

# MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

## GABINETE DO MINISTRO

### INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 2 DE JUNHO DE 2011

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto no Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, no Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, na Instrução Normativa MAPA nº 1, de 16 de janeiro de 2007, e o que consta do Processo nº 21000.011272/2010-95, resolve:

Art. 1º Aprovar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescado e seus Derivados, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa.

Art. 2º Os métodos de que trata esta Instrução Normativa serão adotados pelos Laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

WAGNER ROSSI

## ANEXO

### MÉTODOS ANALÍTICOS OFICIAIS FÍSICO-QUÍMICOS

#### PARA CONTROLE DE PESCADO E SEUS DERIVADOS

##### 1. Normas de colheita de amostras

1.1. A colheita da amostra constitui a primeira fase da análise do produto. Dentro desse conceito, o serviço de colheita deve estar bem integrado com o laboratório, devendo haver sincronismo entre a remessa e a capacidade do laboratório em executar as análises.

1.2. As amostras para análises físico-químicas deverão ser enviadas separadas daquelas destinadas às análises microbiológicas.

1.3. As amostras devem ser enviadas em sua embalagem original para evitar modificações em suas características.

1.4. As amostras para análises físico-químicas deverão ser acondicionadas em recipientes limpos e íntegros (sem perfurações, rachaduras, etc.). A quantidade mínima a ser encaminhada ao laboratório deve ser de 500 g (quinhentos gramas); nos casos em que forem solicitados os ensaios de fósforo e metabissulfito, aumentar em 200 g (duzentos gramas) a quantidade de amostra para cada prova solicitada. Quando o peso unitário não atingir o mínimo estabelecido neste subitem, deverão ser colhidas tantas unidades quantas necessárias para se obter aquele quantitativo. Neste caso, cuidados especiais são necessários para que todas as unidades pertençam ao mesmo lote, partida, data de fabricação, etc., a fim de serem mantidas as características de homogeneidade da amostra.

1.5. O ensaio de histamina requer uma amostra composta de 9 (nove) unidades embaladas separadamente em quantidade superior a 500 g por unidade.

1.6. Para o ensaio de desglaciamento, a amostra deve ser composta de 6 (seis) unidades em sua embalagem original, independentemente da quantidade em cada embalagem.

1.7. Em casos especiais, a amostra poderá ser acompanhada de relatório adicional, contendo informações

que possam auxiliar o analista na condução do seu trabalho.

1.8. As amostras deverão ser acompanhadas de indicação precisa dos tipos de análises a serem realizadas.

1.9. Depois de colhidas, as amostras deverão ser acondicionadas adequadamente para evitar qualquer alteração nas mesmas até sua chegada ao laboratório. Assim, as amostras de produtos facilmente perecíveis deverão ser acondicionadas em recipientes isotérmicos, embaladas em sacos plásticos transparentes e acompanhadas de gelo ou outra substância refrigerante, cuidando-se sempre para que não haja contato destas com a amostra.

1.10. As amostras que devem chegar congeladas ao laboratório serão acondicionadas em recipientes isotérmicos com gelo seco. Na falta deste, acondicionar a amostra (previamente embalada e posteriormente embrulhada em papel alumínio ou plástico) em recipiente isotérmico com a adição de gelo comum ou reciclável.

1.11. Providências especiais deverão ser tomadas para que o tempo decorrido entre a colheita da amostra e sua chegada ao laboratório seja o mais breve possível, recomendando-se que seja evitada a utilização de mecanismos que impliquem estocagem intermediária entre o ponto de colheita e o laboratório.

1.12. Somente serão aceitas para análise amostras acondicionadas em embalagem lacrada pela pessoa que efetuou a colheita, sugerindo-se para tal a utilização de lacre ou outro tipo de fechamento hermético que não possa ser violado sem que se torne evidente.

Tal providência se faz necessária para evitar a substituição ou adulteração da amostra entre o ponto de colheita e o laboratório, com reflexos no resultado da análise.

1.13. Todas as amostras que chegarem ao laboratório em condições diferentes das preconizadas serão recusadas, cabendo ao laboratório notificar, das razões da não aceitação, a pessoa que realizou a colheita.

## 2. Análise sensorial e preparo de amostra

### 2.1. Peixe fresco inteiro ou eviscerado

#### 2.1.1. Características sensoriais

2.1.1.2. Aspecto Na avaliação sensorial, o produto deverá apresentar-se com todo o frescor da matéria prima convenientemente conservada; deverá estar isento de toda e qualquer evidência de decomposição, manchas por hematomas, coloração distinta da normal para a espécie considerada, incisões ou rupturas das superfícies externas:

a) Escamas: unidas entre si e fortemente aderidas à pele.

Devem ser translúcidas e com brilho metálico. Não devem estar viscosas.

b) Pele: úmida, tensa e bem aderida.

c) Mucosidade: em espécies que a possuem, deve ser aquosa e transparente.

d) Olhos: devem ocupar a cavidade orbitária, serem brilhantes e salientes.

e) Ânus: fechado.

f) Opérculo: rígido, deve oferecer resistência à sua abertura.

A face interna deve ser nacarada, os vasos sanguíneos cheios e fixos.

g) Brânquias: de cor rosa ao vermelho intenso, úmidas e brilhantes, ausência ou discreta presença de

muco.

h) Abdômen: tenso, sem diferença externa com a linha ventral.

Na sua evisceração, o peritônio deverá apresentar-se muito bem aderido às paredes, as vísceras inteiras, bem diferenciadas, brilhantes e sem dano aparente.

i) Músculos: aderidos fortemente aos ossos da espinha dorsal e/ou cartilagens, de elasticidade marcante.

2.1.1.3. Odor Característico da espécie.

2.1.1.4. Coloração Característica da espécie.

2.1.2. Preparo de amostras Retirar porção da musculatura de várias regiões do peixe, picar e homogeneizar. Analisar imediatamente.

2.2. Crustáceos

2.2.1. Características sensoriais

2.2.1.2. Aspecto Deverá apresentar-se, no geral, brilhante e úmido, tendo o corpo em curvatura natural, rígida, artículos firmes, resistentes, com carapaça bem aderente ao corpo, olhos vivos e destacados.

2.2.1.3. Odor Característico da espécie.

2.2.1.4. Coloração Característica da espécie, sem qualquer pigmentação estranha.

2.2.2. Preparo de amostras Picar e homogeneizar uma porção da musculatura. Analisar imediatamente. Caso a amostra requeira processamento com casca e/ou cabeça, indicar o referido procedimento no resultado.

2.3. Moluscos bivalves (mariscos)

2.3.1. Características sensoriais

2.3.1.2. Aspecto Deverá apresentar-se com carne úmida, bem aderente à concha e de aspecto esponjoso.

2.3.1.3. Odor Agradável e pronunciado.

2.3.1.4. Coloração a) Característica da espécie.

b) Cinzenta clara nas ostras e amarelada nos mexilhões.

2.3.2. Preparo de amostras Picar e homogeneizar uma porção da musculatura. Analisar imediatamente.

2.4. Cefalópodes (polvo e lula)

2.4.1. Características sensoriais

2.4.1.1. Aspecto Deverá apresentar-se com pele lisa e úmida, olhos vivos e salientes nas órbitas, carne consistente e elástica.

2.4.1.2. Odor Característico da espécie.

2.4.1.3. Coloração Ausência de qualquer pigmentação estranha à espécie.

2.4.2. Preparo de amostras Picar e homogeneizar uma porção da musculatura. Analisar imediatamente.

## 2.5. Filé de peixe resfriado ou congelado

### 2.5.1. Características sensoriais

2.5.1.1. Aspecto Na avaliação sensorial, o produto deverá apresentar-se com todo o frescor da matéria prima convenientemente conservada; deverá estar isento de toda e qualquer evidência de decomposição, manchas por hematomas, coloração distinta à normal para a espécie considerada, incisões ou rupturas.

2.5.1.2. Coloração Característica da espécie.

2.5.1.3. Consistência Firme, variando conforme a espécie.

2.5.1.4. Odor Característico da espécie.

2.5.2. Preparo de amostras Descongelar em refrigerador ou à temperatura ambiente e descartar o líquido do degelo. Picar e homogeneizar uma porção da musculatura. Analisar imediatamente.

## 2.6. Pescado em conserva

### 2.6.1. Características sensoriais

2.6.1.1. Aspecto Sem vísceras, com exceção de rins e gônadas, com ou sem cabeça, com ou sem cauda, conservando ou não as escamas, segundo a classe e variedade da conserva, contendo, no mínimo, 50% de peixe no conteúdo do envase.

a) Conservas de peixe eviscerado: os peixes eviscerados devem ser envasados ordenadamente e a maioria das unidades contidas em um envase deve ser de tamanho uniforme.

b) Conservas de filé de peixe: o filé de peixe deve estar isento de coágulos sanguíneos, guelras, vísceras, escamas e ossos da espinha dorsal, com ou sem pele e envasados ordenadamente. A maioria das unidades contidas em um envase deve ser de tamanho uniforme, podendo ser adicionadas porções de filés de um tamanho menor para completar o peso líquido.

c) Conservas de medalhão ou posta: o medalhão ou posta deve estar livre de escamas, coágulos sanguíneos, guelras e vísceras.

d) Conservas de pedaço de peixe: o pedaço de peixe deve estar livre de escamas, coágulos sanguíneos, guelras e vísceras.

e) Conservas de peixe picado: o produto deve estar livre de pele, escamas, coágulos sanguíneos, partes ósseas, guelras e vísceras.

f) Conservas de pasta de peixe: o produto, na sua composição, deve estar livre de pele, escamas, coágulos sanguíneos, partes ósseas, guelras e vísceras.

2.6.1.2. Coloração Característica da espécie, do tipo e classe do produto, livre de descolorações e enegrecimentos.

2.6.1.3. Consistência Característica da espécie, do tipo e classe do produto. Caso o produto contenha espinha dorsal, cauda ou nadadeira, estas devem ser de consistência macia.

2.6.1.4. Odor Característico da espécie, do tipo e classe do produto, livre de odores estranhos.

### 2.6.2. Preparo de amostras

a) Peixe enlatado, moluscos e outros produtos marinhos enlatados: colocar todo o conteúdo da lata (carne

e líquido) em um misturador para obter uma massa homogênea. Analisar imediatamente.

b) Líquido (óleo) pode ser analisado separadamente drenando por 2 minutos em peneira Nº 8 a 12. No caso de peixe envasado com sal ou salmoura, após desprezar todo o líquido, enxaguar o sal aderido com solução saturada de cloreto de sódio.

## 2.7. Peixe salgado e peixe salgado seco

### 2.7.1. Características sensoriais

2.7.1.1. Aspecto O produto deverá apresentar-se isento de larvas ou parasitos, sujidades, vísceras ou material estranho que possa comprometer a qualidade do produto e constituir prejuízo à saúde.

2.7.1.2. Odor Característico, próprio da espécie processada, isenta de odores estranhos tais como: mofo e ranço.

2.7.1.3. Coloração Característica, sem alterações provocadas por: bactérias halofílicas (rosa e/ou vermelha); fungos (manchas brancas e/ou marrom escuro); ranço (amarelo e/ou laranja).

2.7.1.4. Consistência Firme, variando conforme a espécie do pescado.

2.7.2. Preparo de amostras Tomar várias porções de diferentes regiões do peixe, de acordo com o seu tamanho, de maneira a obter-se uma amostra expressiva, retirar os ossos não comestíveis e preservar a pele. Passar a amostra 3 (três) vezes em moedor de carne (disco com orifícios de 1,5 a 3,0 mm de diâmetro), remover e misturar as partes não trituradas à massa obtida, antes de repetir cada moagem. Analisar imediatamente.

## 3. Métodos qualitativos

### 3.1. Avaliação de embalagem

3.1.2. Princípio O método baseia-se na inspeção visual do produto em busca de defeitos que comprometam a integridade e a validade do produto acabado.

3.1.3. Campo de aplicação Conservas de pescados.

3.1.4. Materiais e equipamentos Não aplicável.

3.1.5. Reagentes e soluções Não aplicável.

### 3.1.6. Procedimento de análise

a) Inspeccionar a embalagem externamente em busca de defeitos tais como: ferrugem, falhas de recravação, amassamento, vazamento e estufamento;

b) Em conservas, verificar a presença de um vácuo detectável;

c) Observar as condições internas da lata, verificar se há falhas no verniz ou pontos de oxidação principalmente junto às costuras;

e se a estanhagem está perfeita.

3.1.7. Expressão dos resultados Reportar os defeitos encontrados ou sua ausência.

3.1.8. 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.

### 3.2. Nitratos

3.2.1. Princípio Baseia-se na reação de oxidação da difenilamina, transformando-se em difenil-benzidina e posteriormente em um composto quimoidal de coloração azul. A reação se processa preferencialmente em presença de cloretos.

3.2.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescado curado, conservas e semiconservas de pescado.

#### 3.2.3. Materiais e equipamentos

a) Balança analítica com resolução de 0,1 g;

b) Banho-maria;

c) Balão volumétrico de 250 mL;

d) Bastão de vidro;

e) Béquer de 50 mL;

f) Erlenmeyers de 250 ou 500 mL;

g) Funil;

h) Papel de filtro qualitativo;

i) Pipetas graduadas de 1 e 10 mL;

j) Tubo de ensaio.

3.2.4. Reagentes e soluções a) Acido sulfúrico P.A.;

b) Difenilamina (C<sub>12</sub>H<sub>11</sub> N);

c) Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado (K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]·3H<sub>2</sub>O) a 15% (m/v);

d) Solução de sulfato de zinco hepta-hidratado (Zn·SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) ou acetato de zinco di-hidratado ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> Zn·2H<sub>2</sub>O) a 30% (m/v);

e) Solução de tetraborato de sódio deca-hidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) a 5% (m/v).

#### 3.2.5. Procedimento de análise

a) Pesar entre 9 e 11 g de amostra homogeneizada em béquer de 50 mL.

b) Transferir para erlenmeyer de 500 mL com o auxílio de 100 mL de água deionizada quente.

c) Adicionar 5 mL da solução de tetraborato de sódio a 5%.

d) Deixar em banho-maria por 15 minutos, agitando frequentemente.

e) Esfriar à temperatura ambiente e, com o auxílio de um funil e bastão de vidro, transferir o conteúdo do erlenmeyer, quantitativamente, para balão volumétrico de 250 mL, lavando o erlenmeyer com aproximadamente 50 mL de água deionizada quente (60°C).

f) Deixar esfriar e adicionar 5 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5 mL da solução de sulfato ou acetato de zinco a 30%, agitando por rotação após a adição de cada reagente. Completar o volume com água.

g) Filtrar em papel de filtro qualitativo, transferindo-se 5 mL do filtrado para um tubo de ensaio.

h) Adicionar cristais de difenilamina e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado lentamente pela parede do tubo.

3.2.6. Expressão dos resultados Positivo: em presença de nitratos haverá formação de um anel azul na interface entre o ácido e o filtrado, cuja intensidade de cor é dependente da concentração de nitrato na amostra. Se o resultado for duvidoso pelo aparecimento de coloração muito escura, faz-se uma diluição do filtrado.

3.2.7. 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.

### 3.3. Nitritos

3.3.1. Princípio Baseia-se na reação de diazotação de nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rosa.

3.3.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescado curado, conservas e semiconservas de pescado.

#### 3.3.3. Materiais e equipamentos

a) Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;

b) Banho-maria;

c) Balão volumétrico de 250 mL;

d) Bastão de vidro;

e) Béquer de 50 mL;

f) Erlenmeyers de 250 ou 500 mL;

g) Funil;

h) Papel de filtro qualitativo;

i) Pipetas graduadas de 1 e 10 mL;

j) Tubo de ensaio.

#### 3.3.4. Reagentes e soluções

- a) Solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) a 15% (m/v);
- b) Solução de sulfato de zinco hepta-hidratado ( $Zn \cdot SO_4 \cdot 7H_2O$ ) ou acetato de zinco di-hidratado ( $(CH_3COO)_2 Zn \cdot 2H_2O$ ) a 30% (m/v);
- c) Solução de tetraborato de sódio deca-hidratado ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ) a 5% (m/v);
- d) Solução de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina ( $C_{12}H_{16}Cl_2N_2$ ) a 0,5% (m/v):

Dissolver 0,500 g  $\pm$  0,002 g de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina em 100 mL de água. Estocar em frasco âmbar sob refrigeração. A solução deve ser desprezada quando apresentar alteração da coloração.

- e) Solução de sulfanilamida ( $C_6H_8N_2O_2S$ ) a 0,5% (m/v) em ácido clorídrico (HCl) (1+1):

Dissolver 1,250 g  $\pm$  0,002 g de sulfanilamida em 250 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) (1+1). Esta solução é válida por dois meses.

### 3.3.5. Procedimento de análise

- a) Pesar entre 9 e 11 g de amostra homogeneizada em béquer de 50 mL;
- b) Transferir para erlenmeyer de 500 mL com o auxílio de 100 mL de água deionizada quente;
- c) Adicionar 5 mL da solução de tetraborato de sódio a 5%;
- d) Deixar em banho-maria por 15 minutos, agitando frequentemente;
- e) Esfriar à temperatura ambiente e, com o auxílio de um funil e bastão de vidro, transferir o conteúdo do erlenmeyer, quantitativamente, para balão volumétrico de 250 mL, lavando o erlenmeyer com aproximadamente 50 mL de água deionizada quente (60°C);
- f) Deixar esfriar e adicionar 5 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5 mL da solução de sulfato ou acetato de zinco a 30 %, agitando por rotação após a adição de cada reagente. Completar o volume com água;
- g) Filtrar em papel de filtro qualitativo, transferindo-se 5 mL do filtrado para um tubo de ensaio;
- h) Adicionar 0,5 mL da solução de sulfanilamida a 0,5 %, agitar e deixar reagir por 3 minutos;
- i) Adicionar 0,5 mL da solução de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina a 0,5 %, agitar e deixar em repouso de 10 a 30 minutos.

3.3.6. Expressão dos resultados Positivo: desenvolvimento de coloração rosa, cuja intensidade depende da concentração de nitrito na amostra.

Observação: Amostras que possuem nitrito em excesso proporcionam coloração vermelha fugaz que passa a amarelo pardo, podendo confundir-se com um resultado negativo.

3.3.7. 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.

### 3.4. Prova de cocção



3.4.1. Princípio Fundamenta-se na avaliação das características sensoriais da carne de pescado após seu aquecimento.

3.4.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescado fresco, resfriado e congelado.

3.4.3. Materiais e equipamentos a) Balança com resolução de 1 g.

b) Bico de Bunsen ou placa aquecedora;

c) Erlenmeyer de 500 mL;

d) Vidro de relógio.

3.4.4. Reagentes e soluções Não aplicável.

3.4.5. Procedimento de análise

a) Retirar porções musculares (entre 79 e 81 g) de várias partes da amostra e transferir para erlenmeyer de 500 mL;

b) Adicionar água até cobrir a amostra, tampar com vidro de relógio e aquecer até o início dos primeiros vapores;

c) Retirar o vidro de relógio e avaliar os odores desprendidos.

3.4.6. Expressão dos resultados Reportar os odores percebidos: característico, amoniacal, sulfídrico, rançoso ou outros (especificar).

3.4.7. 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.

3.5. Prova para óleo de oliva

3.5.1. Princípio Baseia-se no aparecimento de fluorescência pela incidência de luz ultravioleta no óleo de oliva.

3.5.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a conservas e semiconservas em óleo de oliva.

3.5.3. Materiais e equipamentos

a) Câmara ultravioleta ou lâmpada ultravioleta de 254 nm;

b) Béquer de 50 mL ou cristalizador;

c) Funil;

d) Papel de filtro qualitativo;

e) Proveta de 50 mL.

3.5.4. Reagentes e soluções Não aplicável.

### 3.5.5. Procedimento de análise

- a) Transferir 10 mL do óleo filtrado para béquer de 50 mL ou cristizador;
- b) Levar à câmara ultravioleta ou adaptar uma lâmpada de ultravioleta em lugar escuro;
- c) Observar a fluorescência.

3.5.6. Expressão dos resultados Presença: aparecimento de fluorescência avermelhada.

3.5.7. 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.

## 4. Métodos quantitativos

### 4.1. Acidez em ácido oleico

4.1.2. Princípio Fundamenta-se na reação de neutralização do ácido oleico pelo hidróxido de sódio, em presença de fenolftaleína como indicador.

4.1.3. Campo de aplicação Este método é aplicável a conservas e semiconservas de pescado em óleo.

### 4.1.4. Materiais e equipamentos

- a) Balança analítica com resolução de 0,0001 g;
- b) Bureta de 10 mL;
- c) Erlenmeyer ou béquer de 150 mL;
- d) Proveta de 100 mL.

### 4.1.5. Reagentes e soluções

- a) Solução alcoólica de fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>) a 1% (m/v);
- b) Solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L;
- c) Solução de álcool etílico (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) e éter etílico (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O) (1+2) (v/v) neutralizada;
- d) Adicionar gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 2 % e neutralizar com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L até coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos.

4.1.6. Procedimento de análise a) Pesar 5 g ± 0,0050 g do óleo em erlenmeyer ou béquer de 150 mL;

b) Adicionar 40 mL da solução álcool-éter recém-neutralizada e algumas gotas da solução alcoólica de fenolftaleína a 1%;

c) Titular com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos.

4.1.7. Expressão dos resultados Acidez em ác. oleico/100g =  $V \cdot 0,1 \cdot f \cdot 282,45 \cdot 100 / (m \cdot 1000)$  Em que:

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

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

m = massa da amostra, em gramas;

0,1 = concentração em mol/L da solução de hidróxido de sódio;

282,45 = massa molar do ácido oleico.

Observação: Expressar os resultados com duas casas decimais.

4.1.8. Referências bibliográficas BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal.

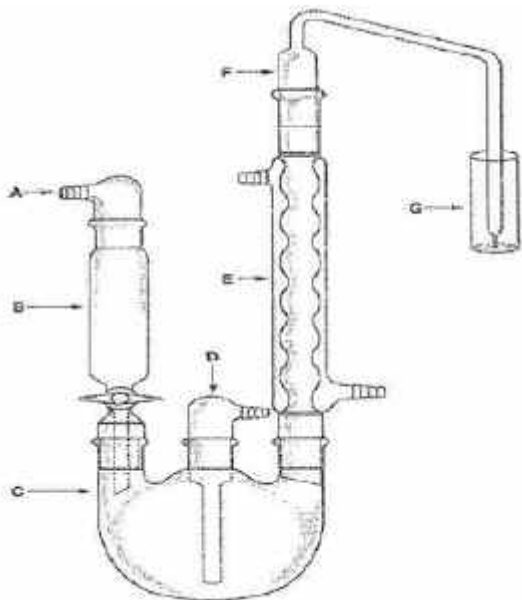
Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II - Métodos físicos e químicos. Brasília: 1981.

4.2. Anidrido sulfuroso e sulfitos 4.2.1. Princípio O método mensura sulfitos livres e não livres, como os produtos provenientes de adições carbonílicas, em alimentos. Uma amostra é aquecida em presença de ácido clorídrico, convertendo os sulfitos em SO<sub>2</sub>, levados por um fluxo de nitrogênio até uma solução de peróxido de hidrogênio na qual são oxidados a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O teor de sulfitos na amostra é então obtido a partir da titulação com uma solução padronizada de NaOH.

4.2.2. Campo de aplicação Aplicável a pescados com teor de sulfitos superior a 10 mg/kg, mesmo em presença de outros compostos sulfurosos voláteis.

4.2.3. Materiais e equipamentos

a) Aparelho de Monier-Willians conforme figura a seguir:



Aparelho de Monier-Willians:

(A) tubo de vidro com junta para borbulhamento de gás;

(B) funil de adição com junta esmerilhada;

- (C) balão de fundo redondo de 1000 mL com três bocas;
- (D) tubo de vidro com junta para borbulhamento de gás;
- (E) condensador de bolas;
- (F) tubo de vidro em "U" com junta esmerilhada;
- (G) recipiente receptor (pode ser utilizado um erlenmeyer).

- b) Balança analítica com resolução mínima de 0,1 g;
- c) Banho de circulação capaz de manter a água de resfriamento a uma temperatura inferior a 15°C;
- d) Bureta de 10 mL;
- e) Manta aquecedora;
- f) Nitrogênio de alta pureza;
- g) Processador de alimentos ou liquidificador.

#### 4.2.4. Reagentes e soluções

- a) Etanol 99%;
- b) Solução de ácido clorídrico 4 mol/L;
- c) Solução indicadora de vermelho de metila;
- d) Solução padronizada de hidróxido de sódio 0,01 mol/L;
- e) Solução de peróxido de hidrogênio a 3%.

#### 4.2.5. Procedimento de análise

- a) Montar o Aparelho de Monier-Willians, certificando-se de que as juntas não permitam vazamentos;
- b) Conectar o banho de circulação ao condensador (E) e inicie o fluxo do líquido refrigerante;
- c) Adicionar ao balão de três bocas (C) do aparelho 400 mL de água deionizada;
- d) Adicionar ao funil de separação (B) 90 mL de HCl 4 mol/L;
- e) Adicionar ao frasco receptor (G) 30 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% previamente titulados com uma solução 0,01 mol/L de NaOH até a coloração amarela utilizando o indicador vermelho de metila;
- f) Conectar o gás N<sub>2</sub> ao borbulhador (D) e iniciar o fluxo, mantendo-o em aproximadamente 200 mL/min;
- g) Aguardar cerca de 15 minutos para a desoxigenação do sistema;
- h) Transferir 50 g da amostra para o processador de alimentos, adicionando 5 mL de etanol e 95 mL de água. Triturar até que os pedaços possam passar pela junta 24/40 do balão de três bocas (C);
- i) Adicionar rapidamente esta mistura ao balão de três bocas (C) do aparelho;
- j) Através da conexão (A), aplicar N<sub>2</sub> sobre o HCl contido no funil de separação (B);

k) Abrir a torneira do mesmo, adicionando-o ao sistema.

Fechar a válvula quanto restarem cerca de 3 mililitros do ácido;

l) Ligar o aquecimento a uma potência tal que entre 80 e 90 gotas/min do condensado retornem do condensador (E) ao balão (C);

m) Deixar o conteúdo do balão (C) em ebulição por 1h40min;

n) Recolher o receptor (G), titulando-o com solução de NaOH 0,01 mol/L até que o ponto final amarelo persista por mais de 20 segundos.

4.2.6. Expressão dos resultados  $SO_2 = 32,02 \cdot V \cdot 0,01 \cdot f \cdot 1000/m$  Em que:

32,02 = miliequivalente-grama do  $SO_2$ ;

V = volume de Solução de NaOH 0,01 mol/L gasto na titulação, em mL;

0,01 = concentração da Solução de NaOH, em mol/L;

f = fator de correção para a Solução de NaOH;

m = massa de amostra utilizada, em g.

4.2.7. Referências bibliográficas AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 990.28. 18 ed. Gaithersburg: 2010.

### 4.3. Cloretos

4.3.1. Princípio Em uma titulação de precipitação, os cloretos são convertidos em AgCl insolúvel pela adição de nitrato de prata em pH levemente alcalino utilizando o cromato de potássio como indicador.

O final da titulação é visualizado pela formação de um precipitado vermelho-tijolo de cromato de prata.

4.3.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescados curados, conservas e semiconservas de pescado.

### 4.3.3. Materiais e equipamentos

a) Agitador magnético;

b) Balança analítica com resolução de 0,0001 g;

c) Banho-maria;

d) Forno mufla;

e) Balão volumétrico de 100 mL;

f) Bastão de vidro;

g) Bico de Bunsen ou chapa aquecedora;

h) Bureta de 25 mL;

i) Cadinho de porcelana;

- j) Erlenmeyer de 125 mL;
- k) Funil;
- l) Papel de filtro qualitativo;
- m) Pipeta graduada de 5 mL;
- n) Pipeta volumétrica de 10 mL.

#### 4.3.4. Reagentes e soluções

- a) Solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) (1+9);
- b) Solução de cromato de potássio (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) a 5% (m/v);
- c) Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L;
- d) Solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) 0,1 mol/L.

#### 4.3.5. Procedimento de análise a) Pesar em cadinho de porcelana 2 g ± 0,005 g de amostra homogeneizada;

- b) Levar o conjunto ao bico de Bunsen ou chapa aquecedora até a carbonização completa;
- c) Incinerar em cadinho de porcelana entre 530 e 550°C até obter cinzas claras (cerca de 4 horas);
- d) Não havendo clareamento das cinzas, adicionar 2 a 3 gotas de água, secar em placa aquecedora ou estufa a 105°C ± 2°C e levar ao forno mufla até obter cinzas claras.
- e) Adicionar ao cadinho 2 a 3 gotas de solução de ácido nítrico (1+9) para facilitar a dissolução das cinzas e 10 mL de água deionizada quente;
- f) Agitar com bastão de vidro e filtrar, recebendo o filtrado em erlenmeyer de 125 mL;
- g) Lavar bem o cadinho e o papel de filtro com aproximadamente 20 mL de água deionizada quente;
- h) Ajustar o pH do filtrado entre 7,0 a 10,5 com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L;
- i) Adicionar 1 mL de solução de cromato de potássio a 5% e titular com solução de nitrato de prata 0,1 mol/L até o surgimento dos primeiros precipitados persistentes de coloração vermelho-tijolo;
- j) Fazer uma prova em branco.

#### 4.3.6. Expressão dos resultados % de cloretos em NaCl = $(V - V_b) \cdot 0,1 \cdot f \cdot 58,5 \cdot 100 / (m \cdot 1000)$ Em que:

V = volume da solução de nitrato de prata 0,1 mol/L gastos na titulação, em mL;

V<sub>b</sub> = volume da solução de nitrato de prata 0,1 mol/L gastos na titulação do branco, em mL;

f = fator de correção da solução de nitrato de prata 0,1 mol/L;

m = massa da amostra, em gramas;

0,1 = concentração em mol/L da solução de nitrato de prata;

58,5 = massa molar do cloreto de sódio.

4.3.7. 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.

SKOOG, D. A. et alli. Fundamentos de Química Analítica, 8ª ed. São Paulo: Thonson Learning, 2007.

#### 4.4. Desglaciamento

4.4.1. Princípio O método baseia-se na remoção em condições controladas do glaciamento da amostra para determinação do peso do produto desglaciado e percentual de glaciamento.

4.4.2. Campo de aplicação Pescados congelados glaciados.

4.4.3. Materiais e equipamentos

a) Balança com resolução de 0,1 g;

b) Termômetro com resolução de 0,1°C, abrangendo a faixa 0°C a 30°C;

c) Recipiente paralelepípedo com um volume superior a 10 vezes o peso bruto da amostra;

d) Peneira com malha de 2,4 mm em aço inoxidável;

e) Cronômetro.

4.4.4. Reagentes e soluções Não aplicável.

4.4.5. 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 em uma 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 retirado, evitando-se o descongelamento;

e) Retirar o conjunto peneira mais produto e deixar escorrer por 50 segundos  $\pm$  10 segundos. Para facilitar a drenagem, a peneira deverá permanecer inclinada em um ângulo entre 15° e 17°. A água aderida na superfície da amostra deve ser removida com o auxílio de toalhas de papel, evitando-se pressionar a amostra;

f) Pesar a amostra desglaciada determinando, com isso, o peso do produto desglaciado (Ppd);

g) Repetir este procedimento para as 5 amostras restantes.

Observações:

. 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 Ppd 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  $-6^{\circ}\text{C}$ . No momento do ensaio, a amostra deve estar a uma temperatura entre  $-6^{\circ}\text{C}$  e  $-12^{\circ}\text{C}$ .

4.4.6. Expressão dos resultados Determinar o peso do produto glaciado para cada amostra subtraindo-se do peso bruto o peso da embalagem correspondente:

$$P_{pg} = P_B - P_E$$

a) Reportar o "peso glaciado" (PG) como a média dos P<sub>pg</sub>:

$$PG = \sum P_{pg} / n$$

b) Reportar o "peso desglaciado"(PD) como a média dos P<sub>pd</sub>:

$$PD = \sum P_{pd} / n$$

c) Determinar o percentual de glaciamento utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de glaciamento} = (\sum (PG - PD) / \sum PG)$$

Observação: Expressar os resultados com uma casa decimal.

4.4.7. Referências bibliográficas Codex Alimentarius Standard. Codex Standard for Quick Frozen Lobsters - Codex Stan 95 rev. 2. Roma: FAO/WHO, 2004.

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

Codex Alimentarius Standard.

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. 18 ed. Gaithersburg: 2010.

#### 4.5. Fósforo total

4.5.1. Princípio O método baseia-se na conversão fósforo presente na amostra em ortofosfato. A reação deste com molibdato em meio ácido produz um complexo misto molibdato/fosfato que, na presença do íon vanadato, forma o ácido molibdovanadofosfórico de cor amarelada. A intensidade da cor amarela é proporcional à concentração de íons fosfato na amostra e quantificada espectrofotometricamente a 420 nm.

4.5.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescados e seus derivados.

4.5.3. Materiais e equipamentos

a) Balança com resolução de 0,0001 g;

b) Balões volumétricos de 100, 200 e 1000 mL;



- c) Béquer de 250 ou 300 mL;
- d) Cadinho de porcelana;
- e) Espectrofotômetro de absorção molecular;
- f) Forno mufla com programação de temperatura;
- g) Funil;
- h) Papel de filtro qualitativo;
- i) Pipetas graduadas ou pipetador automático;
- j) Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 e 10 mL;
- k) Placa aquecedora;
- l) Provetas;
- m) Vidro de relógio.

#### 4.5.4. Reagentes e soluções

- a) Solução ácido clorídrico 1+3;
- b) Ácido Nítrico;
- c) Fosfato de potássio monobásico;
- d) Solução de Metavanadato de amônio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ):

Dissolver 1 g de metavanadato de amônio em 125 mL de água quente, deixar esfriar e adicionar 125 mL de ácido perclórico a 70%.

- e) Solução de Molibdato de amônio:

Dissolver 20 g de molibdato de amônio tetrahidratado em 200 mL de água quente e deixar esfriar.

- f) Solução de molibdovanadato:

Adicionar gradualmente a solução de molibdato à solução de metavanadato sob agitação e completar para 1000 mL.

- g) Solução padrão de fósforo:

Solução estoque (2 mg de P/mL) - solubilizar em água deionizada exatamente 8,788 g de fosfato de potássio monobásico previamente seco em estufa a 105°C por duas horas, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água deionizada e homogeneizar.

h) Solução de trabalho (0,1 mg de P/mL) - Diluir 50 mL da solução estoque em 500 mL de água deionizada e 10 mL de ácido sulfúrico 20 mol/L, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água deionizada e homogeneizar.

4.5.5. Procedimento de análise a) Pesar 2,0 g da amostra em béquer de 150 mL. Levar à mufla e aumentar gradualmente a temperatura até 550 - 600°C, calcinando a amostra por 4h a esta temperatura;

- b) Adicionar 40 mL de ácido clorídrico 1+3 e algumas gotas de ácido nítrico, levar à ebulição em placa aquecedora, deixar esfriar;
- c) Filtrar para balão de 200 mL, completar o volume com água deionizada e homogeneizar;
- d) Pipetar uma alíquota desta solução para balão volumétrico de 100 mL de modo que a solução final tenha não mais que 1,5 mg de P/mL. Adicionar 20 mL da solução de molibdovanadato, completar o volume com água deionizada e aguardar 10 minutos;
- e) Preparar a curva de calibração a partir de alíquotas de 1, 2, 5, 7 e 10 mL da solução de trabalho de fósforo em balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 20 mL da solução de molibdovanadato, completar o volume e homogeneizar.
- f) Estas soluções possuem estabilidade limitada, devendo ser utilizadas imediatamente e descartadas logo após o uso.
- g) Fazer a leitura no espectrofotômetro em 420 nm utilizando branco contendo 20 mL da solução de molibdovanadato e 80 mL de água deionizada;
- h) Obter a concentração em mg de P na alíquota a partir da curva de calibração.

4.5.6. Expressão dos resultados P total em g/kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> =  $W \cdot V_{se} \cdot 2,29 / (m \cdot V_a)$  Em que:

W = mg de fósforo na alíquota, obtido da curva de calibração;

V<sub>se</sub> = volume da solução estoque, em mL;

V<sub>a</sub> = volume da alíquota, em mL;

m = massa da amostra, em g, 2,29 = fator de conversão para P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

4.5.7. Referências bibliográficas AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 965.17. 18 ed. Gaithersburg: 2010.

4.6. Histamina e outras aminas biogênicas (cadaverina, putrescina, espermidina, espermina) 4.6.1. Princípio

Baseia-se na extração ácida das aminas, derivação antes da coluna e fora de linha com cloreto de dansila em pH alcalino, seguido de separação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Gradiente de Eluição e Detecção Ultravioleta - CLAE/UV.

4.6.2. Campo de aplicação Pescado resfriado, congelado, curado, conservas e semiconservas de pescado.

4.6.3. Materiais e equipamentos

- a) Agitador tipo vortex;
- b) Balança analítica com resolução de 0,0001 g;
- c) Banho de água quente com capacidade aproximada de temperatura de 60°C;
- d) Bureta de 50 mL;
- e) Centrífuga Refrigerada (4°C) com rotores para tubos de 50 e 15 mL e velocidade até 6000 RPM;
- f) Coluna para CLAE Kromasil C18 ou Nucleosil C18 (5 µm, 100 Å, 25 cm x 4.6 mm) - Fase Reversa;

- g) Concentrador-evaporador de amostras com temperatura de  $\sim 60^{\circ}\text{C}$ ;
- h) Homogeneizador/triturador tipo Turrax com velocidade até 20.000 RPM;
- i) Mesa Agitadora Orbital com timer;
- j) Micropipeta de volume variável de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  com incremento de escala de 1,0  $\mu\text{L}$ ;
- k) Pré-coluna Brownlee C18 ou Nucleosil C18 (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 3cm x 4.6 mm);
- l) Seringas com capacidade aproximada de 1,0 mL;
- m) Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, dotado de Bomba Binária ou superior para Gradiente de Eluição Binário, Detector Ultravioleta e Injetor automático - CLAE/UV;
- n) Tubos de centrífuga de 15 e 50 mL em polipropileno (PP) transparente;
- o) Tubos de ensaio de 5 mL;
- p) Unidade filtrante com membrana de PTFE, poro 0,45  $\mu\text{m}$ , diâmetro de 13 a 15 mm, para uso com seringa.

#### 4.6.4. Reagentes e soluções

- a) Acetona UV/CLAE - Grau Espectroscópico;
- b) Acetonitrila UV/CLAE - Grau Espectroscópico;
- c) Solução de Ácido Perclórico a 0,2 mol/L;
- d) Solução de Cloreto de Dansila ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{S}$ ) 7,50 g/L de acetona (armazenar a 5 -  $10^{\circ}\text{C}$ );
- e) Solução padrão de Cadaverina ( $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$ ) a 1,0 g/L em HCl 0,1 mol/L (armazenar a 5 -  $10^{\circ}\text{C}$ );
- f) Solução padrão de Espermina ( $\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{N}_4 \cdot 4\text{HCl}$ ) a 1,0 g/L em HCl 0,1 mol/L (armazenar a 5 -  $10^{\circ}\text{C}$ );
- g) Solução padrão de Espermidina ( $\text{C}_7\text{H}_{19}\text{N}_3 \cdot 3\text{HCl}$ ) a 1,0 g/L em HCl 0,1 mol/L (armazenar a 5 -  $10^{\circ}\text{C}$ );
- h) Solução padrão de Histamina ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3 \cdot 2\text{HCl}$ ) a 1,0 g/L em HCl 0,1 mol/L (armazenar a 5 -  $10^{\circ}\text{C}$ );
- i) Solução padrão de Putrescina ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$ ) a 1,0 g/L em HCl 0,1 mol/L (armazenar a 5 -  $10^{\circ}\text{C}$ );
- j) Solução de L-Prolina ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$ ) a 100 g/L (armazenar a 5 -  $10^{\circ}\text{C}$ );
- k) Solução saturada de bicarbonato de sódio (armazenar a 5 -  $10^{\circ}\text{C}$ );
- l) Solução de ácido clorídrico a 0,1 mol/L;
- m) Tolueno UV/ CLAE - Grau Espectroscópico.

4.6.5. Procedimento de análise a) Deixar a amostra atingir a temperatura de refrigeração ( $\sim 10^{\circ}\text{C}$ ) somente o tempo necessário para adquirir consistência de corte;

- b) Desembalar a amostra, retirar aponevroses, gorduras e ossos;
- c) Tomar porções da musculatura de várias regiões do pescado e cortar a amostra em pedaços menores

para homogeneizar;

d) Transferir uma pequena quantidade para o homogeneizador tipo Turrax, triturar e descartar;

e) Transferir o restante da amostra para o homogeneizador tipo Turrax, triturar recolhendo em pote plástico com tampa ou saco plástico devidamente identificado;

f) Amostras de enlatados devem passar pelo mesmo procedimento de trituração/homogeneização. Neste caso o líquido constante na lata deve ser homogeneizado junto com toda parte sólida;

g) Pesar, imediatamente após a homogeneização da amostra, 5,0 g da amostra em tubo de centrífuga de 50 mL, evitando que a amostra entre em contato com a borda do tubo;

h) Pesar duas porções de 5,0 g de uma matriz branca para histamina e demais aminas biogênicas, fortificando uma delas para o cálculo da recuperação. A fortificação deve estar em uma concentração que esteja compreendida na curva de calibração a ser utilizada;

i) Pesar 5,0 g de matriz branca em 5 tubos de centrífuga de 50 mL para construção da curva de calibração. Fortificar com soluções de histamina e demais aminas biogênicas adicionando alíquotas das soluções dos padrões para obtenção das seguintes concentrações:

o LQ (limite de quantificação do método), como primeiro ponto da curva, 25, 50, 100 e 150 mg.kg<sup>-1</sup>. Outras concentrações podem ser utilizadas desde que estabelecidas em procedimento prévio de validação do método;

j) Adicionar aos tubos 10,0 mL de ácido perclórico 0,2 mol/L. Agitar, inicialmente, em vortex por 30 segundos e depois agitar em mesa agitadora por 10 minutos para extração das aminas;

k) Nas amostras fortificadas com as soluções padrão, o volume de ácido perclórico 0,2 mol/L a ser adicionado deve considerar o volume dos padrões adicionados, obtendo-se sempre um volume final de 10,0 mL. Por exemplo, para fortificar a matriz branca com 250 µL de solução padrão, deve-se adicionar 9,75 mL de ácido perclórico 0,2 M;

l) Centrifugar a 6000 x g por 10 minutos à temperatura de 4°C;

m) Coletar 200 µL do sobrenadante para tubo de centrífuga de 15 mL. Adicionar 400 µL de solução saturada de bicarbonato de sódio agitar rapidamente para misturar, e em seguida adicionar 800 µL de Solução de Cloreto de Dansila;

n) Agitar em vortex por aproximadamente 30 segundos e deixar ao abrigo da luz em banho de água quente a aproximadamente 60°C por 5 minutos;

o) Retirar do banho e adicionar 200µL de solução de LProlina.

Agitar em vortex por aproximadamente 30 segundos e deixar ao abrigo da luz à temperatura ambiente por 30 minutos;

p) Adicionar 1 mL de tolueno, agitar novamente em vortex por 1 minuto e centrifugar a 6000 x g por 10 minutos à temperatura de 4°C, para separação das fases;

q) Recuperar a fase orgânica (sobrenadante) com auxílio de pipetador automático para tubo de ensaio de 5 mL. Levar ao concentrador de amostras e evaporar por adição de fluxo de nitrogênio por 10 a 15 minutos a uma temperatura de aproximadamente 60°C;

r) Dissolver o extrato com 600 µL de acetonitrila. Filtrar em unidade filtrante com membrana de PTFE direto para o frasco (vial) do cromatógrafo;

s) Obter os cromatogramas das amostras, da curva de calibração e amostras para cálculo da recuperação no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência equipado com coluna de fase reversa C18 (5 µm, 100 Å, 25 cm x 4,6 mm), detecção no UV a 254 nm, utilizando injeção de 20 µL e o seguinte gradiente:

Tempo, min	Água, %	Acetonitrila, %
0	40	60
6	25	75
8	25	75
13	5	95
20	5	95
21	40	60
30	40	60

#### 4.6.6. Expressão dos resultados

a) Utilizar o método dos mínimos quadrados e a área dos picos para obtenção da curva de calibração a partir dos cromatogramas obtidos das amostras fortificadas em "5h". O coeficiente de correlação (r) da curva de calibração deve ser superior a 0,95, caso contrário, a curva deve ser repetida.

b) Calcular, utilizando a curva padrão, a concentração das aminas nas amostras branca e fortificada obtidas em "5g", obtendo-se o fator de recuperação.

c) A partir da curva padrão, obter a concentração das aminas em mg/kg, corrigindo-os pelo fator de recuperação.

d) Amostras com concentrações superiores ao maior ponto de concentração dos padrões da curva devem ser diluídas com acetonitrila até que estejam compreendidas na faixa linear da curva de calibração utilizada.

4.6.7. Referências bibliográficas Malle P., Valle M. e Bouquelet S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. J. AOAC Internat. 1996, 79, 43-49.

Duflos G., Dervin C., Malle P. e Bouquelet S. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). J. AOAC Internat.

1999, 82, 1097-1101.

#### 4.7. Lipídios

4.7.1. Princípio Fundamenta-se na extração dos lipídios em solvente apropriado e posterior determinação gravimétrica.

4.7.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescados e seus derivados.

#### 4.7.3. Materiais e equipamentos

a) Balança analítica com resolução de 0,001 g;

b) Banho-maria;

- c) Estufa;
- d) Extrator de Soxhlet;
- e) Algodão desengordurado;
- f) Dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro;
- g) Proveta de 25 mL.

4.7.4. Reagentes e soluções Éter de petróleo (faixa de ebulição entre 30 e 60°C) ou nhexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>).

#### 4.7.5. Procedimento de análise

- a) Pesar 5 g ± 0,005 g de amostra, secar em estufa a 105°C durante 2 horas ou usar a amostra após a determinação da umidade;
- b) Transferir a amostra seca para um cartucho de extração com auxílio de um bastão de vidro e uma porção de algodão desengordurado;
- c) Cobrir a amostra no cartucho com o algodão, colocando no extrator de Soxhlet acoplado ao balão previamente seco em estufa a 105°C por 1 hora e pesado;
- d) Extrair com solvente por um período mínimo de 3 horas;
- e) Desacoplar o balão do extrator, retirar o cartucho com a amostra e recuperar o solvente;
- f) Evaporar o solvente em banho-maria a 65°C e secar em estufa a 105°C por 1 hora;
- g) Esfriar em dessecador e pesar. Repetir a operação até peso constante.

Observação: Poderão ser utilizados sistemas automatizados baseados no mesmo princípio desde que conhecidos os desvios em relação ao presente método.

4.7.6. Expressão dos resultados % de lipídios =  $(M_{a+b} - M_b) \cdot 100 / M_a$  Em que:

$m_a$  = massa da amostra, em gramas;

$m_{a+b}$  = massa da amostra seca + balão, em gramas;

$m_b$  = massa do balão, em gramas.

#### 4.7.7. 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.

#### 4.8. Nitrogênio total e proteína total

4.8.1. Princípio Baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio por meio da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e quantificada por titulometria ácido-base.

4.8.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescados e seus derivados.

#### 4.8.3. Materiais e equipamentos

- a) Aparelho ou bloco digestor e destilador macro ou micro- Kjeldahl;
- b) Balança analítica com resolução de 0,0001 g;
- c) Béquer de 250 mL;
- d) Buretas de 25 ou 50 mL;
- e) Erlenmeyers de 125 ou 250 mL;
- f) Espátula;
- g) Gral de porcelana com pistilo;
- h) Papel indicador universal de pH;
- i) Papel de pesagem (papel vegetal livre de nitrogênio);
- j) Pipeta graduada de 1 mL;
- k) Pipetas volumétricas de 2 e 10 mL;
- l) Provetas de 50, 100 e 250 mL;
- m) Tubo de Kjeldahl.

#### 4.8.4. Reagentes e soluções

- a) Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) p.a.;
- b) Antiespumante (talco, parafina ou silicone);
- c) Mistura catalítica:

Misturar em gral de porcelana 10 partes de sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) p.a. ou sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) p.a. ou bissulfato de potássio ( $\text{KHSO}_4$ ) p.a. e uma parte de sulfato de cobre II pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) p.a. até obtenção de um pó fino.

Pode-se utilizar misturas comerciais prontas de mesma formulação.

- d) Solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) a 50% (m/v);
- e) Solução de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) a 4% (m/v):
- f) Indicador misto: Pesar 0,132 g de vermelho de metila ( $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ ) e 0,06 g de verde de bromocresol ( $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ ).

Dissolver em 200 mL de álcool etílico ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) a 70% (v/v). Filtrar se necessário e guardar em frasco âmbar.

O indicador misto poderá ser incorporado à solução de ácido bórico a 4% na proporção de 8 mL por litro.

- g) Solução padrão de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,05 mol/L ou solução padrão de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) 0,1 mol/L;

#### 4.8.5. Procedimento de análise

##### 4.8.5.1. Micro e semimicro Kjeldahl:

- a) Pesar entre 0,5 e 0,8 g de amostra e transferir para tubo de Kjeldahl;
- b) Adicionar 2,5 g de mistura catalítica e 7 mL de ácido sulfúrico p.a.;
- c) Aquecer em bloco digestor, a princípio, lentamente, mantendo a temperatura de 50°C por 1 hora ou dependendo das instruções do fabricante;
- d) Elevar gradativamente a temperatura até atingir entre 400 e 410°C;
- e) Quando o líquido se tornar límpido e transparente, de tonalidade azul-esverdeada, retirar do aquecimento, deixar esfriar e adicionar 10 mL de água;
- f) Acoplar ao destilador um erlenmeyer contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4% com 4 ou 5 gotas de solução de indicador misto;
- g) Adaptar o tubo de Kjeldahl contendo a amostra digerida ao destilador e adicionar a solução de hidróxido de sódio a 50% até que a mesma se torne negra (cerca de 20 mL);
- h) Proceder à destilação por tempo suficiente para que toda a amônia seja destilada. A solução receptora deve ser mantida fria durante a destilação;
- i) Titular com solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L ou solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L até a viragem do indicador.

##### 4.8.5.2. Macro-Kjeldahl:

- a) Pesar em balança analítica entre 1,0 e 1,2 g de amostra e transferir para tubo de Kjeldahl;
- b) Adicionar 5 g de mistura catalítica e 20 mL de ácido sulfúrico p.a.;
- c) Aquecer em bloco digestor, a princípio, lentamente, mantendo a temperatura de 100°C por 1 hora ou dependendo das instruções do fabricante;
- d) Elevar gradativamente a temperatura até atingir entre 400 e 410°C;
- e) Quando o líquido se tornar límpido e transparente, de tonalidade azul-esverdeada, retirar do aquecimento, deixar esfriar e adicionar 50 mL de água;
- f) Acoplar ao destilador um erlenmeyer contendo 25 mL de solução de ácido bórico a 4% com 4 ou 5 gotas de solução de indicador misto;
- g) Adaptar o tubo de Kjeldahl contendo a amostra digerida ao destilador e adicionar a solução de hidróxido de sódio a 50% até que a mesma se torne negra (cerca de 40 mL);
- h) Proceder à destilação por tempo suficiente para que toda a amônia seja destilada. A solução receptora deve ser mantida fria durante a destilação;
- i) Titular com solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L ou solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L até a viragem do indicador;
- j) Efetuar análise em branco com os reagentes.

Observações:



1. Verificar as condições do aparelho de destilação com solução padrão de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), cuja recuperação deve ser de no mínimo 99,5% em nitrogênio.

2. Verificar o desempenho do sistema (digestão e destilação) utilizando uma mistura de 0,2 g de lisina e 0,8 g de sacarose. A recuperação deve ser de no mínimo 98% em nitrogênio.

3. Poderão ser utilizados sistemas automatizados baseados no mesmo princípio desde que conhecidos os desvios em relação ao presente método.

4.8.6. Expressão dos resultados para HCl: % de nitrogênio total =  $V \cdot 0,1 \cdot f \cdot 14,0067 \cdot 100 / (m \cdot 1000)$   
para H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: % de nitrogênio total =  $V \cdot 0,05 \cdot 2 \cdot f \cdot 14,0067 \cdot 100 / (m \cdot 1000)$  % de proteína total = % de nitrogênio total x 6,25 Em que:

V = volume da solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L ou solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L gasto na titulação, após a correção do branco, em mL;

0,1 = concentração do ácido clorídrico;

0,05 = concentração do ácido sulfúrico;

f = fator de correção da solução de ácido utilizado;

14,0067 = massa molar do nitrogênio;

m = massa da amostra, em gramas;

6,25 = fator de conversão de nitrogênio total em proteína.

4.8.7. Referências bibliográficas AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 981.10. 18 ed. Gaithersburg: 2010.

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.

4.9. Resíduo mineral fixo

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

4.9.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescado salgado, seco e salgadoseco.

4.9.3. Materiais e equipamentos

a) Balança analítica com resolução de 0,0001 g;

b) Estufa;

c) Forno mufla;

d) Placa aquecedora;

- e) Cadinho de porcelana;
- f) Dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro;
- g) Tenaz metálica.

#### 4.9.4. Reagentes e soluções Não aplicável.

#### 4.9.5. Procedimento de análise

- a) Aquecer o cadinho de porcelana em forno mufla entre 530 e 550°C durante 30 minutos, esfriar em dessecador e pesar;
- b) Pesar  $2 \text{ g} \pm 0,0050 \text{ g}$  de amostra homogeneizada;
- c) Levar o conjunto à placa aquecedora até a carbonização completa;
- d) Incinerar em forno mufla entre 530°C e 550°C até obter cinzas claras (cerca de 4 horas);
- e) Não ultrapassar 550°C para evitar perda de cloretos. Não havendo clareamento das cinzas, adicionar 2 a 3 gotas de água, secar em placa aquecedora ou estufa a  $105^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  e levar ao forno mufla até clareamento das cinzas;
- f) Esfriar em dessecador e pesar.

#### 4.9.6. Expressão dos resultados % de resíduo mineral fixo = $(m_{c+c} - m_c) \cdot 100/m_a$ Em que:

$m_a$  = massa da amostra, em gramas;

$m_{c+c}$  = massa das cinzas + cadinho, em gramas;

$m_c$  = massa do cadinho, em gramas.

#### 4.9.7. 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.

#### 4.10. Umidade e voláteis

##### 4.10.1. Princípio Fundamenta-se na perda de água e substâncias voláteis a 105°C.

4.10.2. Campo de aplicação Este método é aplicável a pescado salgado, seco e salgadoseco e derivados de pescado.

##### 4.10.3. Materiais e equipamentos

- a) Balança analítica com resolução de 0,0001 g;
- b) Estufa;
- c) Dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro;
- d) Pesa-filtro ou cápsula (de aço inoxidável, alumínio ou porcelana);

e) Tenaz metálica.

4.10.4. Reagentes e soluções Não aplicável.

4.10.5. Procedimento de análise

a) Colocar o pesa-filtro ou cápsula em estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 1 hora, esfriar em dessecador e pesar;

b) Pesar  $5 \text{ g} \pm 0,0005 \text{ g}$  de amostra homogeneizada;

c) Levar à estufa por 3 horas. Esfriar em dessecador e pesar;

d) Levar o conjunto à estufa por mais uma hora, esfriar em dessecador e pesar;

e) Repetir esta operação até obter massa constante.

4.10.6. Expressão dos resultados % de umidade e voláteis =  $(\text{mas} + \text{c} - \text{mc}) \cdot 100 / \text{ma}$  Em que:

ma = massa da amostra, em gramas;

mas+c= massa das cinzas + cadinho, em gramas;

mc= massa do cadinho, em gramas.

4.10.7. 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.

D.O.U., 03/06/2011 - Seção 1