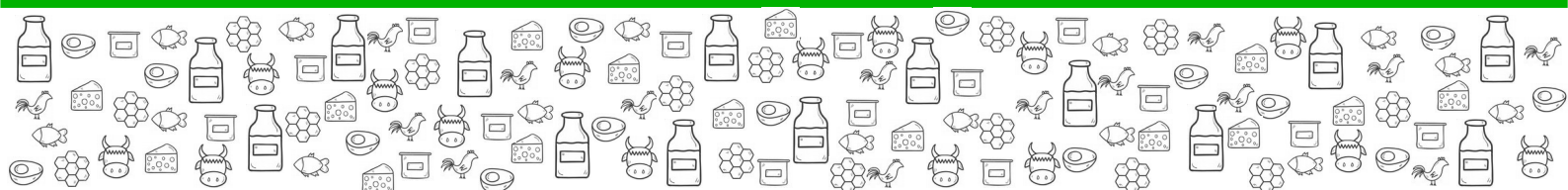


Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal



Minas Gerais 2019

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

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

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

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 gordura”.

2.2 Acidez em leite fluido

2.2.1 Princípio

Consiste na titulação, utilizando como indicador a fenolftaleína, de uma porção da amostra por uma solução alcalina de concentração conhecida.

2.2.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a leite cru, leite pasteurizado, leite de cabra e leite UHT.

2.2.3 Materiais e equipamentos

- Balança com resolução mínima de 0,01 g;
- Banho-maria;
- Béquer de 100 mL;
- Bureta com resolução mínima de 0,05 mL;
- Pipeta volumétrica de 20 mL;
- Proveta de 50 mL.

2.2.4 Reagentes e soluções

- Solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (m/v);
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹;
- Solução de fucsina P.A. (C.I. 42510):

Dissolver 0,06 g de fucsina em 50 mL de álcool etílico absoluto contendo 0,5 mL de ácido acético p.a. Completar o volume para 100 mL com álcool etílico.

2.2.5 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 entre 38 °C e 40 °C em banho-maria, esfriar até temperatura ambiente agitando ocasionalmente.

2.2.6 Procedimento de análise

- (a) Pipetar, para um béquer de 100 mL, 20 mL da amostra. Se necessário expressar o resultado em “g de ác. láctico/100 g”, registrar a massa da amostra;
- (b) Adicionar ao béquer 40 mL de água livre de gás carbônico;
- (c) Adicionar 2 mL da solução de fenolftaleína a 1% (m/v);

(d) Titular com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ até aparecimento de coloração rósea forte persistente por aproximadamente 30 segundos.

Obs.: Deve-se utilizar como padrão de coloração para o ponto final da titulação uma solução de 20 mL da amostra diluída em 40 mL de água à qual se adicionou 100 µL da solução de fucsina.

2.2.7 Cálculo e expressão dos resultados

$$\text{Acidez em g de ác. láctico/100 mL} = \frac{V \cdot f \cdot 0,1 \cdot 0,09 \cdot 100}{20}$$

onde:

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol

L⁻¹; 0,09 = fator de conversão para ácido láctico;

0,1 = molaridade de solução de hidróxido de

sódio; 20 = volume da amostra.

Se necessário expressar a acidez em “g de ác. láctico/100 g”:

$$\text{Acidez em g de ác. láctico/100 g} = \frac{V \cdot f \cdot 0,1 \cdot 0,09 \cdot 100}{m}$$

onde:

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol

L⁻¹; 0,09 = fator de conversão para ácido láctico;

0,1 = molaridade de solução de hidróxido de

sódio; m = massa da amostra.

Em ambos os casos, expressar o resultado obtido com duas casas decimais.

2.2.8 Referências bibliográficas

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, *Official Method 947.05*. 20 ed. Rockville: 2016.

2.3 Acidez em manteiga da terra e manteiga comum

2.3.1 Princípio

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

2.3.2 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.

2.3.3 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.

2.3.4 Reagentes e soluções

- Solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (m/v);
- Solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹;
- Solução de álcool etílico (C₂H₅OH) e éter etílico (C₄H₁₀O) (1+2) (v/v).

2.3.5 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.

2.3.6 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) Titular a amostra com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos ou, opcionalmente, pH 8,4;
- (d) Repetir o procedimento utilizando apenas 40 mL da solução álcool-éter (branco).

2.3.7 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 mol L⁻¹ gasto na titulação, em mL;

V_{branco} = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ gasto na titulação do branco, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹;

m = massa da amostra, em gramas;

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

Expressar os resultados com duas casas decimais.

2.3.8 Referências bibliográficas

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.

2.4 Ácido benzoico e/ou benzoatos

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

2.5 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.

2.6 Amido – qualitativo

2.6.1 Princípio

A reação entre amido e o iodo forma um composto de absorção de coloração azul.

2.6.2 Campo de aplicação

Leite fluido, leite em pó, 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 0,5 g de iodo (I_2) e 1,5 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 fluido:

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. Transferir 10 mL da amostra para tubo de ensaio, aquecer até ebulição em banho-maria e deixar por 5 minutos. Esfriar em água corrente.

(b) 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 5 minutos. Esfriar em água corrente.

(c) 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 até fervura por 5 minutos. Filtrar, se necessário, esfriar e transferir uma alíquota de aproximadamente 20 mL para tubo de ensaio.

2.6.6 Procedimento de análise

Adicionar 2 gotas de solução de Lugol à amostra preparada conforme 2.6.5 e observar.

2.6.7 Expressão dos resultados

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

Pode-se utilizar como referência uma amostra de leite sabidamente negativo adicionado de 0,4 g L⁻¹ de amido.

2.6.8 Referências bibliográficas

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 e caseinatos

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.

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 Referências bibliográficas

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).

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 $38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, 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 °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 Referências bibliográficas

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *15212-1:1998: Oscillation-type density meters - Part 1: Laboratory instruments*. Genebra: 2004.

2.12 Detecção de gordura estranha (pureza de gordura láctea)

De acordo com a metodologia descrita na norma IDF 202, reportar “positivo” ou “negativo” quanto à presença de gordura de origem não láctea.

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 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 (H_2O_2) a 3% (v/v);
- Solução hidroalcoólica de guaiacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$) a 1% (v/v):

Em béquer 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 minutos, 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 minutos e observar desenvolvimento de coloração salmão no tubo de ensaio;
- (d) Efetuar teste “positivo” adicionando 5 gotas de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_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 Referências bibliográficas

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-fostato, que é oxidada pela NAD a gliconato-6-fostato na presença de glicose-6-fostato-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 %, 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 Referências bibliográficas

Manual do kit Sucrose (Saccharose) – Merck 116141

2.16 Dispersabilidade

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

2.17 Etanol em leites fermentados

Com o auxílio do método descrito na norma AOAC 982.12, determinar o teor de etanol na amostra, expressando o resultado em “% (v/m)” com uma casa decimal.

2.18 Extrato seco desengordurado (ESD), sólidos não gordurosos (SNG)

2.18.1 Leite fluido

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.

2.18.2 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.

2.19 Extrato seco total (EST)

2.19.1 Leite

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

2.19.2 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 Fosfatase alcalina

2.20.1 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.

2.20.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a leite pasteurizado.

2.20.3 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.

2.20.4 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 (Na_2CO_3) p.a. e 37,17 g de bicarbonato de sódio (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.

2.20.5 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.

2.20.6 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 minutos;
- (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 minutos; (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 horas de o leite ter sido processado.

2.20.7 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.

2.20.8 Referências bibliográficas

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.

2.21 Gordura, matéria gorda, matéria gorda no extrato seco, lipídeos totais

2.21.1 Bebida láctea

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.

2.21.2 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.

2.21.3 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.

2.21.4 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.

2.21.5 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. Opcionalmente, 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.

2.21.6 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.

2.21.7 Leites fermentados

Utilizar o método descrito na norma IDF 116 para obtenção do teor de matéria gorda, expressando o resultado obtido em “g/100 g” com duas casas decimais.

2.21.8 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.

2.21.9 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.

2.21.10 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.

2.22 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: 1 °C = 0,9656 °H .

2.23 Índice de CMP

2.23.1 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).

2.23.2 Campo de aplicação

Leite fluido e leite em pó.

2.23.3 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 μm , 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 μL e com fluxo da fase móvel de 0,5 a 1,5 mL min^{-1} .

2.23.4 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 (K_2HPO_4), 12,37 g de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) e 21,41 g de sulfato de sódio (Na_2SO_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 mol L^{-1} e solução de hidróxido de potássio a 3 mol L^{-1} . Transferir para balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume e filtrar a solução em membrana de 0,45 μm . Antes do uso, desgaseificar.
- Matriz branca de leite fluido ou leite desidratado reconstituído;
- Solução de ácido tricloroacético (CCl_3COOH) a 24%. Preparar no dia de uso ou a partir de uma solução estoque de ácido tricloroacético a 48%.

2.23.5 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.

2.23.6 Procedimento de análise

- (a) Preparar cinco soluções padrão de CMP contemplando, no mínimo, um ponto abaixo de 30 mg L^{-1} e um ponto acima de 75 mg L^{-1} na matriz branca;

- (b) A uma alíquota de 20 mL das amostras preparadas e de cada padrão, adicionar 10 mL de ácido tricloroacético a 24% lentamente e sob agitação constante;
- (c) Deixar em repouso por 60 minutos 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.

Obs.: Poderão ser utilizadas amostras de referência de teor de CMP certificado para confecção da curva de calibração.

2.23.7 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 na amostra utilizando a equação da curva de calibração.

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

2.23.8 Referências bibliográficas

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

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.

2.24 Índice de peróxidos

2.24.1 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.

2.24.2 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.

2.25 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)”.

2.26 Lactose

2.26.1 Caseinatos e queijo em pó

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.

2.26.2 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 2.27, 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.

2.26.3 Outros produtos lácteos

Determinar o teor de lactose anidra de acordo com o método descrito na seção 2.27, 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.

2.27 Lactose e sacarose por cromatografia iônica

2.27.1 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), carbolinas (C=O) ou hetereátomos 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.

2.27.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a leite e produtos lácteos.

2.27.3 Materiais e equipamentos

- Balança semi-analítica com resolução mínima de 0,01 g;
- Balões volumétricos de 25, 50, 1000, 2000 mL;

- Coluna para carboidratos de estireno/divinilbenzeno;
- Cromatógrafo de íons, com detector amperométrico de célula de ouro, com sistema de diálise e forno acoplados. O sistema deve utilizar uma coluna trap para carboidratos;
- Micropipetas de 10, 1000 e 5000 μL ;
- Tubos para cromatografia iônica.

2.27.4 Reagentes e soluções

- Fase móvel: solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 5 mmol L^{-1} ;
- Padrão de Lactose a 2 g L^{-1} ;
- Padrão de Sacarose a 1 g L^{-1} .

2.27.5 Preparo da amostra

(a) Leite em pó, composto lácteo em pó e isolado proteico em pó:

Pesar 10 g de leite em pó desnatado ou 13 g de leite em pó integral, acrescentar 100 mL de água com auxílio de uma proveta e agitar até a completa dissolução. Para leite parcialmente desnatado ou semidesnatado, verificar a forma de reconstituição de acordo com o fabricante. Tomar uma alíquota de 1 mL do produto reconstituído, transferir para balão volumétrico de 200 mL e completar para o volume. Preparar a amostra em duplicata.

(b) Demais produtos:

Tomar uma alíquota de 1 mL para produtos líquidos ou 1,00 g para produtos pastosos, transferir para balão volumétrico de 200 mL e completar para o volume. Preparar a amostra em duplicata.

Para produtos com teor reduzido de lactose, utilizar balão volumétrico de 100 mL.

2.27.6 Procedimento

(a) Equilibrar o sistema cromatográfico nas seguintes condições: fluxo isocrático de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna em $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, eletrodo de trabalho de ouro (3 mm), eletrodo de referência de paládio, espaçador em $50 \mu\text{m}$, potencial de medida em 50 mV, faixa de medida em $200 \mu\text{A}$, 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 10 ou $20 \mu\text{L}$;

(b) Preparar uma curva de calibração dos açúcares por diluição das soluções padrão de acordo com as concentrações mostradas na Tabela 2. Utilizar as concentrações menores de lactose quando se for analisar produtos com teor reduzido.

A curva deve ser feita em duplicata para cada lote de análises. O coeficiente de correlação (r^2) da curva de calibração deve ser superior a 0,98. A curva deve ser feita em duplicata para cada lote de análises. A cada 30 amostras, deve-se

Tabela 2: Curva de calibração para lactose e sacarose por CI.

Ponto	Sacarose, em mg L ⁻¹	Lactose, em mg L ⁻¹
1	1	80 (5)*
2	3	100 (10)*
3	5	140 (20)*
4	10	200 (40)*
5	20	240 (60)*

Nota: * Para análise de produto de baixo teor ou “zero”.

verificar a validade da curva utilizando-se o ponto central da mesma, tolerando-se um variação de $\pm 15\%$ nesta concentração.

(c) Transferir as duplicatas das amostras preparadas para vials e injetar.

2.27.7 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.

$$\begin{aligned}\text{Sacarose ou Lactose, em g/100 g} &= \frac{V \cdot c}{m \cdot 100} \\ \text{Sacarose ou Lactose, em g/100 mL} &= \frac{V \cdot c}{v \cdot 100}\end{aligned}$$

onde:

c = valor obtido da curva de concentração, em 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;

100 = fator de conversão de mg kg⁻¹ para g/100 g.

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

2.27.8 Referências bibliográficas

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

2.28 Maltodextrina

2.28.1 Princípio

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

2.28.2 Campo de aplicação

Produtos lácteos.

2.28.3 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 μm ;
- Frasco Autoclavável de 250 mL;
- Homogeneizador tipo turrax;
- Proveta 50 mL;
- Sistema de cromatografia líquida com detecção de massas MS/MS *ion trap*;
- 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;

2.28.4 Reagentes e soluções

- Acetato de amônio, grau ACS;
- Acetonitrila, grau HPLC;
- Fase Móvel A:

Pesar 0,1541 \pm 0,001 g de acetato de amônio e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL e completar com um pouco de água ultrapura. Adicionar 1 mL de ácido acético glacial ao balão volumétrico e completar com água ultrapura até 1000 mL.

- Fase Móvel B:

Adicionar 20 mL da solução de Acetato de Amônio 100 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 mmol L⁻¹ preparada sempre que for realizar o ensaio.
- Solução de Ácido Tricloroacético 5%. Válida por 1 mês se estocada em refrigerador com temperatura inferior a 10 °C;
- Solução estoque de 1 mg mL de maltodextrina dextrose equivalente (DE) 16,6-19,5. Válida por 1 mês se estocada em refrigerador com temperatura inferior a 10 °C;

2.28.5 Preparo da amostra

(a) Produtos sólidos:

Pesar, em béquer, 5,0 0 \pm g da amostra. Diluir com 50 mL de água ultrapura morna (50 °C). Deixar esfriar e aliquotar 1000 μ l para tubo falcon de 15 mL. Adicionar 2 mL de TCA 5%.

(b) Queijo e Iogurte:

Pesar, em tubo falcon de 50 mL, 5,0 0, ~~1~~g da amostra. Diluir com 10 mL de TCA 5%.

(c) Produtos Líquidos:

Aliquotar 1 mL de amostra para tubo falcon de 15 mL. Adicionar 2 mL de TCA 5%.

2.28.6 Procedimento de análise

(a) Preparo da Curva de Calibração

A curva de calibração é preparada realizando a adição das soluções de fortificação diretamente à matriz branca. Para pesquisa de maltodextrina, a matriz branca será leite fluido. Preparar a curva nas concentrações descritas na Tabela 3.

(b) Homogeneizar as amostras manualmente por agitação e centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 5 °C;

(c) Transferir, com auxílio de micropipeta, 1000 μ l para Eppendorf e centrifugar, novamente, a 12 000 rpm por 10 min 0 °C;

(d) Para as amostras de produtos sólidos, queijo e iogurte, transferir 500 μ l do sobrenadante do Eppendorf para os vials. Completar os vials com 500 μ l de TCA 5%. Agitar os vials e analisar por LC-MS/MS.

(e) Para as amostras de produtos líquidos e os pontos da curva de calibração, transferir 100 μ l do sobrenadante do Eppendorf para os vials. Completar os vials com 900 μ l de TCA 5%. Agitar os vials e analisar por LC-MS/MS.

(f) Ajustar o sistema cromatográfico e detector MS-MS de acordo com as condições sugeridas nas Tabelas 4 e 5. Ajustes nestas condições visando otimizar o sinal do analito podem ser necessários.

Tabela 3: Fortificação para curva de calibração.

Concentração, em mg ml ⁻¹	Solução de maltodextrina 1 mg mL ⁻¹ , em µL	Amostra branca, em µL
0,00	0	1000,5
0,25	2,5	997,5
0,50	5,0	995,0
1,00	10,0	990,0
1,50	15,0	985,0
2,00	20,0	980,0
5,00	50,0	950,0

Tabela 4: Gradiente sugerido utilizando um fluxo de 0,4 ml min⁻¹.

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

Tabela 5: 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.

2.28.7 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. Como é utilizada curva em matriz, não há necessidade de efetuar correção sobre os valores obtidos.

Se o resultado da amostra for superior a 0,25 g l⁻¹, o resultado é considerado positivo para a presença de maltodextrina na amostra. Se o resultado estiver abaixo de 0,25 g l⁻¹, o resultado é considerado negativo para a pesquisa de maltodextrina.

2.28.8 Referências bibliográficas

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.

2.29 Partículas queimadas

2.29.1 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”.

2.29.2 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”.

2.30 Peroxidase

2.30.1 Princípio

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

2.30.2 Campo de aplicação

Este método é aplicável a leite pasteurizado.

2.30.3 Materiais e equipamentos

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

2.30.4 Reagentes e soluções

- Solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (v/v);
- Solução hidroalcoólica de guaiacol (C₇H₈O₂) a 1% (v/v):

Em béquer 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.

2.30.5 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.

2.30.6 Procedimento de análise

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

2.30.7 Expressão dos resultados

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

2.30.8 Referências bibliográficas

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.

2.31 pH

2.31.1 Princípio

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

2.31.2 Campo de aplicação

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

2.31.3 Materiais e equipamentos

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

2.31.4 Reagentes e soluções

- Soluções padrão de pH.

2.31.5 Preparo da amostra

- (a) Soro de leite em pó: 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 CO₂;

2.31.6 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.

2.31.7 Expressão dos resultados

Reportar o valor obtido com uma casa decimal.

2.31.8 Referências bibliográficas

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.

2.32 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.

Para amostras de leite em pó, 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.

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 descrito neste Manual.

2.33 Substâncias redutoras voláteis (álcool etílico)

2.33.1 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.

2.33.2 Campo de aplicação

Este método aplica-se a leite fluido.

2.33.3 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 kitazato/balão com saída lateral;
- Tubo de ensaio 20 x 200 mm;
- Tubo de silicone ou látex de 25 cm.

2.33.4 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).

2.33.5 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.

2.33.6 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 minutos;
- (e) Observar a coloração da solução sulfocrômica no tubo de ensaio.

2.33.7 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 amostra obtiver resultado positivo para formaldeído.

2.33.8 Referências bibliográficas

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

2.34 Umectabilidade

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

2.35 Umidade

2.35.1 Caseína e caseinatos

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

2.35.2 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.

2.35.3 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.

2.35.4 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.

2.35.5 Leite em pó

Utilizar o método descrito na norma IDF 26A:1993, expressando o resultado em “g/100 g” com duas casas decimais.

2.35.6 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.

2.35.7 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.

2.36 Vitamina A

Utilizar o método descrito na norma AOAC 2001.13 para obtenção do teor de vitamina A, expressando o resultado em “UI/100 g” com duas casas decimais usando a seguinte relação: 1 UI = 0,3 µg.

BIBLIOGRAFIA:

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **MANUAL DE ANÁLISE DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**. 29 de Agosto de 2019.