cromatográfico, monitorando a 205 nm ou 210 nm.

### 2.25.7 Cálculo e expressão dos resultados

Plotar, no eixo  $y$ , as áreas do pico referente ao CMP obtidas dos cromatogramas *versus* o volume do padrão adicionado (eixo  $x$ ). Calcular a inclinação ( $m$ ) e intercepção ( $b$ ) da curva. Determinar a concentração na amostra a partir da equação:

$$\text{Índice de CMP, em mg/L} = \frac{b \cdot C}{m \cdot V}$$

onde:

$b$  = Intercepção da curva;

$C$  = Concentração do padrão de CMP, em mg/L (2000 mg L<sup>-1</sup>);

$m$  = inclinação da curva;

$V$  = volume da amostra adicionado, em mL (20 mL).

Expressar o resultado da amostra em “mg/L” como um número inteiro.

### 2.25.8 Bibliografia

Kees Olieman e J. W. van den Bedem. *A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder*. Netherlands Milk and Dairy Journal, vol. 37, p. 27-36, 1983.

Kees Olieman e Jan A. M. van Riel. *Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed phase HPLC*. Netherlands Milk and Dairy Journal, vol. 43, p. 171-184, 1989.

## 2.26 Índice de peróxidos

### 2.26.1 Gordura anidra de leite (*butter oil*)

Utilizar o método descrito na norma IDF 74 para determinação do Índice de Peróxidos em “mmol de  $O_2$ /kg de gordura” na amostra, convertendo-o em “mEq de  $O_2$ /kg de gordura” por meio da seguinte relação: 1 mEq = 0,5 mmol. Expressar o resultado final com uma casa decimal.

### 2.26.2 Manteiga

Adicionar aproximadamente 20 g de amostra a um tubo de centrífuga, fundindo-a em forno estufa entre 40 e 45 °C. Separar a porção gordurosa por centrifugação e filtrar a 40-45 °C em forno estufa. O filtrado deve apresentar-se límpido e visivelmente livre de umidade e sólidos. Analisar imediatamente de acordo com a metodologia descrita na norma AOAC 965.33, expressando o resultado final em “mEq de  $O_2$ /kg de gordura” com uma casa decimal.

## 2.27 Índice de solubilidade

Utilizando o método descrito na norma IDF 129, determinar o Índice de Solubilidade utilizando temperatura de reconstituição de 24 °C. Expressar o resultado com duas casas decimais em “mL (24 °C)”.

## 2.28 Lactose

### 2.28.1 Caseinatos

Determinar o teor de lactose anidra de acordo com o método descrito na norma IDF 106, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.28.2 Leite fluido, leite em pó e creme de leite

Determinar o teor de lactose anidra de acordo com o método descrito na norma IDF 198, na norma IDF 214 (apenas leite fluido) ou no método descrito na seção 2.29, expressando o resultado obtido, com duas casas decimais, em “g/100 g” ou “g/100 mL” de acordo com a forma de apresentação do produto.

### 2.28.3 Queijo em pó e soro de leite em pó

Determinar o teor de lactose de acordo com o método descrito na norma NMKL 148 ou pelo método descrito na Seção 2.29. Reportar os teores dos açúcares quantificados em “g/100 g” com uma casa decimal.



### 2.28.4 Outros produtos lácteos

Determinar o teor de lactose anidra de acordo com o método descrito na seção 2.29, expressando o resultado obtido, com duas casas decimais, em “g/100 g” ou “g/100 mL” de acordo com a forma de apresentação do produto.

## 2.29 Lactose, glicose, frutose e sacarose por cromatografia iônica

### 2.29.1 Princípio

Os contra-íons de aminas interagem com a espécie aniônica, de forma que quanto maior o pKa da espécie, maior o tempo de retenção do composto na coluna, pois é favorecida a interação entre o analito e a fase estacionária. Existe uma hierarquia de acidez que preconiza o aumento da interação com a fase estacionária, baseada na relação do pKa e da elevação do pH, por interação com a fase móvel. Quanto maior o número de hidroxilas (-OH), carbonilas (C=O) ou heteroátomos de oxigênio (R-O-R) presentes nas cadeias de carboidratos, maior será a interação com a fase estacionária, aumentando o tempo de retenção e permitindo a separação dos sacarídeos.

### 2.29.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a leite e produtos lácteos.

### 2.29.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,01 g;
- Balões volumétricos de 25, 50, 100, 1000, 2000 mL;
- Duas colunas para carboidratos de estireno/divinilbenzeno montadas em série;
- Cromatógrafo de íons, com detector amperométrico de célula de ouro, com sistema de diálise;
- Micropipetas de 100, 1000 e 5000  $\mu\text{L}$ ;
- Tubos para cromatografia iônica.

### 2.29.4 Reagentes e soluções

- Fase móvel: solução de hidróxido de sódio (NaOH) a  $300 \text{ mmol L}^{-1}$  e acetato de sódio a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ;
- Padrão de frutose a  $2 \text{ g L}^{-1}$ ;
- Padrão de glicose a  $2 \text{ g L}^{-1}$ ;
- Padrão de lactose a  $2 \text{ g L}^{-1}$ ;
- Padrão de sacarose a  $2 \text{ g L}^{-1}$ .

### 2.29.5 Preparo da amostra

(a) Lactose em leite fluido:

Pesar uma alíquota de 0,100 g, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar para o volume. Preparar a amostra em duplicata. Para produtos isentos ou com teor reduzido de lactose, utilizar uma alíquota de 1,00 g.

(b) Sacarose em leite em pó:

Pesar 10,0 g de leite em pó desnatado ou 13,0 g de leite em pó integral, acrescentar 100 mL de água e agitar até a completa dissolução. Para leite parcialmente desnatado ou semidesnatado, verificar a forma de reconstituição de acordo com o fabricante. Aliquotar 1,0 mL, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar para o volume.

(c) Sacarose em leite fluido

Aliquotar 1,0 mL, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar para o volume.

(d) Lactose, sacarose, glicose e frutose em leite condensado:

Pesar uma alíquota de 0,5 g, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar para o volume. Após, diluir 1,0 mL em balão volumétrico de 25 mL. Preparar a amostra em duplicata.

(e) Lactose em leite em pó e soro de leite em pó

Pesar uma alíquota de 0,25 g, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar para o volume. Após, diluir 1,0 mL em balão volumétrico de 25 mL. Preparar a amostra em duplicata

Pode-se efetuar ajustes nas diluições, de modo que as leituras obtidas estejam dentro da faixa linear da curva de calibração.

### 2.29.6 Procedimento

- (a) Equilibrar o sistema cromatográfico nas seguintes condições: fluxo isocrático entre 0,3 e 0,4 mL min<sup>-1</sup>, eletrodo de trabalho de ouro (3 mm), eletrodo de referência de paládio, espaçador em 50 µm, potencial de medida em 50 mV, faixa de medida em 200 µA, duração da medida em 100 ms, duração do ciclo em 550 ms, temperatura da célula de medida em 35 °C no modo PAD, loop de injeção de 20 µL;
- (b) Preparar, em duplicata, uma curva de calibração dos açúcares por diluição das soluções padrão nas concentrações individuais de 5, 10, 30, 50, 70 e 90 mg L<sup>-1</sup>. O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) da curva de calibração deve ser superior a 0,98.
- (c) Transferir as duplicatas das amostras preparadas para vials e injetar.

A cada 15 amostras, deve-se verificar a validade da curva utilizando-se o ponto central da mesma, tolerando-se um variação de  $\pm 5\%$  nesta concentração. Caso encontre-se uma variação superior, efetuar nova calibração reinjetando a curva e o controle.

### 2.29.7 Expressão dos resultados

Os resultados são calculados a partir da equação da reta obtida na curva de calibração, calculando-se a concentração baseada na respectiva resposta.

$$\text{Frutose, ou glicose ou sacarose ou lactose, em g/100 g} = \frac{V \cdot c \cdot f}{m \cdot 10000}$$

Produtos isentos ou com baixo teor de lactose:

$$\text{Lactose, em g/100 mL} = \frac{V \cdot c \cdot f}{v \cdot 10}$$

onde:

$c$  = valor obtido da curva de concentração, em  $\text{mg L}^{-1}$ ;

$m$  = massa da amostra, em g;

$v$  = volume da amostra, em mL;

$V$  = volume do balão volumétrico utilizado no preparo da amostra;

10000 = fator de conversão de  $\text{mg kg}^{-1}$  para g/100 g.

10 = fator de conversão de  $\text{mg kg}^{-1}$  para mg/100 g.

$f$  = fator de diluição adicional, se utilizado.

Expressar o resultado obtido com duas casas decimais. Para sacarose em leite fluido e desidratado, reportar “detectado” se a concentração encontrada for superior a 0,025 g/100 mL. Em caso diverso, reportar “não detectado”.

### 2.29.8 Bibliografia

Metrohm. *Determinação de Lactose Residual em leite zero lactose*. AN-C-BR-002. Disponível em <http://www.metrohm.com>, acessada em 31/08/2016.

## 2.30 Maltodextrina

### 2.30.1 Princípio

São precipitados os interferentes e a maltodextrina (HEX5) é determinada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

### 2.30.2 Campo de aplicação

Produtos lácteos.

### 2.30.3 Materiais e equipamentos

- Agitador de tubos tipo Vortex ou similar;
- Balança analítica com resolução mínima de 0,0001 g;
- Balões volumétricos;
- Béquer de 100 mL;
- Centrífuga para Eppendorf refrigerada;

- Centrífuga refrigerada;
- Coluna de HPLC HILIC, 150 x 2,1 mm, tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ;
- Frasco Autoclavável de 250 mL;
- Homogeneizador tipo turrax;
- Micropipetas de 0,5 a 5  $\mu\text{L}$ , 10 a 100  $\mu\text{L}$  e 100 a 1000  $\mu\text{L}$ ;
- Proveta 50 mL;
- Sistema de cromatografia líquida com detecção de massas MS/MS triplo quadrupolo;
- Tubos de centrífuga de 15 e 50 mL, de polipropileno, com tampa de rosca;
- Tubos Eppendorf de 1,0 a 2,0 mL;
- Vial com capacidade de 1,5 a 2,0 mL;

#### 2.30.4 Reagentes e soluções

- Acetonitrila, grau HPLC;

- Fase Móvel A:

Adicionar 20 mL da solução de acetato de amônio 100  $\text{mmol L}^{-1}$  e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL e adicionar um pouco de água ultrapura. Adicionar 1 mL de ácido acético glacial ao balão volumétrico e completar com água para o volume.

- Fase Móvel B:

Adicionar 20 mL da solução de acetato de amônio 100  $\text{mmol L}^{-1}$  e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL e adicionar um pouco de acetonitrila. Adicionar 1 mL de ácido acético glacial ao balão volumétrico e completar com acetonitrila para o volume.

- Leite fluido isento de maltodextrinas;
- Maltodextrina dextrose equivalente (DE) 16,6-19,5;
- Solução de acetato de amônio 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , válida por 3 meses sob refrigeração;
- Solução de ácido tricloroacético 5%. Válida por 1 mês se estocada em refrigerador com temperatura inferior a 10 °C;
- Solução estoque de 100  $\text{g L}^{-1}$  de maltodextrina dextrose equivalente (DE) 16,6-19,5. Válida por 1 mês se estocada em refrigerador com temperatura inferior a 10 °C;

### 2.30.5 Preparo da amostra

- (a) Leite fluido:

Homogeneizar a amostra.

- (b) Leite em pó:

Pesar  $1,00\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$  de leite em pó desnatado ou  $1,30\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$  de leite em pó integral em tubo falcon de 50 mL. Reconstituir o leite com 10 mL de água. Para leite parcialmente desnatado ou semidesnatado, verificar a forma de reconstituição de acordo com as instruções do fabricante.

- (c) Queijo e Iogurte:

Pesar, em tubo falcon de 50 mL,  $5,00\text{ g} \pm 0,10\text{ g}$  da amostra. Diluir com 10 mL de TCA 5%.

- (d) Outros produtos lácteos:

Pesar, em em copo de béquer,  $5,00\text{ g} \pm 0,10\text{ g}$  da amostra. Diluir com 50 mL de água ultrapura morna ( $\approx 50^\circ\text{C}$ ). Deixar esfriar.

### 2.30.6 Procedimento de análise

- (a) Aliquotar 1 mL de amostra para tubos falcon de 15 mL;
- (b) Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de TCA 5% e agitar manualmente ou com vórtex;
- (c) Adicionar mais 500  $\mu\text{L}$  de TCA 5% e agitar;
- (d) Adicionar 1 mL de TCA 5% e agitar;
- (e) Centrifugar a 4000 rpm por 20 min a  $5^\circ\text{C}$ ;
- (f) Transferir, com auxílio de micropipeta, 1 mL do sobrenadante para tubo de eppendorf;
- (g) Centrifugar a 12 000 rpm por 20 min a  $0^\circ\text{C}$ ;
- (h) Transferir 900  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para os vials e analisar por LC-MS/MS. Para queijos e iogurte transferir 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do Eppendorf para os vials. Completar os vials com 500  $\mu\text{L}$  de TCA 5%. Agitar os vials e analisar por LC-MS/MS;
- (i) Analisar, por batelada, uma alíquota de 1 mL de leite fluido fortificado a  $0,25\text{ g L}^{-1}$  para verificação do limite de detecção.

Ajustar o sistema cromatográfico e detector MS-MS de acordo com as condições sugeridas nas Tabelas 2 e 3. Ajustes nestas condições visando otimizar o sinal do analito podem ser necessários.

### 2.30.7 Expressão dos resultados

Se a resposta obtida na amostra for igual ou superior à obtida na amostra fortificada a  $0,25\text{ g L}^{-1}$ , o resultado é considerado positivo para a presença de maltodextrina na amostra. Caso contrário, o resultado é considerado negativo.

**Tabela 2:** Gradiente sugerido utilizando um fluxo de 0,4 mL min<sup>-1</sup>.

Tempo, em min	A, em %	B, em %
0,0	5	95
4,0	70	30
6,5	70	30
8,0	5	95
13,0	5	95

**Tabela 3:** Parâmetros sugeridos para o detector MS-MS

<i>m/z</i> Q1	<i>m/z</i> Q3	<i>Dwell Time</i>	DP	EP	CE	CXP
851,21	527,1	200	296	10	67,000	4,000
851,21	689,1	200	296	10	67,000	6,000
851,21	509,0	200	296	10	67,000	4,000
851,21	365,0	200	296	10	79,000	4,000
851,21	671,0	200	296	10	63,000	4,000

**Nota:** CUR: 8; CAD: 30; IS: 5500; TEM: 700; GS1: 55; GS2: 55. Volume de injeção: 2 µL.

### 2.30.8 Bibliografia

Gustavo Braga Sanvido, Jerusa Simone Garcia, Yuri E. Corilo, Boniek G. Vaz, Jorge J. Zacca, Ricardo G. Cosso, Marcos N. Eberlin, e Martin G. Peter. *Fast Screening and Secure Confirmation of Milk Powder Adulteration with Maltodextrin Via Electrospray Ionization-Mass Spectrometry [ESI(+)-MS] and Selective Enzymatic Hydrolysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 58, p. 9407-9412, 2010.

## 2.31 Natamicina

Seguir o procedimento descrito nas normas IDF 140-1, IDF 140-2 ou o procedimento descrito na Seção 2.16, conforme a matriz a ser analisada. Reportar o resultado obtido na camada exterior em “mg/dm<sup>2</sup>” e na massa em “mg/kg”.

## 2.32 Nitritos e nitratos em queijos

Determinar o teor de nitritos e nitratos em “g de NaNO<sub>2</sub>/100 g” com três casas decimais, utilizando o método descrito nas normas NMKL 165, NMKL 194 ou IDF 189-1. Reportar o resultado conforme descrito abaixo:

### Nitritos

- Resultados inferiores a 0,001 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como “não detectado”;
- Resultados entre 0,001 e 0,002 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como “detectado”;
- Resultados maiores ou iguais a 0,002 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como obtidos.

### Nitratos

- Resultados inferiores a 0,001 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como “não detectado”;
- Resultados entre 0,001 e 0,003 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como “detectado”;
- Resultados maiores ou iguais a 0,003 g de  $\text{NaNO}_2$ /100 g devem ser expressos como obtidos.

Uma nova curva de calibração deve ser obtida a cada batelada de análises, independentemente do método utilizado.

## 2.33 Nisina

Seguir o procedimento descrito na norma IDF/RM 217 ou, opcionalmente, o procedimento descrito na Seção 2.16. Reportar o resultado obtido com uma casa decimal em “mg/kg”.

## 2.34 Partículas queimadas

### 2.34.1 Caseínas e caseinatos

Seguir o procedimento descrito na norma IDF 107, reportando como resultado a classificação observada, ou seja, como “Disco A”, “Disco B”, “Disco C” ou “Disco D”.

### 2.34.2 Leite em pó

Seguir o procedimento descrito no ADPI Bulletin 916, reportando como resultado a classificação observada, ou seja, como “Disco A”, “Disco B”, “Disco C” ou “Disco D”.

## 2.35 Peroxidase

### 2.35.1 Princípio

A peroxidase, ao hidrolisar o peróxido de hidrogênio, libera oxigênio, o qual transformará o guaiacol da sua forma leuco para a forma corada.

### 2.35.2 Campo de aplicação

Este método é aplicável a leite pasteurizado.

### 2.35.3 Materiais e equipamentos

- Banho-maria;
- Pipetas de 2 e 10 mL;
- Tubo de ensaio.

### 2.35.4 Reagentes e soluções

- Solução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 3% (v/v);
- Solução hidroalcoólica de guaiacol ( $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$ ) a 1% (v/v):

Em béquero de 50 mL, colocar 1 mL de guaiacol, adicionar 10 mL de álcool etílico p.a. e agitar para dissolver. Transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água. Guardar em frasco âmbar.

### 2.35.5 Preparo da amostra

Homogenizar a amostra a temperatura ambiente, agitando e invertendo o recipiente ou embalagem cinco ou seis vezes. Quando a amostra contiver grumos de creme, aquecer de 38 a 40 °C em banho-maria, esfriar até temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.

### 2.35.6 Procedimento de análise

- (a) Transferir 10 mL da amostra para um tubo de ensaio, aquecer em banho-maria a 45 °C por 5 min, para ativação da enzima;
- (b) Acrescentar 2 mL da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1% ao tubo de ensaio, pelas suas paredes;
- (c) Adicionar três gotas da solução de peróxido de hidrogênio a 3%;
- (d) Aguardar 5 min e observar desenvolvimento de um anel de coloração salmão no tubo de ensaio.

### 2.35.7 Expressão dos resultados

Reportar positivo caso observe-se o desenvolvimento de um anel de coloração salmão.

### 2.35.8 Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos*. Brasília: 1981.



## 2.36 pH

### 2.36.1 Princípio

Fundamenta-se na medida, por meio de aparelho adequado, da concentração de íons hidrogênio na amostra.

### 2.36.2 Campo de aplicação

Soro de leite, soro de leite em pó, ovos líquidos, ovos desidratados, gelatina e colágeno.

### 2.36.3 Materiais e equipamentos

- Balança com resolução mínima de 0,1 g;
- Béquer de 100 mL;
- pH-metro;
- Proveta.

### 2.36.4 Reagentes e soluções

- Soluções padrão de pH.

### 2.36.5 Preparo da amostra

- (a) Soro de leite em pó, gelatina e colágeno: preparar uma solução a 10% (m/v);
- (b) Soro de leite: homogeneizar;
- (c) Ovos líquidos: homogeneizar;
- (d) Ovos desidratados: reconstituir na proporção em massa de 1 parte do produto para 3 partes de água livre de CO<sub>2</sub>;

### 2.36.6 Procedimento de análise

- (a) Calibrar o pH-metro de acordo com as instruções do fabricante utilizando um mínimo de dois padrões abrangendo a faixa de pH a ser medida;
- (b) Efetuar a medida do pH, com correção para 20 °C.

### 2.36.7 Expressão dos resultados

Reportar o valor obtido com uma casa decimal.

### 2.36.8 Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos*. Brasília: 1981.

## 2.37 Proteína

Determinar o teor de proteína bruta na amostra de acordo com a norma IDF 20-1. Expressar o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais. Alternativamente, utilizar o método descrito na norma IDF 185.

Resultados não conformes devem ser confirmados pelo método descrito na norma IDF 20-1.

Para amostras de leite em pó e leite condensado, expressar o resultado com base no extrato seco desengordurado:

$$\text{Proteína, em g/100 g de ESD} = \frac{100 \cdot P}{ESD}$$

onde:

$P$  = Teor de proteína na amostra, em g/100 g;

$ESD$  = Teor de extrato seco desengordurado da amostra, obtido por meio dos métodos descritos neste Manual, em g/100 g.

Para amostras de caseína e concentrados proteicos, expressar o resultado em base seca:

$$\text{Proteína, em g/100 g de base seca} = \frac{100 \cdot P}{EST}$$

onde:

$P$  = Teor de proteína na amostra, em g/100 g;

$EST$  = Teor de extrato seco total da amostra, obtido por meio dos métodos descritos neste Manual, em g/100 g.

## 2.38 Substâncias redutoras voláteis (álcool etílico)

### 2.38.1 Princípio

Em meio ácido, hidroxilas ligadas a carbono primário ou secundário são oxidados pela ação do ácido crômico, com consequente redução do cromo(VI) a cromo(III), modificando a coloração da solução sulfocrômica.

### 2.38.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a leite fluido.

### 2.38.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,01 g;

- Bico de Bunsen ou placa aquecedora;
- Kitazato de 500 mL ou balão de fundo redondo com saída lateral de 500 mL;
- Pipeta graduada de 10 mL;
- Pipeta de Pasteur;
- Proveta de 100 mL;
- Rolha de borracha, para vedação da abertura superior do kitassato/balão com saída lateral;
- Tubo de ensaio 20 x 200 mm;
- Tubo de silicone ou látex de 25 cm.

#### 2.38.4 Reagentes e soluções

- Antiespumante (solução a 3%);
- Solução sulfocrômica:  
Dissolver 1,15 g de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) em 10 mL de água, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ).

#### 2.38.5 Preparo da amostra

Homogenizar a amostra a temperatura ambiente, agitando e invertendo o recipiente ou embalagem 5 ou 6 vezes. Quando a amostra contiver grumos de creme, aquecer de 38 a 40 °C em banho-maria, esfriar até temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.

#### 2.38.6 Procedimento de análise

- (a) Medir 100 mL da amostra e transferir para o kitassato ou balão de fundo redondo com saída lateral;
- (b) Adicionar 10 mL de antiespumante e misturar bem;
- (c) Transferir para um tubo de ensaio 2 mL da solução sulfocrômica e mergulhar nessa solução a extremidade da pipeta de Pasteur acoplado ao kitassato/balão por um tubo de silicone ou látex, de modo a formar um sistema fechado;
- (d) Aquecer a amostra contida no kitassato/balão, mantendo em fervura por 5 min;
- (e) Observar a coloração da solução sulfocrômica no tubo de ensaio.

#### 2.38.7 Expressão dos resultados

Reportar “positivo” se observada a mudança na coloração da solução sulfocrômica para verde e “negativo” em caso diverso.

Dado que o formaldeído é um interferente para este ensaio, não realizá-lo se a amostras obtiver resultado positivo para formaldeído.

### 2.38.8 Bibliografia

Vladimir N. Alexeyev. *Qualitative Analysis*, Editora Mir. Moscou: 1967.

## 2.39 Umectabilidade

Utilizar o método descrito na norma IDF 87, expressando o resultado como um inteiro em “s”.

## 2.40 Umidade

### 2.40.1 Caseína e caseinatos

Utilizar o método descrito na norma IDF 78, expressando o resultado em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.40.2 Doce de leite

Utilizar o método descrito na norma IDF 15 para obtenção do teor de sólidos totais na amostra. Calcular o teor de umidade:

$$\text{Umidade, em g/100 g} = 100 - ST$$

onde  $ST$  é o teor de sólidos totais. Expressar o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.40.3 Gordura anidra do leite (*butter oil*)

Utilizar o método descrito na norma IDF 23, obtendo a quantidade de água na amostra. Reportar o valor obtido como Umidade, expressando o resultado em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.40.4 Manteiga

Utilizar o método descrito nas normas IDF 80-1 ou IDF 191-1 para obtenção do teor de umidade, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais ou uma casa decimal, de acordo com o método utilizado.

### 2.40.5 Leite em pó, soro de leite em pó, concentrados proteicos em pó e queijo em pó

Utilizar o método descrito na norma IDF 26, expressando o resultado em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.40.6 Queijo, requeijão e ricota por coagulação

Utilizar o método descrito na norma IDF 4 para obtenção do teor de sólidos totais na amostra. Calcular o teor de umidade:

$$\text{Umidade, em g/100 g} = 100 - ST$$

onde  $ST$  é o teor de sólidos totais. Expressar o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

### 2.40.7 Ricota por concentração

Utilizar o método descrito na norma IDF 58 para obtenção do teor de sólidos totais na amostra. Calcular o teor de umidade:

$$\text{Umidade, em g/100 g} = 100 - ST$$

onde  $ST$  é o teor de sólidos totais. Expressar o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

## 2.41 Umidade e lipídios em leite e produtos lácteos por microondas e ressonância magnética nuclear - método de rotina

Pode-se utilizar, como método de rotina, o método descrito na norma AOAC 2008.06 para determinação dos teores de umidade e gordura no leite e produtos lácteos, à exceção de doce de leite, leite condensado e sobremesas lácteas.

Resultados não conformes devem ser confirmados por outro método descrito neste manual.

# Mel e produtos apícolas

\*\*\*

## 3.1 Preparo de amostras

Para amostras de mel, devem ser seguidos os procedimentos descritos na norma ABNT NBR 15714-1. Demais produtos devem seguir os procedimentos descritos nos métodos.

## 3.2 Acidez livre

Determinar a acidez livre utilizando o método descrito nas normas ABNT NBR 15714-6 ou AOAC 962.19, reportando o resultado obtido em “mEq/kg” com uma casa decimal.

## 3.3 Açúcares redutores

Determinar os teores de glicose e frutose pelo método AOAC 977.20, reportando como “Açúcares redutores” a soma dos valores obtidos em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 3.4 Atividade diastásica

Determinar a atividade diastásica utilizando o método descrito na norma AOAC 958.09. Reportar o resultado obtido na escala Goethe com uma casa decimal.

## 3.5 Compostos fenólicos em própolis

Determinar o teor de compostos fenólicos totais utilizando o método descrito na norma ABNT NBR 16956-6, reportando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

## 3.6 Compostos fenólicos em extrato de própolis

### 3.6.1 Princípio

Baseia-se na reação dos compostos fenólicos com o reagente de Folin-Ciocalteu e posterior quantificação espectrofotométrica a 760 nm. O teor de compostos fenólicos totais é expresso em g de ácido gálico/100 g.

### 3.6.2 Campo de aplicação

Este método é aplicável a extrato de própolis.

### 3.6.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,0001 g;
- Balões volumétricos de 10, 50 e 100 mL;
- Espectrofotômetro de absorção molecular capaz de efetuar leituras em 760 nm;
- Micropipetador de 100  $\mu\text{L}$  – 1000  $\mu\text{L}$ .

### 3.6.4 Reagentes e soluções

- Etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) P.A.;
- Reagente de Folin-Ciocalteu  $2 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 20% (m/v);
- Soluções padrão de ácido gálico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ):

Dissolver 0,250 g de ácido gálico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ) em 5 mL de etanol e diluir para 50 mL com água em balão volumétrico. Diluir, em balão volumétrico, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$ , 600  $\mu\text{L}$ , 800  $\mu\text{L}$  e 1000  $\mu\text{L}$  desta solução para 10 mL, obtendo-se soluções padrão de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $400 \text{ mg L}^{-1}$  e  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. A solução estoque é estável por até 2 semanas se estocada sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$  –  $8^\circ\text{C}$ .

### 3.6.5 Preparo da amostra

Agitar a embalagem para homogeneização da amostra.

### 3.6.6 Procedimento de análise

- (a) Em balão volumétrico de 25 mL, pesar aproximadamente 250 mg da amostra, completando para o volume com metanol.
- (b) Adicionar uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da amostra diluída e de cada uma das soluções padrão a diferentes balões volumétricos de 10 mL;
- (c) Adicionar 7 mL de água e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu;
- (d) Agitar e incubar a temperatura ambiente entre 1 e não mais que 8 min;
- (e) Adicionar 1,5 mL de solução de carbonato de sódio a 20% (m/v);
- (f) Completar o volume com água e deixar em repouso por 60 min a temperatura ambiente;

- (g) Transferir para cubeta do espectrofotômetro e efetuar leitura da amostra e das soluções padrão a 760 nm, utilizando um branco dos reagentes como referência, registrando os valores obtidos.

Analisar as amostras em duplicata, obtendo uma nova curva de calibração a cada batelada.

### 3.6.7 Cálculo e expressão dos resultados

A partir dos valores de absorvância e concentração dos padrões em  $\text{mg L}^{-1}$ , obter pelo método dos mínimos quadrados a equação da curva de calibração. A partir desta equação, obter a concentração de compostos fenólicos na amostra diluída, utilizando a equação abaixo para determinar a concentração na amostra:

$$\text{Compostos fenólicos, em g de ác. gálico/100 g} = \frac{W \cdot V_b}{m} \cdot 0,1$$

onde:

$W$  = Concentração de compostos fenólicos expressos em ácido gálico, obtido da curva de calibração;

$V_b$  = volume do balão volumétrico utilizado na diluição inicial, em mL (25 mL);

$m$  = massa da amostra, em mg;

0,1 = fator de conversão de g/kg para g/100 g.

Expressar como resultado a média da duplicata com uma casa decimal.

### 3.6.8 Bibliografia

Ricardo G. Woisky e Antonio Salatino. *Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control*. Journal of Apicultural Research. Vol. 37(2), p. 99-105, 1998.

Andrew L. Waterhouse. *Determination of Total Phenolics*, in: Current Protocols in Food Analytical Chemistry, I1.1.1-I1.1.8, Wiley, 2001.

## 3.7 Compostos flavonoides em própolis

Determinar o teor de flavonoides totais utilizando o método descrito na norma ABNT NBR 16956-4, reportando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

## 3.8 Compostos flavonoides em extrato de própolis

### 3.8.1 Princípio

Os flavonoides solubilizados em metanol podem combinar-se com o reagente cromogênico  $\text{Al}^{3+}$  para formar uma substância colorida, com absorção máxima próxima ao comprimento de onda de 425 nm.

### 3.8.2 Campo de aplicação

Este método é aplicável a extrato de própolis.



### 3.8.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,0001 g;
- Balões volumétricos de 10, 25, 50 e 100 mL;
- Espectrofotômetro de absorção molecular capaz de efetuar leituras em 425 nm;
- Micropipetador de 100  $\mu\text{L}$  – 1000  $\mu\text{L}$ .

### 3.8.4 Reagentes e soluções

- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) P.A.;
- Solução de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) a 5% em metanol;
- Solução padrão de quercetina ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ ) a 300  $\text{mg L}^{-1}$  em metanol.

### 3.8.5 Preparo da amostra

Agitar a embalagem para homogeneização da amostra.

### 3.8.6 Procedimento de análise

- (a) Em balão volumétrico de 25 mL, pesar aproximadamente 250 mg da amostra, completando para o volume com metanol.
- (b) Em balões volumétricos de 25 mL, adicionar alíquotas de 0,20 mL, 0,30 mL, 0,40 mL, 0,50 mL e 0,60 mL da solução padrão de quercetina e 2 mL da amostra diluída.
- (c) Adicionar, a cada balão, aproximadamente 15 mL de metanol e 500  $\mu\text{L}$  da solução de cloreto de alumínio a 5% em metanol,
- (d) Completar o volume com metanol, agitar e aguardar 30 min com o balão protegido da luz;
- (e) Determinar a absorbância dos padrões e da amostra em 425 nm em cubeta de caminho óptico de 1 cm utilizando como referência um branco dos reagentes.

Analisar as amostras em duplicata, obtendo uma nova curva de calibração a cada batelada.

### 3.8.7 Cálculo e expressão dos resultados

A partir dos valores de absorbância e concentração dos padrões em  $\text{mg L}^{-1}$ , obter pelo método dos mínimos quadrados a equação da curva de calibração. A partir desta equação, obter a concentração de compostos flavonoides na amostra diluída, utilizando a equação abaixo para determinar a concentração na amostra:

$$\text{Compostos flavonoides, em g de quercetina/100 g} = \frac{W \cdot V_b}{m \cdot V_a} \cdot 0,1$$

onde:

$W$  = Concentração de compostos fenólicos expressos em quercetina, obtido da curva de calibração;

$V_{bi}$  = volume do balão volumétrico utilizado na diluição inicial, em mL (25 mL);

$V_a$  = volume da alíquota adicionada ao balão da medida, em mL (2 mL);

$m$  = massa da amostra, em mg;

0,1 = fator de conversão de g/kg para g/100 g.

### 3.8.8 Bibliografia

Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT NBR 16956-4:2021 - Apicultura - Própolis - Parte 4: Determinação de flavonoides totais*. São Paulo: 2021.

## 3.9 Hidroximetilfurfural

Determinar o teor de hidroximetilfurfural (HMF) utilizando o método descrito nas normas ABNT NBR 15714-9 ou AOAC 980.23, reportando o resultado obtido em “mg de HMF/kg” com uma casa decimal.

## 3.10 Índice de acidez, ésteres e de relação

### 3.10.1 Princípio

Fundamenta-se na neutralização até o ponto de equivalência dos ácidos existentes em 1 g de cera para obtenção do Índice de Acidez. A saponificação total dos glicerídeos e ésteres e posterior titulação dos ácidos graxos resultantes fornece o Índice de Ésteres.

### 3.10.2 Campo de aplicação

Cera de abelha.

### 3.10.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Bureta de 10 mL com resolução mínima de 0,1 mL;
- Condensador de refluxo;
- Erlenmeyer de 250 mL com junta esmerilhada;
- Pipetas volumétricas de 25 e 50 mL;
- Placa aquecedora.

### 3.10.4 Reagentes e soluções

- Álcool etílico neutralizado com hidróxido de potássio (KOH) a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e fenolftaleína como indicador;
- Solução de ácido clorídrico (HCl) a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (m/v);
- Solução etanólica de hidróxido de potássio (KOH) a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.10.5 Preparo da amostra

Picar a amostra em pequenas porções e armazenar em recipiente fechado.

### 3.10.6 Procedimento de análise

- (a) Pesar cerca de 3 g de amostra em Erlenmeyer;
- (b) Adicionar 25 mL de álcool etílico neutralizado e aquecer até dissolução da amostra;
- (c) Adicionar 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (m/v) e titular com solução etanólica de hidróxido de potássio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  até róseo persistente durante 30 s;
- (d) Utilizar o volume gasto de solução hidróxido de potássio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  ( $V_{KOH}$ ) para determinação do Índice de Acidez;
- (e) Adicionar ao erlenmeyer exatamente 25 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e 50 mL de álcool etílico neutralizado;
- (f) Deixar em refluxo por 4 h;
- (g) Titular, sob aquecimento, com solução de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  até descoramento;
- (h) Utilizar o volume gasto de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  ( $V_{HCl}$ ) para determinação do índice de ésteres;
- (i) Efetuar prova em branco, anotando o volume de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  gasto no branco ( $V_{branco}$ ).

### 3.10.7 Cálculo e expressão dos resultados

$$\text{Índice de acidez, em mg de KOH/g} = \frac{V_{KOH} \cdot f \cdot 28,05}{m}$$

$$\text{Índice de ésteres, em mg de KOH/g} = \frac{(V_{branco} - V_{HCl} \cdot f') \cdot f \cdot 28,05}{m}$$

$$\text{Índice de relação} = \frac{\text{Índice ésteres}}{\text{Índice de acidez}}$$

onde:

$V_{KOH}$  = volume de solução etanólica de hidróxido de potássio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação, em mL;

$V_{HCl}$  = volume de solução de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação, em mL;

$V_{branco}$  = volume de solução de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação do branco, em mL;

$m$  = massa da amostra, em g;

$f$  = fator de correção da solução etanólica de hidróxido de potássio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ;

$f'$  = fator de correção da solução de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

Expressar os resultados obtidos com uma casa decimal.

### 3.10.8 Bibliografia

FAO JECFA. *Combined Compendium for Food Additive Specifications - Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications*, Monographs No. 1, Vol. 4. Roma: 2006.

United States Pharmacopeial Convention. *Food Chemicals Codex*. 4th ed. Washington: National Academy Press, 1996.

## 3.11 Insolúveis

Utilizar o método descrito na norma ABNT NBR 15714-5, expressando o resultado final em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 3.12 Massa mecânica (insolúveis no etanol), cera e solúveis no etanol

Utilizar o método descrito na norma ABNT NBR 16956-1 para a obtenção do teor de cera, teor de sólidos solúveis e a massa mecânica (teor de resíduos insolúveis), expressando o resultado final em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 3.13 Perda por dessecação em própolis

Determinar a perda por dessecação utilizando o método descrito na norma ABNT NBR 16956-2, reportando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 3.14 Extrato seco

### 3.14.1 Princípio

Secagem de uma alíquota da amostra, a uma temperatura determinada, até massa constante e pesagem para determinação do extrato seco.

### 3.14.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a extrato de própolis.

### 3.14.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,0001 g;
- Banho-maria;
- Cápsulas de alumínio, vidro, aço inoxidável ou níquel, com cerca de 25 mm de profundidade e diâmetro de aproximadamente 50 mm;
- Estufa com circulação de ar a  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 3.14.4 Reagentes e soluções

Não aplicável.

### 3.14.5 Preparo da amostra

Homogeneizar a amostra em seu recipiente.

### 3.14.6 Procedimento de análise

- Aquecer a cápsula em uma estufa a  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 1 h, transferir para dessecador, esfriar até a temperatura ambiente e pesar ( $m_0$ );
- Transferir 5 mL da amostra para cápsula e pesar;
- Levar o conjunto ao banho-maria e secar sob vapor por 30 min;
- Transferir a cápsula para estufa a  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 1 h;
- Transferir para dessecador e esfriar por aproximadamente 30 min;
- Pesar e anotar a massa;
- Repetir o procedimento de *d* a *f*, utilizando tempo de secagem de uma 30 min, até que a variação entre duas pesagens consecutivas seja inferior a 5 mg ou que a amostra ganhe massa, devendo-se considerar a menor massa obtida como a massa final ( $m_1$ ).

Obs.: Realizar o ensaio em duplicata.

### 3.14.7 Cálculo e expressão dos resultados

$$\text{Extrato seco, em g/100 mL} = \frac{m_1 - m_0}{5} \cdot 100$$

onde:

$m_0$  = massa da cápsula com sua tampa, em gramas;

5 = volume da amostra, em mililitros;

$m_1$  = massa da cápsula + massa dessecada da amostra, em gramas.

Expressar como resultado a média das duplicatas com duas casas decimais.

### 3.14.8 Bibliografia

Ricardo G. Woisky e Antonio Salatino. *Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control*. Journal of Apicultural Research. Vol. 37(2), p. 99-105, 1998.

International Organization for Standardization. *6731: Milk, cream and evaporated milk – Determination of total solids content (Reference method)*. Genebra: 2010.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT NBR 16956-2:2021 - Apicultura - Própolis - Parte 2: Determinação da perda por dessecação e teor de umidade*. São Paulo: 2021.

## 3.15 Ponto de fusão

### 3.15.1 Princípio

Baseia-se na determinação do ponto de fusão de uma amostra submetida a aquecimento controlado por meio de equipamento específico.

### 3.15.2 Campo de aplicação

Este método é aplicável a cera de abelhas.

### 3.15.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 1 g;
- Béquer de 50 mL;
- Funil de vidro;
- Material descrito na norma ISO 6321;
- Papel de filtro.

### 3.15.4 Reagentes e soluções

Não aplicável.

### 3.15.5 Procedimento de análise

- (a) Pesar cerca de 15 g da amostra em um béquer e fundir em estufa a 70 °C;
- (b) Filtrar com papel de filtro qualitativo;
- (c) Obter o ponto de fusão de acordo com o método A descrito na norma ISO 6321.

### 3.15.6 Expressão dos resultados

Reportar o valor obtido com uma casa decimal.

### 3.15.7 Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos*. Brasília: 1981.

International Organization for Standardization. *6321:2002: Animal and vegetable fats and oils – Determination of melting point in open capillary tubes (slip point)*. Genebra: 2002.

## 3.16 Ponto de saponificação turva

### 3.16.1 Princípio

Baseia-se na medição da temperatura em que os ácidos graxos iniciam a solidificação, após saponificação.

### 3.16.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a cera de abelha.

### 3.16.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Balão de fundo chato de 100 mL;
- Banho-maria a 80 °C;
- Bureta de 50 mL;
- Condensador de refluxo;
- Termômetro com resolução mínima de 1 °C.

### 3.16.4 Reagentes e soluções

- Solução de saponificação:

Dissolver 4,0 g de hidróxido de potássio em 90 mL de álcool etílico livre de aldeídos mantido a aproximadamente 15 °C durante a dissolução. Deixar atingir a temperatura ambiente, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume.

### 3.16.5 Procedimento de análise

- (a) Pesar cerca de 15 g da amostra em um béquer e fundir em estufa a 70 °C;
- (b) Filtrar com papel de filtro qualitativo;
- (c) Pesar entre 2,9 e 3,1 g da amostra filtrada e passar para balão de fundo chato de 100 mL;

- (d) Adicionar 30 mL de solução de saponificação;
- (e) Acoplar o condensador e refluxar a mistura por 2 h;
- (f) Transcorrido o tempo, desconectar o condensador;
- (g) Colocar, dentro do balão, um termômetro;
- (h) Girar suavemente o balão enquanto a temperatura da solução decresce. A temperatura em que se notar uma turvação da solução ou formação de pequenos glóbulos será considerado o ponto de saponificação turva.

Obs.: Para maior precisão da leitura, colocar embaixo do balão e colado neste, um cartão tendo impresso letras negras com altura de 1 cm. Quando as letras observadas através do balão tornam-se de difícil visibilidade, será esta a temperatura considerada como ponto de turvação.

### 3.16.6 Expressão dos resultados

Reportar a temperatura do ponto de saponificação turva como um número inteiro.

### 3.16.7 Bibliografia

United States Pharmacopeial Convention. *Food Chemicals Codex*. 4th ed. Washington: National Academy Press, 1996.

## 3.17 Resíduo mineral fixo/Cinzas

### 3.17.1 Mel

Utilizar o método descrito na norma ABNT NBR 15714-3, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

### 3.17.2 Própolis

Utilizar o método descrito na norma ABNT NBR 16956-3, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 3.18 Sacarose

Determinar o teor de “Sacarose” em “g/100 g” pelo método AOAC 977.20, reportando o valor obtido com uma casa decimal.

## 3.19 Teor alcoólico em extrato de própolis

Com o auxílio do método descrito na norma AOAC 983.12, determinar o teor alcoólico na amostra, expressando o resultado em “°GL (v/v)” com uma casa decimal.

Poderão ser utilizados equipamentos automatizados de destilação para a execução do método.



## 3.20 Teste para adulteração por açúcares C-4

Determinar a quantidade aparente de açúcares C-4 por meio do Método II da norma AOAC 998.12. Reportar positivo se o valor obtido for superior a 7%.

## 3.21 Teste para cera de carnaúba

### 3.21.1 Princípio

Baseia-se nas diferenças entre os pontos de cristalização em álcool n-butílico da cera de abelha e da cera de carnaúba.

### 3.21.2 Campo de aplicação

Este ensaio aplica-se a cera de abelhas.

### 3.21.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Banho-maria;
- Microscópio ou lente de aumento;
- Tubos de ensaio.

### 3.21.4 Reagentes e soluções

- Álcool n-butílico (1-butanol).

### 3.21.5 Procedimento

- (a) Pesar aproximadamente 50 mg de amostra em tubo de ensaio;
- (b) Adicionar ao tubo 10 mL de álcool n-butílico;
- (c) Aquecer, sob agitação, o tubo de ensaio em banho de água em ebulição até completa dissolução;
- (d) Transferir o tubo de ensaio para banho a 60 °C e deixá-lo em repouso;
- (e) Observar os cristais formados.

### 3.21.6 Expressão dos resultados

Reportar negativo se os cristais formados parecerem agulhas soltas ou aglomeradas, sem presença de massas amorfas sob o microscópio ou lente de aumento.

### 3.21.7 Bibliografia

United States Pharmacopeial Convention. *Food Chemicals Codex*. 4th ed. Washington: National Academy Press, 1996.

## 3.22 Teste para cera japonesa, resinas e gorduras

### 3.22.1 Princípio

Baseia-se nas diferenças de solubilidade dos produtos de saponificação da cera de abelha e de suas impurezas.

### 3.22.2 Campo de aplicação

Este ensaio aplica-se a cera de abelhas.

### 3.22.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Erlenmeyer de 125 mL;
- Papel de filtro qualitativo.

### 3.22.4 Reagentes e soluções

- Ácido clorídrico (HCl) 3,5 mol L<sup>-1</sup>;
- Papel de pH ou solução 1% de fenolftaleína;
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 3,5 mol L<sup>-1</sup>.

### 3.22.5 Procedimento

- (a) Pesar entre 0,9 e 1,1 g de amostra em erlenmeyer;
- (b) Adicionar 35 mL da solução de hidróxido de sódio;
- (c) Manter sob ebulição por 30 min, mantendo o volume constante por adição ocasional de água;
- (d) Após este período, ocorre a separação entre a cera e a parte líquida, a qual deve manter-se límpida. Esfriar e filtrar em papel qualitativo;
- (e) Acidificar o filtrado com solução de ácido clorídrico;
- (f) Observar se há formação de precipitados.

### 3.22.6 Expressão dos resultados

Reportar positivo se houver formação de precipitados após acidificação.

### 3.22.7 Bibliografia

United States Pharmacopeial Convention. *Food Chemicals Codex*. 4th ed. Washington: National Academy Press, 1996.

## 3.23 Umidade em mel

Utilizar o método B da norma AOAC 969.38 ou a norma ABNT NBR 15714-2, reportando o valor obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

# Ovos e derivados

\*\*\*

## 4.1 Lipídios

Determinar o teor lipídico da amostra por meio da norma AOAC 925.32, reportando o resultado com duas casas decimais em “g/100 g”.

## 4.2 pH

Utilizar o método descrito no Capítulo 2, Seção 2.36.

## 4.3 Proteína

Multiplicar o teor de nitrogênio na amostra, determinado em acordo com a norma ISO 1871, pelo fator de conversão 6,25, expressando o resultado obtido “em g/100 g” com duas casas decimais. Alternativamente, utilizar a norma AOAC 992.15.

## 4.4 Resíduo mineral fixo

### 4.4.1 Princípio

Fundamenta-se na eliminação da matéria orgânica e inorgânica volátil à temperatura de 550 °C. O produto obtido é denominado de resíduo mineral fixo ou cinzas.

### 4.4.2 Campo de aplicação

Ovo líquido e ovo desidratado.

### 4.4.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,0001 g;
- Cadinho de porcelana, quartzo, metal ou qualquer outro metal inerte nas condições do ensaio com diâmetro mínimo de 60 mm e paredes inclinadas com altura mínima de 25 mm;
- Dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro;

- Forno tipo mufla capaz de atingir e manter a temperatura de  $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ ;
- Pinça metálica.

#### 4.4.4 Reagentes e soluções

- Água oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 30% (v/v).

#### 4.4.5 Preparo da amostra

Homogenizar a amostra agitando e invertendo o recipiente ou embalagem 5 ou 6 vezes.

#### 4.4.6 Procedimento de análise

- (a) Aquecer o cadinho em forno mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos, esfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesar ( $m_0$ );
- (b) Pesar entre 2 e 3 g da amostra homogeneizada no cadinho ( $m_1$ );
- (c) Colocar o cadinho no forno mufla e aumentar gradualmente a temperatura até  $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ , mantendo-o nesta temperatura por tempo suficiente para obtenção de cinzas claras (aproximadamente 4 h);
- (d) Retirar o cadinho para dessecador e esfriar até temperatura ambiente;
- (e) Observar a coloração das cinzas. Se obtidas cinzas de coloração negra, adicionar algumas gotas de peróxido de hidrogênio a 30% e repetir as etapas de incineração. Se as cinzas possuem coloração entre branco e cinza claro, pesar o conjunto cinzas+cadinho ( $m_2$ );

#### 4.4.7 Cálculo e expressão dos resultados

$$\text{Resíduo Mineral Fixo, em g/100 g} = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \cdot 100$$

onde:

$m_0$  = massa do cadinho, em gramas;

$m_1$  = massa da amostra, em gramas;

$m_2$  = massa do cadinho + cinzas, em gramas.

Reportar a média aritmética de duas determinações com uma casa decimal.

#### 4.4.8 Bibliografia

International Organization for Standardization. *ISO 936:1998: Meat and meat products - Determination of total ash*. Genebra: 1998.

### 4.5 Sólidos totais

Determinar o teor de sólidos totais na amostra por meio da norma AOAC 925.30, reportando o resultado com duas casas decimais em “g/100 g”.

# Pescados e subprodutos da pesca

\*\*\*

## 5.1 Preparo de amostras

Instruções específicas, requeridas e descritas nos métodos, também devem ser observadas. Caso a análise não se inicie imediatamente, manter a amostra preparada sob refrigeração em recipiente hermeticamente fechado. Para prevenir perda de água durante o preparo, utilize porções tão grandes quanto possível. Preparar o pescado como para consumo, descartando ossos e outras partes não comestíveis, salvo instrução contrária presente na metodologia analítica.

### 5.1.1 Peixes *in natura*

Limpar o peixe removendo, se presentes, escamas e vísceras. Filetar o peixe de ambos os lados. Para peixes pequenos (inferiores a 15 cm), utilizar entre 5-10 unidades.

Para peixes grandes, a cada 3 peixes cortar seção transversal de aproximadamente 2,5 cm logo após a nadadeira peitoral, uma seção entre o primeiro corte e o ânus e uma seção logo após o ânus. Descartar pele e ossos.

**Em moinho:** Moer rapidamente por 3 vezes em moedor com abertura de 3 mm, misturando após cada moagem.

**Em processador de alimentos:** Cortar a amostra em pedaços de aproximadamente 5 cm e transferir, juntamente com qualquer líquido, para o recipiente do equipamento. Processar por 30 s, raspar as laterais do recipiente com espátula e reincorporar à porção principal da amostra, assim como qualquer material preso nas lâminas. Processar por 30 s adicionais. Repetir este processo por 2 vezes. Se utilizado equipamento que realize a raspagem simultaneamente ao processamento, pode-se efetuar o preparo em uma única etapa de aproximadamente um minuto.

### 5.1.2 Conservas e produtos enlatados

Preparar todo o conteúdo da lata em moinho ou processador de alimentos como em 5.1.1.

### 5.1.3 Produtos salgados, salgados secos e defumados

Remover, se presentes, ossos e o sal aderido à superfície. Preparar peixes inteiros como em 5.1.1. Homogeneizar em moinho ou processador de alimentos como em 5.1.1

Bacalhau espalmado e similares (p. ex. Saithe) devem ser amostrados e analisados de acordo com o método *cross section* descrito no Codex Stan 167.

#### 5.1.4 Moluscos bivalves e cefalópodes

Cortar porções da musculatura e homogeneizar em moinho ou processador de alimentos como em 5.1.1.

#### 5.1.5 Crustáceos

Remover a carapaça, cortar porções da musculatura e homogeneizar em moinho ou processador de alimentos como em 5.1.1. Para camarões e lagostas, não utilizar a cabeça.

#### 5.1.6 Bibliografia

AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Official Method 937.07. 21 ed. Rockville: 2019.

### 5.2 Acidez em óleo de pescado

Utilizar o método descrito na norma ISO 660, expressando o resultado obtido em “g de ác. oleico/100 g” com uma casa decimal.

### 5.3 Amido

Utilizar o método descrito no Capítulo 1, Seção 1.6.

### 5.4 Anidrido sulfuroso e sulfitos

Utilizando o método descrito na norma AOAC 990.28, determinar o teor de sulfitos na porção edível do pescado, expressando o resultado em “g de SO<sub>2</sub>/100 g” com três casas decimais.

### 5.5 Bases voláteis totais

#### 5.5.1 Princípio

As bases voláteis são extraídas da amostra com uma solução de ácido perclórico. Após alcalinização, o extrato é submetido a destilação por arraste de vapor, sendo os componentes de básicos voláteis absorvidos pelo ácido receptor. A concentração de BVT é determinada por titulação das bases absorvidas.

#### 5.5.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a pescados e produtos a base de pescado.

### 5.5.3 Materiais e equipamentos

- Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Bureta de 10 mL, graduada em 0,05 mL;
- Equipamento para destilação por arraste de vapor;
- *Erlenmeyers*;
- Funil de vidro;
- Homogeneizador tipo Turrax com velocidade igual ou superior a de 15 000 RPM;
- Papel de filtro;
- Proveta de 25 mL;

### 5.5.4 Reagentes e soluções

- Antiespumante a base de silicone;
- Solução de ácido bórico a  $30 \text{ g L}^{-1}$ ;
- Solução de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) a  $60 \text{ g L}^{-1}$ ;
- Solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) a  $200 \text{ g L}^{-1}$ ;
- Solução de fenolftaleína a  $10 \text{ g L}^{-1}$
- Solução indicadora de Tashiro:  
Dissolver 0,2 g de vermelho de metila e 0,1 g de azul de metileno em 100 mL de etanol a 95%.
- Solução padronizada de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;

### 5.5.5 Preparo da amostra

(a) Pescado congelado:

Remover, se presente, a água de recobrimento (“glaciamento”) da amostra utilizando água corrente. Retirar porções musculares da amostra ainda congelada, triturar e homogeneizar. Analisar imediatamente.

(b) Pescado resfriado:

Retirar porções musculares da amostra, triturar e homogeneizar. Analisar imediatamente.



### 5.5.6 Procedimento de análise

- (a) Pesar 10 g  $\pm 0,1$  g de amostra triturada para erlenmeyer;
- (b) Adicionar 90 mL de  $\text{HClO}_4$  a  $60 \text{ g L}^{-1}$ ;
- (c) Homogeneizar em Turrax por 2 min;
- (d) Filtrar. O filtrado, se mantido refrigerado, pode ser analisado em até 7 dias;
- (e) Colocar 50 mL do filtrado no dispositivo de destilação por arraste de vapor;
- (f) Adicionar ao filtrado cerca de 5 gotas de solução de fenolftaleína. Se necessário, adicionar algumas gotas de antiespumante;
- (g) Adicionar 6,5 mL de  $\text{NaOH}$  a  $200 \text{ g L}^{-1}$ . A alcalinização é verificada mediante a mudança de cor para rosa;
- (h) Regular o equipamento de modo a obter cerca de 100 mL de destilado em 10 min. O destilado é recolhido em recipiente com 100 mL de solução de ácido bórico;
- (i) Após 10 min, recolher o destilado e adicionar ao mesmo algumas gotas do indicador de Tashiro;
- (j) Titular com solução de ácido clorídrico até a viragem do indicador. Opcionalmente, pode-se utilizar como ponto final da titulação o pH de  $5,0 \pm 0,1$ .

O ensaio deve ser conduzido em duplicata. Os resultados obtidos são considerados corretos se a diferença entre as duplicatas não exceder 2 mg de N/100 g. Deve ser realizado uma prova em branco, substituindo-se os 50 mL do filtrado por 50 mL de solução de ácido perclórico.

O equipamento para destilação por arraste de vapor deve ser verificado mediante a destilação de soluções de cloreto ou sulfato de amônio, tolerando-se uma recuperação entre 99% e 101%.

Equipamentos automatizados podem ser utilizados, desde que baseados nos mesmos princípios e satisfaçam a condição de verificação.

### 5.5.7 Expressão dos resultados

$$\text{Bases voláteis totais, em mg de N/100 g} = \frac{(V - V_b) \cdot f \cdot 0,1 \cdot 14 \cdot 2 \cdot 100}{m}$$

onde:

$V$  = volume de solução de  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação da amostra, em mL;

$V_b$  = volume de solução de  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação do branco, em mL;

$f$  = fator de correção da solução de  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;

0,1 = molaridade de solução de  $\text{HCl}$ , em  $\text{mol L}^{-1}$ ;

14 = massa molar do nitrogênio, em  $\text{g mol}^{-1}$ ;

2 = fator de diluição;

$m$  = massa da amostra, em g.

Reportar a média aritméticas das duplicatas como um número inteiro.

### 5.5.8 Bibliografia

Jornal Oficial das Comunidades Europeias, nº L97 de 29/04/1995, p. 84-87.

## 5.6 Cloreto de sódio (NaCl)

### 5.6.1 Princípio

O sal é extraído com água da amostra. Após precipitação das proteínas, a concentração de cloretos é determinada por titulação de uma alíquota da solução com nitrato de prata padronizado (método de Mohr) e calculado como cloreto de sódio.

### 5.6.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a pescado, produtos a base de pescado, carne e produtos cárneos.

### 5.6.3 Materiais e equipamentos

- Agitador magnético;
- Balança analítica com resolução mínima de 0,01 g;
- Balão volumétrico de 250 mL;
- Bureta;
- *Erlenmeyers*;
- Funil de vidro;
- Papel de filtro.

### 5.6.4 Reagentes e soluções

- Solução de cromato de potássio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) a 5% m/v;
- Solução de fenolftaleína a  $10 \text{ g L}^{-1}$ ;
- Solução de ferrocianeto de potássio ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ ) a 15% m/v;
- Solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Solução de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ) a 30% m/v;
- Solução padrão de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 5.6.5 Preparo da amostra

Retirar porções musculares da amostra, triturar e homogeneizar.

### 5.6.6 Procedimento de análise

- (a) Pesar 5 g de amostra para balão volumétrico de 250 mL;
- (b) Adicionar aproximadamente 100 mL de água e agitar vigorosamente;
- (c) Adicionar 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v e agitar;
- (d) Adicionar 5 mL de solução de sulfato de zinco e agitar;
- (e) Completar o volume do balão com água;
- (f) Após nova agitação, filtrar o conteúdo do balão.
- (g) Transferir um alíquota do filtrado para Erlenmeyer, adicionando duas gotas de solução de fenolftaleína;
- (h) Adicionar solução de hidróxido de sódio lentamente até o surgimento de uma coloração rósea;
- (i) Adicionar cerca de 100 mL de água e 1 mL de solução de cromato de potássio;
- (j) Titular com solução de nitrato de prata, sob agitação constante, até mudança persistente da coloração da solução para vermelho-tijolo claro.

O ensaio deve ser conduzido em duplicata. Deve ser realizada uma prova em branco dos reagentes.

### 5.6.7 Expressão dos resultados

$$\text{NaCl, em g/100 g} = \frac{(V - V_b) \cdot f \cdot 0,1 \cdot 58,45 \cdot 250 \cdot 100}{m \cdot A \cdot 1000}$$

onde:

$V$  = volume de solução de  $\text{AgNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação da amostra, em mL;

$V_b$  = volume de solução de  $\text{AgNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação do branco, em mL;

$f$  = fator de correção da solução de  $\text{AgNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ;

$0,1$  = molaridade de solução de  $\text{AgNO}_3$ , em  $\text{mol L}^{-1}$ ;

$58,45$  = massa molar do NaCl, em  $\text{g mol}^{-1}$ ;

$250$  = volume do balão volumétrico;

$A$  = alíquota tomada, em mL;

$m$  = massa da amostra, em g.

Reportar o teor de sal (NaCl) como a média aritmética das duplicatas em “g de NaCl/100 g” com uma casa decimal.

### 5.6.8 Bibliografia

Codex Alimentarius. *Codex Standard for Salted Fish and Dried Salted Fish of the Gadidae Family of Fishes – Codex Stan 167-1989*. Roma: FAO/WHO, 2016.

## 5.7 Corantes artificiais

Utilizando a metodologia descrita na norma NMKL 130, reportar “presença de *nome comum (código INS)*” para cada corante identificado. Reportar “presença corante hidrossolúvel não identificado” caso seja detectado um corante sem correlação com os corantes testados no método. Deve-se testar, em adição aos corantes descritos na norma, a presença do corante carmoisina (INS 122).

## 5.8 Desglaciamento

### 5.8.1 Princípio

O método baseia-se na remoção em condições controladas do glaciamento da amostra para determinação do percentual de glaciamento.

### 5.8.2 Campo de aplicação

Pescados congelados glaciados.

### 5.8.3 Materiais e equipamentos

- Balança com resolução mínima de 0,1 g;
- Cronômetro;
- Peneira com malha de 2,4 mm em aço inoxidável;
- Recipiente paralelepípedo com um volume superior a 10 vezes o peso bruto da amostra;
- Termômetro com precisão de 0,1 °C, abrangendo a faixa 15 °C a 25 °C;
- Toalha de tecido ou papel.

### 5.8.4 Reagentes e soluções

Não aplicável.

### 5.8.5 Preparo da amostra

Durante o período de transporte e transferência das amostras até o laboratório e durante a sua armazenagem, a temperatura do produto não poderá ser superior a  $-8^{\circ}\text{C}$ . No momento do ensaio, a amostra deve estar a uma temperatura inferior a  $-12^{\circ}\text{C}$ .

### 5.8.6 Procedimento de análise

- (a) Pesar a amostra com embalagem e isenta de gelo exterior, obtendo-se o peso bruto (*PB*) da amostra;

- (b) Pesar a embalagem e/ou invólucro totalmente limpos e sem resíduos, obtendo-se assim o valor do peso da embalagem ( $PE$ );
- (c) Com o produto já sem embalagem, acomodá-lo na peneira e submergir o conjunto em um recipiente contendo um volume aproximado de água de 10 vezes o peso da amostra, observando o volume mínimo de 10 litros. O banho deve estar a uma temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
- (d) Manter o conjunto peneira mais produto submerso até a percepção tátil de que todo o glaciamento foi removido, evitando-se o descongelamento substancial da amostra;
- (e) Retirar o conjunto peneira mais produto e deixar escorrer por  $60 \pm 10$  segundos. Para facilitar a drenagem, a peneira deverá permanecer inclinada, preferencialmente em um ângulo entre  $15^{\circ}$  e  $17^{\circ}$ . A água aderida à superfície da amostra pode ser removida com o auxílio de toalhas de papel ou tecido, evitando-se pressionar a amostra;
- (f) Pesar a amostra desglaciada, determinando o peso do produto desglaciado ( $P_d$ );
- (g) Repetir este procedimento para as 5 amostras restantes.

Obs.: Para amostras de camarão é recomendável que a peneira seja pesada antes do banho e a amostra desglaciada pesada em conjunto com a mesma, subtraindo-se o peso da peneira do peso obtido para obtenção do  $P_d$  da amostra. A utilização da peneira para imersão no banho é opcional para amostras compostas por uma peça única.

### 5.8.7 Cálculo e expressão dos resultados

Determinar o peso do produto glaciado ( $P_g$ ) para cada amostra subtraindo-se do peso bruto o peso da embalagem correspondente:

$$P_g = PB - PE$$

Determinar a média aritmética ( $\overline{P_d}$ ) e desvio padrão ( $s_{P_d}$ ) dos  $P_d$ .

Determinar o percentual de glaciamento ( $\%G$ ) utilizando a fórmula:

$$\%G = \frac{\sum P_g - \sum P_d}{\sum P_d} \cdot 100$$

Calcular o peso do produto desglaciado a ser considerado para inspeção ( $P_{dc}$ ), “peso desglaciado + tolerância”, através da equação  $P_{dc} = \overline{P_d} + 1,646 \cdot s_{P_d}$ .

**Para pescados pré-medidos de peso declarado uniforme, reportar:**

- o “peso glaciado” ( $P_g$ ), como um número inteiro;
- o “peso desglaciado + tolerância” ( $P_{dc}$ ), como um número inteiro;
- o “percentual de glaciamento” ( $\%G$ ), em % como um número inteiro.

Adicionalmente, informar no campo “Observações” do certificado o peso líquido declarado pelo fabricante.

**Para pescados pré-embalados com conteúdo nominal desigual, reportar:**

- o “percentual de glaciamento” ( $\%G$ ), em % como um número inteiro.

### 5.8.8 Bibliografia

Codex Alimentarius. *Codex Standard for Quick Frozen Lobsters – Codex Stan 95 rev. 2*. Roma: FAO/WHO, 2004.

Codex Alimentarius. *Codex Standard for Quick Frozen Shrimps or Prawns – Codex Stan 92 rev. 1*. Roma: FAO/WHO, 1995.

Codex Alimentarius. *Codex Standard for Quick Frozen Blocks of Fish Fillets, Minced Fish Flesh and Mixtures of Filets and Minced Fish Flesh – Codex Stan 165 rev. 1*. Roma: FAO/WHO, 1995.

AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Official Method 963.18. 20 ed. Rockville: 2016.

Codex Alimentarius. *General Guidelines on Sampling – CAC/GL 50*. Roma: FAO/WHO, 2004.

## 5.9 Detecção de formaldeído

Utilizar o método B da norma AOAC 931.08. Reportar “positivo” caso seja detectada a presença de formaldeído na amostra e “negativo” em caso contrário.

## 5.10 Detecção de polifosfatos

### 5.10.1 Princípio

Os ânions polifosfatos são extraídos em água, separados em coluna iônica e derivatizados com auxílio de reagente de molibdato de amônio para detecção no visível.

### 5.10.2 Campo de aplicação

Pescados congelado, pescado congelado com água de recobrimento contendo polifosfatos, pescado com água de recobrimento sem adição de polifosfatos, carne e produtos cárneos congelados.

### 5.10.3 Materiais e equipamentos

- Aparelho para filtração de solventes para cromatografia líquida dotado de membrana de 45 µm;
- Balança analítica com resolução mínima de 0,001 g;
- Balança semi-analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- Balão volumétrico de 1000 mL;
- Centrífuga capaz de gerar uma RCF de 3000×*g* ou superior;
- Homogeneizador tipo Turrax com velocidade igual ou superior a de 15 000 RPM;
- Proveta de 25 mL;
- Seringas acopladas a filtro de membrana de 45 µm;

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, HPLC), dotado de bomba isocrática, forno de reação pós-coluna capaz de manter uma temperatura de  $115^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ou superior, bomba auxiliar para derivatização pós-coluna, detector fotométrico operando no visível, injetor automático, compartimento de colunas capaz de manter uma temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e coluna cromatográfica IC Pack Anion HC ( $15\text{ cm} \times 4,6\text{ mm}$ ) ou similar;
- Tubos para centrífuga em polipropileno com capacidade para 50 mL;
- Vial de 2 mL.

#### 5.10.4 Reagentes e soluções

- Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), grau ACS;
- Ácido etilenodiaminatetracético, sal dissódico (EDTA,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ );
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado;
- Cloreto de potássio (KCl), grau ACS;
- Hidrogenofosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), grau ACS;
- Hidróxido de potássio (KOH), grau ACS;
- Molibdato de amônio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ );
- Pirofosfato de sódio tetrabásico ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ );
- Solução ácida de Mo(V)-Mo(VI) – derivatizante:  
Dissolver 5,30 g de molibdato de amônio em 900 mL de água, com subsequente adição de 100 mL de ácido sulfúrico concentrado. Adicionar, sob agitação, 0,65 g de zinco metálico em pó. Após a completa dissolução do zinco, armazenar em frasco âmbar por até 6 meses.
- Solução de referência de polifosfatos:  
Em 900 mL de água Tipo I, adicionar 148 mg de hidrogenofosfato de sódio, 153 mg de pirofosfato de sódio, 145 mg de trifosfato de sódio e 129 mg de trimetafosfato de sódio. Transferir para balão volumétrico de um litro e completar para o volume. Filtrar a solução em membrana de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  e armazenar sob refrigeração por até 12 meses. Descartar se observada turbidez ou presença de fungos.
- Solução tampão borato pH 9,0 – fase móvel:  
Em 900 mL de água Tipo I, dissolver 6,18 g (100 mmol) de ácido bórico, 2,39 g (42,5 mmol) de hidróxido de potássio, 1,49 g (20 mmol) de cloreto de potássio e 0,484 g (0,13 mmol) de EDTA disódico. Ajustar o pH para 9,0 com auxílio de solução diluída de hidróxido de potássio e/ou solução diluída de ácido bórico, filtrar em membrana de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ , transferir para balão volumétrico de um litro e completar para o volume.
- Trifosfato de sódio pentabásico ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ );

- Trimetafosfato trisódico ( $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ );
- Zinco metálico em pó.

Obs.: Sais de potássio dos ânions polifosfato poderão ser utilizados em substituição aos sais de sódio.

### 5.10.5 Preparo da amostra

- (a) Pescado congelado:

Remover, se presente, a água de recobrimento (“glaciamento”) da amostra utilizando água corrente. Retirar porções musculares da amostra ainda congelada e homogeneizar. Analisar imediatamente.

- (b) Carnes e produtos cárneos:

Retirar porções musculares da amostra ainda congelada e homogeneizar. Analisar imediatamente.

### 5.10.6 Procedimento de análise

- (a) Pesar entre 5,0 e 5,1 g de amostra em tubo de centrífuga de 50 mL;
- (b) Adicionar 25 mL de água Tipo I e homogeneizar utilizando homogeneizador tipo Turrax;
- (c) Deixar em banho-maria acima de 90 °C por 5 min, agitando ocasionalmente;
- (d) Centrifugar por 10 min;
- (e) Com o auxílio de uma seringa acoplada a filtro de membrana de 0,45 µm, coletar cerca de 1 mL do sobrenadante para o vial de HPLC;
- (f) Injetar, utilizando os parâmetros constantes da Tabela 4, a solução de referência de polifosfatos e a amostra. A ordem de eluição segue o número de unidades de fosfato: ortofosfato, pirofosfato, trifosfato, trimetafosfato, etc., conforme exemplificado na Figura 2;

O volume de injeção deve ser suficiente para que se obtenha uma relação sinal/ruído superior a 3 para cada ânion quando injetada a solução de referência numa diluição 1:15.

### 5.10.7 Expressão dos resultados

Considerar “positivo” apenas os picos de polifosfatos integrados no cromatograma com relação sinal/ruído superior a 3.

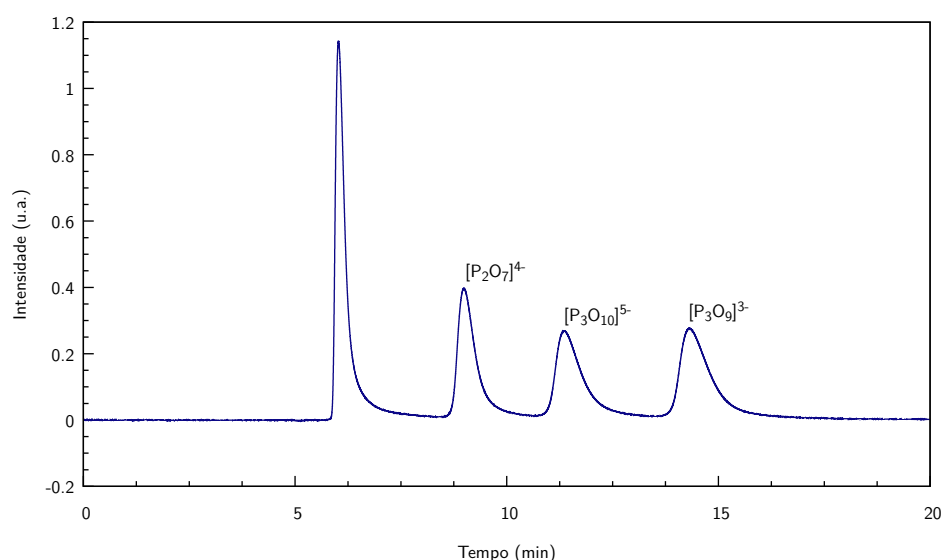
Reportar “Presença de X (Y) na porção muscular” para cada um dos polifosfatos presentes na solução de referência encontrados, sendo X o nome do ânion polifosfato e Y sua fórmula química. Reportar “Presença de polifosfatos  $(\text{PO}_4)_n$ ” se o cromatograma apresentar picos com tempos de retenção superiores ao do trimetafosfato e ausentes da solução de referência. Reportar “não detectado” se o cromatograma apresentar apenas o pico referente ao ânion monofosfato (ortofosfato,  $\text{PO}_4^{3-}$ ).



**Tabela 4:** Parâmetros cromatográficos sugeridos.

Parâmetro	Valor
Detecção	Entre 800 e 840 nm
Tempo de corrida *	20 min
Temperatura da coluna	35 °C ± 2 °C
Temperatura do forno de reação pós-coluna	≥ 115 °C
Fluxo de derivatizante	0,2 mL L <sup>-1</sup>
Fluxo da fase móvel	0,5 mL L <sup>-1</sup>
Volume de injeção	Entre 1 µL e 75 µL

\*Polifosfatos com mais de quatro unidades podem apresentar tempos de retenção superiores a 20 min.

**Figura 2:** Cromatograma representativo da separação dos ânions polifosfato

### 5.10.8 Bibliografia

Norimasa Yosa, Izumi Akazaki, Tetsuya Nakazato, Nobuyuki Ueda, Hiroki Kodama e Akira Tateda. *High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Pyrophosphate in the presence of a 20,000-fold Excess of Orthophosphate*. Analytical Biochemistry, v. 199, p. 279 – 285, 1991.

## 5.11 Determinação de conservantes

Utilizar o método descrito nas Seções 1.2, 1.3 ou 1.17.

## 5.12 Determinação de sulfito por eletroforese capilar de zona

### 5.12.1 Princípio

Este método se baseia na extração e derivatização do sulfito das amostras de pescado (camarões e lagostas) com acetonitrila e formaldeído por extração sólido-líquido (alternativa 1) ou extração por líquido pressurizado (alternativa 2). A separação do analito na forma de íon hidroximetil sulfonato é realizada por eletroforese capilar de zona e a detecção se dá de forma indireta por arranjo de diodos (CZE-DAD). A quantificação é feita por padronização interna com ácido malônico.

### 5.12.2 Campo de aplicação

Camarões e lagostas.

### 5.12.3 Materiais e equipamentos

- Agitador de tubos;
- Balança analítica, com resolução mínima de 0,1 mg;
- Balões volumétricos de 10 mL e 25 mL;
- Béquer pequeno;
- Banho-maria com agitação;
- Banho ultrassônico;
- Capilares de sílica fundida com revestimento externo de poli-imida com 75 µm de diâmetro interno e 38,5 cm de comprimento total (30 cm de comprimento até o detector);
- Centrífuga refrigerada;
- Centrifuga de microtubos;
- Espátulas de vidro ou silicone;
- Estantes para tubos tipo “falcon”;
- Micropipetas e ponteiros para faixas de volume de 1000 µL – 10 000 µL, 100 µL – 1000 µL e 5 µL – 200 µL;
- Microtubos de polipropileno de capacidade mínima de 1,5 mL;
- Seringas plásticas (capacidade 5 ou 10 mL);
- Sistema automático de eletroforese capilar, com detector de arranjo de diodos, controlador de temperatura, operado por software de controle e aquisição de dados;

- Sistema de extração por líquido pressurizado, com tubos extratores, filtros de celulose e fibra de vidro;
- Tubos de polipropileno para extração (tipo “falcon”) de capacidade de 50 mL;
- Vials para eletroforese capilar;
- *Ultra turrax*;

#### 5.12.4 Reagentes e soluções

- Acetonitrila de grau cromatográfico;
- Eletrólito de corrida pH 4,5 (ácido benzenossulfônico 20 mmol L<sup>-1</sup> e ácido aminocaproico 45 mmol L<sup>-1</sup>):

Pesar 0,0877 g de ácido benzenossulfônico e 0,1506 g de ácido aminocaproico em um béquer e diluir em água. Transferir para balão volumétrico de 25 mL e completar volume com água. Filtrar a solução utilizando o sistema de filtração de solvente ou seringa acoplada a membrana de PTFE. Se necessário, ajustar o pH adicionando pequenas massas de um dos dois componentes. Essa solução deve ser preparada no momento do uso.

- Formaldeído (36,5% – 38%);
- Solução de fortificação de íon malonato 120 mg L<sup>-1</sup>
- Solução de fortificação de sulfito derivatizado 10 000 mg L<sup>-1</sup>:  
Pesar 0,1606 g de sulfito de sódio (99% de pureza) em um béquer e dissolver em 805 µL de formaldeído. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e completar volume com água. Essa solução deve ser preparada no momento de uso.
- Solução de hidróxido de sódio 1 mol L<sup>-1</sup>.
- Solução estoque de íon malonato 1000 mg L<sup>-1</sup>;
- Solução extratora/derivatizante (0,3% formaldeído e 70% acetonitrila) para extração sólido-líquido (alternativa 1):  
Em uma proveta, medir 350 mL de acetonitrila. Acrescentar 4,03 mL de formaldeído. Avolumar com água ultrapura até 500 mL. Essa solução é válida por quatro semanas.
- Solução extratora/derivatizante (0,3% formaldeído e 40% acetonitrila) para extração líquido pressurizado (alternativa 2):  
Em uma proveta, medir 200 mL de acetonitrila. Acrescentar 4,03 mL de formaldeído. Avolumar com água ultrapura até 500 mL. Essa solução é válida por quatro semanas.
- Terra diatomácea

### 5.12.5 Preparo da amostra

- (a) Crustáceo congelado:

Remover, se presente, a água de recobrimento (“glaciamento”) da amostra utilizando água corrente. Remover a carapaça, cortar porções da musculatura e homogeneizar em moinho ou processador de alimentos. Analisar imediatamente.

- (b) Crustáceo resfriado:

Remover a carapaça, cortar porções da musculatura e homogeneizar em moinho ou processador de alimentos. Analisar imediatamente.

### 5.12.6 Procedimento

#### 5.12.6.1 Alternativa 1

- (a) Usando balança analítica, pesar  $(5,0 \pm 0,1)$  g de amostra em tubos de polipropileno de capacidade 50 mL;
- (b) Adicionar 10 mL de solução extratora/derivatizante a cada tubo;
- (c) Homogeneizar o conteúdo do tubo com auxílio de *Ultra Turrax*;
- (d) Deixar em banho ultrassônico por 8 min;
- (e) Aquecer em banho-maria a cerca de 90 °C com agitação por 10 min;
- (f) Centrifugar a cerca de 3488 *g* por 10 min à temperatura de 4 °C;
- (g) Transferir 500 µL do extrato para um microtubo e adicionar 500 µL de padrão interno (íon malonato 120 mg L<sup>-1</sup>) e 500 µL de água;
- (h) Centrifugar a amostra por 5 min a cerca de 17 300 *g*;
- (i) Transferir cerca de 500 µL do sobrenadante para os *vials* e injetar no sistema de eletroforese.
- (j) Preparar uma curva de calibração em matriz. Pesar  $(5,0 \pm 0,1)$  g de amostra branca em tubos de polipropileno de 50 mL e fortificar com sulfito derivatizado na faixa de trabalho de 25 a 200 mg L<sup>-1</sup>. Preparar também uma amostra de recuperação fortificada no limite regulatório. Proceder à extração conforme a descrição acima, diluir com padrão interno e injetar no sistema de eletroforese.

#### 5.12.6.2 Alternativa 2

- (a) Usando balança analítica, pesar  $(5,0 \pm 0,1)$  g de amostra em tubos de polipropileno de capacidade 50 mL;
- (b) Adicionar aproximadamente 3 g de terra diatomácea nos tubos contendo as amostras e homogeneizar até completa dispersão com auxílio de um bastão de vidro;
- (c) Transferir a amostra para o tubo extrator com filtro;

- (d) Extrair as amostras em sistema de extração por líquido pressurizado utilizando 30 mL de solução extratora com 0,3% formaldeído e 40% de acetonitrila por 5 min a 90 °C;
- (e) Após extração, resfriar os tubos com os extratos em freezer por 30 min a -18 °C;
- (f) Centrifugar a cerca de 3488 g por 10 min à temperatura de 4 °C;
- (g) Transferir 960 µL do extrato para um microtubo e adicionar 40 µL de padrão interno (íon malonato 1000 mg L<sup>-1</sup>);
- (h) Centrifugar a amostra por 5 min a cerca de 17 300 g;
- (i) Transferir cerca de 500 µL do sobrenadante para os *vials* e injetar no sistema de eletroforese.
- (j) Preparar uma curva de calibração em matriz. Pesar (5,0±0,1) g de amostra branca em tubos de polipropileno de 50 mL e fortificar com sulfito derivatizado na faixa de trabalho de 25 a 200 mg L<sup>-1</sup>. Preparar também uma amostra de recuperação fortificada no limite regulatório. Proceder à extração conforme a descrição acima, diluir com padrão interno e injetar no sistema de eletroforese.

#### 5.12.6.3 Parâmetros instrumentais recomendados para separação

- Injeção hidrodinâmica: 50 mbar/ 5s;
- Comprimento de onda: 210 nm;
- Tensão de separação: -30 kV;
- Temperatura do capilar: 20 °C;
- Condicionamento do capilar: NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> - 15 min; água - 15 min; eletrólito - 15 min;
- Pré-condicionamento entre corridas: eletrólito - 1 min.

#### 5.12.7 Expressão dos resultados

A identificação do analito é feita pelo seu tempo de migração e a quantificação é realizada por padronização interna (50 mg L<sup>-1</sup>, utilizando relação funcional linear de razão das concentrações (eixo x) versus razão de áreas dos picos (eixo y). Expressar o resultado da amostra em “g de SO<sub>2</sub>/100 g”, com três casas decimais utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Dióxido de enxofre, em g/100g} = \frac{\text{Resultado (mg/kg)}}{10.000} \cdot 0,8$$

#### 5.12.8 Referência bibliográfica

Gonçalves, S., Alves, V. R., Pérez, S. O., Ferreira, M., Daguer, H., de Oliveira, M. A. L., Micke, G. A., e Vitali, L. *Rapid method for the determination of citrate, phosphate and sulfite in seafood by capillary zone electrophoresis*. Food Chemistry, vol. 321, p. 126705, 2020.

## 5.13 Determinação do teor de fósforo total

Determinar o teor de fósforo total utilizando um dos métodos descritos na norma ISO 23776, reportando o valor obtido em “g de  $P_2O_5$ /kg” com duas casas decimais.

Amostras “glaciadas” devem ter a água de recobrimento removida com auxílio de água corrente antes do ensaio, tomando-se a precaução de não descongelar substancialmente a amostra.

## 5.14 Histamina

Determinar o teor de histamina em uma amostra composta por nove unidades amostrais utilizando o método descrito na norma NMKL 196 ou na Seção 5.15, reportando o valor de cada unidade amostral e sua média em “mg/kg” como um número inteiro.

Obter uma nova curva de calibração a cada batelada.

## 5.15 Histamina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

### 5.15.1 Princípio

O método se baseia na extração sólido-líquido com partição dos analitos em baixa temperatura, utilizando mistura de solventes orgânicos com baixa proporção de água, acidificados com ácido acético. A separação dos analitos é realizada através da cromatografia líquida em fase reversa, utilizando fase estacionária de cianopropil. A quantificação é feita por espectrometria de massas em modo tandem, utilizando fonte de ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS/MS) e padronização interna.

### 5.15.2 Campo de aplicação

Pescado e produtos derivados.

### 5.15.3 Materiais e equipamentos

- Agitador de tubos tipo vortex;
- Agitador orbital;
- Balança analítica;
- Balões volumétricos de 10 mL;
- Banho de ultrassom;
- Centrífuga refrigerada para tubos de 50 mL;
- Centrífuga refrigerada para microtubos;

- Coluna para cromatografia líquida com fase estacionária de di-isopropil-3-cianopropil silano ligado à sílica hidroxilada, com partículas de diâmetro nominal mínimo de 3,5  $\mu\text{m}$  (Zorbax-Agilent SB-CN, ou similar);
- Dispensador automático de 50 mL;
- Homogeneizador/disruptor de amostras (modelo Ultra Turrax ou similar);
- Micropipetadores e ponteiros para volumes de 2-20  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  e 1000-5000  $\mu\text{L}$ ;
- Microtubos de polipropileno, com capacidade para 1,5 mL;
- Provetas de 250 mL e 500 mL;
- Sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas em modo tandem, com fonte de ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS);
- Tubos de polipropileno, com capacidade para 15 mL e 50 mL (tipo falcon);
- Vials para HPLC de borossilicato com capacidade de 1,5 mL.

#### 5.15.4 Reagentes e soluções

- Solução extratora de acetonitrila:metanol:água (45:45:10 v/v) acidificada com 0,1% ácido acético;
- Fase móvel A (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%);
- Fase móvel B (solução de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico);
- Fase móvel de diluição (fase móvel A:fase móvel B 90:10 v/v);
- Soluções-estoque de histamina 10 000  $\text{mg L}^{-1}$ , preparada em metanol;
- Solução-estoque do padrão interno 1,3-diaminopropano 10 000  $\text{mg L}^{-1}$ , preparada em metanol com baixa proporção de água para dissolução;
- Solução de fortificação de histamina 1000  $\text{mg L}^{-1}$ , preparada em metanol, a partir da solução-estoque.
- Solução de fortificação do padrão interno 1,3-diamino-propano 100  $\text{mg L}^{-1}$ , preparada em metanol, a partir da solução-estoque;

Obs.: os solventes orgânicos devem ser de grau LC-MS e a água deve ser de grau ultrapuro.

### 5.15.5 Preparo da amostra

- (a) Pescado *in natura* e salgado:

Limpar o pescado retirando a pele e escamas, espinha, gordura e vísceras. Retirar porções da musculatura de várias regiões do pescado e cortar as amostras em pedaços menores para processar e homogeneizar em processador.

- (b) Conservas de pescado:

Processar e homogeneizar todo o conteúdo da lata (líquido + parte sólida) em processador.

### 5.15.6 Procedimento de análise

- (a) Utilizando balança analítica, pesar  $2,0 \pm 0,1$  g de amostra em tubos de polipropileno de capacidade 50 mL;
- (b) Fortificar as amostras com 200  $\mu$ L de padrão interno;
- (c) Adicionar 10 mL de solução de extração aos tubos com amostra;
- (d) Homogeneizar o conteúdo de cada tubo por volta de cinco segundos no homogeneizador/disruptor;
- (e) Agitar em mesa agitadora orbital durante 20 min;
- (f) Centrifugar por 10 min à rotação de 3.488g, à temperatura de 4 °C;
- (g) Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL de capacidade e levar ao freezer (à temperatura de cerca de -18 °C) por no mínimo uma hora;
- (h) Centrifugar novamente por 10 min à rotação de 3.488g, à temperatura de 4 °C;
- (i) Transferir 50  $\mu$ L do sobrenadante do extrato para vials e completar com 950  $\mu$ L de fase móvel de diluição (90A:10B). Homogeneizar e injetar no sistema LC-ESI-MS/MS. Caso necessário, ajustar essa diluição à sensibilidade do equipamento.
- (j) Preparar uma curva de calibração em matriz, pesando-se  $2,0 \pm 0,1$  g de amostra “branca” para cada ponto e fortificando com histamina (25 a 200 mg L<sup>-1</sup>) e o padrão interno (100 mg L<sup>-1</sup>). Preparar também uma amostra de recuperação em triplicata, fortificada no limite regulatório. Seguir os procedimentos de extração acima.
- (k) Parâmetros instrumentais: temperatura do forno de coluna: 40 °C; volume de injeção: 10  $\mu$ L; fluxo da fase móvel: 0,5 mL/min; gradiente de eluição: 0-1 min, 90% A; 2-3 min, 80% A; 4 min, 70% A; 5-6 min, 50% A; 7-8 min, 10% A; 9 min, 50% A; 10 min, 90% A; mais 4 min para auto-equilíbrio do sistema;
- (l) Parâmetros de espectrometria de massas: íons precursores:  $m/z$  112,1 (histamina) e  $m/z$  75,1 (1,3-Diaminopropano); transições de quantificação:  $m/z$  54,1 (histamina) e  $m/z$  58,0 (1,3-Diaminopropano); transição de confirmação:  $m/z$  68,1 (histamina).



### 5.15.7 Cálculo e expressão dos resultados

Utilizando o método dos mínimos quadrados, obter, a partir dos cromatogramas dos padrões, uma curva de calibração usando a concentração de histamina em  $\text{mg kg}^{-1}$  versus a razão de áreas dos picos cromatográficos (histamina/padrão interno). Aceitar a curva para valores de  $R^2$  maiores que 0,95. Identificar no cromatograma da amostra o pico com o mesmo tempo de retenção dos padrões de histamina e razão iônica superior a 20% (transição de quantificação/transição de confirmação). Calcular a concentração do analito na amostra utilizando a equação da curva de calibração. Expressar o resultado da amostra em “mg/kg” como um número inteiro.

### 5.15.8 Bibliografia

Luciano Molognoni, Heitor Daguer, Leandro Antunes de Sá Ploêncio, Juliano de Dea Lindner. *A multi-purpose tool for food inspection: simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS*. Talanta, vol. 178, p. 1053-1066, 2018.

## 5.16 Índice de peróxidos

Utilizar o método descrito na norma ISO 3960 para determinação do Índice de Peróxidos na amostra, em “meq de  $\text{O}_2/\text{kg}$ ”. Se necessário, corrigir o valor obtido pelo teor de gordura, expressando o resultado final em “meq de  $\text{O}_2/\text{kg}$  de gordura” com uma casa decimal.

## 5.17 Lipídios totais

Determinar o teor de Lipídios Totais utilizando o método descrito na norma ISO 1443 ou, opcionalmente, na norma NMKL 181 ou na norma AOAC 2008.06. Reportar o valor obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 5.18 Nitritos e Nitratos

Determinar, utilizando o método descrito nas normas NMKL 165 (nitritos e nitratos), NMKL 194 (nitritos e nitratos) ou ISO 2918 (nitritos) e ISO 3091 (nitratos), o teor de nitritos e nitratos na amostra, expressando os resultados obtidos em “g de  $\text{NaNO}_2/100\text{ g}$ ” com três casas decimais. Alternativamente, utilizar o método descrito na seção 1.21.

## 5.19 pH

Determinar o pH no extrato homogeneizado da amostra, conforme metodologia descrita na norma ISO 2917. Reportar o valor obtido com duas casas decimais.

## 5.20 Potássio

Determinar o teor de potássio na amostra utilizando o método descrito na norma AOAC 969.23, reportando o resultado obtido em “mg de K/100 g” como um número inteiro.

Amostras “glaciadas” devem ter a água de recobrimento removida com auxílio de água corrente antes do ensaio, tomando-se a precaução de não descongelar substancialmente a amostra.

Obter uma nova curva de calibração a cada batelada.

## 5.21 Proteína

Determinar o teor de nitrogênio na amostra de acordo com a norma ISO 1871. Multiplicar o valor obtido por 6,25 para obtenção do teor de proteína. Expressar o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais. Alternativamente, utilizar a norma AOAC 992.15.

Amostras “glaciadas” devem ter a água de recobrimento removida com auxílio de água corrente antes do ensaio, tomando-se a precaução de não descongelar substancialmente a amostra.

## 5.22 Relação Umidade/Proteína

A partir dos resultados para o teor de umidade e teor de proteínas, obtidos utilizando-se os métodos estabelecidos neste Manual, calcular a relação U/P, expressando o resultado final com duas casas decimais.

## 5.23 Resíduo mineral fixo (Cinzas)

Determinar o teor de resíduo mineral fixo (Cinzas) utilizando o método descrito na norma ISO 936, reportando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

## 5.24 Sódio

Utilizando o método descrito na norma AOAC 969.23, determinar o teor de sódio na amostra. Reportar o resultado obtido em “mg de Na/100 g” como um número inteiro.

Amostras “glaciadas” devem ter a água de recobrimento removida com auxílio de água corrente antes do ensaio, tomando-se a precaução de não descongelar substancialmente a amostra.

Obter uma nova curva de calibração a cada batelada.

## 5.25 Umidade

Determinar o teor de Umidade utilizando o método descrito na norma ISO 1442, reportando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal. Alternativamente, utilizar o método descrito na norma AOAC 2008.06.

Amostras “glaciadas” devem ter a água de recobrimento removida com auxílio de água corrente antes do ensaio, tomando-se a precaução de não descongelar substancialmente a amostra.

### 5.25.1 Peixe salgado e salgado seco

Determinar o teor de Umidade utilizando o método descrito na norma AOAC 950.46B item (a), reportando o resultado obtido em “g/100 g” com uma casa decimal.

Bacalhau espalmado e similares (p. ex. Saithe) devem ser amostrados e analisados de acordo com o método *cross section* descrito no Codex Stan 167-1989.

# Parte II

## Métodos microbiológicos



# Métodos normalizados

\*\*\*

## 6.1 Água de abastecimento industrial e gelo

Determinação	Técnica	Método
Coliformes totais	Membrana filtrante	ISO 9308-1
<i>Clostridium perfringens</i>	Membrana filtrante	ISO 14189
<i>Enterococcus</i> spp.	Membrana filtrante	ISO 7899-2
<i>Escherichia coli</i>	Membrana filtrante	ISO 9308-1
Microrganismos heterotróficos estritos e não viáveis	Contagem por inoculação em profundidade	SMWW.2882.188
Microrganismos viáveis a 36 °C	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 6222
Microrganismos viáveis a 22 °C	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 6222
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Membrana filtrante	ISO 16266

## 6.2 Carnes e produtos cárneos

Determinação	Técnica	Método
<i>Bacillus cereus</i>	Contagem por inoculação em superfície	ISO 7932
<i>Campylobacter</i> spp.	Contagem por inoculação em superfície	ISO 10272-2
<i>Clostridium perfringens</i>	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 7937
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Contagem por inoculação em profundidade	Capítulo 7 deste manual
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/02-09/89C
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	APHA chapter 9.
Coliformes totais	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 4831
Enterobacteriaceae	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 21528-2
Enterobacteriaceae	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/06-09/97
<i>Escherichia coli</i>	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 16649-2
<i>Escherichia coli</i>	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 16649-3
<i>Escherichia coli</i>	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 7251
<i>Escherichia coli</i>	Contagem por inoculação em superfície	AOAC 998.08
Esterilidade comercial	Incubação da amostra	Capítulo 9 deste manual
<i>Listeria monocytogenes</i>	Deteção e isolamento	ISO 11290-1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Deteção presuntiva por reação em cadeia de polimerase	AFNOR QUA 18/05-07/08
<i>Listeria monocytogenes</i>	Deteção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/11-03/04

(Continua)

Determinação	Técnica	Método
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2004.02
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AFNOR 3M 01/15-09/16
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção e isolamento	MLG 8
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AOAC 2016.08
Mesófilos aeróbios viáveis a 30 °C	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 4833-1
Mesófilos aeróbios viáveis a 30 °C	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/01-09/89
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção e isolamento	ISO 6579-1
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação em cadeia de polimerase	AFNOR QUA 18/03-11/02
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/16-09/05
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/32-10/11
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AOAC 2013.09
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2011.03
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Contagem por inoculação em superfície	ISO 6888-1
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 6888-3
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/09-04/03
<i>Staphylococcus aureus</i>	Contagem por inoculação em superfície	AOAC 2003.11
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AFNOR 3M 01/16-11/16

(Continua)



Determinação	Técnica	Método
Sete principais <i>Escherichia coli</i> produtoras de toxina Shiga (STECs)	Detecção e isolamento	MLG 5C
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção e isolamento	MLG 4
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AOAC 2016.01
Detecção de <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>Salmonella</i> Enteritidis	Sorotipificação	ISO 6579-3

## 6.3 Leite e produtos lácteos

Determinação	Técnica	Método
<i>Bacillus cereus</i>	Contagem por inoculação em superfície	ISO 7932
Bactérias acidófilas específicas	Contagem por inoculação em profundidade	IDF 117 ISO 7889
Bolores e leveduras	Contagem por inoculação em profundidade	IDF 94 ISO 6611
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Contagem por inoculação em profundidade	Capítulo 7 deste manual
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/02-09/89C
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	APHA chapter 9.
Coliformes totais a 30°C	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 4832
Coliformes totais a 30°C	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 4831
Coliformes totais a 30°C	Contagem por inoculação em superfície	AOAC 991.14
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção e isolamento	ISO 11290-1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação em cadeia de polimerase	AFNOR QUA 18/05-07/08
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/11-03/04
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2004.02
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AFNOR 3M 01/15-09/16
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AOAC 2016.08
Mesófilos aeróbios viáveis a 30 °C	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 4833-1

(Continua)

Determinação	Técnica	Método
Mesófilos aeróbios viáveis a 30 °C	Contagem por inoculação em superfície	ISO 4833-2
Mesófilos aeróbios viáveis a 30 °C	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/01-09/89
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção e isolamento	ISO 6579-1
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação em cadeia de polimerase	AFNOR QUA 18/03-11/02
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/16-09/05
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/32-10/11
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2011.03
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AFNOR 3M 01/16-11/16
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AOAC 2016.01
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Contagem por inoculação em superfície	ISO 6888-1
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/09-04/03
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 6888-3
Enterobacteriaceae	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/06-09/97
Enterobacteriaceae	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 21528-2
<i>Escherichia coli</i>	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 16649-2
<i>Escherichia coli</i>	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 7251
<i>Escherichia coli</i>	Contagem por inoculação em superfície	AOAC 998.08

(Continua)

Determinação	Técnica	Método
Enterotoxinas estafilocóccicas	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2007.06

## 6.4 Mel e produtos apícolas

Determinação	Técnica	Método
Bolores e leveduras	Contagem por inoculação em profundidade	IDF 94 ISO 6611
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	APHA chapter 9.
<i>Paenibacillus larvae</i> subs. <i>larvae</i>	Detecção e isolamento	Capítulo 10 deste manual
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção e isolamento	ISO 6579-1
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/16-09/05
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação em cadeia de polimerase	AFNOR QUA 18/03-11/02
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2011.03
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/32-10/11

## 6.5 Ovos e derivados

Determinação	Técnica	Método
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	APHA chapter 9.
Mesófilos aeróbios viáveis a 30 °C	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 4833-1
Mesófilos aeróbios viáveis a 30 °C	Contagem por inoculação em superfície	ISO 4833-2
Mesófilos aeróbios viáveis a 30 °C	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/01-09/89
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção e isolamento	ISO 6579-1
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação em cadeia de polimerase	AFNOR QUA 18/03-11/02
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/16-09/05
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2011.03
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AFNOR 3M 01/16-11/16
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AOAC 2016.01
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/32-10/11
<i>Staphylococcus aureus</i>	Detecção e isolamento	ISO 6888-3
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 6888-3
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Contagem por inoculação em superfície	ISO 6888-1
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/09-04/03
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção e isolamento	ISO 11290-1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação em cadeia de polimerase	AFNOR QUA 18/05-07/08

(Continua)

Determinação	Técnica	Método
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/11-03/04
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2004.02
Enterobacteriaceae	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 21528-2
Enterobacteriaceae	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/06-09/97

## 6.6 Pescados e produtos da pesca

Determinação	Técnica	Método
<i>Bacillus cereus</i>	Contagem por inoculação em superfície	ISO 7932
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Contagem por inoculação em profundidade	Capítulo 7 deste manual
Coliformes termotolerantes a 45 °C	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/02-09/89C
<i>Escherichia coli</i>	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 16649-3
<i>Escherichia coli</i>	Contagem por inoculação em superfície	AOAC 998.08
<i>Escherichia coli</i>	Contagem por inoculação em profundidade	ISO 16649-2
<i>Escherichia coli</i>	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	ISO 7251
Esterilidade comercial	Incubação da amostra	Capítulo 9 deste manual
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção e isolamento	ISO 11290-1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação em cadeia de polimerase	AFNOR QUA 18/05-07/08
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/11-03/04
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2004.02
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AFNOR 3M 01/15-09/16
<i>Listeria monocytogenes</i>	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AOAC 2016.08
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção e isolamento	ISO 6579-1
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação em cadeia de polimerase	AFNOR QUA 18/03-11/02
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/16-09/05

(Continua)



Determinação	Técnica	Método
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AFNOR BIO 12/32-10/11
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AOAC 2013.09
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por reação imunoenzimática	AOAC 2011.03
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AFNOR 3M 01/16-11/16
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AOAC 2016.01
<i>Salmonella</i> spp.	Detecção presuntiva por amplificação do DNA e bioluminescência	AFNOR 3M 01/16-11/16
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Contagem por inoculação em superfície	ISO 6888-1
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Contagem por inoculação em superfície	AFNOR 3M 01/09-04/03
<i>Vibrio cholerae</i>	Detecção e isolamento	ISO 21872-1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Enumeração por Número Mais Provável (NMP)	Capítulo 8 deste manual
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Detecção e isolamento	ISO 21872-1

# Contagem de Coliformes Termotolerantes e Coliformes Totais em alimentos

\*\*\*

## 7.1 Princípio

**Prova presuntiva** Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob teste em ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA) e posterior contagem das colônias suspeitas. O ágar cristal violeta vermelho neutro bile apresenta em sua composição sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos e vermelho neutro, um indicador de pH que revela a fermentação da lactose pelos microrganismos presentes. A adição de sobrecamada visa à prevenção do crescimento e do espraçamento de colônias na superfície do ágar.

**Prova confirmativa para coliformes totais** A confirmação da presença de coliformes totais é feita por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo verde brilhante bile 2% lactose e posterior incubação a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a fermentação da lactose presente no meio. O caldo verde brilhante bile 2% lactose apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante) responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos.

**Prova confirmativa para coliformes termotolerantes** A confirmação da presença de coliformes termotolerantes é feita por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo EC e posterior incubação em temperatura seletiva de  $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , em banho-maria com agitação ou circulação de água. A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a fermentação da lactose presente no meio. O caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante impedindo a sua acidificação. A seletividade é devido a presença de sais biliares responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos.

## 7.2 Campo de aplicação

Neste capítulo está descrito método de contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes aplicável a amostras de matérias-primas, alimentos e rações, devendo ser

utilizada quando o limite máximo tolerado for igual ou superior a 100 UFC/g ou mL.

### 7.3 Materiais e equipamentos

- Vidrarias e equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;
- Banho-maria com movimentação de água (agitação ou circulação).

### 7.4 Meios de cultura, reagentes e soluções

- Insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;
- Ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA);
- Caldo verde brilhante bile 2% lactose;
- Caldo EC;
- Solução salina peptonada 0,1%.

### 7.5 Preparo da amostra

- (a) Após seu recebimento no laboratório as amostras devem ser mantidas até o momento do início da análise de acordo com norma ISO específica.
- (b) Pesar 25 g  $\pm$  5% ou pipetar 25 mL  $\pm$  5% da amostra.
- (c) Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%.
- (d) Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”.

Esta é a diluição  $10^{-1}$

### 7.6 Procedimentos da análise

#### 7.6.1 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

#### 7.6.2 Prova presuntiva

A partir da diluição inicial ( $10^{-1}$ ), efetuar as demais diluições desejadas em solução salina peptonada 0,1%. No caso de produtos líquidos a inoculação pode ser realizada a partir da diluição  $10^0$ .

Sempre utilizar mais de uma placa, seja uma duplicata da mesma diluição, seja duas ou mais de diluições diferentes.

Inocular 1 mL de cada diluição desejada em placas de Petri esterilizadas. Adicionar a cada placa cerca de 15 mL de VRBA previamente fundido e mantido a 46 °C–48 °C em banho-maria. Homogeneizar cuidadosamente e deixar em repouso até total solidificação

do meio. Adicionar, sobre cada placa, cerca de 10 mL de VRBA previamente fundido e mantido a 46 °C–48 °C em banho-maria, formando uma segunda camada de meio. Deixar solidificar.

Após completa solidificação do meio, incubar as placas em posição invertida em temperatura de 35 °C  $\pm$  1 °C por 18 a 24 horas.

As contagens deverão ser realizadas imediatamente após o período de incubação das placas. Na impossibilidade de realizar a contagem imediatamente após o período de incubação, manter as placas sob refrigeração em temperatura de 4 °C a 7 °C por um período não superior a 24 horas. *Esse procedimento não deve tornar-se uma prática rotineira.*

As colônias deverão ser contadas com o auxílio de contador de colônias, o qual deverá:

- estar equipado com placa de vidro ou acrílico, com diâmetro compatível com o das placas utilizadas, dividido milimetricamente em quadrantes com 1 cm<sup>2</sup> de área e com iluminação artificial uniforme;
- ter capacidade para aumento de 1 a 2 vezes, com dispositivo de regulagem de altura para melhor ajuste do foco, podendo ainda dispor de sistema eletrônico ou manual de registro das contagens; e
- estar localizado em local onde não haja incidência direta de luz sobre a plataforma de apoio da placa, para evitar possíveis enganos na identificação das colônias.

Utilizar o estereoscópio para observação de características morfológicas das colônias, para diferenciar microrganismos de partículas da amostra ou do meio e para seleção e isolamento de colônias.

Verificar sempre a proporcionalidade dos resultados obtidos nas diluições sucessivas.

Selecionar placas que contenham entre 15 e 150 colônias.

Contar as colônias que apresentarem morfologia típica de coliformes, ou seja, colônias róseas com 0,5 a 2 mm de diâmetro rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio. Anotar os resultados de contagem.

Contar separadamente colônias típicas e atípicas e submeter 3 a 5 colônias de cada uma às provas confirmativas.

### 7.6.3 Provas confirmativas

#### 7.6.3.1 *Coliformes totais*

Inocular cada uma das colônias típicas e atípicas selecionadas em tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose. Incubar os tubos a 35 °C  $\pm$  1 °C por 24 a 48 horas.

A presença de coliformes totais é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham) ou efervescência quando agitado gentilmente. Anotar o resultado obtido para cada colônia, bem como a diluição utilizada.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

#### 7.6.3.2 *Coliformes termotolerantes*

Inocular as culturas suspeitas de coliformes termotolerantes em tubos contendo caldo EC. Incubar os tubos a 45 °C  $\pm$  0,2 °C por 24 a 48 horas em banho maria com agitação.

A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham) ou efervescência quando agitado gentilmente. Anotar o resultado obtido para cada tubo, bem como a diluição utilizada.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

## 7.7 Expressão dos resultados

Para alimentos comercializados no MERCOSUL os resultados da contagem de coliformes termotolerantes correspondem à determinação “coliformes a 45 °C”.

A aplicação de procedimentos de controle durante o processo analítico visa à garantia da confiabilidade do resultado final, assegurando a sua repetibilidade, precisão e exatidão.

A precisão e a exatidão do método também dependerão da correta observação e aplicação dos procedimentos padronizados estabelecidos para a área analítica.

A garantia da validade dos resultados da contagem estará assegurada quando os resultados dos controles indicarem não haver qualquer falha em nenhuma etapa do processo analítico.

Para o cálculo final das contagens de coliformes totais e termotolerantes, proceder de acordo com o estabelecido na ISO específica.

Expressar o resultado em UFC/g ou ml.

## 7.8 Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de leite e produtos lácteos*. Ministério da Agricultura e do Abastecimento/ Secretaria de Defesa Animal/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/ Divisão de Normas Técnicas. Brasília, D.F. Série Regulamentação Técnica de Identidade e Qualidade de Produtos de Origem Animal; n.2, 1997, 77p.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganismos de los Alimentos - Técnicas de Análisis Microbiológico*. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. V.1. 2. ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.

Hitchins, A. D.; Feng, P.; Watkins W. D.; Rippey S. R.; Chandler L. A. *Escherichia coli and the Coliform bacteria*. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.

Kornacki, J. L.; Johnson, J. L. *Enterobacteriaceae, Coliforms and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p. 69-82.

# Número Mais Provável de *Vibrio parahaemolyticus*

\*\*\*

## 8.1 Princípio

### 8.1.1 Provas presuntivas

**Enriquecimento em caldo seletivo** Inoculação em meio de cultura de enriquecimento seletivo caldo glicose sal Teepol (GSTB) ou caldo Horie arabinose violeta de etila (HAEB), em que a presença de *Vibrio parahaemolyticus* é evidenciada pela turvação do meio após a incubação. Em sua composição, o meio GSTB apresenta teepol, solução aquosa de sulfatos de sódio alcalinos primários que atuam na membrana citoplasmática de microrganismos Gram positivos, inibindo o seu crescimento e formalina que funciona como um agente antimicrobiano. Como o *Vibrio parahaemolyticus* é halófilo obrigatório, os dois meios contém 3% de cloreto de sódio.

**Isolamento em ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (TCBS)** Isolamento se realiza em ágar TCBS, meio seletivo altamente alcalino que contém elevada concentração de tiosulfato e citrato de sódio, responsáveis pela inibição do crescimento das enterobactérias presentes. A bile e o colato de sódio inibem os enterococos. Como indicador de pH, o meio possui o azul de timol e o azul de bromotimol que alteram a cor do meio para amarelo quando da formação de ácido pelos microrganismos que fermentam a sacarose contida no meio.

### 8.1.2 Provas de identificação

A identificação de *Vibrio parahaemolyticus* é feita por meio de provas bioquímicas, sorológicas, morfológicas e tintoriais.

## 8.2 Campo de aplicação

Neste capítulo está descrito método para a determinação do número mais provável de *Vibrio parahaemolyticus* aplicável à amostras de amostras de pescado e derivados.

## 8.3 Materiais e equipamentos

Vidraria e equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

## 8.4 Meios de cultura, reagentes e soluções

- Insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;
- Ágar Müeller-Hinton sal 3%;
- Ágar nutriente sal 3%;
- Ágar gelatina sal 3%;
- Ágar soja triptona sal 3%;
- Ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (TCBS);
- Ágar ferro três açúcares (TSI) sal 3% ou Ágar Kligler sal 3%;
- Ágar motilidade sal 3
- Caldo glicose sal teepol (GSTB) ou Caldo Horie arabinose violeta de etila (HAEB);
- Caldo peptonado sem sal;
- Caldo peptonado sal 3%, 6%, 8% e 10%;
- Caldo ONPG sal 3%;
- Caldo vermelho de fenol manitol sal 3%;
- Caldo vermelho de fenol sacarose sal 3%;
- Caldo vermelho de fenol arabinose sal 3%;
- Caldo vermelho de fenol arginina sal 3%;
- Caldo vermelho de fenol lisina sal 3%;
- Meio O/F (Hugh-Leifson) sal 3%;
- Solução salina peptonada 0,1% sal 3%;
- Solução fisiológica (NaCl 0,85%);
- Agente vibriostático O 129 10 µg;
- Agente vibriostático O 129 150 µg;
- Arabinose;
- L-arginina;

- L-lisina;
- Manitol;
- Sacarose;
- Óleo mineral ou parafina líquida estéreis;
- Reativo para Oxidase (oxalato de *p*-amino-dimetilanilina ou *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenileno-diamina);
- Teepol;
- O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ou p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo;
- Etanol 96%;
- Reagentes para coloração de Gram.

## 8.5 Preparo da amostra

Após seu recebimento no laboratório as amostras devem ser mantidas até o momento do início da análise de acordo com norma ISO específica.

- (a) Pesar 50 g da amostra;
- (b) Adicionar 450 mL de Caldo peptonado sal 3%;
- (c) Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”.

Esta é a diluição  $10^{-1}$ .

## 8.6 Procedimento da análise

### 8.6.1 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

### 8.6.2 Provas presuntivas

#### 8.6.2.1 Inoculação em caldo de enriquecimento seletivo

A partir da diluição inicial ( $10^{-1}$ ), efetuar as demais diluições desejadas em Caldo peptonado sal 3% (no mínimo mais duas diluições). Inocular volumes de 1 mL de cada uma das diluições desejadas em séries de 3 tubos contendo GSTB ou caldo HAEB. Incubar os tubos a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 horas a 24 horas.

A presença de turvação do meio indica a suspeita da presença de *Vibrio parahaemolyticus*. Anotar o número de tubos de cada série que apresentaram turvação.



### 8.6.2.2 Isolamento em ágar tiosulfato citrato sais biliares (TCBS)

A partir de cada tubo de GSTB ou HAEB que apresentar turvação, sem agitá-lo e com auxílio de uma alça de níquel-cromo, de platina ou descartável estéril, retirar uma alçada do crescimento da superfície e estriá-la sobre a superfície seca de ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (TCBS). Incubar as placas em posição invertida a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Verificar o aparecimento de colônias arredondadas, opacas, de cor azul esverdeada, com 2 a 3 mm de diâmetro, típicas de *Vibrio parahaemolyticus*. Quando não houver colônias suspeitas, o resultado será negativo para o tubo de origem.

### 8.6.3 Provas preliminares para identificação de *Vibrio parahaemolyticus*

De cada placa, selecionar de 2 a 3 colônias típicas e transferí-las simultaneamente para tubos contendo caldo peptonado sal 3% e ágar nutriente sal 3% inclinado. Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas.

#### 8.6.3.1 Coloração de Gram

A partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal 3%, proceder à coloração de Gram de acordo com as instruções descritas no Capítulo 11 – Procedimentos de Coloração.

O *Vibrio parahaemolyticus* se apresenta como bastonetes retos ou curvos Gram negativos. Em culturas antigas, pode se apresentar em forma de cocobacilos.

#### 8.6.3.2 Crescimento com 8% de sal e sem sal

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, transferir, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, uma alçada para um tubo contendo caldo peptonado sem sal e caldo peptonado sal 8%. Incubar os tubos a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, verificar a presença de turvação indicativa da ocorrência de crescimento. O *Vibrio parahaemolyticus* não cresce no meio sem sal e cresce no meio com 8% de sal.

#### 8.6.3.3 Prova da oxidase

A partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal 3%, usando palitos de madeira, de plástico descartáveis, pipetas Pasteur, ou alça de platina, realizar a prova de oxidase espalhando a cultura sobre papel filtro impregnado com o reativo para oxidase ou sobre tiras de papel para teste de oxidase, comercialmente disponíveis.

Fazer a leitura em 10 a 20 segundos. Após este tempo, podem ocorrer reações falso-positivas. O aparecimento de cor azul (quando é usado o reativo *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenileno-diamina) ou de cor vermelha intensa (quando o reativo usado é o oxalato de *p*-amino-dimetilanilina) é indicativo de reação positiva. O *Vibrio parahaemolyticus* é oxidase positiva.

Obs: Não utilizar alças de níquel-cromo ou alças de aço para realizar a prova de oxidase, pois traços de óxido de ferro na superfície flambada podem produzir reação falso-positiva.

#### 8.6.3.4 Caldo vermelho de fenol sacarose sal 3%

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, inocular, com auxílio de alça de níquel-cromo, um tubo contendo caldo vermelho de fenol sacarose sal 3%. Cobrir o meio com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéreis. Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração do meio, de vermelho para amarelo, devido à fermentação da sacarose e produção de ácido. O *Vibrio parahaemolyticus* não altera a coloração do meio, pois não é capaz de fermentar a sacarose.

#### 8.6.3.5 Ágar ferro três açúcares sal 3% (TSI) ou Ágar Kligler ferro sal 3%

A partir do cultivo mantido no ágar nutriente sal 3% inclinado, com auxílio de agulha de platina ou níquel-cromo, inocular, mediante picada central em toda a profundidade do ágar e estriando a superfície inclinada, tubos com ágar TSI sal 3% ou ágar Kligler ferro sal 3%. Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

O *Vibrio parahaemolyticus* apresenta base ácida (amarela), sem gás, sem produção de  $\text{H}_2\text{S}$  e bisel alcalino (vermelho).

#### 8.6.3.6 Teste ONPG

A partir da cultura em TSI, inocular uma alçada espessa em tubo contendo 0,5 mL de caldo ONPG sal 3%. Incubar em banho-maria a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas. Examinar os tubos, verificando o aparecimento ou não de cor amarela, indicativa de reação positiva. Se o caldo permanecer incolor, a reação é negativa. O *Vibrio parahaemolyticus* é ONPG negativo.

### 8.6.4 Provas adicionais para identificação de *Vibrio parahaemolyticus*

As colônias que apresentarem comportamento compatível com *Vibrio parahaemolyticus* nas provas preliminares deverão ser submetidas às provas adicionais.

#### 8.6.4.1 Teste do crescimento a $42^{\circ}\text{C}$

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo peptonado sal 3%. Incubar a  $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Após o período de incubação, observar a presença de turvação dos meios. O *víbrio parahaemolyticus* cresce à temperatura de  $42^{\circ}\text{C}$ .

#### 8.6.4.2 Ágar gelatina sal 3%

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular uma placa de Petri contendo ágar gelatina sal 3% (cada placa pode ser dividida em até seis setores e cada cultivo pode ser inoculado no centro de cada setor). Incubar as placas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas.

Colocar as placas em refrigeração por alguns minutos antes e então realizar a leitura, o que facilita a visualização do halo. O aparecimento de um halo opaco ao redor

do crescimento indica a presença da gelatinase. O *Vibrio parahaemolyticus* é gelatinase positiva.

#### 8.6.4.3 Teste da motilidade

A partir da cultura mantida no ágar nutriente sal 3% inclinado, com auxílio de agulha de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, através de picada central, inocular um tubo contendo ágar motilidade sal 3%. Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Um crescimento bacteriano difuso ao redor da picada caracteriza motilidade positiva. O *Vibrio parahaemolyticus* apresenta motilidade positiva.

#### 8.6.4.4 Prova de Hugh-Leifson glicose (OF)

A partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal 3%, inocular com auxílio de agulha de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, dois tubos contendo meio OF glicose (Hugh-Leifson) sal 3%. Cobrir um dos tubos com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril. Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, verificar a viragem de cor dos meios de verde para amarelo e a presença de bolhas de gás nos meios. A cor amarela nos dois tubos significa fermentação da glicose. A presença de cor amarela somente no tubo sem óleo mineral significa utilização oxidativa da glicose. O *Vibrio parahaemolyticus* fermenta a glicose sem produção de gás, ou seja, os dois tubos devem apresentar coloração amarela.

#### 8.6.4.5 Descarboxilação da lisina

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo Caldo vermelho de fenol lisina sal 3%. Inocular também um tubo contendo meio base (sem adição do aminoácido) que servirá de controle. Cobrir os tubos com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril. Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por, no máximo, quatro dias, juntamente com um tubo de Caldo vermelho de fenol lisina sal 3% não inoculado, que servirá de controle negativo.

Examinar os tubos todos os dias. Durante o período de incubação, a cor do meio passa para amarela devido à fermentação da glicose, e, ocorrendo a descarboxilação da lisina, o meio retorna à cor púrpura devido à produção de aminas primárias e dióxido de carbono. O tubo controle, sem aminoácido, deve virar para amarelo e assim permanecer. O *Vibrio parahaemolyticus* descarboxila a lisina.

#### 8.6.4.6 Hidrólise da arginina

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo arginina sal 3%. Inocular também um tubo contendo o meio base (sem adição do aminoácido) que servirá de controle. Cobrir os tubos com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril. Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por, no máximo, quatro dias, juntamente com um tubo de caldo arginina sal 3% não inoculado, que servirá de controle negativo.

Examinar os tubos todos os dias. Durante o período de incubação, a cor do meio passa para amarela devido à fermentação da glicose, ocorrendo hidrólise da arginina o meio retorna a cor púrpura devido à produção de aminas primárias e dióxido de carbono. O tubo controle, sem aminoácido, deve virar para amarelo e assim permanecer. O *Vibrio parahaemolyticus* não hidrolisa a arginina.

#### 8.6.4.7 Prova da fermentação do manitol e arabinose

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo vermelho de fenol manitol sal 3% e outro tubo contendo caldo vermelho de fenol arabinose sal 3%. Cobrir o meio com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril. Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração dos meios de vermelho para amarelo, devido à fermentação dos açúcares e consequente produção de ácido. 99% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fermentam o manitol. 50% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fermentam a arabinose.

#### 8.6.4.8 Teste do halofilismo

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular tubos contendo caldo peptonado sal 6% e 10%. Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Após o período de incubação, observar a presença de turvação nos meios. O *Vibrio parahaemolyticus* cresce a 6% de sal e não cresce, ou apresenta crescimento discreto, a 10% de sal.

#### 8.6.4.9 Sensibilidade do agente vibriostático O/129

Esta prova é utilizada como diferencial entre *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

Embeber um “swab” previamente esterilizado com a cultura suspeita mantida em caldo peptonado sal 3% e inocular uma placa contendo ágar Mueller-Hinton sal 3% ou ágar soja triptona sal 3%, espalhando bem o inóculo, de forma a obter um crescimento o mais homogêneo possível. Deixar as placas absorverem o inóculo. Colocar um disco do agente vibriostático O/129 com concentração de 10 µg e um disco de concentração de 150 µg. Incubar as placas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

O *Vibrio parahaemolyticus* é resistente à concentração de 10 µg de agente vibriostático O/129 enquanto o *V. vulnificus* é sensível. Todos os vibrios são sensíveis à concentração de 150 µg do agente O/129.

## 8.7 Expressão dos resultados

Serão consideradas como positivas para *Vibrio parahaemolyticus* as culturas que apresentarem os seguintes resultados nas provas adicionais de identificação:

- Motilidade positiva
- Hugh Leifson (OF) glicose fermentativo
- Descarboxilação da lisina positiva
- Hidrólise da arginina negativa
- Crescimento a  $42^{\circ}\text{C}$  positivo
- Fermentação do manitol positivo
- Fermentação da arabinose positivo

- Resistente no teste de Sensibilidade ao Agente Vibriostático O/129 a 10 µg
- Sensível no teste de Sensibilidade ao Agente Vibriostático O/129 a 150 µg
- Crescimento com formação de halo no teste Ágar gelatina sal 3%
- Halofilismo (6% sal) positivo
- Halofilismo (8% sal) positivo
- Halofilismo (10% sal) negativo ou crescimento discreto

A partir da combinação de tubos com resultado positivo em cada série, calcular o Número Mais Provável de acordo com a tabela da norma ISO específica, compatível com o número de séries, tubos e massas utilizados. Expressar o valor obtido em NMP/g.

## 8.8 Bibliografia

Elliot, E. L.; Kaysner, C. A.; Jackson, L. e Cebule, T. A. *V. cholerae*, *V. parahae-molyticus*, *V. vulnificus* and *Others vibrio spp.* In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm2006949.htm>.

MacFaddin, J. F. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3ed. Lippincott Williams & Wilkins (Ed.), Philadelphia. 2000. p. 160-169.

# Teste de Esterilidade Comercial para Alimentos de Baixa Acidez - $\text{pH} > 4,6$

\*\*\*

## 9.1 Princípio

**Pré-incubação** Baseia-se na incubação das amostras nas temperaturas de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pelo período de 10 dias e a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pelo período de 5 a 7 dias, objetivando a detecção de crescimento bacteriano com formação de gás, evidenciado pelo tufamento da embalagem e na verificação de possíveis microfugas.

**Semeadura e incubação** Baseia-se na utilização de meios líquidos não seletivos com capacidade de promover o crescimento de microrganismos por meio da incubação em aerobiose e anaerobiose, em temperaturas ideais para o desenvolvimento de microrganismos mesófilos e termófilos.

**Coloração pelo método de Gram e de esporos** Baseia-se na observação microscópica das características morfológicas e tintoriais dos microrganismos presentes e de seus esporos.

**Prova da Catalase** Baseia-se na verificação da capacidade do microrganismo em teste produzir a enzima catalase, que decompõe o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, o que é evidenciado por meio da formação de borbulhas.

**Prova da termofilia estrita** Baseia-se na verificação da germinação e crescimento dos esporos nas temperaturas de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  para certificação da exigência absoluta de elevada temperatura para seu desenvolvimento. A germinação dos esporos a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  indica a capacidade mesofílica do microrganismo. O crescimento a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  indica a capacidade termofílica facultativa do microrganismo. O crescimento somente a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  indica a capacidade termofílica estrita do microrganismo.

## 9.2 Campo de aplicação

Neste capítulo está descrito método para a verificação da eficácia do processo de esterilização em amostras de alimentos comercialmente estéreis de baixa acidez.

## 9.3 Materiais e equipamentos

- Vidraria e equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;
- Abridores metálicos estéreis;
- Pinças estéreis.

## 9.4 Meios de cultura, reagentes e soluções

- Insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;
- Caldo de carne cozida (CCC) ou Caldo Tarozzi;
- Caldo glicose triptona;
- Ágar glicose triptona;
- Ágar nutriente;
- Ágar nutriente com sulfato de manganês;
- Ágar para esporulação;
- Ágar cérebro-coração (ABHI);
- Corantes para a coloração de esporos;
- Corantes para a coloração de Gram;
- Peróxido de hidrogênio 3%;
- Vaspar ou vaselina ou óleo mineral ou parafina líquida.

## 9.5 Preparo da amostra

Após seu recebimento no laboratório as amostras devem ser mantidas até o momento do início da análise de acordo com norma ISO específica.

No recebimento de amostras de conservas enlatadas, verificar a integridade das embalagens, observando se estão amassadas, levemente tufadas ou com microfugas aparentes. Quando forem observadas quaisquer dessas alterações, proceder conforme estabelecido em 9.6.3.

Amostras visualmente normais devem ser pré incubadas, após a realização dos procedimentos abaixo:

- (a) Retirar cuidadosamente a cinta de identificação;

- (b) Lavar a lata com água e detergente, usando esponja;
- (c) Secar com flanela limpa e seca;
- (d) Identificar a amostra com o número de protocolo do laboratório;
- (e) Recolocar a cinta de identificação usando fita adesiva para prendê-la na amostra.

## 9.6 Procedimento da análise

### 9.6.1 Pré-incubação

Forrar a prateleira das estufas com papel filtro e incubar as amostras de forma que a recravação fique em contato com o papel filtro. Incubar em estufa a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 10 dias e a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por um período de 5 a 7 dias.

Após o período de pré-incubação verificar se os recipientes não sofreram tufamento. Verificar se o papel filtro apresenta manchas que possam evidenciar a presença de microfugas ou vazamentos.

**Amostras sem alteração** Registrar como “sem alteração” quando não se observar qualquer alteração dos recipientes.

**Amostras que sofreram alteração durante a pré-incubação** Registrar como “com alteração” quando qualquer alteração for detectada. Ao final da pré-incubação, quando o papel filtro sobre o qual ficaram incubadas as latas estiver manchado, evidenciando a presença de microfugas, descrever a alteração.

Eventualmente, se houver demanda específica, submeter à respectiva amostra à análise de aeróbios e anaeróbios, mesófilos ou termófilos, de acordo com a temperatura da pré-incubação. Proceder conforme descrito em 9.6.3 para a análise destas amostras.

### 9.6.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

### 9.6.3 Amostras tufadas

As amostras que derem entrada no laboratório com evidências de tufamento e estiverem acompanhadas de ofício com solicitação de análise especial serão analisadas imediatamente, devendo ser preparadas conforme as instruções descritas abaixo:

- (a) Fazer desinfecção da embalagem com algodão embebido em solução desinfetante e em seguida com etanol 70% ou etanol 70 °GL;
- (b) Deixar secar;
- (c) Posicionar a lata com borda não codificada para cima e costura lateral voltada para o lado oposto ao analista;



- (d) Colocar um chumaço de algodão embebido em solução desinfetante, previamente aprovada pelos testes do laboratório, no local onde será iniciada a abertura da embalagem;

Obs.: Esse procedimento tem o objetivo de proteger o ambiente e o analista contra uma possível contaminação proveniente do alimento em análise pela expulsão de gases e/ou líquidos presentes no recipiente no momento do rompimento da hermeticidade. Outros cuidados como o uso de luvas, máscara, toucas, etc. também deverão ser adotados.

- (e) Usando um abridor de latas metálico, previamente esterilizado, abrir um pequeno orifício sob o chumaço de algodão;
- (f) Deixar em repouso sem retirar a proteção de algodão sobre o orifício até que a pressão interna do produto esteja equilibrada com a externa;
- (g) Com outro abridor estéril, abrir cuidadosamente a lata e transferir porções do conteúdo, tomadas do lado oposto ao local do orifício inicialmente feito, para os meios de cultivo indicados;
- (h) Após a retirada das alíquotas estabelecidas pela metodologia específica, fechar cuidadosamente a lata e acondicioná-la em saco plástico autoclavável, fechando-o com fita adesiva. A amostra, assim embalada, deverá ser imediatamente descartada conforme norma específica do laboratório.

As amostras alteradas que chegarem desacompanhadas de ofício com solicitação específica não serão analisadas. Fazer constar no Certificado Oficial de Análise a informação do motivo da não aceitação.

Não flambar os recipientes tufados. Os mesmos deverão ser somente desinfetados com algodão embebido em solução desinfetante.

Manter registros das condições das amostras no momento da sua recepção no laboratório.

#### 9.6.4 Inoculação das amostras

Utilizando a amostra incubada a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , retirar alíquotas de cerca de 1 a 2 gramas ou mililitros e semear em quatro tubos contendo caldo de carne cozida ou caldo Tarozi, e também em quatro tubos contendo caldo glicose triptona.

Após a inoculação das amostras, acrescentar, assepticamente, sobre o caldo de carne cozida ou caldo Tarozi uma camada de aproximadamente 2 cm de vaspar ou vaselina ou óleo mineral ou parafina líquida, estéril, previamente fundido.

#### 9.6.5 Incubação

Incubar dois tubos de cada meio nas temperaturas de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 120 horas (5 dias).

### 9.6.6 Leitura e interpretação

Verificar, nos tubos contendo caldo de carne cozida ou caldo Tarozi, a formação de gás, a turvação do meio e possível alteração na aparência da carne do meio, sinais indicativos de crescimento bacteriano.

Os clostrídios sacarolíticos produzem ácido e gás com odor “ácido”, sem a digestão da carne cozida, mas com consequente avermelhamento da mesma.

Os clostrídios proteolíticos degradam a proteína em aminoácidos, com a precipitação da tirosina na forma de cristais brancos, produzindo um odor fétido de compostos sulfurados com consequente enegrecimento da carne cozida e turvação do caldo.

Verificar, nos tubos com caldo glicose triptona, se ocorreu turvação e/ou formação de película na superfície do caldo, alterações que indicam crescimento bacteriano. Considerar como negativo o teste para a esterilidade comercial quando não se observar nenhuma das alterações citadas acima e os controles corresponderem aos resultados esperados.

Dar sequência ao teste quando forem observadas quaisquer das alterações citadas acima e os controles corresponderem aos resultados esperados.

### 9.6.7 Confirmação de tubos com crescimento positivo ou suspeito

Os tubos suspeitos de apresentarem crescimento devem ser repicados por estriamento em placas de ABHI, conforme segue:

- Quando o tubo suspeito for o de caldo glicose triptona incubado a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (aeróbios mesófilos) repicar concomitantemente para duas placas com ABHI. Incubar uma destas placas a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e a outra a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 horas.
- Quando o tubo suspeito for o de caldo glicose triptona incubado a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (aeróbios termófilos) repicar para uma placa com ABHI. Incubar a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 horas.
- Quando o tubo suspeito for o de caldo de carne cozida (ou de caldo Tarozi), incubado a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (anaeróbio mesófilo) ou a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (aeróbios termófilos), repicar para uma placa com ABHI. Incubar por 24 a 48 horas, na mesma temperatura de incubação usada para o tubo de origem ( $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ou  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), em anaerobiose.

### 9.6.8 Leitura

Após a incubação, verificar o crescimento de microrganismos nas placas. O não crescimento indicará resultado negativo para o teste de esterilidade comercial. Quando for verificado crescimento nas placas, repicar as culturas obtidas para tubos com ágar estoque inclinado e incubar nas mesmas condições das placas de origem. Após incubação, realizar os testes complementares.

### 9.6.9 Testes complementares

#### 9.6.9.1 Coloração de Gram

A partir das colônias que crescerem nas placas, preparar esfregaço e corar pelo método de Gram, conforme instruções constantes no Capítulo 11 – Procedimentos de Coloração.

Quando for verificada a presença de bastonetes Gram positivos nos tubos incubados em anaerobiose, a realização da prova de catalase é necessária para a diferenciação entre *Bacillus sp* (catalase positiva) e *Clostridium sp* (catalase negativa). Registrar no resultado final a morfologia dos cultivos celulares isolados observada.

#### 9.6.9.2 Prova da catalase

Com auxílio de alça de platina, palito de madeira, bastão de vidro ou Pipeta de Pasteur estéril, transferir a cultura para uma lâmina de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%.

A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase. A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase. No caso da presença de bastonetes Gram positivos, resultados de catalase negativos indicam a presença de *Clostridium sp* e resultados positivos indicam a presença de *Bacillus sp*.

Quando for detectada a presença de *Clostridium sp*, guardar as culturas para testes complementares, caso sejam necessários.

#### 9.6.9.3 Prova da termofilia estrita

Quando forem detectados bastonetes termófilos, realizar prova para confirmação de termofilia estrita do microrganismo isolado.

A partir dos tubos com caldo glicose triptona positivos incubados a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , repicar maciçamente para tubos contendo ágar nutriente inclinado com sulfato de manganês (ou ágar para esporulação). Incubar a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  de 2 a 10 dias.

A partir do segundo dia, verificar a presença de esporos por meio da aplicação da técnica para coloração de esporos, conforme instruções constantes no Capítulo 11 – Procedimentos de Coloração.

Quando forem detectadas culturas esporuladas, preparar suspensão de esporos, lavando o crescimento obtido no tubo com ágar nutriente/sulfato de manganês com 1 mL de água destilada ou deionizada estéril.

Inativar as formas vegetativas por meio da aplicação de um choque térmico a  $80^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos na suspensão preparada de 1 mL.

Inocular 0,1 mL do lavado, após o choque térmico, em dois tubos contendo caldo glicose triptona. Incubar um tubo a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e outro a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 2 a 4 dias.

Verificar o crescimento de microrganismos, evidenciado pela turvação do caldo. O crescimento bacteriano somente no tubo incubado a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  determina a termofilia estrita do microrganismo isolado. O crescimento bacteriano nos dois tubos determina a termofilia facultativa do microrganismo isolado.

Registrar no resultado final a característica mesofílica ou termofílica do microrganismo isolado.

#### 9.6.9.4 Confirmação de microrganismos “flat sour” (opcional)

A partir das culturas obtidas nas placas de ABHI, provenientes dos tubos positivos de caldo glicose triptona incubados a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , repicar para a superfície seca de 2 placas com ágar glicose triptona. Incubar uma das placas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 horas e a outra a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas em câmara úmida.

O crescimento de colônias amarelas, regulares, com diâmetro de aproximadamente 2 a 3 mm, rodeadas de zona de clarificação também amarela, nas placas incubadas a

55 °C ± 1 °C, com núcleo opaco e o não crescimento naquelas incubadas a 36 °C ± 1 °C, confirmará a presença de *Bacillus stearothermophilus* (renomeado – *Geobacillus stearothermophilus*), microrganismo responsável pela deterioração “flat sour”.

## 9.7 Expressão dos resultados

**Pré-incubação** Expressar no campo referente à emissão do resultado para prova de pré-incubação, nas temperaturas requeridas, o resultado como “sem alteração” quando não se observar qualquer alteração ou anormalidade no recipiente e nas características físicas e/ou sensoriais da amostra, e como “com alteração” quando for observada qualquer alteração ou anormalidade no recipiente ou nas características físicas e/ou sensoriais da amostra. Nesse caso, descrever o tipo de alteração observado.

**Pesquisa de aeróbios e anaeróbios termófilos e mesófilos** Expressar nos campos referentes à emissão dos resultados para as pesquisas de aeróbio e anaeróbio mesófilo e termófilo, o resultado como “negativa”, quando não for observado qualquer desenvolvimento de microrganismos no teste aplicado e como “positiva” quando for observada a presença de microrganismos.

Sempre que possível, fazer constar do resultado final as observações feitas ao microscópio.

## 9.8 Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento - Secretaria de Defesa Animal - Departamento Nacional de Defesa Animal - Coordenação Geral de Laboratório Animal - *Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos - Teste de Esterilidade Comercial*. Brasília, D.F. 1991/1992 - 2ª Revisão, p. 111 - 113.

Deibel K. E.; Jantschke, M. *Canned Foods - Tests for Commercial Sterility*. In: In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p. 577-588.

Denny C. B; Parkinson, N. G. *Canned Foods - Tests for cause of spoilage*. In: In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.583-600.

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. *Bacterial Nomenclature Up-to-Date-(Approved Lists, Validation Lists)*.Nov.2002.Braunschweig, Germany. Disponível em: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>



# Pesquisa de *Paenibacillus larvae* *subsp. Larvae*

\*\*\*

## 10.1 Princípio

**Preparo da Amostra** O aquecimento da amostra a 45 °C visa diminuir a viscosidade, permitir a distribuição homogênea dos esporos e facilitar a manipulação. A diluição com solução salina tamponada, além de viabilizar a concentração dos esporos pela centrifugação que se segue, contribui para bloquear parcialmente a ação inibidora de crescimento bacteriano, exercida por substâncias presentes no mel.

**Centrifugação** Visa concentrar os esporos presentes na amostra por meio de centrifugação a 3.000 x *g* por 30 minutos ( $g = 0,0000118 \times \text{raio do rotor em cm} \times \text{rpm}^2$ ).

**Choque Térmico** Por meio do aquecimento, a 80 °C por 10 min, do sedimento da amostra obtido por centrifugação, obtém-se a eliminação das formas vegetativas de bactérias que podem interferir no crescimento de *Paenibacillus larvae* e dificultar a seleção de colônias.

**Isolamento e Seleção** Baseia-se na semeadura sobre a superfície seca de ágar *Paenibacillus larvae* (ABL), meio composto por ágar estoque, ágar soja triptona, ágar Cereus (PEMBA) - base, suplementado com emulsão de gema de ovo, ácido nalidíxico e ácido pipemídico. A emulsão de gema de ovo promove a multiplicação de *P.larvae* e permite a diferenciação de microrganismos pela reação da lecitinase. A presença de 0,1% de peptona, associada ao piruvato de sódio (presentes no PEMBA), evidencia a precipitação da lecitina da gema do ovo, provocada por espécies de *Bacillus* que possuem essa propriedade. O manitol, carboidrato presente no meio, não é fermentado pelo *Paenibacillus larvae*. O indicador de pH presente no meio é o azul de bromotimol. O ácido nalidíxico atua inibindo total ou parcialmente o crescimento de *P. alvei*, *B. megaterium*, *P.larvae subsp. pulvifaciens*, *P. polymyxa* e *B. pumilus*. O ácido pipemídico atua prevenindo o crescimento de *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *P.larvae subsp. pulvifaciens* e *P. apiarius*.

**Provas confirmativas** Baseiam-se na observação das características morfológicas e tintoriais, na observação da capacidade de decompor a caseína, na incapacidade de produzir

catalase, no crescimento escasso em ágar nutriente isento de extrato de levedura e no crescimento típico no ágar leite com tiamina (ALT).

## 10.2 Campo de aplicação

Neste capítulo está descrito método para detecção de esporos do agente *Paenibacillus larvae subsp. larvae* (referido no restante do texto como *P. larvae*), agente da enfermidade Cria Pútrida Americana, em amostras de produtos da colmeia.

## 10.3 Materiais e equipamentos

- Vidraria e equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;
- Centrífuga (3.000 x g);
- Banho-maria a 80 °C;
- Termômetro 100 °C;
- Tubos para centrífuga tipo Falcon ou similar, com tampa rosqueável, cap. 100 mL.

## 10.4 Meios de cultura, reagentes e soluções

- Insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;
- Ágar cereus (PEMBA) - base\* (opcional: ágar manitol gema de ovo poliximina segundo Mossel (MYP) - base);
- Ágar estoque\*;
- Ágar soja triptona\*;
- Emulsão de gema de ovo 50%\*;
- Ácido pipemídico solução 0,2%\*;
- Ácido nalidíxico solução 0,1%\*;
- Tiamina cloridrato solução aquosa 0,1%\*\*;
- Leite desnatado UHT\*\*;
- Ágar com extrato de levedura\*\*;
- Ágar nutriente sem extrato de levedura;
- Caldo cérebro-coração com tiamina (BHIT);
- Solução salina fosfatada tamponada pH 7,2 (PBS);
- Peróxido de hidrogênio 3%;

- Caldo experimental para anaeróbios.

\* Componente do ágar *Bacillus larvae* (ABL). \*\* Componente do ágar leite com tiamina (ALT).

## 10.5 Preparo da amostra

Após seu recebimento no laboratório as amostras devem ser mantidas até o momento do início da análise de acordo com norma ISO específica.

**Mel e produtos “in natura”** Aquecer a amostra em banho-maria a 45 °C para facilitar a manipulação da mesma e a homogeneização dos esporos presentes. Transferir assepticamente 20 mL da amostra para tubo de centrifuga estéril e adicionar 30 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS). Homogeneizar bem.

**Produtos da colmeia liofilizados** Pesar, assepticamente, 5 g do produto em tubo de centrífuga estéril e adicionar 45 mL de PBS. Deixar em repouso por 10 a 15 min. Homogeneizar bem.

**Pólen** Pesar, assepticamente, 5 g da amostra e adicionar 45 mL de PBS misturando vigorosamente. Filtrar a mistura em papel filtro nº 2 (Whatman). Deixar em repouso por 2 horas para decantação do pólen residual. Transferir cuidadosamente para tubos de centrífuga estéreis com tampa.

## 10.6 Procedimento da análise

### 10.6.1 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

### 10.6.2 Concentração por centrifugação

Centrifugar a 3.000 x *g* por 30 minutos. Após centrifugação, descartar cuidadosamente o sobrenadante. Ressuspender o sedimento em 1 mL de PBS e transferir para tubos com tampa de rosca. Aquecer a 80 °C, em banho-maria, por 10 minutos.

### 10.6.3 Isolamento

Transferir 1,0 mL da suspensão preparada conforme item 10.6.2 para a superfície seca de placas com ABL. Com o auxílio de bastão tipo “hockey”, espalhar cuidadosamente o inóculo sobre a placa. Paralelamente, usando alça de 10 µL, inocular a suspensão por estrias sobre a superfície seca de outra placa com ABL. Incubar as duas placas invertidas a 36 °C ± 1 °C por até 5 dias, observando, após 48 h e depois diariamente, o crescimento de colônias típicas de *Paenibacillus larvae*.

No ABL, as colônias típicas de *Paenibacillus larvae* se apresentam planas, com superfície suavemente granulada, achatadas, com ou sem centro elevado de maior densidade, com bordas levemente irregulares, sem brilho, de cor verde-amarelada e diâmetro de 2 a 5 mm, sem halo de precipitação da lecitina, com ou sem halo de lipólise. Alguns isolados



podem apresentar colônias com centro muitas vezes mais denso (opaco) que as bordas (translúcidas).

Selecionar 3 a 10 colônias típicas e testar quanto à presença de catalase.

#### 10.6.4 Prova da Catalase

Com auxílio de uma alça de platina, bastão de vidro, palito de madeira ou pipetas de Pasteur estéreis, retirar uma alíquota do cultivo, transferir para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Misturar o inóculo ao peróxido e observar a reação.

A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase. A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase. As culturas de *Paenibacillus larvae* são catalase negativas.

Repicar as colônias catalase negativas para tubos contendo ágar leite com tiamina (ALT) inclinado e incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 h. Manter essas culturas para testes complementares, caso sejam necessários.

Realizar as provas confirmativas completas em cada uma das colônias catalase negativas.

#### 10.6.5 Coloração de Gram

Das colônias suspeitas, fazer esfregaço e corar pelo método de Gram. O *P.larvae* se apresenta como bastonete Gram positivo, comumente longo e fino, porém, pode se apresentar de diversos tamanhos, em cadeias de comprimento variável. As culturas que se apresentarem como suspeitas no Gram e catalase negativas devem ser testadas para:

#### 10.6.6 Crescimento em superfície de ágar nutriente sem extrato de levedura

A partir das colônias catalase negativas, repicar também em tubos com ágar nutriente inclinado isento de extrato de levedura e incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 3 dias. A maioria dos *P. larvae* apresenta escasso crescimento em ágar nutriente sem extrato de levedura após 3 dias.

#### 10.6.7 Decomposição da caseína e verificação de crescimento típico no ALT

A partir das colônias catalase negativas, repicar sobre a superfície seca de placas com ágar leite com tiamina (ALT) e incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 3 dias. Após incubação, verificar a presença de halo transparente ao redor das colônias. O *P. larvae* decompõe a caseína em até 3 dias.

As colônias de *Paenibacillus larvae subsp. larvae* no ALT se apresentam de coloração entre branco e gelo, de aspecto sutil e delicado (pouco densas).

### 10.7 Expressão de resultados

Considerar como *P.larvae subsp. larvae* as culturas que se apresentarem como bastonetes Gram positivos finos, médios a longos, dispostos em cadeias, catalase negativas,

com reação positiva para hidrólise da caseína associada ao crescimento típico no ALT, e com crescimento escasso no ágar nutriente sem extrato de levedura em 3 dias, conforme Tabela 11.

Em caso de dúvidas na confirmação de colônias, podem ser utilizados métodos complementares para confirmação de colônias. Os métodos que podem ser utilizados são os que estiverem previstos no Manual da OIE especificamente para análise do microrganismo.

**Tabela 11:** Diferenciação entre *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e outros microrganismos relacionados comumente encontradas em amostras de produtos apícolas.

Microorganismo	Catalase	Crescimento em Ágar nutriente sem extrato de levedura	Decomposição da caseína
<i>P.larvae</i> subsp. <i>larvae</i>	negativo	negativo ou escasso	positivo <sup>#</sup>
<i>Paenibacillus alvei</i>	positivo	positivo	positivo
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	positivo	positivo	positivo
<i>P.larvae</i> subsp. <i>Pulvifaciens</i>	negativo	positivo	positivo
<i>Paenibacillus popilliae</i>	negativo	negativo	negativo
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	negativo	negativo	negativo

<sup>#</sup> Associado ao crescimento característico no ALT.

Expressar o resultado das análises de mel como “Pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*: Presença/20 mL de mel” ou “Pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*: Ausência/20 mL de mel”.

Para outros produtos da colmeia expressar o resultado como “Presença (ou Ausência)/quantidade de amostra submetida à análise”.



# Procedimentos de Coloração

\*\*\*

## 11.1 Objetivo

As técnicas de coloração usadas em microbiologia se destinam à observação de estruturas morfológicas como esporos, flagelos e forma das células, diferenciando microrganismos.

## 11.2 Preparação de esfregaço

Para sucesso na observação, é necessário que o esfregaço seja bem feito, apresentando-se em monocamadas, suficientemente concentrado de forma a facilitar a visualização.

A secagem dos esfregaços deve ocorrer ao ar. Depois de secos, os esfregaços podem ser fixados com calor, passando rapidamente 2 a 3 vezes através da chama de bico de Bunsen.

## 11.3 Coloração de Gram

A coloração de Gram utiliza características diferenciais das células bacterianas. Estas características diferenciais se referem à estrutura da parede celular dos microrganismos. Os microrganismos que contêm altos teores de ácido teicóico em sua parede celular se coram, pela coloração de Gram, em azul intenso e são chamados de “Gram positivos”. Os microrganismos que contêm lipopolissacarídeos na membrana externa somente se coram com o contracolorante, mostrando-se da cor do mesmo (vermelho), e são denominados “Gram negativos”.

### 11.3.1 Reagentes

- Solução cristal violeta;
- Solução de lugol (iodo iodeto de potássio);
- Solução descolorante de etanol-acetona:

Adicionar 10 mL de acetona a 100 mL de etanol 95% . Misturar.

- Solução contracolorante de Safrina O.

### 11.3.2 Procedimento de coloração de Gram modificado por Hucker

Originalmente, a coloração descrita por Christian Gram usava violeta de genciana, que é uma mistura de cristal violeta com outros componentes. Hucker modificou o método substituindo a violeta genciana pelo cristal violeta puro, que é muito estável e permite uma melhor diferenciação dos microrganismos.

- (a) Cobrir o esfregaço com cristal violeta por 1 minuto;
- (b) Retirar o excesso de cristal violeta;
- (c) Cobrir com lugol por 1 minuto;
- (d) Escorrer e lavar suavemente em água;
- (e) Descorar com álcool-acetona ou etanol 95% por 1 a 5 segundos (até que a maior parte do cristal violeta seja removido);
- (f) Lavar delicadamente em água;
- (g) Adicionar solução de contracorante - safranina O - por 30 segundos;
- (h) Lavar delicadamente em água;
- (i) Deixar secar no ambiente.

## 11.4 Coloração de gram para anaeróbios

Esta coloração se baseia na substituição da safranina por arbol fucsina, que é mais efetiva para a coloração de alguns anaeróbios Gram negativos e *Legionella*. O aumento do tempo de exposição ao contracorante (carbol fucsina) permite uma maior penetração do mesmo dentro destas células, o que as tornará mais facilmente visíveis. Para anaeróbios o decolorante usado é o etanol.

### 11.4.1 Procedimento de coloração

- (a) Corar o esfregaço por 30 segundos com cristal violeta;
- (b) Retirar o excesso de cristal violeta;
- (c) Cobrir com lugol por 30 segundos;
- (d) Escorrer e lavar com água corrente (fluxo suave);
- (e) Descorar com etanol 95% por 30 segundos;
- (f) Lavar com água corrente (fluxo suave);
- (g) Adicionar solução de contracorante carbol fucsina por 1 minuto ou mais (solução aquosa de fucsina básica 0,8% (m/v));
- (h) Deixar secar em ambiente.

## 11.5 Técnicas de coloração para flagelos

Os flagelos são organelas das bactérias responsáveis pela motilidade, os quais possuem, em sua constituição, moléculas proteicas denominadas “flagelinas”. O flagelo é formado por milhares de monômeros polimerizados de flagelina ordenados de maneira a formar um único flagelo.

Algumas dificuldades podem ser encontradas quando se deseja demonstrar este tipo de estrutura em uma bactéria:

- A produção de flagelos nas bactérias não é contínua e é dependente de vários fatores como temperatura, substrato, estágio do crescimento, etc.;
- Os flagelos podem ser acidentalmente removidos da bactéria pela pipetagem ou homogeneização muito vigorosa;
- O flagelo se despolimeriza facilmente, isto é, se dissocia em monômeros de flagelina com frequência (quando a temperatura alcança mais de 60 °C, quando o pH se torna muito ácido (pH 4,0) e quando a célula está em presença de álcalis, de ureia e de solventes orgânicos);
- É necessária a aplicação de técnicas para aumentar o diâmetro dos flagelos, de forma a torná-los visíveis pelas técnicas microscópicas usualmente adotadas em laboratórios microbiológicos. O ácido tânico contido no corante se ligará ao flagelo, tornando-o mais grosso. A demonstração do flagelo ocorrerá devido à ligação do corante ao ácido tânico.

### 11.5.1 Reagentes

- Solução A:

Misturar 0,5 g de Fucsina certificada para coloração de flagelo a 50 mL de etanol 95%. Deixar em repouso de um dia para o outro para dissolução.

- Solução B

Adicionar a 100 mL de água destilada, 0,75 g de cloreto de sódio e 1,5 g de ácido tânico.

- Solução corante

Misturar vigorosamente as soluções A e B. A mistura de corantes pode ser usada até 2 meses após o preparo, se mantida sob refrigeração. Poderá se formar um precipitado. O precipitado não deve ser homogeneizado com o restante da solução durante procedimento de coloração.

### 11.5.2 Procedimento de coloração

- (a) Preparar cultura da bactéria em estudo sobre a superfície de ágar infusão de cérebro ou em ágar soja triptona (com ou sem sangue), incubando em temperatura e tempo adequados;
- (b) Transferir delicadamente uma alçada do crescimento para tubo contendo cerca de 3 mL de água destilada. Inverter o tubo uma vez para homogeneizar a suspensão. Colocar uma gota desta suspensão sobre uma lâmina e deixar secar ao ar;

- (c) Cobrir a lâmina com o corante e deixar por 5 minutos, até que um brilho metálico esverdeado cubra metade da área. Não deixar o corante secar sobre a lâmina;
- (d) Retirar o corante enxaguando com água;
- (e) Secar;
- (f) Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

## 11.6 Técnica de coloração para esporos (Wirtz-Conklin)

A parede dos esporos constitui uma barreira eficaz contra a entrada e a saída de materiais do esporo. O tempo prolongado de exposição ao corante verde malaquita, associado ao aquecimento, permite o rompimento desta barreira obtendo-se, então, o esporo corado em verde intenso. Como contracorante é utilizada a safranina, que cora outras estruturas em rosa, facilitando a diferenciação dos esporos.

### 11.6.1 Reagentes

- Solução de Verde malaquita 5%;
- Solução de trabalho de Safranina O.

### 11.6.2 Procedimento de coloração

- (a) Preparar esfregaço e fixar pelo calor;
- (b) Cobrir o esfregaço com o corante verde malaquita 5%;
- (c) Aquecer água em um béquer até começar a sair vapor. Colocar a lâmina sobre este béquer, mantendo o corante aquecido por 5 minutos. Alternativamente, cobrir a lâmina com verde malaquita e aproximar o máximo possível de uma chama de bico de Bunsen e deixar até que desprenda vapor. Afastar do fogo e após 1 a 2 minutos repetir a operação por 3 a 4 vezes;
- (d) Lavar suavemente com água. Evitar o choque térmico que poderá quebrar a lâmina;
- (e) Contracorar com solução de safranina O por 30 segundos;
- (f) Lavar e secar;
- (g) Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

## 11.7 Coloração para corpúsculos de inclusão cristalina

A detecção de corpúsculos de inclusão cristalina é uma das provas usadas para caracterizar algumas variedades de *Bacillus thuringiensis*, sendo utilizada como prova diferencial

de *Bacillus cereus*. Os corpúsculos de inclusão cristalina de algumas variedades de *Bacillus thuringiensis* são cristais tetragonais de toxina, abundantes em culturas velhas (3-4 dias), que somente são liberados após a lise do esporângio.

Dois métodos estão descritos para esta finalidade: coloração a quente, com solução de fucsina básica 0,5%, e coloração a frio, com solução corante à base de azul de Coomasie.

Alternativamente pode ser utilizada a coloração de Wirst-Konklin (verde malaquita) para corar os corpúsculos de inclusão cristalina. Os corpúsculos de inclusão cristalina do *Bacillus thuringiensis* se apresentam como estruturas tetragonais de cor rosa, enquanto os esporos se coram em verde.

### 11.7.1 Reagentes

- Ágar nutriente;
- Álcool metílico;
- Solução corante de Azul de Coomasie;
- Solução de fucsina básica 0,5%.

### 11.7.2 Coloração com fucsina básica

- Repicar a cultura em ágar nutriente inclinado;
- Incubar a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e posteriormente em ambiente por 2 a 3 dias;
- Preparar esfregaço em lâmina de vidro limpa;
- Secar ao ar e fixar rapidamente passando sobre uma chama de bico de Bunsen;
- Mergulhar em álcool metílico, deixando em contato por 30 segundos. Retirar e deixar secar ao ar.
- Corar com solução de fucsina básica 0,5% a quente, aproximar o máximo possível de uma chama de bico de Bunsen e deixar até que desprenda vapor. Afastar do fogo e após 1 a 2 minutos repetir a operação;
- Esperar cerca de 30 segundos para que a lâmina esfrie e
- Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

Os corpúsculos de inclusão cristalina do *Bacillus thuringiensis* se apresentam como pequenos discos de bordas convexas (em forma de grão de lentilha) de cor rosa intensa.

### 11.7.3 Coloração com Azul de Coomasie

- Repicar a cultura em ágar nutriente inclinado;
- Incubar a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e, posteriormente, em ambiente por 3 a 4 dias;
- Preparar esfregaço em lâmina de vidro limpa;
- Secar ao ar e fixar rapidamente passando sobre uma chama de bico de Bunsen;



- (e) Cobrir o esfregaço com a solução corante de Azul de Coomassie por 3 minutos;
- (f) Escorrer e lavar suavemente com água corrente;
- (g) Secar;
- (h) Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

Os corpúsculos de inclusão cristalina do *Bacillus thuringiensis* se apresentam como estruturas tetragonais de cor azul intensa.

## 11.8 Coloração de Gram – carbol-fucsina modificada por Hucker para *campylobacter*

### 11.8.1 Reagentes

- Carbol-fucsina 0,3%;
- Etanol 95%;
- Lugol;
- Solução Corante Cristal violeta-oxalato de amônio para coloração de Campylobacter.

### 11.8.2 Procedimento de coloração

- (a) Preparar esfregaço dos cultivos suspeitos;
- (b) Deixar secar ao ar e fixar delicadamente passando sobre uma chama de bico de Bunsen;
- (c) Corar pelo método de Gram modificado por Hucker;
- (d) Corar por 1 minuto com cristal violeta oxalato de amônio;
- (e) Lavar com água;
- (f) Cobrir com lugol por 1 minuto;
- (g) Lavar com água;
- (h) Descorar com etanol 95% até que saia todo o corante;
- (i) Lavar com água;
- (j) Contracorar com carbol fucsina por 10 a 20 segundos;
- (k) Lavar com água;
- (l) Secar e examinar em microscópio de campo claro com objetiva de imersão.

Todos os cultivos de *Campylobacter* se apresentam como bastonetes Gram negativos, curvos ou espiralados, com arranjo típico em forma de asa de gaivota.

## 11.9 Coloração para observação de movimento browniano de esporos (*Paenibacillus larvae*)

### 11.9.1 Procedimento de coloração

- (a) Preparar o esfregaço em uma lâminula limpa;
- (b) Secar ao ar ou sob o calor de uma lâmpada;
- (c) Fixar sob o calor de uma lâmpada ou fixar passando, rapidamente, por 2 ou 3 vezes, sobre uma chama de bico de Bunsen. Os esporos de *P. larvae* não se fixam na lâminula;
- (d) Corar com solução carbol-fucsina por 10 segundos;
- (e) Tirar o excesso de corante, deixando escorrer;
- (f) Cobrir uma lâmina de vidro com uma camada fina de óleo de imersão e sobre esta colocar a lâminula ainda úmida, em posição invertida, preparada conforme descrito acima;
- (g) Observar em microscópio com objetiva de imersão.

Os esporos se coram em rosa mais intenso que as células e apresentam movimento vibratório (movimento Browniano).

## 11.10 Bibliografia

Acuff, G. R. *Media, Reagents, and Stains*. In: *Compendium of Method for the Microbiological Examination of Foods*, American Public Health Association. 3. ed. Washington DC. Carl Vanderzant & Don F. Splittsoesser, 1992, p. 1093-1208.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. *Manual de métodos microbiológicos para alimentos*. Coordenação Geral de Laboratório Animal. 1991/1992 2ª revisão. 136p.

Bryce, J. R.; Poelma, P. L. *Microscopic Examination of Foods and Care and Use of the Microscope*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. 8.ed. Food and Drug Administration. AOAC International, Gaithersburg, USA. 1995. p. 2.01-2.06.

Clarridge, J. E.; Mullins, J. M. *Microscopy and Staining*. In: *Clinical and Pathogenic Microbiology*, Howard, B. J. *et al.* 2nd Ed. Mosby. St. Louis, 1994, p. 101-115.

Harmon, S. M.; Goepfert, J. M.; Bennett, R. W. *Bacillus cereus*. In: *Compendium of Method for the Microbiological Examination of Foods*, American Public Health Association. 3ª. ed. Washington DC. Carl Vanderzant & Don F.Splittsoesser, 1992, p. 593-604.

Hunt, J. M.; Abeyta, C. *Campylobacter*. In: *Bacteriological Analytical manual*. 8 ed.Food and Drug Administration. AOAC International, Gaithersburg, USA. 1995. p. 7.01 - 7.27.

Shimanuki, H.; Knox, D. A.; Furgala, B.; Caron, D. M.; Williams, J. L. *Diseases and Pests of Honey Bees*. In: *The Hive and the Honey Bee*. J. M. Graham (Ed). Dadant & Sons . Hamilton, Illinois. 1992. P.1083-1150.



# Meios de Cultura, Reagentes e Soluções

\*\*\*

Como medida de segurança, as substâncias componentes dos meios de cultura, das soluções e dos reagentes incluídas neste Manual estão sinalizados com uma letra, indicando o grupo de risco ao qual pertencem, sendo:

- N = nocivo;
- I = irritante;
- T = tóxico;
- H = hidropolvente;
- P = perigoso para o meio ambiente;
- C = corrosivo;
- O = oxidante;
- F = inflamável;
- E = explosivo;
- M = mutagênico;
- Co = comburente.

Recomenda-se que, antes da manipulação e descarte das referidas substâncias, sejam consultadas fichas próprias ou manuais de segurança, visando o reconhecimento dos principais riscos inerentes e das medidas indispensáveis para prevenir ou evitar a ocorrência de acidentes e minimizar os danos à saúde do usuário e ao meio ambiente.

Meios de cultura desidratados fornecidos por diferentes fabricantes podem apresentar pequenas diferenças em suas composições. Observar atentamente a quantidade necessária de meio desidratado, em gramas por litro de meio a ser preparado, o modo de preparo, o tempo e a temperatura de esterilização em cada caso.

Ao adquirir meios de cultura, observar atentamente a formulação, comparando-a com aquela indicada neste manual. Às vezes, as diferentes marcas utilizam diferentes termos para uma mesma substância. Por exemplo, os termos triptona e tripticase referem-se à peptona de caseína obtida por digestão trípica ou pancreática. Assim, os produtos Ágar

tripticase soja, Ágar soja triptona, Caso Ágar (antigo Casoy) referem-se a um produto que contem peptona de caseína (obtida por digestão tríptica ou pancreática) e peptona de farinha de soja.

As soluções preparadas por meio da dissolução do reativo em álcool etílico, seguida ou não da adição de água destilada/deionizada, neste Manual serão denominadas como “solução alcóolica”. Ex.: Alfa-naftol solução alcóolica 5%.

As soluções preparadas por meio da dissolução do reativo em água destilada/deionizada, neste Manual serão denominadas como “solução aquosa”. Ex.: Novobiocina solução aquosa 4%.

As soluções preparadas por meio da dissolução do reativo em meio alcalino ou ácido, neste Manual serão acompanhadas da indicação do diluente usado para sua preparação. Ex.: Ácido nalidixico solução 2% em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, Alfa-naftilamina solução 0,5% em ácido acético 5 mol L<sup>-1</sup>.

Onde houver a indicação “Esterilizar por Filtração” utilizar filtro com membrana de 0,22 µm previamente preparado e esterilizado.

## 12.1 Meios de cultura

### 12.1.1 Ágar *Bacillus larvae* (ABL)



(H) - hidropolvente.

Preparar, separadamente, alíquotas de 100 mL de ágar cereus (PEMBA) base, ágar soja triptona e ágar estoque de acordo com o descrito neste capítulo para cada um dos meios específicos. Fundir os meios e resfriar até 47 °C ± 1 °C, mantendo em banho-maria. Em um erlenmeyer estéril, com capacidade mínima de 500 mL, misturar:

- Ágar cereus (PEMBA) base - 100,0 mL
- Ágar soja triptona (TSA) - 100,0 mL
- Ágar estoque - 100,0 mL
- Emulsão de gema de ovo a 50% estéril (\*) - 30,0 mL
- Solução de ácido pipemidico(H) 0,2% (\*\*) - 3,0 mL
- Solução de ácido nalidixico(H) 0,1% (\*\*) - 3,0 mL

(\*) - último ingrediente a ser misturado para evitar a formação excessiva de espuma. (\*\*) - esterilizadas por filtração

Homogeneizar bem e distribuir cerca de 20,0 mL em placas estéreis. Deixar solidificar em superfície plana. Identificar, datar e armazenar adequadamente.

Antes do uso, secar as placas invertidas, semiabertas, em estufa a 45-50 °C por cerca de 15 minutos.

### 12.1.2 Ágar cérebro-corção (ABHI)

Pesar o ágar cérebro-corção (ABHI) de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/ deionizada correspondente. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de acordo com a necessidade e tampar. Identificar e datar. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar cérebro-corção deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Infusão de cérebro de carneiro - 12,5 g;
- Infusão de coração - 5,0 g;
- Proteose-peptona - 10,0 g;
- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- D (+) glicose - 2,0 g;
- Ágar - 15,0 g;
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .

### 12.1.3 Ágar cereus (PEMBA)



(H) - hidropolvente.

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/ deionizada correspondente. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 90 mL em frascos. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

A composição básica do ágar cereus (PEMBA) base deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona - 1,0 g;
- Manitol - 10,0 g;
- Cloreto de sódio - 2,0 g;
- Sulfato de magnésio - 0,1 g;
- Fosfato de sódio dibasico - 2,5 g;
- Fosfato de potássio monobásico - 0,25 g;

- Azul de bromotimol - 0,12 g;
- Piruvato de sódio - 10,0 g;
- Ágar - 14,0 g;
- pH  $7,2 \pm 0,2$ .

No momento da utilização, adicionar a 90 mL de ágar base fundido e resfriado a 49-50 °C: 10 mL de emulsão de gema de ovo a 50% e 1 mL de sulfato de polimixina B(H) a 0,1% esterilizada por filtração. Homogeneizar, tomando o cuidado para não formar espuma, e distribuir cerca de 15 mL em placas estéreis. Deixar solidificar em superfície plana. Identificar e datar. Manter as placas sob refrigeração, protegidas de modo a evitar desidratação.

Antes do uso, secar as placas a 45-50 °C por cerca de 15 minutos, abertas e invertidas, apoiando a base com a superfície do ágar invertido sobre a borda da tampa da placa ou em fluxo laminar expondo a superfície pelo tempo necessário para a completa secagem.

#### 12.1.4 Ágar com extrato de levedura

Pesar, separadamente, os componentes do ágar com extrato de levedura conforme a formulação abaixo de acordo com o volume de meio a ser preparado. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/ deionizada correspondente. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de acordo com a necessidade, tampar e identificar adequadamente. Autoclavar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

A composição básica do ágar com extrato de levedura deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Ágar - 20,0 g;
- Extrato de levedura - 10,0 g;
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .



#### 12.1.5 Ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA)



(N\*) - nocivo por ingestão, por contato com os olhos e pele  
(N) - nocivo por ingestão  
(I) - pode causar lesões oculares graves  
(H) - muito tóxico para os organismos aquáticos  
(P) - a longo prazo, pode causar efeitos negativos no meio ambiente aquático

Pesar o ágar cristal violeta vermelho neutro bile de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/ deionizada correspondente. Deixar repousar por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Normalmente não é necessário esterilizar este meio, porém, se for preciso, este meio pode ser autoclavado a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.

A composição básica de ágar cristal violeta vermelho neutro bile deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona de carne - 7,0 g;
- Extrato de levedura - 3,0 g;
- Lactose - 10,0 g;
- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- Sais biliares nº 3 - 1,5 g;
- Vermelho neutro ( N\*) - 0,03 g;
- Cristal violeta ( N/I/H/P) - 0,002 g;
- Ágar - 15,0 g
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .

### 12.1.6 Ágar estoque

Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada em sua formulação. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir em tubos volumes que permitam a formação de um bisel longo. Identificar e datar. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após autoclavação, deixar os tubos solidificarem em posição inclinada.

Quando o meio for destinado à estocagem de culturas referenciais, distribuir em tubos pequenos com tampa de rosca ou em frascos tipo penicilina, deixando solidificar em posição vertical. Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar estoque deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona bacteriológica - 13,8 g;
- Extrato de levedura - 6,0 g;
- Extrato de carne - 12,2 g;
- Cloreto de sódio - 10,0 g;
- Fosfato de sódio bibásico - 2,0 g;
- Ágar - 15,0 g;
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .



### 12.1.7 Ágar ferro três açúcares (TSI)

Pesar o ágar TSI de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/ deionizada correspondente. Deixar repousar por cerca de 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volume compatível com o tubo disponível, capaz de formar uma base de  $\pm 3,0$  cm de altura e, sobre ela, um bisel de 2 a 3 cm quando inclinado. Identificar e datar. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar TSI deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Extrato de carne - 3,0 g;
- Extrato de levedura - 3,0 g;
- Peptona de caseína - 15,0 g;
- Peptona de carne - 5,0 g;
- Lactose - 10,0 g;
- Sacarose - 10,0 g;
- D-Glicose - 1,0 g;
- Citrato de amônio e ferro - 0,5 g;
- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- Tiosulfato de sódio - 0,3 g;
- Vermelho de fenol - 0,024 g;
- Ágar - 12,0 g;
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .

### 12.1.8 Ágar ferro três açúcares (TSI) sal 3%

Proceder conforme o indicado pelo fabricante para o preparo do Ágar TSI, acrescentando 25 g de cloreto de sódio a cada litro de meio preparado.

A composição básica do ágar gelatina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona de carne - 5,0 g;
- Extrato de carne - 3,0 g;
- Gelatina - 120,0 g;
- pH  $6,9 \pm 0,2$ .

### 12.1.9 Ágar leite com tiamina (ALT)

Dissolver o ágar com extrato de levedura, preparado conforme o item anterior, e deixar em banho-maria até atingir entre 45 e 50 °C. Em um Erlenmeyer estéril, com capacidade mínima de 500 mL, misturar a cada 300 mL de ágar com extrato de levedura, 100 mL de leite UHT desnatado e 6 mL de solução de tiamina 0,1% esterilizada por filtração. Após homogeneização, distribuir cerca de 20 mL assepticamente em placas estéreis deixando solidificar em superfície plana.

A composição básica do ágar leite com tiamina (ALT) deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Ágar com extrato de levedura - 300 mL;
- Leite UHT desnatado - 100 mL;
- Tiamina cloridrato sol. a 0,1% - 6 mL;

### 12.1.10 Ágar motilidade sal 3%

Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada em sua formulação. Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir em tubos. Identificar e datar. Autoclavar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Deixar solidificar o meio em posição vertical.

A composição básica de ágar motilidade sal 3% deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona de carne - 8,6 g;
- Cloreto de sódio - 30,0 g;
- Ágar - 3,0 g;
- pH  $7,0 \pm 0,2$ .

### 12.1.11 Ágar Müller-Hinton sal 3%

Pesar o ágar Müller-Hinton de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Deixar repousar por 15 minutos. Aquecer, sob agitação, até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 100 mL em frascos apropriados. Autoclavar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. A composição básica do ágar Müller-Hinton sal 3% deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Infusão de carne bovina - 300,0 g;
- Peptona de caseína ácida - 17,5 g;
- Cloreto de sódio - 30,0 g;
- Amido - 1,5 g;

- Ágar - 17,0 g;
- pH  $7,3 \pm 0,2$ .

#### 12.1.12 Ágar nutriente

Pesar o ágar nutriente de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução do ágar. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir alíquotas de 10 mL em tubos apropriados. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após autoclavagem, deixar solidificar em posição inclinada, de forma a obter um bisel longo. Identificar, datar e armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar nutriente deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona - 5,0 g;
- Extrato de carne - 1,0 g;
- Extrato de levedura - 2,0 g;
- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- Ágar - 15,0 g;
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .

#### 12.1.13 Ágar nutriente com sulfato de manganês

Preparar o ágar nutriente conforme descrito na seção 12.1.12 e adicionar 300 mg de sulfato de manganês a cada litro de meio. Fundir o meio e deixar resfriar em banho-maria até  $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$ . Distribuir cerca de 10 mL em tubos. Deixar solidificar de forma inclinada, de maneira a obter um bisel maior ou igual a 4 cm. Identificar, datar e armazenar adequadamente.

#### 12.1.14 Ágar nutriente isento de extrato de levedura

Pesar o ágar nutriente de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução do ágar. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir alíquotas de 10 mL em tubos apropriados. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após autoclavagem, deixar solidificar em posição inclinada, de forma a obter um bisel longo. Identificar, datar e armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar nutriente isento de extrato de levedura deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona de carne - 5,0 g;
- Extrato de carne - 1,0 g;

- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- Ágar - 15,0 g;
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .

### 12.1.15 Ágar nutriente sal 3%

Preparar conforme descrito para o ágar nutriente (seção 12.1.12) e adicionar 25 g de cloreto de sódio, por litro de meio. Fundir o meio e deixar resfriar em banho-maria até 45-50 °C. Distribuir em placas ou tubos, conforme a necessidade. Identificar, datar e armazenar adequadamente.

### 12.1.16 Ágar para esporulação

Pesar o ágar para esporulação de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Deixar em repouso por cerca de 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de acordo com a necessidade. Identificar e datar. Esterilizar a  $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 20 minutos. Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar para esporulação deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Polipeptona - 15,0 g;
- Extrato de levedura - 3,0 g;
- Amido solúvel - 3,0 g;
- Sulfato de manganês - 0,1 g;
- Tioglicolato de sódio - 1,0 g;
- Fosfato de sódio bibásico - 11,0 g;
- Ágar - 15,0 g;
- pH  $7,8 \pm 0,1$ .

### 12.1.17 Ágar soja triptona (TSA)

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 100 mL em frascos adequados. Autoclavar a  $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 15 minutos.

A composição básica do ágar soja triptona deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Triptona (Peptona de caseína-digestão trípica ou pancreática) - 15,0 g;
- Peptona de farinha de soja - 5,0 g;

- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- Ágar - 15,0 g;
- pH  $7,3 \pm 0,2$ .

### 12.1.18 Ágar soja triptona (TSA) sal 3%

Preparar o ágar soja triptona de acordo com as recomendações contidas neste capítulo e adicionar 25 g de cloreto de sódio para cada litro de meio.

### 12.1.19 Ágar tiosulfato-citrato-sais biliares (TCBS)

Pesar o ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS) de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Deixar em repouso por cerca de 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Não autoclavar. Distribuir, assepticamente, volumes de 15 mL em placas de Petri previamente esterilizadas. Antes do uso, secar a superfície do meio, colocando as placas semiabertas e invertidas em estufa a 45-50 °C por cerca de 15 minutos.

A composição básica de ágar tiosulfato-citrato-sais biliaressacarose deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Extrato de levedura - 5,0 g;
- Peptona de carne - 5,0 g;
- Peptona de caseína - 5,0 g;
- Tiosulfato de sódio - 10,0 g;
- Citrato de sódio - 10,0 g;
- Bile - 5,0 g;
- Sacarose - 20,0 g;
- Colato de sódio - 3,0 g;
- Cloreto de sódio - 10,0 g;
- Citrato ferrico - 1,0 g;
- Azul de bromotimol - 0,04 g;
- Azul de timol - 0,04 g;
- Ágar - 15,0 g;
- pH  $8,6 \pm 0,2$ .

### 12.1.20 Caldo Cérebro-coração tiamina (BHI-T)

Pesar o meio caldo cérebro-coração (BHI), de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Antes do uso, adicionar, em cada tubo com 10 mL, 0,2 mL de solução aquosa de tiamina a 0,01%, esterilizada por filtração.

### 12.1.21 Caldo de carne cozida (CCC)

Em cada tubo selecionado para uso, distribuir 10 mL de água destilada/deionizada e 1 g do granulado (ou conforme a indicação do fabricante). Identificar e datar. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

A composição básica do caldo de carne cozida deverá ser a seguinte por litro de meio:

- Músculo cardíaco de boi - 454,0 g;
- Proteose peptona - 20,0 g;
- D-Glicose - 2,0 g;
- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- pH  $7,4 \pm 0,1$ .

### 12.1.22 Caldo EC

Pesar o caldo EC de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Agitar até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio previamente preparados com tubos de Durham invertidos. Identificar e datar. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

A composição básica de caldo EC deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona - 20,0 g;
- Lactose - 5,0 g;
- Bile bovina - 1,5 g;
- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- Fosfato de potássio bibásico - 4,0 g;
- Fosfato de potássio monobásico - 1,5 g;
- pH  $6,9 \pm 0,2$ .

### 12.1.23 Caldo experimental para anaeróbios segundo R. F. Corseuil (caldo Rogert)

Pesar separadamente os seguintes ingredientes:

- Peptona - 20,0 g;
- Extrato de levedura - 5,0 g;
- Extrato de carne - 3,0 g;
- Glicose - 12,5 g;
- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- L-cisteína - 20,0 g;

Transferir para recipiente adequado, adicionando 500 mL de Caldo de Fígado. Adicionar 500 mL de água destilada/deionizada. Agitar até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste do pH para  $7,6 \pm 0,2$ , conforme norma específica do laboratório. Autoclavar a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

Obs. Para preparar o caldo de fígado, ferver durante uma hora o fígado bovino moído na proporção de 500 g para cada litro de água. Filtrar em papel filtro, fracionar em alíquotas de 500 mL e congelar até a sua utilização. Pode-se substituir o extrato de carne e a água destilada por caldo de carne, previamente preparado da mesma forma que o caldo de fígado, utilizando-se músculo bovino.

### 12.1.24 Caldo Glicose-sal 3%-teepol (GSTB)

Pesar o meio caldo glicose sal 3%-teepol, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Homogeneizar até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir 10 mL em tubos com tampa de rosca. Identificar e datar. Autoclavar a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

A composição básica do caldo glicose-sal 3%-teepol deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Extrato de carne - 3,0 g;
- Peptona - 10,0 g;
- Cloreto de sódio - 30,0 g;
- Glicose - 5,0 g;
- Violeta de Metila - 0,002 g;
- Teepol - 4 mL
- pH  $8,8 \pm 0,2$ .

### 12.1.25 Caldo glicose triptona (caldo dextrose triptona)

Pesar o meio glicose triptona, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Homogeneizar até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 10 mL em tubos com tampa de rosca. Identificar e datar. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

A composição básica do caldo dextrose triptona deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Triptona - 10,0 g;
- Glicose - 5,0 g;
- Extrato de carne - 5,0 g;
- pH  $6,7 \pm 0,2$ .

### 12.1.26 Caldo Horie arabinose violeta de etila (HAEB)

Pesar separadamente os seguintes ingredientes:

- Peptona - 5,0 g;
- Cloreto de sódio - 30,0 g;
- Extrato de carne - 3,0 g;
- Violeta de Etila - 0,001 g;
- Azul de Bromotimol - 0,03 g;

Transferir para recipiente adequado. Adicionar 900 mL de água destilada/deionizada. Agitar até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Preparar separadamente 100 mL de uma solução aquosa a 5% de arabinose, esterilizar por filtração e adiciona-la assepticamente aos 900 mL do caldo. Distribuir assepticamente 10 mL em tubos estéreis de 15 x 180 mm.

### 12.1.27 Caldo ONPG sal 3%

Preparar a solução de água peptonada 1% de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante ou compondo a formulação de acordo com as orientações contidas neste capítulo. Adicionar 25,0 g de cloreto de sódio por litro de meio. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Esfriar e reservar. Para o preparo do Caldo ONPG sal 3%, misturar assepticamente 125 mL da solução ONPG em 75 mL da água peptonada-sal 3%.



### 12.1.28 Caldo peptonado sem sal

Pesar, em recipiente apropriado, 10,0 g de Peptona (ou triptona). Dissolver em 1 L de água destilada/deionizada. Agitar até a completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste do pH em  $7,4 \pm 0,2$ , conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio. Identificar e datar. Autoclavar a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

### 12.1.29 Caldo peptonado sal (3%, 6%, 8% ou 10%)

Pesar, em recipiente apropriado, 10,0 g de Peptona (ou triptona) e a quantidade de cloreto de sódio necessária para atingir-se a concentração desejada. Dissolver em 1 L de Água destilada/deionizada. Agitar até a completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste do pH em  $7,4 \pm 0,2$ , conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio. Identificar e datar. Autoclavar a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Armazenar adequadamente.


### 12.1.30 Caldo Verde brilhante bile lactose 2%



(N) - nocivo por ingestão.

Pesar o caldo Verde brilhante bile lactose 2%, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Agitar até completa dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio com tubos de Durham invertidos. Autoclavar a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

A composição básica de caldo Verde brilhante-bile 2%-lactose deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona - 10,0 g;
- Lactose - 10,0 g;
- Bile Bovina - 20,0 g;
- Verde brilhante ( N)- 0,0133 g;
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .

### 12.1.31 Caldo vermelho de fenol - base (para fermentação de carboidratos)

Pesar o caldo vermelho de fenol - base de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Agitar até completa

dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 90 mL em frascos. Autoclavar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos ou esterilizar por filtração após a adição da solução de carboidrato.

A composição básica de caldo vermelho de fenol base deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Proteose peptona - 10,0 g;
- Extrato de carne - 1,0 g;
- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- Vermelho de fenol - 0,018 g;
- pH  $7,4 \pm 0,2$ .

Adicionar aos frascos com 90 mL de meio autoclavado e resfriado a  $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 mL de solução de carboidrato esterilizada por filtração; caso se opte por não autoclavar o meio base, adicionar a solução de carboidrato e esterilizar a mistura por filtração. As soluções de carboidratos deverão estar em concentração final de 5,0 a 10,0 g por litro de meio. O preparo das soluções de carboidratos poderá ser verificada na seção 12.2.9. Distribuir em tubos, de acordo com a necessidade. Tampar e identificar os tubos. Manter sob refrigeração até o momento do uso.

### 12.1.32 Caldo Vermelho de fenol sal 3%

Preparar o caldo vermelho de fenol base de acordo com o indicado, adicionando 30 g de cloreto de sódio por litro de meio.

### 12.1.33 Caldo vermelho de fenol sal 3%-lisina

Preparar o caldo vermelho de fenol-sal de acordo com o indicado. Adicionar 1 mL de solução de lisina a 10% esterilizada por filtração a cada tubo com 10 mL de meio básico.

### 12.1.34 Meio gelatina

Pesar o ágar gelatina, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante ou compondo a formulação. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Deixar em repouso por cerca de 15 minutos. Aquecer até completa dissolução. Distribuir volumes de acordo com a necessidade. Identificar e datar. Autoclavar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar gelatina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Peptona de carne - 5,0 g;
- Extrato de carne - 3,0 g;
- Gelatina - 120,0 g;
- pH  $6,9 \pm 0,1$ .

### 12.1.35 Meio gelatina sal 3%

Preparar o ágar gelatina de acordo com o item anterior, adicionando 30 g de cloreto de sódio por litro de meio.

### 12.1.36 Meio O/F (Hugh-Leifson) sal 3%

Pesar o meio OF glicose de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante, adicionando 30 g de cloreto de sódio por litro de meio a ser preparado. Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Deixar repousar por 15 minutos. Aquecer, sob agitação, até completa dissolução do meio. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir volumes de 4 mL em tubos de ensaio. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

A composição básica de meio OF glicose deverá ser a seguinte, por litro de meio:

- Triptona - 2,0 g;
- Cloreto de sódio - 5,0 g;
- Fosfato de potássio bibásico - 0,3 g;
- Azul de bromotimol - 0,08 g;
- Glicose - 10,0 g;
- Ágar - 2,0 g;
- pH  $6,8 \pm 0,2$ .


## 12.2 Preparo de reagentes e soluções

### 12.2.1 Ácido nalidíxico solução 0,1% em PBS pH 7,2

Transferir 10 mL da solução de ácido nalidíxico 1% para balão volumétrico de capacidade para 100 mL e completar o volume com tampão fosfato pH 7,2. Esterilizar por filtração.

Distribuir em alíquotas de 20 mL, em frascos de vidro estéreis identificados e datados. Manter a  $-20^{\circ}\text{C}$  por até 6 meses. Manter uma das alíquotas sob refrigeração, para uso diário. Usar 1 mL desta solução para cada 100 mL de ágar ABL.

### 12.2.2 Ácido nalidíxico solução 1% em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

Pesar 1,0 g de ácido nalidíxico ( N), colocar em balão volumétrico de 100 mL e adicionar solução de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , agitando para dissolução, até completar o volume. Distribuir em frasco plástico identificado e datado, e manter protegido da luz.

### 12.2.3 Ácido pipemídico solução 0,2% em PBS pH 7,2

Transferir 10 mL da solução de ácido pipemídico 2% para balão volumétrico de capacidade 100 mL e completar o volume com tampão fosfato pH 7,2. Esterilizar por filtração.

Distribuir em alíquotas de 20 mL, em frasco de vidro estéril identificado e datado. Manter a  $-20^{\circ}\text{C}$  por até 6 meses. Manter uma das alíquotas sob refrigeração, para uso diário. Usar 1 mL desta solução para cada 100 mL de ágar ABL.

### 12.2.4 Ácido pipemídico solução 2% em NaOH $0,1\text{ mol L}^{-1}$

Pesar 2,0 g de ácido pipemídico e adicionar NaOH  $0,1\text{ mol L}^{-1}$  até que se dissolva completamente. Transferir para balão volumétrico de capacidade para 100 mL e completar o volume com NaOH  $0,1\text{ mol L}^{-1}$ .

Distribuir em frasco plástico identificado e datado, e manter protegido da luz, sob refrigeração.

### 12.2.5 Emulsão de gema de ovo 50%

Não havendo emulsão comercialmente disponível, escolher ovos com casca perfeita e lavar com água morna. Secar, imergir em etanol a  $70^{\circ}\text{GL}$  durante cerca de 10 minutos ou em solução de ácido peracético a 0,02% por cerca de 15 minutos. Secar com toalha estéril. Quebrar a casca assepticamente e separar a gema da clara, transferindo a gema para frasco estéril. Adicionar o mesmo volume de solução salina 0,85%. Misturar bem, até a completa homogeneização da solução. Pasteurizar a emulsão obtida durante 30 minutos a  $63^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em banho-maria, com agitação suave e frequente.

Realizar o controle de esterilidade da emulsão de gema de ovo conforme abaixo especificado:

- (a) Inocular 0,1 mL da emulsão de gema de ovo em um tubo contendo caldo BHI;
- (b) Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas;
- (c) Após incubação, repicar com alça para a superfície seca de ágar Baird Parker e PCA;
- (d) Incubar a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.
- (e) Verificar a presença de crescimento bacteriano.

Em caso de crescimento, descartar a emulsão.


### 12.2.6 Peróxido de hidrogênio solução aquosa 3% (10V)



(C) - Corrosivo. Provoca queimaduras

(I) - Extremamente irritante às vias respiratórias e olhos

(E) - Potencialmente explosivo

O peróxido de hidrogênio 3% pode ser adquirido em farmácias ou pode-se preparar a solução 3% a partir de peróxido de hidrogênio ( C/I/E) 20V ou 100V conforme abaixo:

- A partir de peróxido de hidrogênio 100V (30%): pesar 10 g do peróxido e diluir para 100 mL com água destilada/ deionizada.
- Peróxido de hidrogênio 20V (6%): medir em proveta 50 mL do peróxido e completar o volume a 100 mL com água destilada/ deionizada.


Identificar e datar. Manter sob refrigeração, protegida da luz.

### 12.2.7 Reativo para Oxidase I - *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilenodiamina

Dissolver 0,5 g de *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilenodiamina em 50 mL de água destilada/deionizada. Distribuir volumes de 5 mL em frascos de cor âmbar ou envoltas em papel alumínio. Identificar e datar. Manter a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A alíquota em utilização deve ser mantida sob refrigeração, protegida da luz.

Não utilizar o reativo se este apresentar coloração azul.

### 12.2.8 Reativo para Oxidase II - Oxalato de *p*-amino-dimetilanilina

Pesar 0,5 g de oxalato de *p*amino- dimetilanilina ( N/H), em recipiente apropriado. Adicionar 50 mL de água destilada/deionizada. Agitar até completa dissolução. Distribuir volumes de 5 mL em frascos de cor âmbar ou envoltas em papel alumínio. Identificar e datar. Manter a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A alíquota em utilização deve ser mantida sob refrigeração, protegida da luz.

Não utilizar o reativo se este apresentar coloração vermelha ou marrom.

### 12.2.9 Soluções de carboidratos

Para as provas de fermentação de carboidratos, recomenda-se o uso das soluções nas concentrações de 5,0 g ou 10 g por litro de meio.

Arabinose 10%; Glicose 10%; Manitol 10%; Maltose 10%; Rafinose 10%; Ramnose 5%; Sacarose 10% ou Xilose 5%:

Dissolver 5,0 ou 10 g do carboidrato desejado em 100 mL água destilada/deionizada. Esterilizar por filtração. Distribuir volumes de 10 ou 20 mL em frascos estéreis. Identificar e datar adequadamente. Manter sob refrigeração.

### 12.2.10 Solução Carbol-fucsina 0,3%

Dissolver 0,3 g de fucsina básica em 10 mL de etanol. Adicionar a uma solução de 5,0 mL de fenol (cristais fundidos) em 95 mL de água destilada.

### 12.2.11 Solução contracorante de Safrina O

Preparar uma solução estoque adicionando 2,5 mL de Safranina O a 100 mL de Etanol 95%.

Para a solução de trabalho, adicionar 10 mL da Solução estoque de Safranina O a 90 mL de água destilada.

#### 12.2.11.1 Solução corante Azul de Coomasie

A 100 mL de água destilada, adicionar 50 mL de metanol, 7 mL de ácido acético glacial e 0,25 g de Azul de Coomasie.

### 12.2.12 Solução corante Cristal violeta

Dissolver 2 g de Cristal Violeta (90-95% de pureza) em 20 mL de etanol 95%. Filtrar em papel de filtro. Adicionar a uma solução de 0,2 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada. Deixar em repouso por 24 horas, filtrando em seguida. Estocar em frasco âmbar.

### 12.2.13 Solução corante Cristal violeta-oxalato de amônio para coloração de *Campylobacter*

Misturar uma solução de 2,0 g de Cristal Violeta (90-95% de pureza) em 200 mL de etanol 95% a uma solução de 8,0 g de oxalato de amônio em 800 mL de etanol 95%. Deixar em repouso por uma noite ou mais em temperatura ambiente. Filtrar em filtro de papel grosso.

### 12.2.14 Solução de lugol (iodo iodeto de potássio)

Adicionar a 300 mL de água destilada, 1 g de cristais de iodo (ou iodo ressublimado) e 2 g de iodeto de potássio. Misturar e deixar em repouso até dissolução.

### 12.2.15 Solução de Verde malaquita 5%

Adicionar 2,5 g de Verde malaquita a 50 mL de água destilada. Misturar e deixar em repouso de um dia para o outro para dissolução.

### 12.2.16 Solução salina 0,85%

Pesar 8,5 g de cloreto de sódio. Transferir para um recipiente adequado. Adicionar 1 L de água destilada/deionizada. Agitar com auxílio de bastão de vidro até dissolução. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir de forma a garantir o volume desejado após a autoclavagem. Autoclavar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Identificar, datar e armazenar adequadamente.

### 12.2.17 Solução salina fosfatada tamponada pH 7,2 (PBS)

Preparo das soluções estoque: *Solução fosfato de potássio monobásico* ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ : Dessecar o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a  $110^\circ\text{C}$  por uma hora. Pesar 20,41 g do sal e dissolver em água deionizada. Completar o volume para 1000 mL em balão volumétrico.

*Solução fosfato de sódio bibásico* ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ : Dessecar o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a  $130^\circ\text{C}$  por duas horas. Pesar 21,29 g do sal e dissolver em água deionizada. Completar o volume para 1000 mL em balão volumétrico.

A composição básica da solução salina fosfatada tamponada deverá ser a seguinte, por litro:

- Cloreto de sódio - 1,7 g;
- Solução fosfato de potássio monobásico  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$  - 24 mL;
- Solução de fosfato de sódio bibásico  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$  - 76 mL;
- Água destilada/deionizada - q.s.p. 1000 mL;
- pH  $7,2 \pm 0,2$ .

Distribuir volumes conforme a necessidade. Autoclavar a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

### 12.2.18 Solução salina peptonada 0,1%

Pesar, separadamente, 8,5 g de cloreto de sódio e 1,0 g de peptona. Transferir para recipiente adequado e adicionar 1000 mL de água destilada/deionizada. Agitar com auxílio de bastão de vidro até dissolução. Verificar a necessidade de ajuste do pH em  $7,0 \pm 0,2$ , conforme norma específica do laboratório. Distribuir de forma a garantir o volume desejado após a autoclavagem. Identificar e datar. Autoclavar a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

### 12.2.19 Solução salina peptonada 0,1%-sal 3%

Seguir o procedimento para preparo da Solução salina peptonada 0,1%, adicionando 30 g de cloreto de sódio por litro de solução.

### 12.2.20 Tiamina cloridrato solução 0,01%

Pesar 100 mg de tiamina e transferir para o balão volumétrico de capacidade para 100 mL e completar o volume com água destilada/deionizada. Transferir 5 mL da solução de solução 0,1% para um balão volumétrico de capacidade para 50 mL e completar o volume com água destilada/deionizada. Esterilizar por filtração. Distribuir em frascos estéreis. Manter protegida da luz, em refrigeração por até três meses.

ISBN 978-85-7991-155-2



9 788579 911552

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

