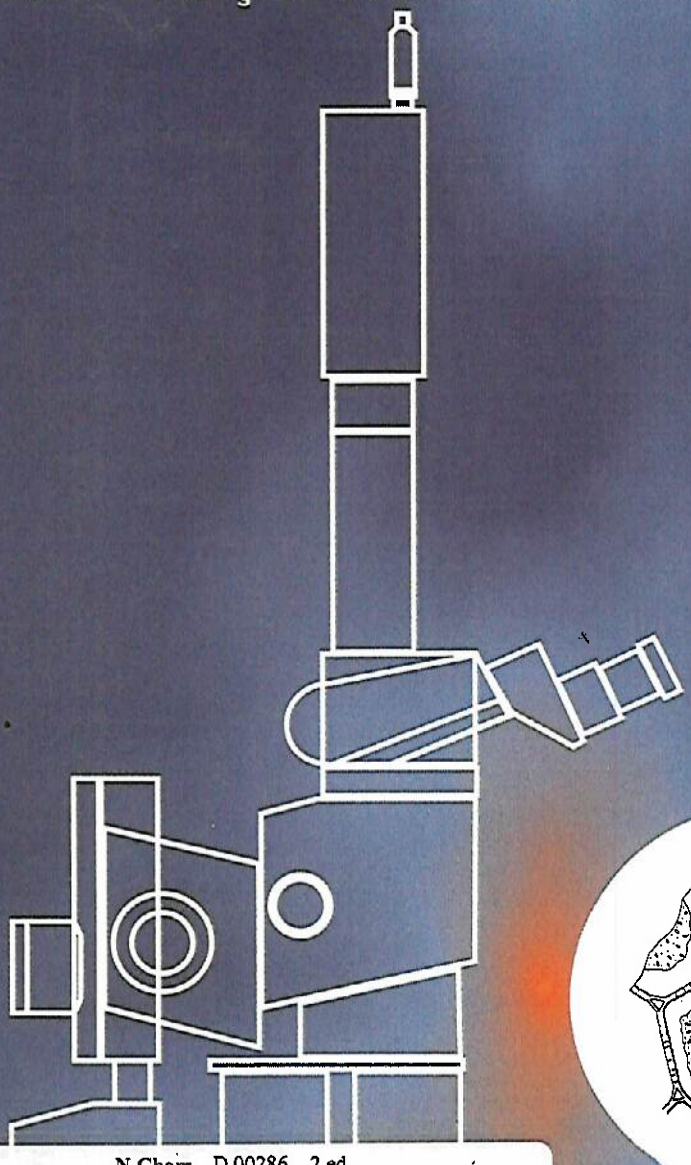
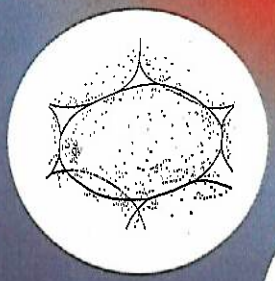
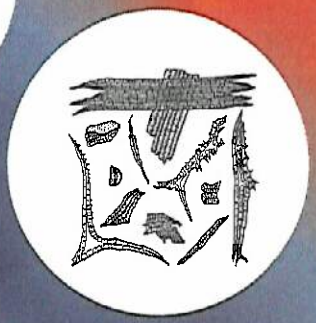
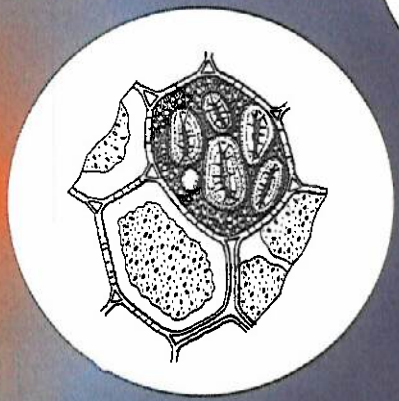
MICROSCOPIA EM ALIMENTOS

IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E MATERIAL ESTRANHO









D.00286
2.ed.

N.Cham D.00286 2.ed.
Título: Microscopia em alimentos : identificação histológica e material

00029510
ITAL - BC

ITAL
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Governador do Estado
Geraldo Alkimin

Secretário de Agricultura e Abastecimento
João Carlos de Souza Meirelles

Secretário Adjunto
Lourival Carmom Monaco

Chefe de Gabinete
Teresa Ferrari

Coordenador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
José Sidnei Gonçalves

Diretor do Instituto de Tecnologia de Alimentos
Luis Madi

CENTRO DE INFORMAÇÃO EM ALIMENTOS – CIAL / ITAL
Av. Brasil, 2880 · Caixa Postal 139 · CEP 13.073-001 · Campinas · São Paulo
Tel. (0**19) 3743-1750 · Fax (0**19) 3743-1747 · www.ital.org.br · cial@ital.org.br

664.07 B234m
2. ed.
ex. 1
2001

664.07 B234m
29510

MICROSCOPIA EM ALIMENTOS

IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E MATERIAL ESTRANHO

2ª Edição

Margarida Kikuta Barbieri
Pesquisador do Núcleo de Análises Físicas, Sensoriais e Estatística - LAFISE/ITAL
MSc Tecnologia de Alimentos

Ivânia Athié
Pesquisador do Centro de Informação em Alimentos - CIAL/ITAL
DSc Ciências Biológicas

Dalmo Cesar de Paula
Biólogo do Núcleo de Análises Físicas, Sensoriais e Estatística - LAFISE/ITAL

Gina Maria B.Q. Cardozo
Biólogo do Núcleo de Análises Físicas, Sensoriais e Estatística - LAFISE/ITAL

Campinas - SP
2001

D. 00480
Ex. 2
ITAL

Ficha catalográfica elaborada pelo CIAL/ITAL

544.82 Microscopia em alimentos: identificação histológica e material
M583 estranho / Margarida Kikuta Barbieri... [et al.]. Campinas : CIAL/ ITAL, 2001.
151p.

ISBN 85-7029-043-8

1. Microscopia alimentar. 2. Alimento-Análise 3. Alimento-Material estranho I. Barbieri, Margarida Kikuta II. Título.

Expediente

Assessor de Editoração
Revisão Idiomática/Português
Cristina H.R.C. Gonçalves

Revisão Bibliográfica
Odete M. Dalben

Projeto Visual
Editoração Eletrônica
Deunice A.R. Garcia

Produção de Arte e Capa
Antônio Carriero
Deunice A.R.Garcia
Renato A.R. Gomes

Apesar das recomendações contidas nesta publicação serem baseadas em estudos científicos e experiência industrial, as referências a procedimentos operativos e/ou métodos e tipos de equipamentos e/ou instrumentos não significam qualquer garantia de que são suficientes para prevenir danos, vazamentos, perdas, acidentes, intoxicações ou ferimentos, resultantes do seu uso. Além disso, o estudo e o uso desta publicação por qualquer pessoa, empresa ou entidade não asseguram proficiência nas operações e procedimentos discutidos nesta publicação. A aplicação de afirmações, recomendações ou sugestões aqui contidas não pode ser considerada como geradora de qualquer responsabilidade por danos, vazamentos, perdas, acidentes, intoxicações ou ferimenros decorrentes. Todos os nomes de marcas e produtos mencionados são marcas ou comerciais de suas respectivas companhias, e suas menções não devem ser interpretadas como sugestão ou recomendação de compra ou uso.

APRESENTAÇÃO

As práticas de Microscopia em Alimentos: identificação histológica, isolamento e detecção de matérias estranhas, são fundamentais para o controle da qualidade dos alimentos, uma vez que servem como parâmetro para a avaliação das condições de sanidade e higiene na fabricação dos produtos.

Esta publicação tem o objetivo de contribuir com o trabalho de análise da área de Microscopia em Alimentos, apresentando metodologias e referências bibliográficas específicas, publicadas por órgãos competentes nacionais e internacionais.

A primeira parte, **Identificação Histológica,** trata de técnicas que permitem avaliar a qualidade de um alimento quanto ao seu grau de pureza, revelando a presença dos elementos histológicos característicos que identificam a origem da matéria-prima e que podem ter sido adicionados no produto intencionalmente - fraudes - ou acidentalmente - falhas no processo - comprometendo a sua qualidade.

A segunda parte, **Material Estranho em Alimentos,** trata de métodos microanalíticos que permitem o isolamento e a detecção da presença de sujidades - leves e pesadas - em insumos e alimentos industrializados, compreendendo em sua maioria métodos atualizados e traduzidos da AOAC (17ª ed. – 2000), que são utilizados no Núcleo de Análises Físicas e Sensoriais e Estatistica - LAFISE/ITAL. Apresenta também fotos ilustrativas de contaminações por pêlos, ácaros e fragmentos de insetos, usualmente encontradas em alimentos.

Finalmente, gostaríamos de agradecer o apoio da Associação Brasileira da Insdústria da Alimentação - ABIA na edição desta obra e pelo seu reconhecimento da importância dessa abordagem para a melhoria da qualidade dos processos envolvidos na indústria alimentícia.

Os Autores

SUMÁRIO

IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA 1

1. INTRODUÇÃO 1

2. DIAGNÓSTICO 1

3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA 2

4. ESTRUTURAS MICROSCÓPICAS 5

4.1. Abóbora (*Curcubita pepo*,L.) 5

4.2. Alho (*Allium sativum*, L.) 6

4.3. Amendoim (*Arachis hypogaea*, L.) 7

4.4. Amidos - grãos de amido (200x) 8

4.5. Arroz (*Oryza sativa*, L.) 9

4.6. Banana (*Musa paradisiaca*, L.) 10

4.7. Café (*Coffea arabica*, L.) 11

4.8. Cebola (*Allium cepa*, L.) 12

4.9. Chá Mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) 13

4.10. Feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) 14

4.11. Mamão, morango, uva 15

4.12. Mel 16

4.13. Noz-moscada (*Myristica fragans*, Hontt) 17

4.14. Pimenta-do-reino (*Piper nigrum*,L.) 18

4.15. Pimentão (*Capsicum annuum*, L.) 19

4.16. Salsa (*Petrosolum sativum*, Hoffm.) 19

4.17. Soja (*Glycine hispida*, Maxim.) 20

4.18. Trigo (*Triticum aestivum*, L.) 21

4.19. Tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) 22

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 23

MATERIAL ESTRANHO EM ALIMENTOS
Isolamento e Detecção - Métodos Microanalíticos 25

1. INTRODUÇÃO 25

2. DEFINIÇÕES SEGUNDO A A.O.A.C. (ZIOBRO, 2000) 26

3. ISOLAMENTO E DETECÇÃO 27

3.1. Métodos diretos de exame 27

3.2. Métodos de isolamento para detecção microscópica 27

4. MATERIAL E EQUIPAMENTOS 30

5. REAGENTES 34

6. SUJIDADES LEVES E PESADAS - TÉCNICAS ESPECIAIS 37

7. MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE SUJIDADES EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS 42

7.1. Polpas de frutas 42
7.2. Molhos 45
7.3. Produtos cárneos 47
7.4. Chocolate e cacau - método de flutuação 49
7.5. Café moído 51
7.6. Produtos de laticínios 55
7.7. Nozes (noz, castanha, avelã, caju, etc.) e produtos derivados (exceto pecã) 62
7.8. Pecã 65
7.9. Coco picado 67
7.10. Pasta de amendoim 68
7.11. Grãos e sementes 69
7.12. Produtos de confeitaria 81
7.13. Cevada, aveia e mistura de cereais desidratados para alimento infantil 84
7.14. Geleiada e geléia 86
7.15. Sucos cítricos e de abacaxi (enlatados) 87
7.16. Açúcar e produtos de açúcar 88
7.17 Xaropes, melaço e mel 92
7.18. Açúcar 93
7.19. Alimento infantil (purê) 94
7.20. Cogumelos 95
7.21. Especiarias e condimentos 97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 131
BIBLIOGRAFIA PARA CONSULTA 131
APÊNDICE 133

IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

1. INTRODUÇÃO

A microscopia em alimentos é a técnica microanalítica que pode ser utilizada no controle de qualidade para a identificação dos componentes de um produto, permitindo constatar se os produtos estão de acordo com as especificações constantes do seu licenciamento. O exame microscópico fornece informações importantes, tais como: a verificação da designação correta do produto no rótulo, se a amostra é pura ou contém alguma mistura estranha, se esta mistura é uma impureza acidental (sujidade), ou adição intencional (fraude), visando a um fim econômico.

Além de fornecerem resultados qualitativos, os métodos microscópicos também podem ser utilizados para a obtenção de dados quantitativos, como exemplo, a percentagem da composição de misturas de pós de origem vegetal em especiarias e em pós medicinais, e a estimativa da porção vegetal pulverizada utilizada como adulterante em um produto.

O diagnóstico de alimentos de origem vegetal por microscopia requer, além de muita prática em técnica microscópica geral, um bom conhecimento das estruturas anatômicas das matérias-primas em questão (tecidos histológicos predominantes). Esse conhecimento é adquirido com o exame repetido das partes de plantas, em cortes longitudinais e transversais, antes da homogeneização e pulverização do material.

O corte transversal serve para orientar quanto à disposição geral dos tecidos e dos elementos celulares simples, enquanto o corte longitudinal mostra, em grande quantidade, as estruturas que são observadas e identificadas no produto pulverizado.

Após a familiarização com os tecidos e elementos celulares simples, em cortes transversais e longitudinais de plantas íntegras, pode-se partir para a análise do material pulverizado, o qual pode apresentar falsificações ou impurezas que, por conveniência, não foram retiradas ou foram adicionadas durante o processamento do alimento.

Constatando-se os tecidos celulares simles, característicos da matéria-prima, procede-se à identificação das substâncias estranhas presentes no produto.

A análise de amostras em pó é a mais difícil, sendo na prática a mais freqüente. A peneiragem constitui freqüentemente uma ajuda no caso de misturas grosseiras, permitindo a seleção e separação do produto segundo o tamanho das partículas. Na porção mais grosseira podem ser visualizadas, a olho nu ou com o auxílio de lupa, várias indicações do material analisado.

2. DIAGNÓSTICO

A composição da amostra é verificada preparando-se várias lâminas, as quais devem ser observadas através de todo o campo, de maneira que todas as estruturas características sejam captadas. A lâmina preparada com ou sem clarificação, dependendo da natureza da análise, é observada inicialmente no aumento menor para a obtenção da vista geral (presença ou não de substâncias estranhas). Os elementos suspeitos são observados e identificados no aumento maior.

Analistas com bastante prática microscópica podem ter dúvidas mesmo que o elemento focalizado corresponda às estruturas contidas na literatura ou em fotos. Por essa razão, uma das condições essenciais

para um controle microscópico de alimentos é a elaboração de uma coleção de amostras-padrão das matérias-primas principais e também das substâncias que são normalmente utilizadas para a falsificação do produto, de modo que características histológicas possam ser comparadas diretamente. Em alguns casos, plantas ou suas partes podem ser identificadas por meio de descrições, ilustrações e chaves contidas na literatura. Bons trabalhos de referência são indispensáveis para a identificação dos constituintes do alimento.

3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA

As amostras para a microscopia são preparadas de diferentes maneiras, dependendo de cada caso.

Tecidos vegetais firmes

As seções podem ser preparadas à mão livre, com o uso de uma lâmina ou estilete, que é o método mais utilizado para análise de alimentos.

Este método pode também ser adaptado para análise de porções de tecidos frágeis.

Tecidos frágeis

Podem ser imersos em uma solução concentrada de álcool, para a desidratação e conseqüente endurecimento do material, facilitando assim o corte.

Material lenhoso ou outro material resistente

Pode ser secionado da seguinte maneira: Intumesce-se o material em água, etanol a 70% ou glicerol: etanol 95% (1 + 1). Umedece-se o estilete ou lâmina com o mesmo líquido antes de cortar uma camada fina.

Material seco ou quebradiço

Intumesce-se em água fria por um determinado tempo. A imersão em água quente acelera o processo de intumescimento, mas não é aconselhada devido à modificação que provoca em vários conteúdos celulares, principalmente no amido.

Amostra gordurosa

Desidrata-se pelo álcool retificado ou absoluto. Desengordura-se utilizando-se éter, ou clorofórmio, ou toluol; ou éter de petróleo.

Amostra líquida

Centrifuga-se, decanta-se e examina-se o sedimento; filtra-se.

Amostra açucarada

Dissolve-se em água para retirar o açúcar, decanta-se e desengordura-se quando necessário.

Amostra mista

Desidrata-se, desengordura-se, lava-se em água e separam-se as diversas camadas ou componentes. A separação dos componentes pode ser feita a) a seco, quando há na amostra fragmentos de aspecto e cores diferentes, possibilitando separá-los por meio de agulhas ou estiletes; b) em água, quando a dissolução do material em água facilitar a separação da partícula ou fragmento visado. Quando as partículas não podem ser distintas a olho nu, a separação é feita sob microscópio estereoscópio.

Amostra corada

Retira-se o corante por meio de dissolução em água, álcool ou éter. Quando as partículas separadas se apresentarem fortemente pigmentadas, o descoloramento é feito com solução de hipoclorito de sódio ou cloral hidratado.

Amostras pulverizadas

A maneira de preparação da lâmina depende do tamanho das partículas. Se as partículas são grosseiras, deve-se então triturar em almofariz até se obter um pó fino.

Os pós finos podem ser analisados colocando-se pequenas quantidades sobre a lâmina, adicionando-se uma ou duas gotas de água ou outro líquido e, em seguida, cobrindo-se com a lamínula e movendo-se cuidadosamente, de um lado para outro para eliminação das bolhas de ar. Essas bolhas de ar podem ser eliminadas pelo aquecimento rápido (porém podem provocar gelatinização ou desorganizar a estrutura dos grãos de amido), ou pela adição de uma gota de álcool entre a lâmina e a lamínula (provoca alterações em menor escala).

Uma outra técnica para preparar o material composto por tecidos lenhosos ou outros tecidos rígidos, reduzindo-os a seus constituintes celulares, é a seguinte:

Ferve-se o tecido em HNO_3 50%, ao qual se adicionaram alguns cristais de cloreto de potássio imediatamente antes do uso. Quando os tecidos começam a se desintegrar, lave-os em água, agitando e decantando.

Os tratamentos subseqüentes dependem se as montagens das lâminas serão temporárias (montadas diretamente em água ou glicerol), ou permanentes (desidratadas em álcool absoluto, transferidas para xileno ou tolueno e então montadas em uma lâmina com bálsamo ou uma resina sintética).

Montagens temporárias

A técnica da gelatina de glicerol é satisfatória para montagens de lâminas semipermanentes. Para preparar gelatina de glicerol (= glicerina), embebem-se 10g de gelatina culinária em 60ml de água fria; aquece-se em banho-maria para dissolver e então mistura-se com 70ml de glicerol e 1g de fenol. Armazena-se em vários frascos de boca larga com tampa rosqueável e retiram-se pequenas porções quando necessário.

Se o material estiver em um meio alcoólico ou aquoso, deve ser transferido para uma lâmina, adiciona-se um pouco de gelatina de glicerol e aquece-se gentilmente até que a gelatina derreta e envolva o exemplar. Coloca-se, então, uma lamínula, espera-se a gelatina endurecer e retira-se o excesso de gelatina em volta da lamínula. Finalmente, circunda-se a margem da lamínula com base para unhas para evitar a desidratação da lâmina.

As seções podem ser tratadas, se necessário, com **soluções clarificantes** para evidenciar certas características, como segue:

Clarificam-se as seções, para evidenciar detalhes da estrutura da parede celular, com solução de NaOH, cloral hidratado (8g de cloral hidratado em 5 ml H_2O) ou solução acidificada de cloral hidratado-glicerol (45g de cloral hidratado + 10ml glicerol + 25ml de HCL diluído (1 parte HCL concentrado + 8 partes de água). Esse tratamento destrói amido e outros conteúdos celulares.

Para clarificar com solução acidificada de cloral-hidratado-glicerol, transferem-se as seções para uma lâmina, adicionam-se algumas gotas da solução, coloca-se a lamínula e aquece-se levemente a lâmina em uma placa aquecida, até que a mistura borbulhe. A vantagem dessa solução sobre outros agentes clarificantes é que contém glicerol, permitindo que se use a lâmina por uma semana ou mais sem ressecar.

Montagens permanentes

Montam-se os exemplares em bálsamo do Canadá ou alguma outra resina para montagem, natural ou sintética, em solvente orgânico. É essencial desidratar o exemplar antes da montagem nesses meios. Para isso, passa-se o material por uma série de soluções alcoólicas de concentrações crescentes, terminando-se por álcool absoluto. Passa-se, então, o exemplar para o solvente usado no meio de montagem, geralmente xileno ou tolueno. Transfere-se a seção para uma lâmina, adiciona-se uma gota do meio de montagem, cobre-se com a lamínula e deixa-se o material em local seguro para enrijecer.

Soluções corantes

Para distinguir amido de outras inclusões em uma montagem em água, introduz-se uma gota de solução de I-KI (1g de iodo + 3g de iodeto de potássio; dissolve-se em pouca água e dilui-se a 50ml com H_2O) na margem da lamínula. Conforme a solução se difunde sob a lamínula, o amido se torna azul ou azul-escuro.

Geralmente não é necessário corar ou tomar precauções para preservar o citoplasma em sua forma natural. As características importantes para a identificação estão principalmente nas paredes celulares e em certos constituintes celulares, tais como resina, amido e cristais. Entretanto, corar pode auxiliar a evidenciar tecidos que são de difícil distinção. Grande número de corantes são disponíveis (LILLIE, 1977) e muitas técnicas para corar são descritas na literatura(BERLYN *et al.*, 1976).

Teste da lignina

Para determinar se uma parede celular contém lignina, montam-se as seções em lâmina em solução de 2% de phloroglucinol em etanol a 95%, na qual uma mesma quantidade de HCL concentrado foi adicionado imediatamente antes do uso. Paredes celulares lignificadas tornar-se-ão vermelhas; outras permanecerão descoloridas.

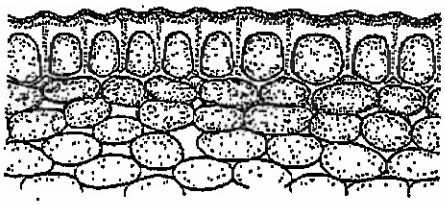
Amostra com partículas ínfimas

Material seco pulverizado pode ser peneirado para separar as partículas que são suficientemente finas e translúcidas em lâminas para microscopia. Para a maioria dos casos, uma peneira nº60 é adequada. As mesmas soluções corantes e clarificantes e os meios de montagem usados para seções podem ser usados para pós. Pós colocados diretamente em uma lâmina em meio de montagem podem necessitar aquecimento lento até o ponto de ebulição, para eliminar bolhas de ar.

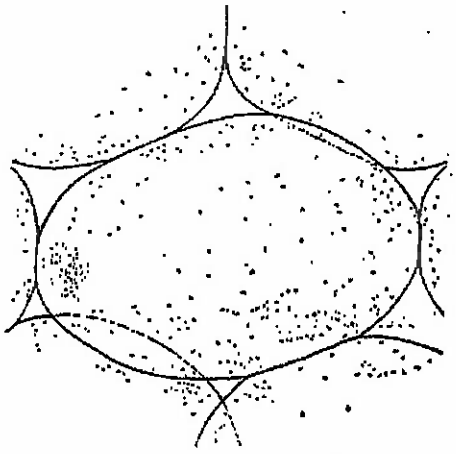
4. ESTRUTURAS MICROSCÓPICAS

4.1. Abóbora (*Curcubita pepo*, L.)

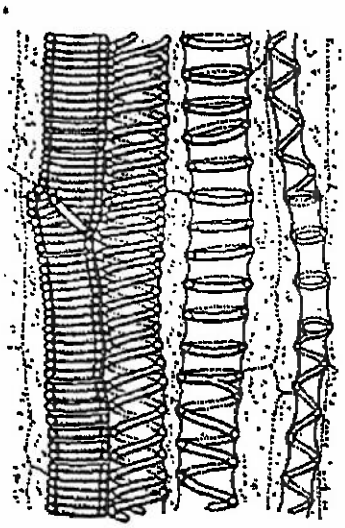
- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.



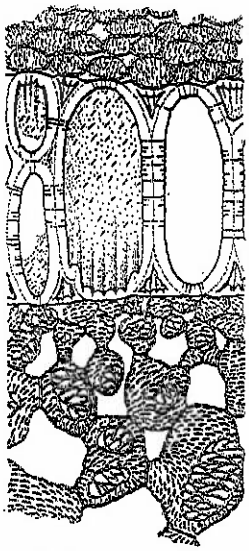
Corte transversal



Células parenquimáticas



Vasos espiralados e anelados



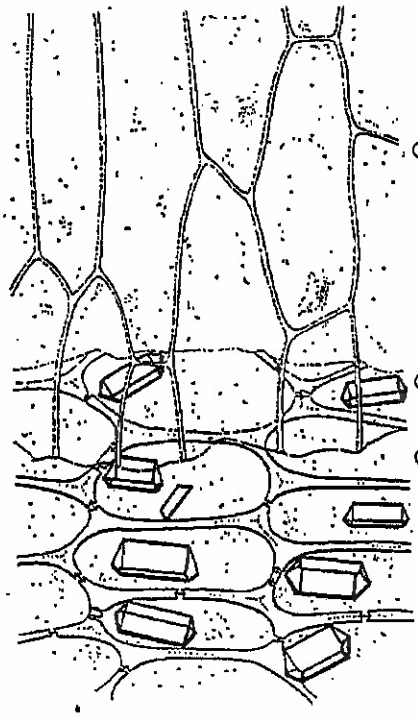
Células pétreas

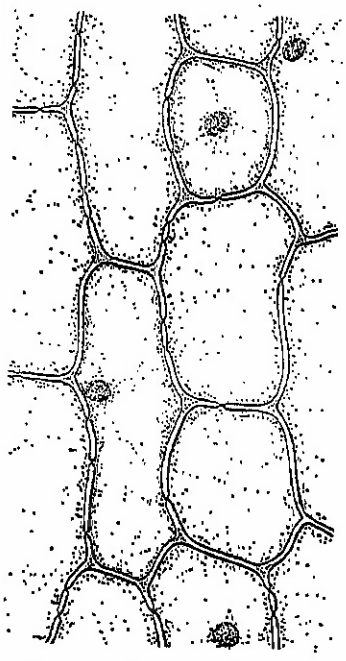
Fonte: GASSNER (1989)

4.2. Alho (*Allium sativum*, L.)

- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.

Observação das células hipodérmicas menores, com paredes espessadas colenquimaticamente, pontuações acentuadas, contendo cristais grandes de oxalato de cálcio.





Células da epiderme (parte carnosa)

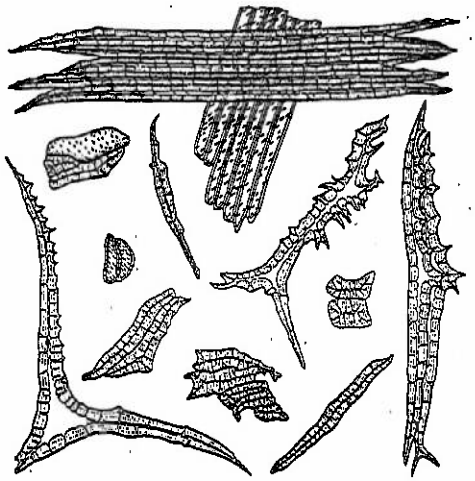
Fonte: GASSNER (1989)

4.3. Amendoim (*Arachis hypogaea*, L.)

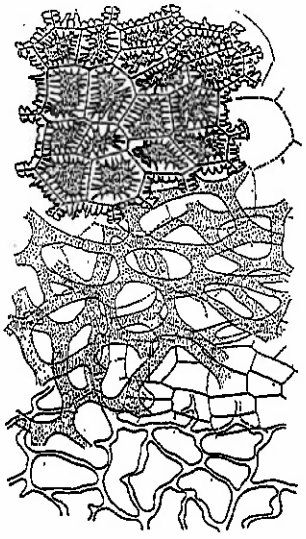
- Desengorduramento do material;
- Maceração em água;
- Preparo da lâmina.

Observar:

- Células pétreas isodiamétricas pontilhadas;
- Células nervosas (fibras) longas características;
- Células pétreas típicas com paredes bem grossas;
- Células epidérmicas com espessamento em forma de serra (cor marrom, solúvel em cloral hidratado). Normalmente é suficiente encontrar estas células para se certificar da presença de amendoim na amostra;
- Grão de amido arredondados e pequenos.



Células pétreas e fibras do amendoim

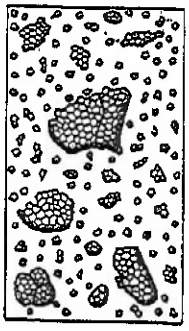


Casca de semente de amendoim

Fonte: GASSNER (1989)

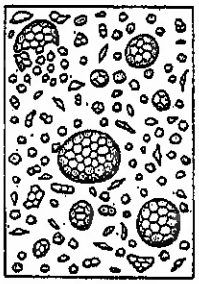
4.4. Amidos - grãos de amido (200x)

Várias amostras são identificadas por meio dos grãos de amido, que são típicos para cada produto considerado.



Arroz

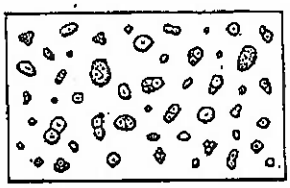
Amendoim



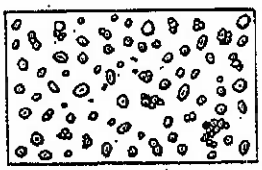
Aveia

Banana

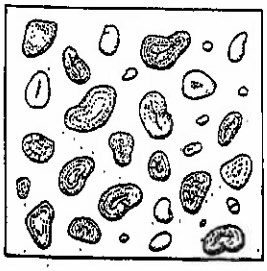
Batata



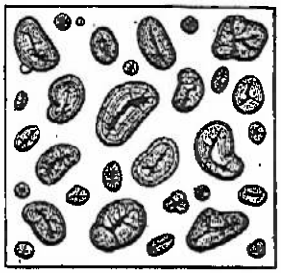
Cacau



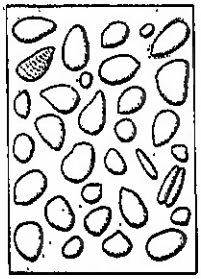
Castanha de caju



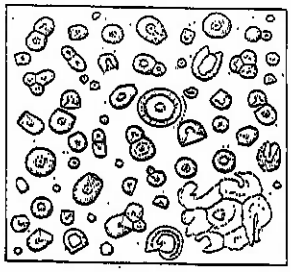
Ervilha



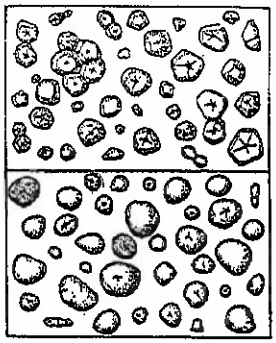
Feijão



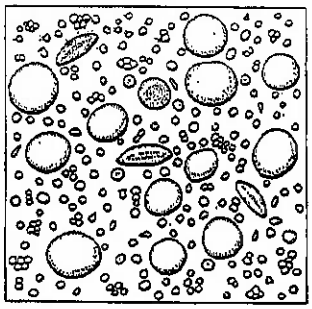
Gengibre



Mandioca



Milho

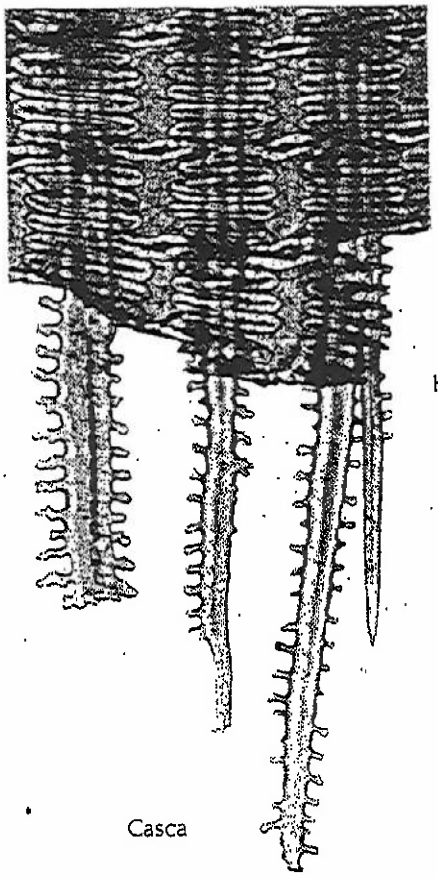


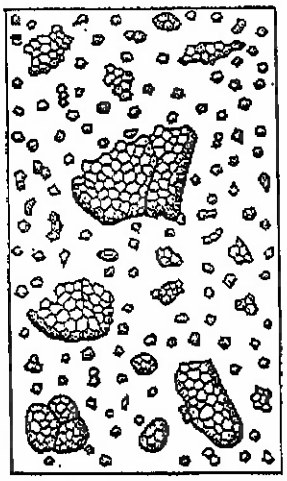
Trigo

Fonte: GASSNER (1989)

4.5. Arroz (*Oryza sativa,* L.)

- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.

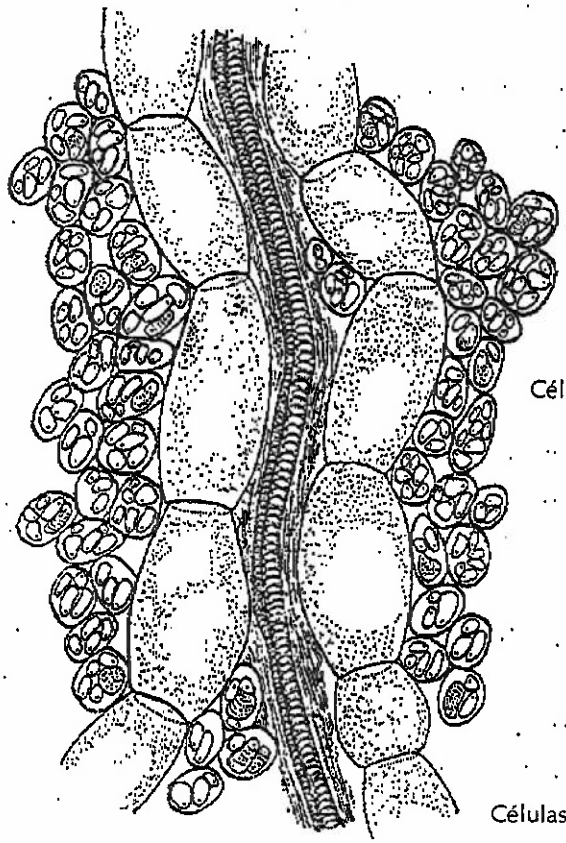




Grãos de Amido

Fonte: GASSNER (1989)

4.6. Banana (*Musa paradisiaca*, L.)



Grãos de amido

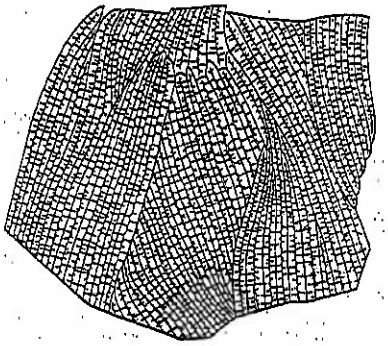
Fonte: GASSNER (1989)

4.7. Café (*Coffea arabica*, L.)

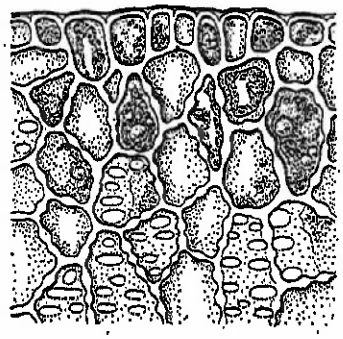
- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina em meio aquoso e em solução clarificante (cloral hidratado).

Observar:

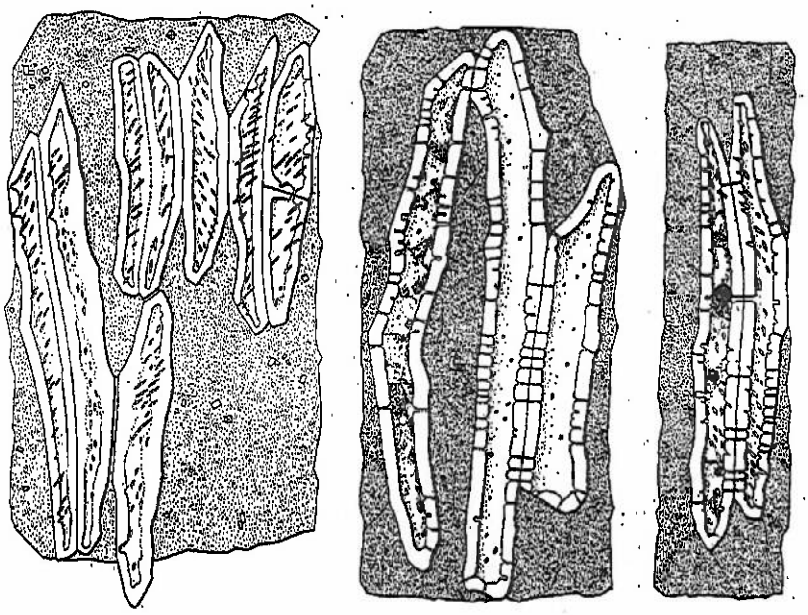
- Células do endosperma com pontuações típicas;
- Cristais de oxalato de cálcio;
- Células pétreas.



Endocarpo (pergaminho)



Corte transversal do endosperma



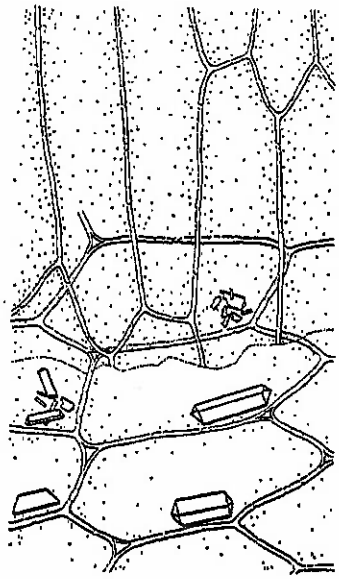
Coffea arabica L. *Coffea liberica* Bull. *Coffea robusta* Chev.

Fonte: GASSNER (1989)

4.8. Cebola (*Allium cepa*, L.)

- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.

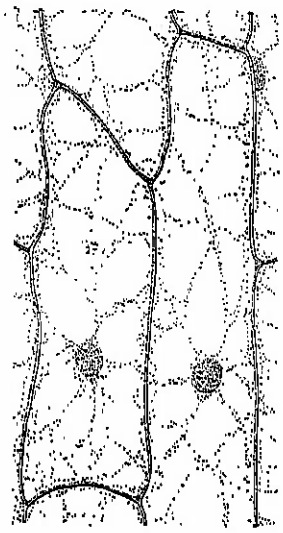
Observar:

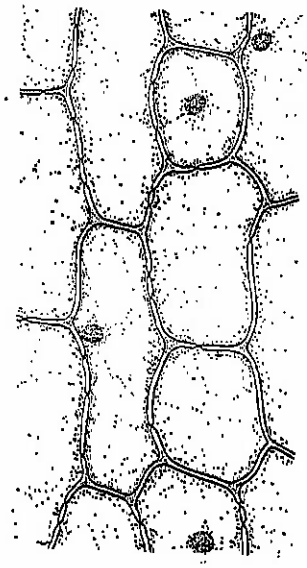


Epiderme

Hipoderme

Casca



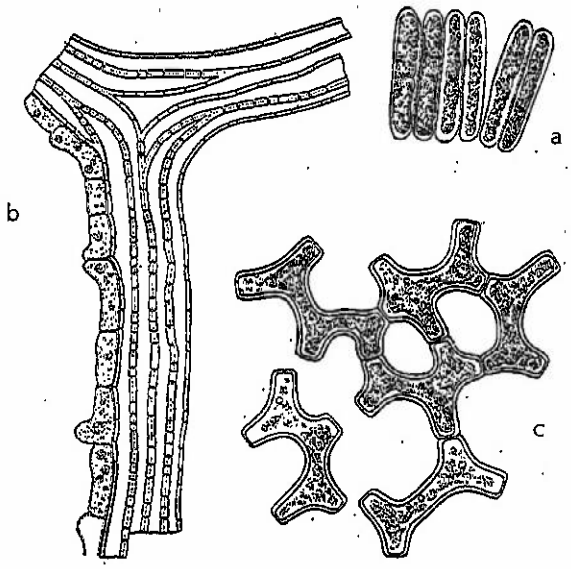


Células epidérmicas da parte carnosa

Fonte: GASSNER (1989)

4.9. Chá Mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.)

- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina com solução clarificante (cloral hidratado).

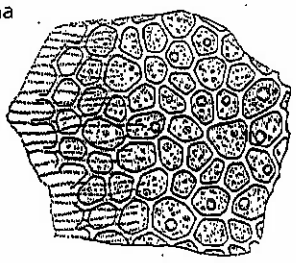


Mesófilo da folha

a - Célula palissádica
b - Célula fibrosa da nervura
c - Parênquima esponjoso

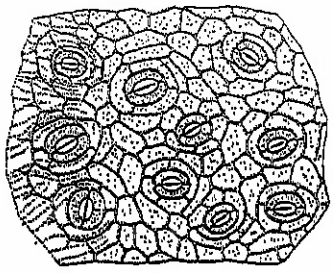
Parte superior da folha

Raias cuticulares



Parte inferior da folha

Estômatos

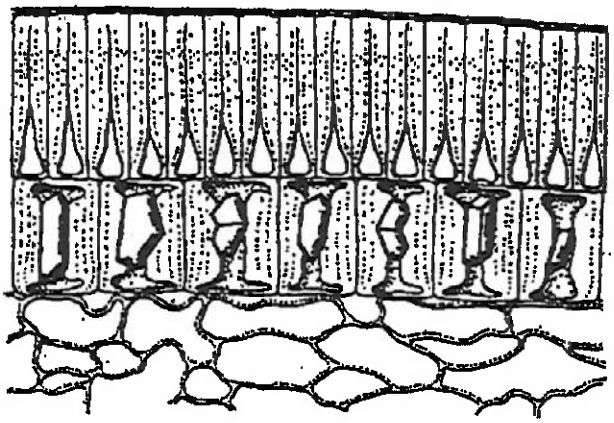


Células epidérmicas

Fonte: GASSNER (1989)

4.10. Feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)

- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.

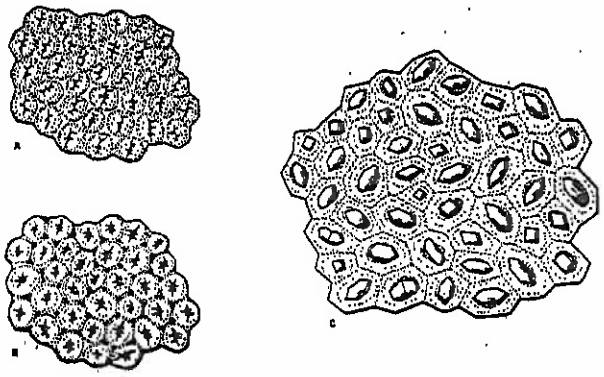


Células palissádicas

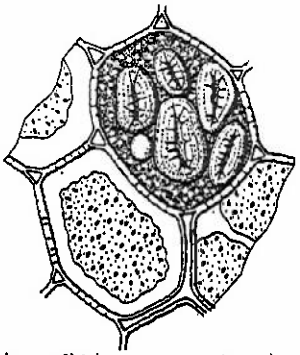
Células-suporte com cristais de oxalato de cálcio

Camada interna

Corte transversal de semente



A - Camada palissádica superior
B - Camada palissádica inferior
C - Células-suporte com cristais de oxalato



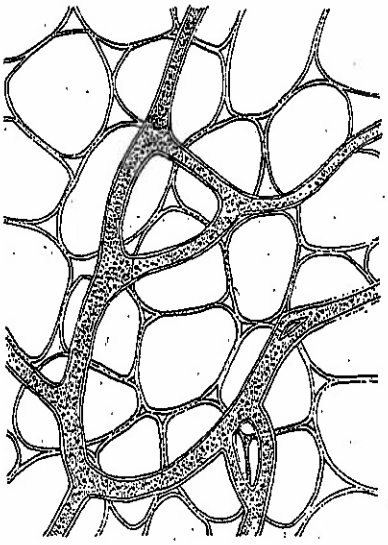
Célula do cotilédone com grãos de amido

Grãos de amido

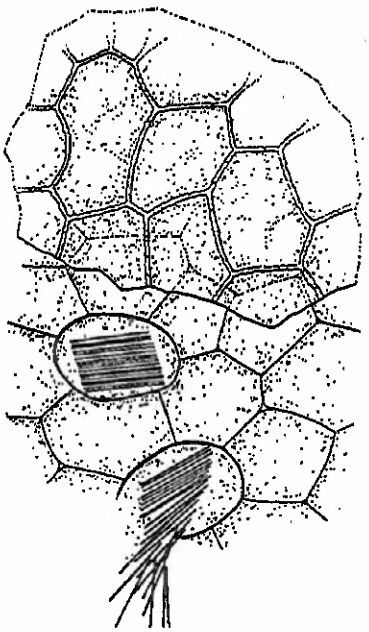
Fonte: GASSNER (1989)

4.11. Mamão, morango, uva

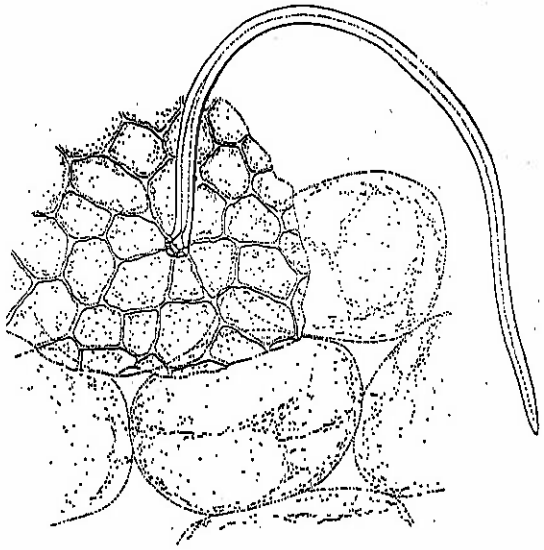
Mamão (*Carica papaya*)



Semente de uva (*Vitis vinifera*, L.)



Morango (*Fragaria* spp.)



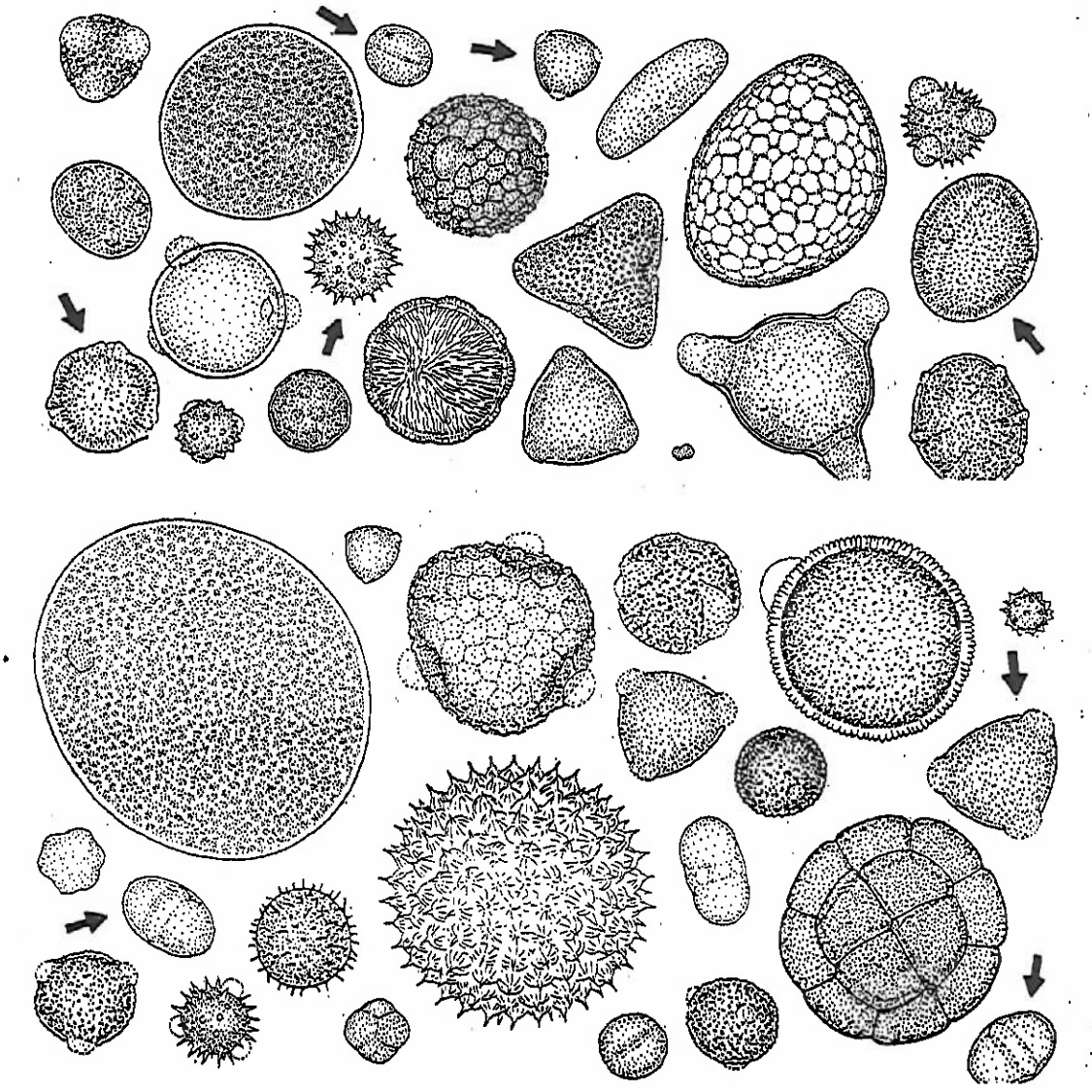
Fonte: GASSNER (1989)

4.12. Mel

A determinação microscópica do mel permite verificar a sua origem e também a sua natureza.

Preparo da lâmina

Dissolvem-se 10g de mel em 30ml de água, centrifuga-se e despreza-se o sobrenadante. Análisa-se microscopicamente o sedimento.

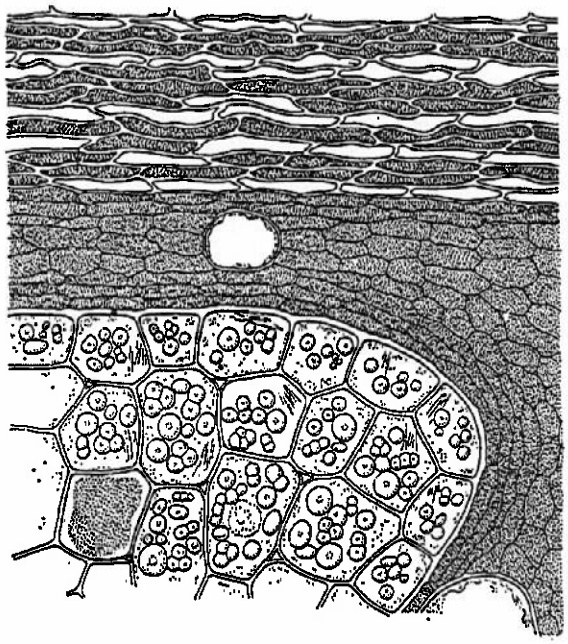


Grãos de pólen

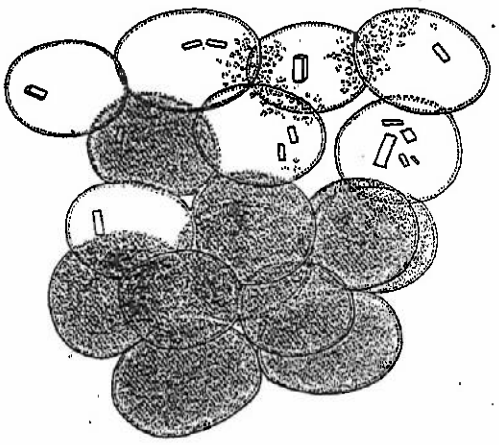
Fonte: GASSNER (1989)

4.13. Noz-moscada (*Myristica fragans*, Hontt)

- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.



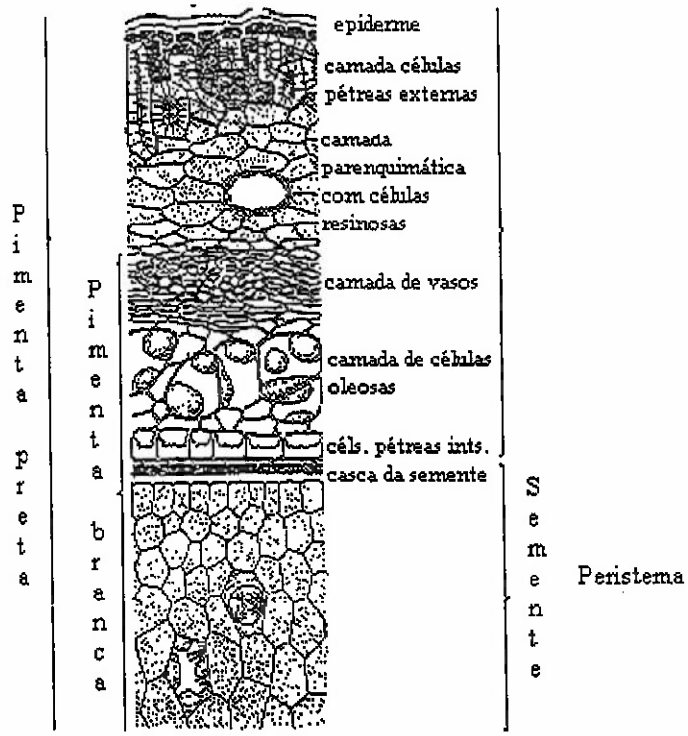
Corte transversal de noz-moscada

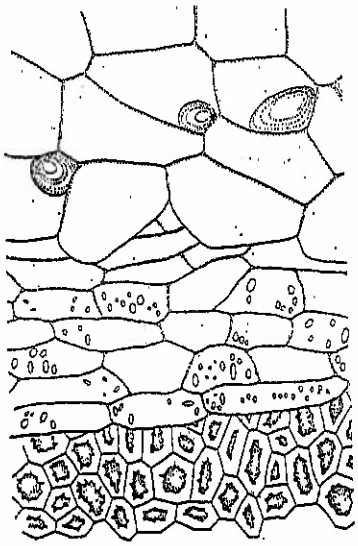


Células redondas com cristais
Corte transversal do perisperma externo

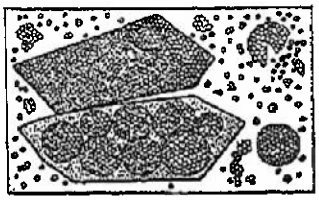
Fonte: GASSNER (1989)

4.14. Pimenta-do-reino *(Piper nigrum,L.)*





Camada interna

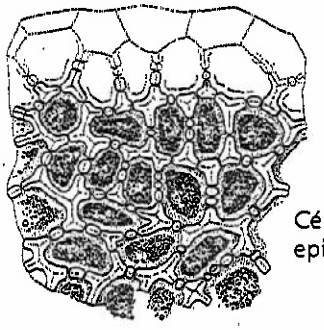


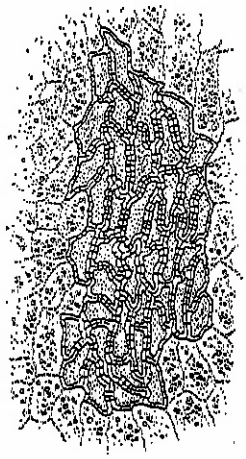
Amido do perisperma das sementes

Fonte: GASSNER (1989)

4.15. *Pimentão (Capsicum annuum, L.)*

- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.



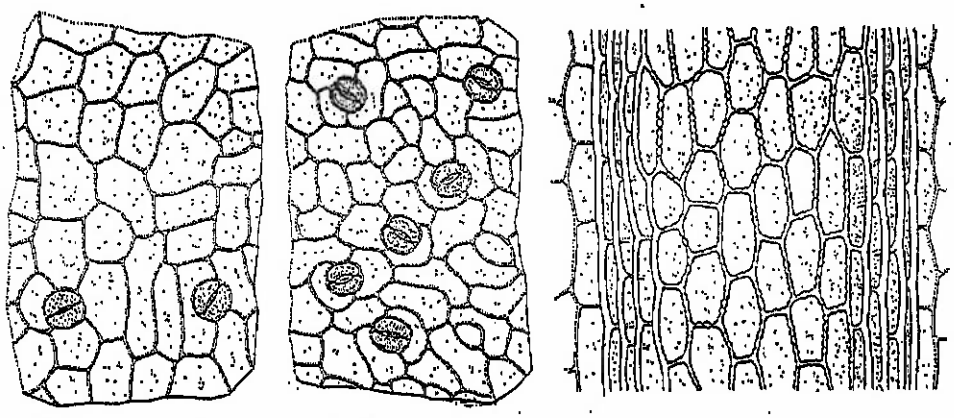


Células pétreas da epiderme interna do fruto

Fonte: GASSNER (1989).

4.16. Salsa (*Petrosolum sativum*, Hoffm.)

- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.

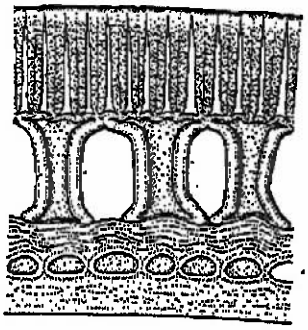


Epiderme superior | Epiderme inferior com estômatos | Nervura

Fonte: GASSNER (1989)

4.17. Soja (*Glycine hispida*, Maxim.)

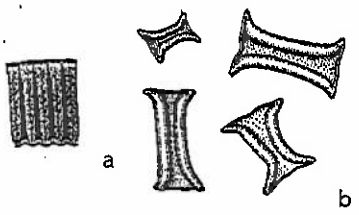
- Desengorduramento da amostra;
- Maceração em água;
- Preparo da lâmina



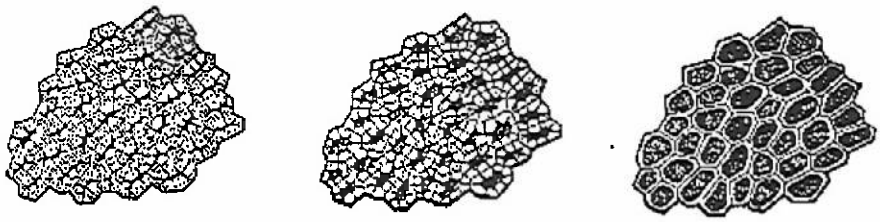
Células palissádicas

Células-suporte

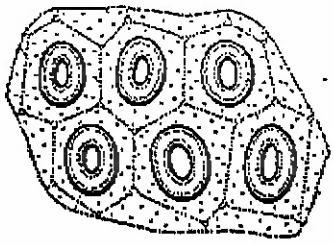
Células aleurônicas



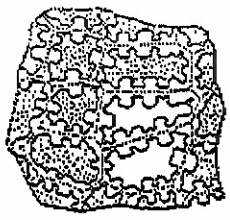
a - Células palissádicas
b - Células-suporte



Camada palissádica em diferentes profundidades



Células-suporte

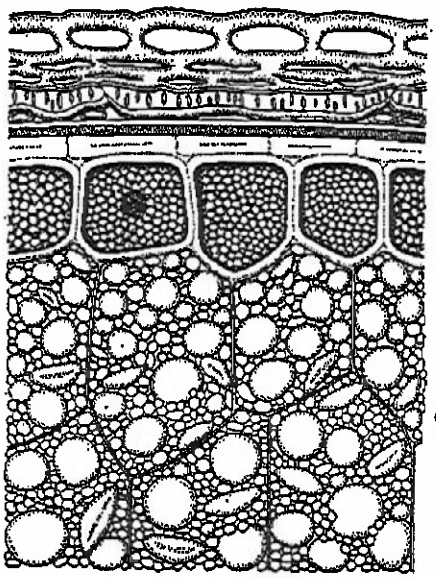


Camada aleurônica

Fonte: GASSNER (1989)

4.18. Trigo (*Triticum aestivum*, L.)

- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.



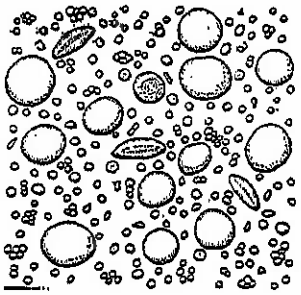
Células longitudinais

Células transversais

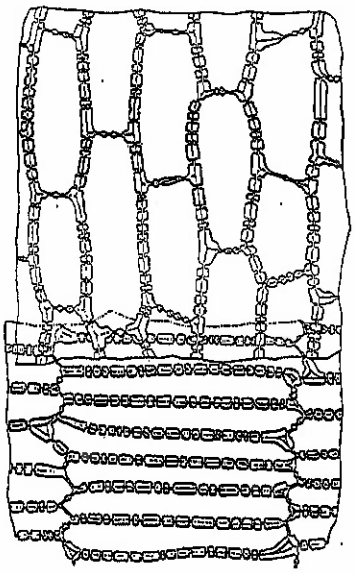
Casca da semente

Células aleurônicas

Células com amido



Grãos de amido



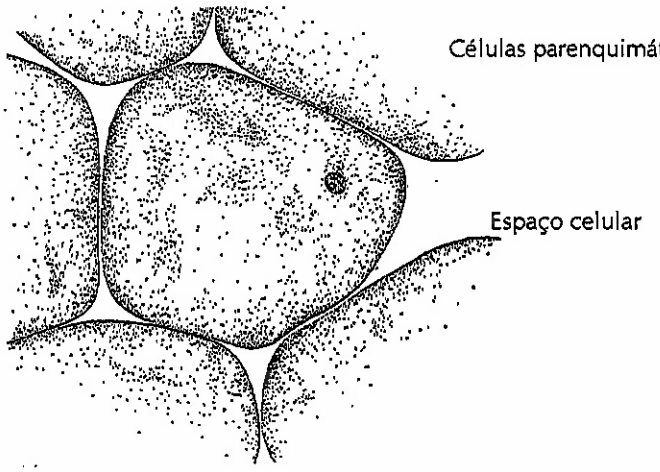
Células longitudinais

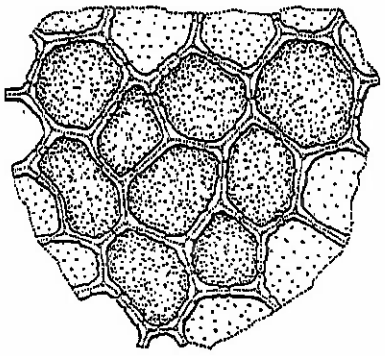
Células transversais

Fonte: GASSNER (1989)

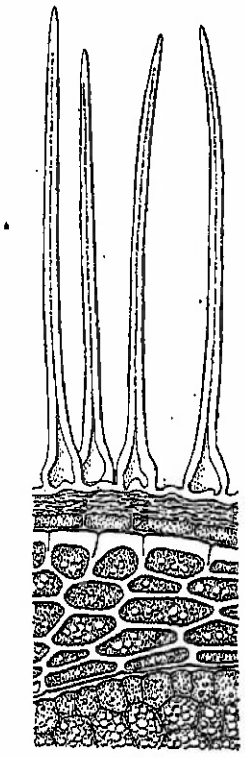
4.19. Tomate (*Solanum lycopersicum*, L.)

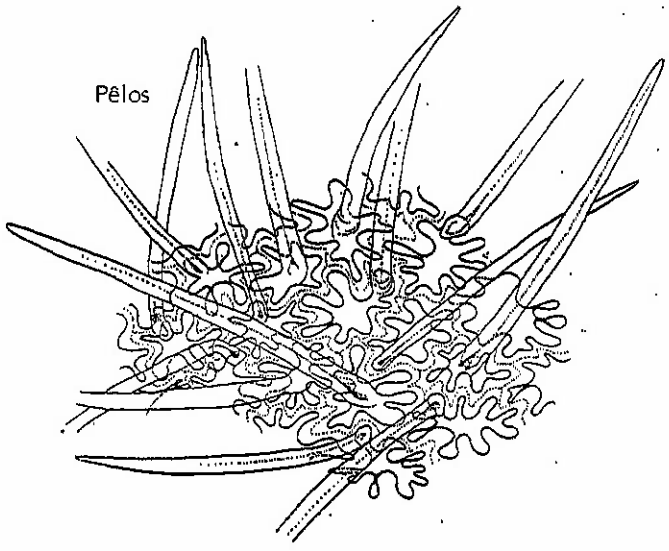
- Homogeneização da amostra;
- Preparo da lâmina.





Células da casca da semente





Fonte: GASSNER (1989)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIZUE, G. *et al.* **Apostila sobre microscopia de alimento.** São Paulo: USP/Departamento de Botânica, sd. 61p.

BARBIERI, M.K.; PASSINHO,H.C.R.; BISPO, E. da S. **Identificação histológica, isolamento e detecção de material estranho em Alimentos.** Salvador: Universidade Federal da Bahia/Faculdade de Farmácia, 1993. 52p.

BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P. **Botanical Microtechnique and Cyto Chemistry.** Iowa State: University Press, Anes, 1976.

GASSNER, G. **Mikroskopishe untersuchung pfianzicher lebensmittel.** Stuttgart: Gustav Fisher Verlag. 1989. 414p.

LILLIE, R.D. (Ed.) **Conn`s Biological Stains.** Baltimore: Willians & Wilkins, 1977.

PARRY, W.J. **Spices:** their morphology, histology and chemistry. New York: Chemical Publishing Co., 1962. 226p.

SCHULZE, A. E. Analytical Plant Histology. IN: GORHAN, J.R. (Ed.). **Principles of food analysis for filth, decomposition and foreing matter.** Arlington, U.S.: Departament of Health and Human Services, Public Health Service FDA, 1985. Chapter 11, p. 181-190.

WINTON, A. L.; WINTON, K. B. **The structure and composition of foods.** New York: John Willey & Sons, Inc., 1939. V.1, v.2 e v.4, 2194p.

YOKOMIZO, Y. Identificação e detecção de adulteração nos condimentos. **Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.12, p.11-26, 1967.

MATERIAL ESTRANHO EM ALIMENTOS
Isolamento e Detecção - Métodos Microanalíticos

1. INTRODUÇÃO

Os métodos microanalíticos referem-se aos testes baseados no uso de microscópio para detectar a presença de material estranho em alimentos (SMITH, citado em KRAMER, 1970).

O material estranho pode ser orgânico ou inorgânico, vivo ou inerte, prejudicial ou não, podendo fazer ou não parte da porção comestível da matéria-prima. Como exemplo, tem-se: sementes, partes estragadas de vegetais, insetos, fragmentos de insetos, ovos e larvas, pêlos e excrementos de roedores, areia, terra, etc. Tais sujidades não devem causar, de modo algum, deterioração dos alimentos.

A presença de materiais estranhos pode diminuir a aceitabilidade do produto do ponto de vista estético, uma vez que fabricantes, consumidores e órgãos de fiscalização esperam que os alimentos sejam inteiramente livres de material estranho.

Alguns desses materiais estranhos originam-se de matérias-primas que sofrem ataques de pragas ainda no campo e assim são carregados para o produto final, enquanto outros podem ser provenientes de manuseio, processo tecnológico ou armazenamento e distribuição inadequados. 0 processo de controle das infestações deve começar com a matéria-prima antes de chegar na planta de processamento e continuar através de cada etapa da linha de produção até o produto final a ser consumido .

O exame microscópico de produtos acabados é especialmente importante em alimentos que foram triturados ou moídos, tais como: cereais, polpas de frutas, purês vegetais, etc. Em tais produtos, as sujidades que poderiam ser visíveis macroscopicamente na matéria-prima tornam-se camufladas através da massa, na forma de pequenas partículas, as quais se tornam não detectáveis sem a ajuda de um microscópio.

A extração e identificação dos materiais estranhos nem sempre poderá dar uma relação quantitativa quanto às condições higiênicas da indústria e da matéria-prima. Porém, elas irão mostrar, de uma forma qualitativa, se houve contaminação, indicando ainda os pontos críticos onde as práticas de sanitização, controle da qualidade da matéria-prima e condições do processamento deverão ser enfatizadas.

A análise de amostras infestadas por insetos, por meio da observância do estágio de desenvolvimento do inseto e a data de fabricação do produto, pode muitas vezes fornecer indicações importantes para a implementação da qualidade, permitindo concluir se a infestação ocorreu na indústria ou no ponto de venda.

Análises realizadas no Núcleo de Análises Físicas, Sensoriais e Estatística- LAFISE do Instituto de Tecnologia da Alimentos - ITAL- Campinas- S.P., no período de 1996 a 1999, mostram os principais materiais estranhos comumente encontrados em alguns alimentos processados.

Confeitos de chocolate, biscoitos ao leite, biscoitos de maizena, biscoitos salgados, biscoitos recheados, paçoca de amendoim e balas de amendoim, geralmente, apresentam materiais estranhos oriundos de Lepidoptera, tais como teias, excrementos, lagartas, pupas e adultos. As principais espécies que atacam esses produtos são os piralídeos *Plodia interpunctella* (Hübner) e *Ephestia cautella* (Walker), esta principalmente em produtos contendo amendoim.

Fragmentos de insetos, principalmente de coleópteros, em biscoitos, provavelmente estão

relacionados à matéria-prima ou à sanitização deficiente das indústrias e/ou às estruturas inapropriadas que permitem a entrada e muitas vezes a proliferação de insetos nos resíduos e materiais armazenados. Fragmentos de Díptera e Blattodea são ocasonalmente encontrados devido a essas deficiências.

Café

Amostras de café torrado e moído apresentam fragmentos de insetos que muitas vezes chegam a mais de 100 por 25g de amostra, predominantemente do escolitídeo *Hypotenemus hampei (Ferrari)*, broca da cereja do café, o qual se desenvolve no interior destas no campo, e também ácaros, provavelmente relacionados à poeira, e pêlos de roedores relacionados ao armazenamento.

Massas alimentícias secas

A principal ocorrência em massas alimentícias secas tem sido os coleópteros *Sitophilus oryzae* (L.) e *Sitophilus zeamais* (Mots.). Essas espécies atacam o produto já pronto no ponto de venda ou na indústria antes da expedição. Realizam o desenvolvimento de ovo a adulto no interior da massa, ficando essa com estrias brancas características devido ao caminhamento e alimentação das larvas. O inseto deixa o interior da massa na fase adulta. Em altas infestações é comum a ocorrência do microhimenóptero *Anisopteromalus calandrae*, o qual parasita larvas de Sitophilus. Embora esse inseto realize o controle biológico, contribui por outro lado para poluir ainda mais o alimento. Também se desenvolvem em massas os coleópteros *Oryzaephilus surinamensis* (L.) e *Cryptolestes* spp. Podem ser encontradas diferentes fases de desenvolvimento de Lepidoptera e seus excrementos e teias, relacionados com o armazenamento inadequado do produto.

Ácaros e fragmentos de insetos encontrados em análise de sujidades são provavelmente provenientes da matéria-prima (farinha).

Alimentos farináceos

Em misturas para pizza e para bolos tem-se observado, com relativa freqüência, o desenvolvimento do coleóptero *Tribolium castaneum* (Herbst).

Alimentos prontos para consumo

As análises de alimentos prontos para o consumo, tais como grãos cozidos, molhos de tomate, misturas para sopas, etc., permitem observar que a fonte das infestações podem ser: a) oriundas do campo durante a cultura dos vegetais, como insetos que se desenvolvem no interior das sementes e grãos e são liberados durante o processamento do alimento, como por exemplo bruquídeos em feijões e grão-de-bico; b) devidas às condições inadequadas de sanitização da indústria, como indicam a presença de dípteros, blatódeos, himenópteros e coleópteros diversos; c) causadas por armazenamento inadequado da matéria-prima, como a presença de ácaros e insetos de produtos armazenados em geral.

2. DEFINIÇÕES SEGUNDO A A.O.A.C. (ZIOBRO, 2000)

Material estranho

Qualquer material estranho ao produto, que seja associado a condições ou práticas inadequadas de produção, estocagem ou distribuição, incluindo sujidades (leves, pesadas, separadas por peneira), material decomposto (tecidos podres devido a causas parasíticas ou não-parasíticas) e miscelâneas

(areia, terra, vidro, ferrugem), ou outras substâncias estranhas. Excluem-se dessa definição as contagens bacterianas.

Sujidades

Quaisquer materiais indesejáveis no produto, advindos de contaminação por animal, tais como: roedores, insetos ou pássaros, ou qualquer outro material indesejado proveniente de condições sanitárias impróprias de manuseio.

Sujidades pesadas

Sujidades mais pesadas separadas do produto por sedimentação, baseando-se na diferença de densidade entre a sujidade, as partículas do alimento e os líquidos usados para imersão do alimento, como clorofórmio, etc. Exemplos de tais sujidades são excrementos e fragmentos de excrementos de insetos e roedores, areia e terra.

Sujidades leves

Partículas de sujidades mais leves que são lipofílicas e são separadas do produto por flutuação em uma mistura líquida de óleo-água. Exemplos de tais sujidades são fragmentos de insetos, insetos inteiros, pêlos de roedores, bárbulas de penas, entre outros.

Sujidades separadas por peneira

Partículas de sujidades de tamanho específico separadas quantitativamente do produto pelo uso de peneiras de malhas selecionadas.

3. ISOLAMENTO E DETECÇÃO

3.1. Métodos diretos de exame

Em alguns casos, procedimentos de extração e utilização de microscópio não são necessários para separar e identificar a sujidade.

Os métodos diretos de exame podem ser empregados quando a contaminação por insetos, roedores ou fungos, ou outras substâncias estranhas ao produto, podem ser detectadas adequadamente pelo exame macroscópico, como normalmente o consumidor o faria (DENT, 1985). Como exemplos, tem-se pedras e insetos em frutas secas, insetos em massas alimentícias, fungos em pães e doces, etc.

3.2. Métodos de isolamento para detecção microscópica

A maioria das sujidades detectadas por métodos microanalíticos é de fragmentos insolúveis de insetos e partículas provenientes de roedores.

Certos constituintes solúveis de urina podem ser detectados por métodos microquímicos (Teste de Urease e Teste de Xandidol para uréia) e substâncias relativamente insolúveis, como ácido úrico de excrementos de aves e insetos, podem ser precipitadas (com solução aquosa de ácido nítrico 1:1) e identificadas.

As separações são feitas, em sua grande maioria, envolvendo técnicas, tais como: diferencial de

umedecimento, densidade específica, tamanho, solubilidade e/ou aparência da sujidade e do alimento envolvido. A combinação dessas técnicas pode ser necessária, em alguns casos, para que resultados satisfatórios possam ser alcançados.

A Food and Drug Administration (KRAMER, TWIGG, 1970) define os seguintes procedimentos básicos para isolamento:

a. Sedimentação

Se o contaminante a ser isolado tem uma densidade específica maior que a do produto alimentício, a decantação com água ou com solventes orgânicos de densidade específica adequada separa o material.

O isolamento por densidade específica é usado principalmente quando o material tem o tamanho de partícula semelhante ao do alimento. Um exemplo deste tipo de separação é o isolamento de excrementos de roedores da farinha de milho e da pasta de amendoim (KRAMER, TWIGG, 1970).

Num líquido com densidade específica ao redor de 1,49, os fragmentos de excrementos tendem a sedimentar, enquanto os do material vegetal flutuam. Com o aumento da densidade específica, maior quantidade de tecido vegetal tende a flutuar, arrastando alguns fragmentos de excrementos. É necessário, então, um balanço perfeito entre a necessidade de flutuar os tecidos vegetais e a crescente possibilidade de perder os fragmentos de excrementos.

Areia, terra, vidro e outros materiais semelhantes também são isolados por sedimentação. No método de sedimentação, a fase flutuante deve ser agitada de tempos em tempos para liberar as sujidades pesadas da massa de tecidos flutuante, possibilitando a sedimentação das mesmas.

b. Solução-dispersão

Quando o produto alimentício é solúvel em água, o método mais óbvio de isolamento de contaminantes é pela dissolução, filtração e coleta do resíduo num papel de filtro para exame. Esse método é adequado se o teor de resíduos examinados não for muito grande. Açúcar, sal, xaropes, mel e balas podem ser analisados por este método.

Substituindo-se água por solvente orgânico adequado pode-se analisar grande número de alimentos gordurosos, como gorduras animais e vegetais.

Utilizando-se solução ácida e calor, em vez de água, um número grande de outros alimentos, tais como: manteiga, queijos e certos materiais polvilhados com amido, como balas, pode ser disperso e dissolvido. Assim, a hidrólise ácida é uma das técnicas mais rápidas e eficazes para remover proteínas e amido.

Outra forma de hidrólise de proteínas e amido é a enzímica. Desde que o amido cru não sofre hidrólise por nenhuma das enzimas comumente utilizadas na determinação de sujidades, a hidrólise de alguns alimentos por solução ácida é muito usada.

As enzimas contidas na pancreatina são as mais usadas nos métodos microanalíticos. O extrato de pâncreas fresco digere gordura, mas a pancreatina comercial possui pouca atividade lipolítica. O amido cru não é afetado pelas enzimas do pâncreas; porém, algumas vezes interfere na extração e peneiragem. Já o amido cozido é completamente hidrolisado e pode ser filtrado por completo em papel de filtro de rápida filtração.

A pancreatina possui pouco ou nenhum efeito na cutícula de insetos, mas digere certas partes

de pêlos de roedores. Raramente é possível hidrolisar os alimentos por completo por meio de métodos enzímicos e uma vez que muito resíduo permanece, outras técnicas devem ser empregadas em conjunto com a da pancreatina.

O etileno diamino tetracetato tetrassódico (Na_4EDTA) e outros seqüestrantes de ácidos aminocarboxílicos que hidrolisam e solubilizam as proteínas são os agentes utilizados em conjunto com a pancreatina para proporcionar uma digestão rápida e completa. São usados, por exemplo, em produtos de laticínio para a filtração direta.

As soluções alcalinas concentradas devem ser evitadas nas técnicas de dispersão, pois afetam ou dissolvem os pêlos de roedores. Os pêlos de roedores também são mais sensíveis a soluções ácidas do que outros contaminantes. Portanto, a utilização de soluções concentradas de NaOH, KOH, Na_3PO_4 e Na_2CO_3, bem como aquecimentos prolongados com soluções ácidas devem ser evitados quando se está procurando o isolamento de pêlos de roedores.

Os fragmentos de insetos não são grandemente afetados nem por ácidos nem por álcalis. O seu aquecimento em solução de NaOH a 10% durante 5 a 10 minutos pode torná-los mais quebradiços à ação mecânica. No estudo microanalítico, pode-se considerar que os fragmentos de insetos não são afetados por ácidos, com exceção da carbonização ocorrida pelo aquecimento prolongado com ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado.

c. Filtração

Se uma pequena porção de resíduo permanecer após a aplicação de algum destes métodos de dissolução, este resíduo pode ser facilmente separado por filtração em papel de filtro. Se o teor do resíduo for grande e o material estranho for de tamanho suficiente, é aconselhável, algumas vezes, a filtração em tecidos ou o uso de peneiras. O tamanho da abertura da peneira ou da malha do tecido deve ser sempre levado em conta, em função do tamanho da partícula do alimento, a fim de proporcionar uma separação do alimento e do contaminante. A maioria dos procedimentos de filtração de sujidades é realizada em papel de filtro marcado, o qual é a seguir examinado em microscópio estereoscópio sob aumento de 10 a 40 vezes.

Quando o material coletado é de tamanho relativamente grande, recomenda-se que a filtração seja efetuada por sucção em funil de Hirsch e que o papel empregado permita uma filtração rápida. Recomenda-se ainda que o papel de filtro seja marcado por linhas separadas pela distância de aproximadamente 5-10mm, utilizando tintas à prova de água, de óleo ou de álcool. Estas linhas servirão de guia para o exame microscópico. Para a contagem de ovos e larvas de moscas, recomenda-se papel preto, o que proporciona um contraste, permitindo contagem mais precisa.

d. Flutuação em óleo e o frasco-armadilha de Wildman

A maioria dos alimentos é composto de misturas complexas; desta maneira eles não são completamente solúveis e não podem ser examinados após a filtração em papel ou peneira, mas devem ser separados antes.

Observou-se que, quando se misturava gasolina a uma solução aquosa contendo insetos, fragmentos de insetos e pêlos de roedores, os materiais estranhos flutuavam para a camada superior de gasolina. Este princípio tem sido, então, utilizado para o isolamento de sujidades.

Os fragmentos de insetos flutuam em óleo principalmente devido à afinidade da cutícula do inseto em óleo, a qual não é umedecida pela água. O empuxo exercido sobre o fragmento de inseto ou pêlo de roedor depende parcialmente do peso específico do óleo aderido à esses materiais, comparado ao do meio aquoso.

As soluções alcoólicas em água são utilizadas como meio líquido do processo de flutuação. Estas soluções alcoólicas em água atuam de duas formas:

- diminuindo o peso específico do meio aquoso;
- diminuindo a tensão superficial do meio aquoso, a qual proporciona umedecimento mais rápido dos tecidos das plantas e, conseqüentemente, resulta na sua sedimentação mais rápida.

A adição de substâncias, como Tween 80 (surfactante) e Na_4EDTA (seqüestrante), em soluções alcoólicas (meio de flutuação), é indicada para prevenir que muitos dos constituintes indesejados de alimentos ascendam à superfície com a camada oleosa.

Outros fatores, como o pH e aquecimento, devem ser controlados, pois podem influenciar na recuperação dos fragmentos de insetos. A flutuação em soluções de pH muito baixo ou elevado resulta numa recuperação incompleta, que pode ser parcialmente explicada porque a maioria das bases atua como emulsificantes. O aquecimento de amido e proteínas em água ou solução alcoólica diluída proporciona o cozimento e a gelatinização, diminuindo a recuperação, portanto, o uso de aquecimento não é recomendado, mas quando necessário deve ser feito com solução aquosa de álcool 60%.

Os óleos especificados no "Official Methods of Analysis" (ZIOBRO, 2000) são: gasolina, querosene, óleo mineral e óleo de rícino. Estes óleos foram selecionados pela sua capacidade de umedecer o contaminante e não o material vegetal do alimento. Gasolina e querosene são suficientemente fluidos e não causam maiores problemas devido à viscosidade. O óleo de rícino é viscoso e, devido ao seu alto peso específico, afunda em soluções alcoólicas, somente podendo ser usado em soluções aquosas. A solução aquosa de óleo de rícino é usada sempre aquecida, devido à alta viscosidade e ao alto peso específico.

Ovos e insetos, larvas de dípteros e de alguns nematóides sedimentam em camadas de óleo/água, respondendo diferentemente da maioria das sujidades provenientes de insetos, as quais normalmente flutuam.

4. MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Ref. A.O.A.C. nº 945.75 B (ZIOBRO, 2000)

Observação: Evitar o uso de materiais feitos de polietileno, tais como béqueres, funis, contêineres, entre outros, pois fragmentos de insetos e pêlos de roedores aderem aos aparatos feitos com esse material.

a. Aerador de água

Para produzir jato de água aerada de fluxo brando, remove-se a peneira interna. Para jato forçado, recoloca-se a peneira interna (Fisher Scientific Co., nº91-404) conforme Figura 1. Caso o aerador tenha mais de um disco, usa-se somente o disco com furos menores (~1mm).

O Núcleo de Análises Físicas, Sensoriais e Estatística - LAFISE do ITAL utiliza, em substituição a esse equipamento, um condicionador de água construído com a finalidade de possibilitar uma filtragem eficiente, com posterior condicionamento da temperatura da água através de controlador microprocessado, tendo como principal aplicação a lavagem de amostras que exigem a aeração e jato de água brando para a remoção das partículas de resíduo de alimentos. Esse equipamento foi desenvolvido pela MS Tecnopon® Instrumentação Científica e não é disponível comercialmente.

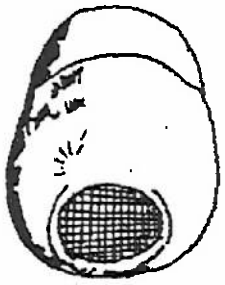


FIGURA 1. Aerador de água

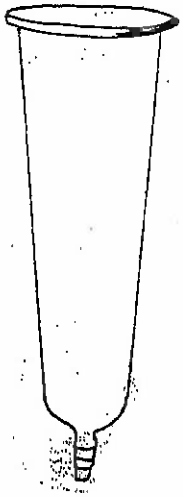


FIGURA 2. Percolador

b. Filtro de tecido

Tecido de seda de malha e espessura padronizadas, como utilizado em moinhos de farinha.

O número de fios especifica o número da malha por polegadas linear. "X","XX" ou "XXX", depois do número, referem-se à espessura do fio da trama do tecido, o qual também afeta o tamanho da abertura do tecido. Portanto, deve-se seguir exatamente a designação do número e do "X" do filtro de tecido.

Preparam-se os discos, fervendo os quadrados grandes do tecido antes de cortá-los em círculos de 85cm. Os círculos cortados de tecido não fervido encolhem e ficam deformados. Alisam-se os círculos a ferro e riscam-se linhas de 5 a 7mm de distância com tinta da Índia ou outro material permanente, usando uma pena fina.

Quando necessário tinge-se o tecido riscado aquecendo-o e agitando-o durante cerca de 15 minutos em solução (80-85°C) de 50mg de corante azul no 1 da FD&C em um litro de água contendo 2,5ml de ácido acético. Enxágua-se bem o tecido com água e guarda-se no escuro.

c. Vasos de extração

1. Funil de Kilborn - capacidade de 1 litro, com dimensões de 3,5 polegadas por 9,5 polegadas de altura, abertura da extremidade de 8mm. Tubo de borracha com 3/8 de polegada de diâmetro interno e pinça permitem um bom fechamento.

2. Percolador - capacidade de 2 litros, da Corning Glass Works nº 7040 (Figura 2), ou equivalente, conforme tamanho e forma geral: 115mm de diâmetro interno x 400mm de altura, cerca de 90mm de diâmetro interno a 200mm abaixo do topo, com 8-9mm de diâmetro para o tubo de drenagem e pinça para fechar. Usar bastão de vidro de 370 x 10mm de diâmetro quando especificado, para prevenir a compactação da amostra na abertura de drenagem.

3. Frasco-armadilha de Wildman - Consiste de um Erlenmeyer de 1 ou 2 litros, ao qual se insere uma rolha de borracha justa presa em um bastão de metal de 5mm de diâmetro e cerca de 10cm mais longo do que a altura do frasco (bastão de diâmetro maior não é aconselhável porque provoca maior deslocamento de líquido). O bastão é inserido até a extremidade oposta da rolha e guarnecido com parafuso e arruela para vedar a rolha. O parafuso e a arruela da extremidade inferior devem ser embutidos na rolha para evitar quebra do frasco (Figura 3).

d. Papel de filtro

Usar papel liso, de alto poder de umedecimento com rápida ação de filtração, riscado em linhas de 5mm de distância com tinta à prova de óleo, álcool e água. Papel de filtro quantitativo FRAMEX, 9cm θ, Ref. 389 [1], procedência S&S, ou similar.

e. Copo de papel de filtro

Papel de filtro S&S-588 ou equivalente, para desengordurar amostra.

Moldar parcialmente os copos ao redor da base do menor béquer especificado no método e colocar gentilmente no béquer maior. Remover o béquer menor e transferir a amostra para este copo de papel.

f. Funil de filtração com sucção (Figura 4)

Usar funil de Büchner ou Hirsch como especificado no método, com papel de filtro ou tecido de filtração em forma de copo para evitar perda de resíduos.

O uso de tela metálica ou tecidos de seda entre a superfície perfurada do funil e o papel de filtro acelera a filtração e apresenta maior uniformidade na distribuição dos sólidos.

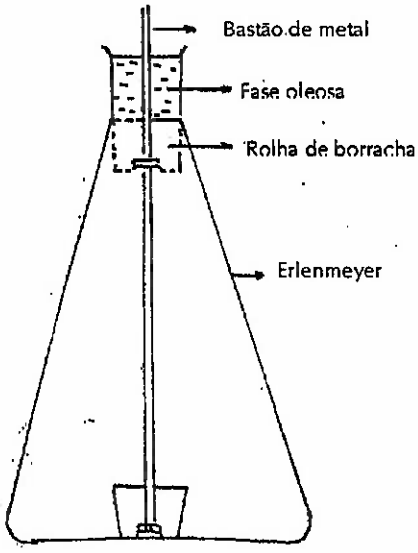


FIGURA 3. Frasco-armadilha de Wildman

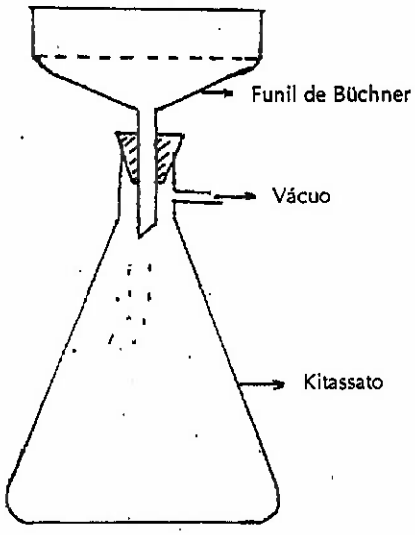


FIGURA 4. Funil de filtração com sucção

g. Peneiras

A peneira de nº 100 ou mais fina deve ser plana e de malha de aço inoxidável (não deve ser de tecido).

h. Autoclave

1. Tipo exaustão de vapor lenta. Calibrar em "exaustão lenta", para reduzir a pressão de 15 para zero psi em 15 a 20 minutos.

2. Tipo exaustão rápida. Deixa-se esfriar para zero 0°C antes de abrir a autoclave ou antes da ventilação.

i. Misturadores

1. Velocidade alta - usar frasco de 1 litro com 4 lóbulos, adaptado com 4 lâminas, sendo 2 lâminas com diâmetro de 60mm inclinadas para cima cerca de 30° e 2 lâminas com diâmetro de 55mm inclinadas para baixo cerca de 25°. Operar na velocidade especificada no método, usando transformador de variável.

2. Velocidade alta elevada-alternativa para misturador de velocidade alta - misturador com 6 chanfraduras, lâminas de aço puro com bordas cortantes girando no eixo do motor suspenso e a velocidade controlada. As lâminas rotatórias da base são de aço puro, tendo 4 recortes denteados formando lóbulos. Sorvall Omni-Mixer (Du Pont Instrument Co, Sorvall Operations, Peck's In, Newtown, CT 06470, USA) ou equivalente.

j. Agitador de manteiga (Figura 5).

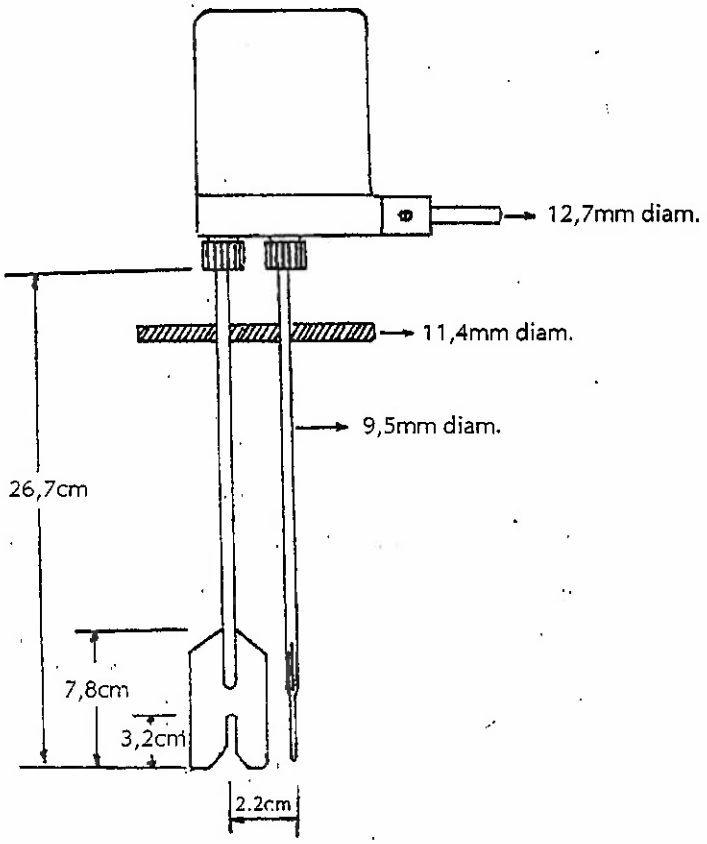


FIGURA 5. Agitador de manteiga

k. Centrífuga

Centrífuga tipo International EXD (International Equipment Co.) com 8 lugares, cabeçote nº 240, suporte nº 320, anel nº 325 e almofada nº 571, ou outra centrífuga que dê equivalente máximo de força centrífuga relativa.

A seguinte fórmula pode ser usada para determinar o equivalente centrípeta:

$N_1^2 r_1 = N_2^2 . r_2$, onde $N_1 = 2200$ r.p.m. e $r_1 = 19{,}6$cm (distância do centro do cabeçote até a base do tubo na horizontal).

l. Iluminadores para microscópio estereoscópio

Para o exame de sujidades, o iluminador deve ser sólido e flexível; o transformador ou resistor deve ter variação de intensidade de luz e ajuste de foco, para dar uniformidade clara do campo de visão, e luz de cor azul-branca de origem fria e de baixa voltagem.

m. Barra magnética e chapa de aquecimento com agitação

As barras magnéticas devem ser revestidas de teflon, apresentando cerca de 47mm de comprimento por 9mm de diâmetro.

O aquecimento da chapa deve ser independente do uso da agitação e a chapa deve possuir controles para as variáveis calor e velocidade. Ver também 970.66B (c).

n. Microscópios

1. Microscópio composto - para contagem de bolor, outras sujidades e material decomposto. O microscópio deve ter as seguintes especificações mínimas: corpo da binocular com oculares inclinadas; 4 pares focais de objetivas acromáticas de cerca de 4, 10, 20 e 40X; canhão giratório com 4 lugares; condensador Abbe com N.A. de 1,25; ocular 10X; ajuste fino mecânico.

2. Microscópio estereoscópio recomendado para o exame de sujidades - deve ter as seguintes especificações mínimas: corpo da binocular com oculares inclinadas, canhão deslizante ou giratório acomodando 3 objetivas e 3 pares focais de objetivas (1X, 3X e 6 ou 7,5X) pareadas com oculares de campo amplo de 10X e 15X, montados numa base com iluminação de luz transmitida ou refletida.

Geralmente, o aumento usado no exame de rotina dos filtros de papel é de 30X. Verificação em magnitude maior pode ser requerida.

5. REAGENTES

Ref. A.O.A.C. nº 945.75 C (ZIOBRO, 2000)

a. Solução ácido-álcool

Ácido clorídrico concentrado p.a.(HCl) e álcool a 60% na proporção 1:9, respectivamente, ou HCl e isopropanol a 40% na proporção 1:9.

b. Álcool

Etanol comercial a 95% (não recuperado), a menos que outro tipo de álcool seja especificado no método. Fazer todas as diluições por volume.

c. Solução álcool 60% - cloreto de cálcio

Para cada 3 litros de álcool a 60% (este é o volume requerido para uma análise), adicionar 200g

de cloreto de cálcio anidro ($CaCL_2$), agitar até dissolver o sal e filtrar. A turvação da solução causada por traços de carbonato de cálcio desaparecerá (ou seja, a solução tornar-se-á límpida) durante a análise, quando a solução for acidificada.

d. Solução anti-espumante

1g de anti-espumante A-Dow Corning, completamente dissolvido em 20ml de acetato de etila. Usar o sobrenadante e guardá-lo em recipiente bem fechado. Pode ser utilizado o éter etílico como anti-espumante.

e. Solução detergente

Preparar solução aquosa de lauril sulfato de sódio como requerido no método.

f. Emulsificantes (agentes ativos de superfície, não-iônicos, solúveis em água)

- Igepal CO 730 - Nonylphenoxypoly (ethyleneoxy) ethanol
- Igepal DM-710 - Dialkylphenoxypoly (ethyleneoxy)ethanol
- Igepal CO-630 - Nonylphenoxypoly (ethyleneoxy) ethanol

g. Líquido de flotação

Óleo mineral (l) e heptano (h), na proporção de 85:15, respectivamente.

h. Heptano

N-heptano comercial contendo menos de 8% de tolueno.

i. Solução-padrão saturada de sulfato de indoxil (indicador de urina)

Aproximadamente 0,1mg/ml (da Sigma Chemical Co.). Estocar em recipiente escuro (resistente à luz) sob refrigeração. A solução é estável por cerca de 1 mês.

j. Isopropanol saturado com heptano

Para 600ml de isopropanol adicionar 45ml de heptano e 430ml de água destilada; misturar e deixar em repouso por uma noite (em funil de separação). Sifonar abaixo da interface.

k. Querosene desodorizado

l. Óleo mineral

Óleo parafínico, vaselina líquida, Nujol ou equivalente.

m. Solução de pancreatina

Usar grau USP ou solução fresca de pancreatina refrigerada a 10°C. Misturar na proporção de

5g/100ml de água destilada à temperatura aproximada de 40°C. Para queijos usar solução especial de 10g/100ml de água. Agitar com misturador tipo mixer, ou bater em liqüidificador durante 10 minutos, ou deixar agitando durante 30 minutos em "Shaker". Centrifugar a 1500 r.p.m. e filtrar o sobrenadante através de papel de filtro S&S nº 8, ou equivalente. Alternativamente, filtrar através de chumaços de algodão de 10-13cm de espessura e depois através de papel nº8 em funil de Hirsch com sucção.

n. Solução de fosfato de sódio ($Na_3 PO_4$)

Grau técnico a 5% em água.

o. Solução de Tween-80-álcool 60%

Para 40ml de polissorbato 80 (Zeneca Ag Products), adicionar 210ml de álcool a 60%, misturar e filtrar (volumes proporcionais podem ser preparados).

p. Solução de Tween-80-isopropanol 40%

Para 40ml de polissorbato 80, adicionar 210ml de isopropanol 40%, misturar e filtrar (volumes proporcionais podem ser preparados).

q. Solução EDTA tetrassódico-álcool 60%

Dissolver 5g de etileno diamino tetracetato tetrassódico (Na_4EDTA) em 100ml de água e adicionar 150ml de álcool, misturar e filtrar (volumes proporcionais podem ser preparados).

r. Solução de EDTA tetrassódico-isopropanol 40%

Dissolver 5g de etileno diamino tetracetato tetrassódico (Na_4 EDTA) em 150ml de água, adicionar 100ml de isopropanol, misturar e filtrar (volumes proporcionais podem ser preparados).

s. Solução-padrão de uréia

20mg/ml de água. Esta solução é estável durante 3 meses.

t. Agentes umectantes

1. **Tergitol aniônico.7** - heptadecila sulfato de sódio (Sigma Chemical Co).
2. **Triton X-114** - álcool alquilaril poliéter (Rohm & Haas Co.).

Observações:

- "H_2O" - o termo água significa água destilada, exceto onde outro tipo diferente é especificado ou quando a água não é misturada com o produto analisado, como no banho-maria.

- Nas expressões (1+2), (5+4), etc., mencionadas juntamente com o nome do reagente, o primeiro número indica o volume do reagente usado e o segundo número indica o volume de água. Por exemplo, solução de ácido clorídrico: 1+2 (HCl: 1+2), significa reagente preparado pela mistura de 1 (um) volume de HCl com 2 (dois) volumes de H_2O. Quando um dos reagentes é sólido, a expressão significa partes em peso; sendo que o primeiro número representa o reagente sólido e o segundo o volume de água. Soluções onde o solvente não é especificado são soluções aquosas.

6. SUJIDADES LEVES E PESADAS - TÉCNICAS ESPECIAIS

REF. A.O.A.C. nº 970.66, 17ª ed., 2000.

a. Técnica de peneiramento com água

Usar peneira limpa de diâmetro adequado (8 polegadas no mínimo), tipo de malha adequada (plana, não do tipo sarja entrelaçada) e número de malhas adequado (100, 140, 230, etc.). Manter a peneira sob o aerador de água, com jato de água à temperatura especificada no método, a um ângulo aproximado de 30º.

Despejar porções da amostra bem misturada na peneira (não muito grande para não obstruir a malha ou que resulte em espuma excessiva), de modo que jatos de pressão moderada de água contate o material na peneira.

Aumentar a pressão da água para se conseguir a ação máxima de peneiragem, mas de modo a não ocorrer perda de amostra na borda da peneira.

Manter o material lavado na borda interior da peneira (inclinando a peneira num ângulo de 30º) e direcionar o jato de água na amostra até que toda a espuma do detergente saia e as águas de lavagem se tornem límpidas.

Adicionar novas porções de amostra e lavar até eliminar toda a espuma do detergente.

Transferir quantitativamente o material retido na peneira, como especificado no método.

Lavar as paredes da peneira usando pisseta, direcionando o jato de água na peneira ligeiramente inclinada, até transferir todo o resíduo de amostra aderido na borda da peneira.

b. Operação com o frasco-armadilha de Wildman (Figura 6)

A menos que outro método específico seja indicado, resfriar a mistura no frasco à temperatura ambiente.

Acertar o volume do líquido até cerca de 900ml no frasco de 2 litros e 600ml para o frasco de 1 litro.

Adicionar o volume de líquido de flotação (óleo) conforme indicado no método, despejando-o lentamente pelo bastão de agitação.

Agitar com barra magnética, 970.66B(c).

Adicionar líquido suficiente para elevar o volume do líquido de flotação até o gargalo do frasco (**Nota:** desaerar todo o líquido de flotação antes de usar).

A menos que outro procedimento seja referido no método, deixar a mistura em repouso durante 30 minutos, agitando ocasionalmente a camada da base a cada 3-6 minutos, durante os 20 primeiros minutos.

Girar a rolha para remover o sedimento e sifonar a camada oleosa por elevação da rolha (fechar) até o gargalo do frasco, estando certo de que a fase oleosa e 1cm do líquido abaixo da interface estejam acima da rolha.

Transferir a camada oleosa para béquer.

Enxaguar o bastão e as paredes do gargalo do frasco com o líquido de extração que foi utilizado para a flutuação e coletar no mesmo béquer.

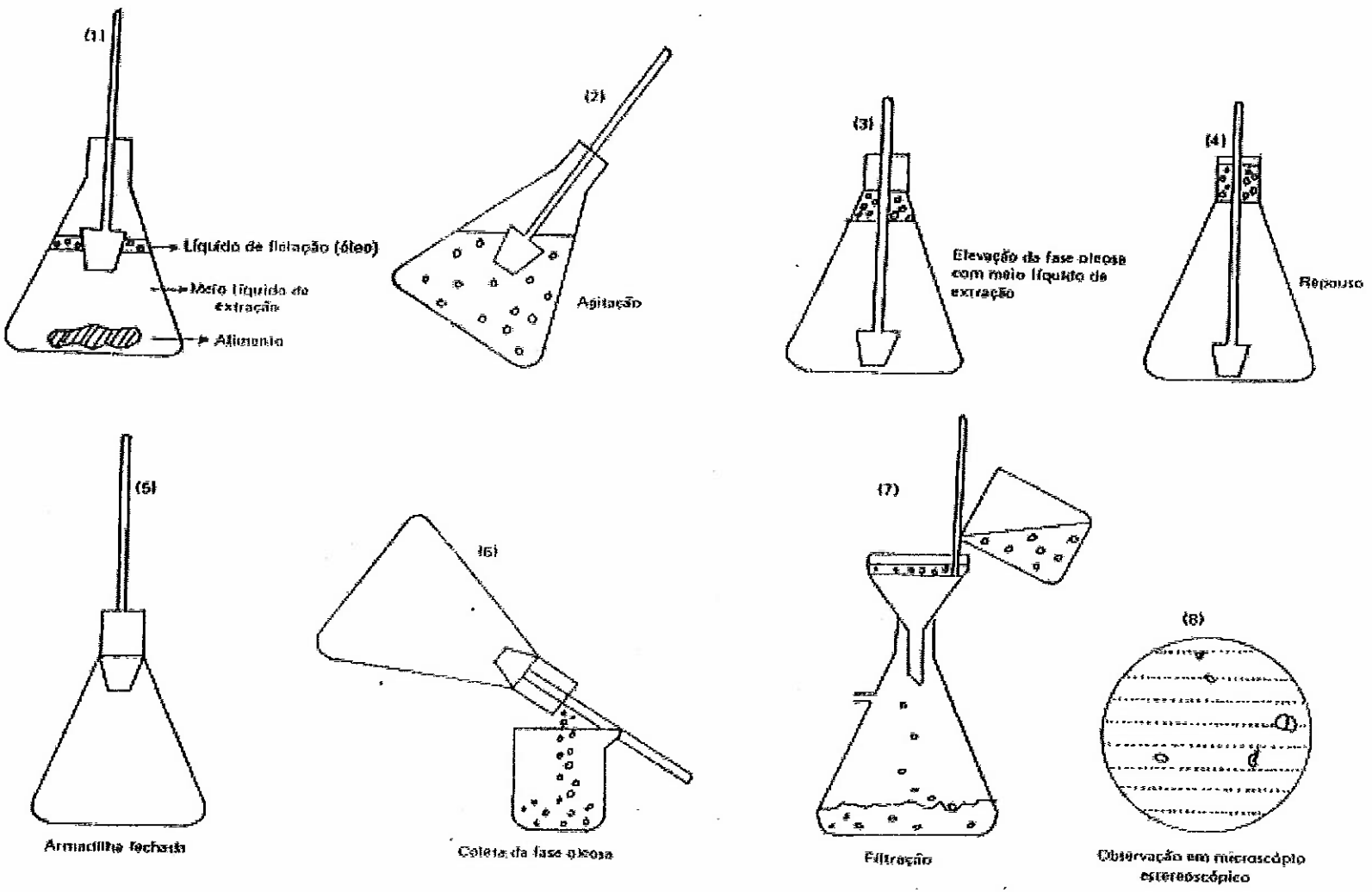


FIGURA 6. Técnica de extração com frasco-armadilha de Wildman (AKIZUE *et al.*, sd).

Observação: Não lavar as paredes do gargalo do frasco com álcool a 95% ou outro líquido que interfira com a relação de superfície das duas fases, pois isso pode causar menor recuperação das extrações subseqüentes.

Filtrar o material coletado e os líquidos de lavagens através de papel de filtro de filtração rápida, com sucção, em funil de Büchner.

Adicionar o líquido de flotação, conforme especificado, no frasco-armadilha e agitar vigorosamente.

Adicionar o meio líquido de extração em quantidade suficiente para trazer o líquido de flotação até o gargalo do frasco.

Proceder à segunda extração, lavar e filtrar como na primeira extração.

c. Operação com agitador magnético

Para dispersar o líquido de flotação na amostra, dilui-se o meio líquido de extração ao volume especificado no método e ajusta-se à temperatura apropriada.

Adicionar a barra magnética, 945.75(m), e volume adequado do líquido de flotação. Vagarosamente aplicar a velocidade máxima de agitação, de modo que não provoque respingos (a porção central do magneto é geralmente visível somente na base do redemoinho), e agitar pelo tempo estabelecido no método.

d. Técnica de filtração (tratamento do material extraído)

Se o material coletado no béquer contiver resíduo apreciável de amido, adicionar ácido clorídrico (HCl) suficiente para obter uma solução de 1-2% de HCl, levar à ebulição e filtrar a quente.

Se a gordura ou material coloidal retardar a filtração, acelere-a aplicando jatos de água quente sobre o papel durante a filtração.

e. Branqueamento de material vegetal

Com os procedimentos de sedimentação ou flutuação, alguns constituintes do alimento podem ser extraídos juntamente com as partículas de sujidades. Com o branqueamento apropriado desses constituintes, as sujidades podem ser contrastadas com o fundo branco do papel de filtro por uma das seguintes técnicas:

1. Para sujidades pesadas - umedecer o papel com água ou álcool a 50% (essa técnica não branqueia completamente o material, mas deixa excrementos de roedores e outras sujidades macias e flexíveis).

2. Para exame de sujidades leves - molhar o papel com glicerol-álcool (1:1) imediatamente após a filtração. Colocar líquido suficiente no papel para saturar as fibras, mas de modo a não causar o escoamento do material estranho. Esse agente branqueador não endurece a sujidade no papel, como fazem muitos óleos que são usados como agentes clareadores.

3. Óleo de cravo-da-índia pode ser usado para clarear material vegetal. Este óleo tem índice de refração alto e poder clarificante maior que a solução álcool-glicerol.

f. Iluminação para microscópio estereoscópio (iluminação direta)

Focalize e ajuste a luz para incidir em cima do papel em ângulo de cerca de 70° com a horizontal. A luz pode vir da direita ou da esquerda.

g. Exame microscópico dos papéis de filtro

Proceder ao exame microscópico em aumento de 30X (a menos que outro aumento seja especificado no método), usando microscópio estereoscópio, no papel corretamente clareado com fundo branco opaco.

Examinar as partículas, virar todos os pedaços maiores de material, como por exemplo: farelos que podem esconder as sujidades.

Examinar todos os pedaços de material duvidoso em aumento de 60-75X. Aumento de pelo menos duas vezes a magnitude usada no exame original é necessário para observar detalhes não percebidos no aumento menor.

Se persistir a dúvida, clarear o fragmento novamente e examinar em microscópio composto. Assume-se que o analista possua completo conhecimento da aparência do material autêntico.

h. Contagem de insetos e outras sujidades animais

Para o diagnóstico das características dos fragmentos de insetos contar como originário de inseto qualquer fragmento que apresentar uma ou mais das seguintes características (ver Apêndice, Figuras 1 a 5):

1. Forma característica de apêndice específico inteiro ou de porções, ou de partes do corpo.
2. Pontos de articulação (vários tipos de juntas).
3. Um ou mais pêlos ou cerdas do corpo.
4. Uma ou mais cicatrizes das cerdas.
5. Superfície desenhada (esculpida), característica do inseto.
6. Presença de uma ou mais suturas (vários tipos separando o corpo em placas ou escleritos).
7. Diagnóstico para as características de pêlos de animal e humano, (ver Apêndice, Figuras 6 a 18).

i. Modo de relatar a sujidade

1. Recipiente - descrever o tamanho, tipo e recravação do recipiente e anotar as condições se este não estiver intacto.
2. Produto - especificar o nome comum, se a identidade for conhecida, ou simples descrição.
3. Código(s) - nome do(s) fabricante(s) ou distribuidor e marcas de identificação.
4. Método(s) - citar o(s) número(s) dos parágrafos da A.O.A.C. usados e anotar quaisquer modificações realizadas.
5. Quantidade examinada - numere as subamostras analisadas e anote a quantidade de cada subamostra. Se a quantidade utilizada for variada, relatar cada uma.
6. Materiais encontrados - relatar os materiais encontrados na ficha de relatório, pelo número da subamostra. Usar somente as categorias aplicáveis e reportar qualquer elemento de sujidade encontrada somente sob uma das categorias, não mais que uma. Dentro das categorias, agrupar os elementos de sujidades por identidade (quando conhecida), e então por tamanho ou outra descrição apropriada da aparência.

7. Se a contagem de uma porção de sujidades presentes for impraticável, relatar número aproximado ou avaliação mínima antes do termo "contagem muito numerosa".

8. Resumir os resultados da amostra por categorias médias e totais. Anotar se a amostra foi ou não fumigada antes do envio ou na recepção do laboratório, se há insetos inteiros, ácaros ou outros artrópodes.

9. Numerar os insetos inteiros ou equivalentes (isto é, cabeças separadas ou porções do corpo com a cabeça unida). Discriminar insetos inteiros ou equivalentes em subtotais. Dar a identidade, estágio do ciclo de vida e tamanho em mm. Especificar se inseto inteiro se encontrava vivo ou morto.

10. Numerar as exúvias (pele) de insetos, dar a identidade (se conhecida), tamanho (mm) e estado (ninfa, larva ou pupa). Discriminar as exúvias inteiras (com porção da cabeça) e fragmentos de exúvia.

11. Numerar os ovos de insetos e dar a identidade, se conhecida.

12. Numerar os fragmentos de insetos e dar a identidade (se conhecida), dimensões ou variações do tamanho (mm) e nome da parte. Mencione se os fragmentos identificados são de insetos adultos ou imaturos.

13. Numerar as cerdas - se for de mosca, relatar.

14. Excreta de insetos - relatar peso (mg) e/ou contar os excrementos, com as dimensões ou variações do tamanho (mm). Dar a identidade, se conhecida.

15. Penetração de inseto na embalagem - relatar o número, tamanho (mm) e direção. Anotar a integridade da embalagem e o acabamento do fechamento e das costuras.

16. Numerar os ácaros - dar a identidade (se conhecida), relatar se mortos ou vivos. Relatar os fragmentos de ácaros como subcategoria.

17. Numerar outros artrópodes além de insetos e ácaros - relatar se mortos ou vivos, dar a identidade (por exemplo, aranha, pseudo-escorpiões). Relatar os fragmentos como subcategoria.

18. Numerar os materiais fecais de rato ou camundongo - dar a identidade ou o comprimento e diâmetro em mm. Dar o peso (mg), se proveniente de sementes de condimentos, temperos, semente de cacau, café ou grãos.

19. Numerar os fragmentos de excrementos de rato ou camundongo - dar a base para a identificação. Dar as dimensões ou variações do tamanho (mm). Dar o peso (mg), se proveniente de sementes de condimentos, temperos, sementes de cacau, café ou grãos.

20. Outros excrementos de mamíferos - reportar o tamanho (mm) e o peso (mg). Dar a identidade (exemplo: gato, gado), se for conhecida, e a base para a identificação.

21. Numerar os pêlos e fragmentos de pêlos de rato ou camundongo – reportar o comprimento (mm) de cada pêlo e de fragmento de pêlo ou, se for numeroso, agrupar em categorias de tamanho.

22. Numerar outros pêlos e fragmentos de pêlos - reportar o comprimento (mm), agrupando-os como em (13). Se não for identificado relatar se estriado ou não estriado.

23. Numerar as penas, fragmentos de penas e bárbulas - dar as dimensões variações do tamanho (mm) das penas e dos fragmentos.

24. Urina na embalagem ou no alimento - dar a identidade. Reportar o odor de urina, se for detectado. Dar o número e as dimensões ou tamanho (polegadas) da mancha e anotar se houve penetração no produto. Reportar os componentes detectados pelo teste da A.O.A.C.

25. Excremento de pássaros na embalagem ou sob o produto (afirme qual) - reportar a quantidade em peso (mg) ou o número e as dimensões do excremento.

26. Outros materiais estranhos - descrever e reportar cada tipo, quantificando apropriadamente.

7. MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE SUJIDADES EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

7.1. Polpas de frutas

Sujidades leves - método de flutuação

Ref. KRAMER, A.; TWIGG, B. **Quality Control for the Food Industry**, 3rd ed., Westport, AVI, 1970, v. 1, p. 155-172.

Reagentes:

- Óleo de rícino
- Heptano
- Água destilada aquecida e fria sem bolhas de ar
- Glicerina

Materiais:

- Papel de filtro (Whatman nº 4, 7cm diâmetro) com 8-10 linhas paralelas (feitas com lápis ou tinta à prova de água e solvente)
- Béquer de 400ml
- Placa de "petri"
- Frasco-armadilha (Wildman trap flask) de 2 litros

Equipamentos:

- Aparato para filtração a vácuo com funil de Büchner contendo uma tela fina (cerca de 30 mesh)
- Microscópio estereoscópio
- Balança semi-analítica

Tamanho da amostra

- 100g para extrato ou concentrado de tomate e polpas de frutas.
- 200g para outros produtos de tomate

Procedimento:

1. Pesar a amostra em béquer e transferir para o frasco-armadilha, usando várias porções de 100ml de água. Adicionar cerca de 35ml de óleo.

2. Agitar bem a amostra movendo o agitador para cima e para baixo diversas vezes, misturando o óleo com a água, porém sem formar bolhas de ar. Misturar durante 2 minutos.

3. Preencher o frasco vagarosamente quase até o gargalo com água aquecida (55-70°C) derramando-a pela parede do frasco, a fim de evitar a formação de bolhas de ar.

4. Deixar o frasco em repouso por alguns minutos, agitando ocasionalmente com cautela.

5. Retirar as bolhas de óleo da parede do frasco com o auxílio do bastão de agitação, porém evite distúrbio excessivo da camada de óleo.

6. Quando o óleo parar de subir e a fase aquosa estiver bem definida, adicionar água aquecida bem devagar trazendo o óleo até o gargalo do frasco.

7. Levantar o agitador vagarosamente até a camada inferior do óleo, fechando firmemente a abertura do frasco.

8. Transferir a fase oleosa para um béquer.

9. Lavar o gargalo do frasco com água aquecida e transferir águas de lavagem para o béquer.

10. Adicionar 15ml de óleo ao frasco e repetir os passos de 2 a 8.

11. Repetir a decantação do óleo no béquer quantas vezes forem necessárias para a total remoção do óleo.

12. Descartar o conteúdo do frasco, enxaguar e encher até cerca de 3/4 com água aquecida, livre de bolhas de ar.

13. Transferir o material coletado no béquer para o frasco.

14. Separar novamente a fase oleosa, transferindo-a para o béquer, usando para isso heptano nas lavagens finais.

15. Filtrar sob vácuo a amostra coletada no béquer, escorrendo-a cuidadosamente pelo bastão de agitação. Enxaguar.

16. Remover o papel de filtro para uma placa de petri umedecendo com solução de glicerina em água a 25%.

Procedimento de contagem:

1. Colocar a placa com o papel de filtro sob o microscópio. Use luz suficientemente forte para mostrar todos os detalhes no papel de filtro.

2. Verificar todas as linhas riscadas, movendo os fragmentos encontrados com o auxílio de um estilete e anotando o material encontrado.

3. Não contar material duvidoso.

Sujidades em Produtos de Tomate

Ref. A.O.A.C. nº 955.46, 17ª ed., 2000.

A. Ovos e larvas de moscas

a. Produtos triturados

1. Homogeneizar a amostra e transferir para separador de 2 litros.
2. Adicionar 20-30ml de heptano e agitar bem, aliviando a pressão quando necessário.

3. Encher o separador com água, de modo a produzir agitação máxima. Colocar o separador em descanso e deixar assentar.

4. A cada 15min, durante uma hora, retirar 15-20ml do separador e agitar gentilmente o separador com movimento rotativo para facilitar o assentamento dos ovos e de larvas de moscas. Se o líquido drenado contiver sementes, passe-o através de peneira nº 10, enxágüe as sementes e a peneira, recolha os líquidos e enxágüe o béquer com água.

5. Filtrar em tecido 10XX pré-tratado e tingido (ver item 4.b material e equipamentos), em funil de Büchner.

6. Examinar procurando ovos e larvas em aumento de 10X. Se ovos de moscas ou larvas forem encontradas, continuar a separação e drenagem como descrito anteriormente, por mais uma hora.

b. Tomates envasados

1. Reduzir à polpa os tomates inteiros contidos na lata, de modo a danificar ou quebrar o menor número possível de ovos e larvas. Isso pode ser conseguido passando-se o material através de peneira nº6 ou nº8 e retornando-se as sementes e os resíduos que permanecem na peneira para a polpa.

2. Colocar 500g da polpa de tomate previamente bem misturada, em separador de 6L.

3. Adicionar 125-150ml de heptano (ver Reagentes item h) e cerca de 1L de H_2O e agitar vigorosamente, liberando a pressão se houver necessidade.

4. Encher o separador com H_2O.

5. Coloque o separador em anel de descanso e deixar as camadas separarem.

6. A cada intervalo de 15min, durante uma hora, drenar 25-30ml do fundo do separador e gentilmente agitar o separador com movimento giratório para facilitar o assentamento de ovos e larvas de moscas. Cada porção pode ser examinada imediatamente, ou ser combinada com as porções subseqüentes.

7. Passar as porções drenadas através de peneira nº10 e enxaguar completamente as sementes e a peneira, recolhendo a porção líquida e a água de enxágüe em béquer.

8. Filtrar através de tecido de malha 10XX em funil de Büchner.

9. Examinar o tecido procurando por ovos e larvas em aumento de 10X. Se ovos ou larvas de moscas forem encontrados nesse exame, continue separando e drenando, como descrito, por mais uma hora.

B. Sujidades Leves

a. Produtos triturados

1. Colocar 200g de qualquer produto de tomate exceto extrato e concentrados (para os quais se usam 100g) em Frasco Armadilha (Figura 3), com 20ml de óleo de rícino e misturar bem.

2. Adicionar H_2O aquecida (cerca de 70ºC) suficiente para encher o frasco. Inicialmente, bolhas de ar tendem a trazer para a superfície tecidos de tomate, porém, após várias agitações estes começam a assentar, deixando bastante clara a camada de água próxima da fase oleosa.

3. Deixar em repouso durante 30min, com ocasionais agitações suaves, e então recolher o sobrenadante em béquer.

4. Lavar o gargalo do frasco com heptano, para remover o óleo de rícino aderido. Adicionar mais um pouco de água aquecida ao frasco, agitar, deixar em repouso por 10min e recolher novamente o sobrenadante. Ocasionalmente, pode ser necessário transferir o material coletado para outro frasco-armadilha e lavar novamente para eliminar tecidos de tomate.

5. Filtrar a porção obtida, lavar completamente o béquer, os lados do funil e o papel com heptano, para dissolver o óleo e acelerar a filtração.

6. Examinar o papel em aumento de 20-30X.

b. Tomates envasados

1. Drenar todo o conteúdo em peneira nº6, recolhendo o suco drenado. Para envases contendo menos do que 3lb(1.350g), use peneira nº 8. Use peneiras maiores para envases maiores, ou drene e enxágüe em porções determinadas.

2. Enxaguar a porção em peneira com água aquecida (cerca de 70ºC) usando pisseta e transfira o suco drenado, fragmentos e a água do enxágüe para 1 ou 2 frasco-armadilha de Wildman (máximo de 900ml/frasco).

3. Completar o volume nos frascos a 900ml com água (70ºC) e adicione 20-25ml de óleo de rícino.

4. Inclinar o frasco cerca de 45º e misturar por 1min com movimentos rotativos rápidos (200-250 giros/min). Evitar respingos pela superfície com a rolha.

5. Adicionar água quente para trazer a camada de óleo para o gargalo e deixe em repouso por 30min, agitando ocasionalmente.

6. Recolher a camada de óleo-água e os fragmentos que emergirem em béquer.

7. Enxaguar o óleo do gargalo com heptano. Adicionar ao frasco cerca de 10ml de água quente, agitar, deixar repousar por 10min e recolher para o mesmo béquer.

8. Adicionar 25-30ml heptano ao béquer e agitar para dissolver o óleo.

9. Filtrar em papel (use água quente ou heptano, se necessário) e examinar o papel microscopicamente.

7.2. Molhos

Sujidades leves - método da flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 992.12, 17ª ed., 2000.

Aplicável para determinar sujidades leves em molhos contendo molho de soja, espessantes e condimentos

Reagentes:

- Agente umectante - sulfato *tetrasódico* - (sodium tetradecyl sulfate) (ver item 5. Reagentes)
- Na_4EDTA - isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Óleo mineral (ver item 5. Reagentes)
- Isopropanol 40%

Materiais:

- Béquer de 400ml e de 1,5 litro
- Peneira nº230
- Banho de vapor
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Frasco-armadilha de 2 litros

Equipamentos:

- Microscópio estereoscópico
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Balança semi-analítica

Procedimento:

Pré-tratamento

1. Adicionar 100g da amostra, bem misturada, ao béquer de 1,5 litro.

2. Adicionar 980ml água e 20ml de sulfato tetrasódico.

3. Aquecer em banho de vapor por 30 minutos, agitando o conteúdo ocasionalmente, com bastão de vidro.

Isolamento

1. Lavar o bastão com água e peneirar o conteúdo do béquer, em porções, em peneira nº230 (ver item 6. Técnicas Especiais), usando jatos fortes de água aquecida, se necessário. Peneirar até que a espuma cesse, o excesso do óleo seja removido e não se observe mais redução do resíduo.

2. Levar o resíduo para a margem da peneira, aplicando jatos suaves de água aquecida.

3. Umedecer o resíduo com isopropanol a 40% e transferir para frasco-armadilha de 2 litros com isopropanol a 40%.

4. Lavar as paredes do frasco com isopropanol a 40%, até completar o volume a 400ml.

5. Ferver em placa de aquecimento durante 10 minutos, com agitação magnética.

6. Remover o frasco do aquecimento e adicionar imediatamente 50ml de solução de Na_4EDTA - isopropanol 40%, deixando a solução escorrer lentamente pelo bastão de agitação.

7. Agitar manualmente durante um minuto, com suaves movimentos rotatórios, cuidando para que o resíduo não adira às paredes do frasco.

8. Deixar em repouso por 5 minutos e completar o volume até 800ml, lavando as paredes do frasco com isopropanol a 40%.

9. Adicionar 50ml de óleo mineral, através do bastão de agitação.

10. Agitar magneticamente por 3 minutos.

11. Completar o volume do frasco com isopropanol a 40%, através do bastão de agitação.

12. Agitar o conteúdo do frasco a cada 5 minutos, durante 20 minutos.

13. Trazer o bastão de agitação até a altura média do frasco, lavar com isopropanol a 40% e fixá-lo.

14. Deixar em repouso durante 10 minutos e coletar a fase oleosa em béquer de 400ml. Lavar o gargalo, o bastão com isopropanol a 40%.

15. Adicionar 35ml de óleo mineral e agitar manualmente o conteúdo por 1 minuto, para dispersar o óleo.

16. Repetir o procedimento a partir do item 11.

17. Filtrar o conteúdo do béquer em papel riscado, lavar o béquer e filtrar a água de enxágüe com isopropanol a 40%.

18. Examinar o papel sob microscópio em aumento de 30X.

7.3. Produtos cárneos

Sujidades leves em lingüiça de porco (crua) e carne moída ou hambúrguer - método da digestão enzimática

Ref. A.O.A.C. nº 973.60, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Emulsificante-Igepal CO 730 ou o detergente Lauril Sulfato de Sódio a 5%
- Ácido clorídrico-HCL
- Pepsina 1:10.000 ou Pepsina NF
- Triton X-114 (ver item 5. Reagentes)
- Isopropânol 40%
- Óleo mineral
- Líquido de flotação (ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Béquer de 2 litros
- Peneira nº 230
- Banho-maria
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Frasco-armadilha de 2 litros(ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Moedor de carne

- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico
- Incubadora (opcional ao banho-maria)

Procedimento:

1. Moer e homogeneizar a amostra.

2. Pesar 225g em béquer de 2 litros.

3. Adicionar 980ml de água quente, 20ml de emulsificante e agitar por 5 minutos.

4. Adicionar 20ml de HCl e agitar por um minuto. Proceder à digestão por uma noite (a) ou realizar a digestão rápida (b).

Observação: Com carne moída usar somente digestão por uma noite com 5,0g de pepsina 1: 10.000 ou 10g de pepsina NF. Em flutuação (c), omitir a adição de 50ml de HCl e subseqüente fervura. Após a adição de óleo mineral deixar em repouso 20 minutos, em vez de 10 minutos HCl e agitar por um minuto.

a. Digestão por uma noite

1. Adicionar 0,5g de pepsina 1:10.000 ou 2,0g de pepsina NF e agitar por um minuto.

2. Digerir em banho-maria a 50°C ou em incubadora por 18h.

3. Adicionar 5ml de Triton X-114 e agitar por um minuto.

4. Manter as amostras à temperatura de digestão em banho-maria até o momento de peneirar.

5. Peneirar em porções em peneira nº 230 com jatos de água aquecida (cerca de 70°C).

6. Transferir para papel de filtro riscado, se pequenas quantidades de resíduo permanecerem na peneira, ou proceder à flutuação (c).

b. Digestão rápida

1. Adicionar 2g de pepsina 1:10.000 ou 10g de pepsina NF e agitar por um minuto.

2. Proceder a digestão por 2h em banho-maria a 62° C.

3. Adicionar 5ml de Triton X-114 e agitar por 1 minuto. Manter a amostra no banho até o momento de peneirar.

4. Peneirar em porções em peneira nº 230 com jatos de água quente e transferir para papel de filtro riscado, se permanecer pequena quantidade de resíduo na peneira.

5. Proceder à flutuação.

c. Flutuação

1. Umedecer o resíduo na peneira com isopropanol 40% e transferir para frasco-armadilha de 2 litros usando isopropanol a 40%.

2. Levar o volume para um litro com isopropanol a 40% e adicionar 50ml de HCl.

3. Ferver durante 10 minutos em placa de aquecimento, com agitação magnética suave.

4. Esfriar até temperatura ambiente em banho de água fria e adicionar 40ml de líquido flutuação.

5. Agitar magneticamente por 3 minutos.

6. Deixar a fase oleosa separar durante 1 minuto e vagarosamente completar o volume do frasco com isopropanol a 40%, escorrendo o líquido pelo bastão de agitação e mantendo a rolha do bastão logo acima do conteúdo do frasco.

7. Agitar gentilmente o material depositado no fundo do frasco com o bastão de agitação, por 5-10 minutos.

8. Deixar em repouso por 5 minutos e imediatamente coletar a fase oleosa.

9. Adicionar 25ml de óleo mineral, agitar manualmente por 30 segundos e deixar 10 minutos em repouso.

10. Repetir a coleta da fase oleosa.

11. Lavar o gargalo do frasco com isopropanol e transferir o enxágüe para o béquer com o material coletado.

12. Filtrar em papel de filtro riscado e examinar em microscópio estereoscópico.

7.4. Chocolate e cacau - método de flutuação

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 965.38 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 2%
- Heptano comercial contendo menos que 8% de tolueno
- Triton X-114 a 2% e a 5% em água
- Solução de hipoclorito de sódio: 5ml de NaOCl comercial + 95ml de água

Materiais:

- Béquer
- Peneira no 230
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Papel de filtro riscado (ver item Mat. e Equip)
- Funil de Büchner com tubo de borracha adaptável à haste do funil de Büchner

Equipamentos:

- Balança semi-analítica

- Placa de aquecimento com agitação
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Misturar 50g de cacau ou 100g de chocolate (cortado em fatias) em 500ml de solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 2% à temperatura de 55-70°C.

2. Despejar em peneira nº 230.

3. Lavar com água a 55-70°C, usando aerador.

4. Remover a gordura inclinando-se a peneira cerca de 20° e jogar água através do líquido, que é coletado ao lado.

5. Quando a gordura e material fino tiverem sido lavados e a espuma desaparecido, transfira o resíduo para o frasco-armadilha de 2 litros com água.

6. Adicionar cerca de 500ml de água e ferver durante 10 minutos. Esfriar à temperatura ambiente e adicionar água até o volume de 1 litro.

7. Despejar 50ml de heptano comercial contendo menos que 8% de tolueno, escorrendo pelo bastão de agitação.

8. Colocar o agitador magnético, levantar o bastão de agitação acima da superfície do líquido e prender com pinça. Agitar durante 5 minutos.

9. Após a agitação, encher o frasco com água. Deixar em repouso durante 30 minutos, agitando vagarosamente a camada inferior a cada 5 minutos nos primeiros 20 minutos.

10. Remover o heptano.

11. Adicionar mais 35ml de heptano, agitar manualmente durante 1 minuto e deixar em repouso durante 15 minutos e novamente retirar o heptano.

12. Filtrar ambas as porções retiradas usando funil de Büchner . Retirar o papel e examinar sob microscópio.

Observação: Se a quantidade de fragmentos no papel de filtro for grande, proceder à técnica do branqueamento, como descrita a seguir (itens 1 a 6), após examinar o papel quanto à presença de pêlos.

Técnica do Branqueamento

1. Retornar o papel de filtro para o funil de Büchner, em frasco de sucção. Lavar bem com água. (Se o papel contiver álcool e glicerol provenientes do exame de pêlos, lave-o primeiramente com álcool e então com água). Aplicar vácuo até o papel parecer seco.

2. Desligar o vácuo e fechar o tubo adaptado à haste do funil de Büchner.

3. Adicionar 5-7ml de solução de NaOCl ao funil (cerca de 3mm) e deixar descansar até que o branqueamento dos tecidos seja completado (menos de 30 minutos).

Observação: Manter o nível da solução por todo o período e não deixar que essa solução saia pela borda do filtro.

4. Retirar a rolha, tornar a ligar o vácuo e deixar o tempo necessário.

5. Lavar o papel de filtro com água.

6. Examinar os fragmentos de insetos e outros materiais sob microscópio.

Torta Prensada I

1. Aquecer a amostra (geralmente pedaços muito duros) 2-3 horas a 60-70°C e quebrar em pedaços de 1cm.

2. Misturar 50g em 500ml de solução quente de lauril sulfato de sódio a 2% em béquer de 800ml.

3. Agitar com agitador magnético à baixa velocidade, durante 2-3 horas, até dispersão completa ou deixar em maceração por uma noite.

4. Agitar vigorosamente e despejar a porção em peneira nº 230 e prosseguir o método a partir da etapa 3.

Torta Prensada II

1. Quebrar a amostra em pedaços de 1cm, usando martelo ou material equivalente.

2. Pesar 50g em béquer de 1 litro e adicionar 100ml de óleo de amendoim.

3. Colocar o agitador magnético e aquecer com agitação suave até 150°C.

4. Transferir para chapa fria de agitação e agitar durante 10 minutos à velocidade em que não ocorram respingos.

5. Adicionar 500ml de solução aquosa de Triton X-114 a 5% e agitar durante 5 minutos.

6. Despejar em peneira de nº 230 e prosseguir o método a partir da etapa 3.

Observação: Se gotas de óleo forem visíveis após a peneiragem, lavar o material na peneira com solução de Triton X-114 a 2% com pisseta. Repita se necessário. Continuar peneirando até que o Triton seja totalmente removido.

7.5. Café moído

Sujidades pesadas e leves – método de sedimentação e de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 988.16, 17ª ed., 2000.

a. Sujidades pesadas, areia e terra

Reagentes:

- Clorofórmio ($CHCl_3$)
- Tetracloreto de carbono (CCl_4)

Materiais:

- Béquer de 600ml
- Funil de Büchner
- Papel de filtro isento de cinzas

Equipamentos:

- Balança
- Capela
- Chapa de aquecimento
- Bomba ou trompa de vácuo

Procedimento:

1. Pesar 100g de amostra em um béquer de 600ml, adicionar 350ml de $CHCl_3$ e ferver durante 15 minutos agitando ocasionalmente (em capela).

2. Lavar as paredes do béquer com $CHCl_3$. Deixar a mistura esfriar e decantar durante 15 minutos, agitando ocasionalmente a camada superior.

3. Decantar cuidadosamente o $CHCl_3$ e o material flutuante em papel de filtro de15 cm em Büchner, sem perturbar o resíduo pesado do fundo do béquer.

4. Repetir a decantação com pequenas quantidades de $CHCl_3$ até que praticamente nenhum tecido vegetal permaneça no fundo do béquer. (A densidade aparente do $CHCl_3$ pode ser aumentada por adição de CCl_4, se for necessário flutuar com mais eficiência algum tecido vegetal. Não adicionar CCl_4 além de uma parte deste para uma parte de $CHCl_3$).

5. Transferir o resíduo do béquer para papel de filtro isento de cinzas e examinar as sujidades sob microscópio.

6. Se o resíduo for grande, incinerar o papel de filtro e determinar o peso de areia, terra, etc.

b. Sujidades leves (café moído)

Reagentes:

- Clorofórmio ($CHCl_3$)
- Isopropanol p.a
- Óleo mineral
- Solução de hipoclorito de sódio (5ml de NaOCl comercial + 95ml de água)

Materiais:

- Béqueres de 150ml, 250ml e 400ml
- Papel de filtro de 24cm
- Pinça
- Funil de Büchner
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Barra magnética
- Papel de filtro riscado (ver item Mat. e Equip)
- Tubo de borracha adaptável à haste do funil de Büchner

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Banho de vapor (banho-maria)
- Chapa de aquecimento com agitação
- Estufa comum ou a vácuo

Procedimento:

1. Fazer copos de papel de filtro com o papel de 24cm e os béqueres de 150 e 250ml. Pesar 25g de amostra neste copo.

2. Adicionar 100ml de $CHCl_3$, colocando a maioria do líquido por fora do copo de papel, no béquer de 250ml. Pressionar o copo para baixo no $CHCl_3$ e colocar em banho de vapor.

3. Ferver durante 5 minutos evitando excessiva perda de $CHCl_3$. Levantar o papel, prender com uma pinça e deixar gotejar.

4. Descartar o solvente e repetir a extração com 2 porções de 100ml de $CHCl_3$.

5. Colocar o papel em um funil de Hirsch e aspirar até uma secagem aparente. Completar secagem em:

- capela por uma noite, ou;
- estufa por uma hora a 80°C, ou;
- estufa a vácuo a 80°C por 30 minutos com vácuo maior do que 5 polegadas (13cm).

6. Lavar a amostra com um total de 400ml de água, em um frasco-armadilha de 2 litros.

7. Ferver cuidadosamente durante 15 minutos, remover da chapa de aquecimento e deixar ao lado. Diluir para 600ml com água, colocar agitação magnética, adicionar 400ml de isopropanol não diluído e aquecer até ponto de ebulição fervendo durante 2-3 minutos.

8. Adicionar 40ml de óleo mineral e aquecer até fervura vigorosa. Transferir para resfriamento com agitação magnética e continuar com a agitação por mais 5 minutos.

9. Vagarosamente encher o frasco com isopropanol a 40% deixando o líquido fluir pelo bastão de agitação enquanto a rolha é mantida acima do conteúdo.

10. Agitar com movimentos circulares para ressuspender os sólidos e remover o sobrenadante após 2 minutos.

11. Filtrar em papel de filtro riscado.

12. Adicionar 30ml de óleo mineral, agitar manualmente durante 30 segundos.

13. Após 5 minutos de repouso coletar a fase oleosa e filtrar em outro papel de filtro riscado.

14. Examinar ambos os papéis microscopicamente.

Observação: Se houver muitos resíduos, examinar quanto à presença de pêlos de roedores e, a seguir, proceder ao branqueamento para realizar o exame de fragmentos e outros materiais estranhos, como descrito no método 7.4, em Técnica do branqueamento.

c. Sujidades leves (outros substitutos de café exceto chicória)

Reagente:

- Heptano comercial contendo menos que 8% de tolueno.

Materiais:

- Papel de filtro
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Estufa comum
- Placa de aquecimento
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Secar o material decantado em papel de filtro durante 1 noite ou durante 1 hora em estufa a 80°C.

2. Transferir o material seco para frasco-armadilha de 2 litros e adicionar 400ml de água aquecida.

3. Ferver durante 15 minutos e, se necessário, adicionar intermitentemente pequenas quantidades de água fria para evitar formação de espuma.

4. Resfriar a menos de 20°C.

5. Extrair 2 vezes, usando 35 e 25ml de heptano, respectivamente.

6. Na primeira extração, após misturar o heptano, deixar em repouso durante 5 minutos antes de encher o frasco.

7. Filtrar e examinar sob microscópio.

d. Sujidades leves (chicória moída)

Reagentes:

- Lauril sulfato de sódio
- Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$)
- Isopropanol p.a
- Isopropanol a 40% em água
- Óleo mineral

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Peneira nº 230
- Frasco-armadilha de 2 litros

- Barra magnética
- Papel de filtro riscado (ver item. Mat. e Equip)

Equipamentos:

- Banho de vapor (banho-maria)
- Placa de aquecimento
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Adicionar 50g de amostra em um béquer de 1 litro contendo 5g de lauril sulfato de sódio, 10g de $NaHCO_3$ e 500ml de água.

2. Agitar e colocar em banho de vapor.

3. Aquecer 20 minutos, agitando 2 vezes a intervalos de 5 minutos e lavar os lados com um pouco de água após cada agitação.

4. Transferir para peneira nº 230 e lavar até que a espuma termine.

5. Enxaguar o material retido na peneira com cerca de 100ml de isopropanol a 40%.

6. Transferir para um frasco-armadilha de 2 litros com isopropanol a 40%.

7. Diluir a 800-900ml com isopropanol a 40% e ferver durante 4 minutos com agitação moderada.

8. Adicionar 50ml de óleo mineral e aquecer até a ebulição iniciar novamente.

9. Resfriar com agitação magnética e agitar por 5 minutos.

10. Encher o frasco-armadilha com isopropanol a 40%, fazendo-o escorrer pela haste enquanto a rolha fica acima do conteúdo e agitar imediatamente para suspender novamente os sedimentos.

11. Agitar mais 2 vezes a intervalos de 3 minutos.

12. Suspender a rolha, lavar com alguns ml de isopropanol a 40% e prender a rolha cerca de 75mm abaixo da interface. Deixar em repouso durante 4 minutos.

13. Extrair, lavar o gargalo do frasco e filtrar em papel riscado.

14. Adicionar 25-30ml de óleo mineral, agitar manualmente durante 45 segundos à velocidade moderada e adicionar 15-20ml de água.

15. Deixar em repouso durante 20 minutos, extrair, enxaguar o gargalo do frasco com isopropanol não diluído e filtrar em outro papel de filtro riscado.

16. Examinar os papéis sob aumento de 20-30X.

7.6. Produtos de laticínios

A. Sujidades - métodos de filtração

Ref. A.O.A.C. n º 960.49, 17ª ed., 2000

Usar os seguintes métodos independentemente ou em várias combinações. Pesar 225g exceto

em 960.49 F (caseína), em recipiente adequado e usar papel de filtro S&S nº 8 riscado. Cortar os queijos duros em pedaços pequenos.

a. Leite evaporado, leite condensado, creme doce, leite em pó

Reagentes:

- Solução aquosa de oxalato de sódio ($Na_2C_2O_4$) a 3%
- Solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 2%

Materiais:

- Béquer de 2-2,5 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Bomba vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Reconstituir 225g dos produtos desidratados ou concentrados em béquer.

2. Diluir os produtos reconstituídos com igual volume de água aquecida, solução aquecida de ($Na_2C_2O_4$) a 3% ou solução de Na_2CO_3 a 2%.

3. Filtrar com sucção.

4. Durante a filtração, lavar o filtro continuamente com água próxima da ebulição para evitar acúmulo de uma camada de partículas que obstruem o filtro.

5. Examinar o papel sob microscópio.

b. Manteiga

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Papel de filtro riscado (ver item 4 Mat. e Equip)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Banho-maria ou estufa a 80°C
- Bomba ou trompa de vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 225g da amostra em béquer de 1 litro.

2. Colocar o béquer em banho-maria ou estufa com temperatura próxima de 80°C.

3. Quando a gordura separar, filtrar diretamente em papel de filtro riscado, com sucção, retendo a maior parte do coalho e da água no béquer.

4. Após filtrar a gordura, filtrar o material restante.

5. Para facilitar a filtração do coalho, lavar o filtro com água próxima ao ponto de ebulição durante o processo.

6. Examinar o papel sob microscópio.

Para manteiga que não permite filtração por esse processo, usar o método 960.49C .

c. Queijo macio ou cremoso, creme ácido, leite em pó desnatado e integral

Reagentes:

- Solução de ácido fosfórico: 1+40 (H_3PO_4: 1+40)
- Hidróxido de sódio 1-5% em água
- Álcool comercial 95%

Materiais:

- Béqueres de 1,5 e 2 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4 Mat. e Equip)

Equipamentos:

- Barra magnética de agitação a quente(ver item 4. Mat. e Equip.)
- Agitador de manteiga (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Bomba ou trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Cortar 225g de queijo em cubos de 6mm (ou pesar 225g para as outras amostras).

2. Adicionar 800-1000ml de H_3PO_4 (1+40) fervente em béquer de 1,5-2 litros.

3. Agitar continuamente em agitador de manteiga, a baixa velocidade, ou em placa de agitação a quente, com bastão de agitação de cerca de 75x12mm, até dispersar a amostra (em geral mais de 20 minutos).

4. Filtrar sem deixar a mistura acumular no papel de filtro, lavando continuamente o papel com água próxima da ebulição, para prevenir entupimento.

5. Se a filtração estiver difícil, adicionar água, álcali diluído (1-5%), H_3PO_4 (1 + 40) ou álcool aquecido, até limpar o filtro.

6. Recomeçar a adição da suspensão da amostra e de água.

7. Examinar o papel sob microscópio.

d. Queijos duros, nata dura, queijos de leite semidesnatado (Romano, Ricota, Feta, Pecorino, Sardo, Queijo de leite de cabra, Sbrinz, Goya, Queijo de soro de leite, etc.)

Observação: Este método não se aplica a queijo contendo ervas, especiarias ou fungos na sua composição.

Reagentes:

- Solução aquosa de etileno diamino tetracetato tetrassódico (Na_4EDTA a 20%)
- Hidróxido de amônia (NH_4OH)
- Ácido clorídrico: 1 + 2 (HCl: 1 + 2)
- Álcool comercial 95%
- Solução de pancreatina a 10% em água

Materiais:

- Almofariz
- Béquer 4 litros
- Parafilme M
- Pergaminho vegetal PATAPAR
- Peneira nº 60 (malha da peneira 5cm q)
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento
- Agitador de manteiga (ver item 4. Mat. Equip.)
- Potenciômetro
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Preparar o queijo para amostragem cortando e descartando camadas finas para remover toda a parte velha, capa de parafina e mofo da amostra.

2. Cortar e triturar 225g do queijo preparado em béquer de 4 litros.

3. Adicionar cerca de 700ml de água filtrada a cerca de 55°C.

4. Colocar o béquer sobre a chapa quente e agitar com o agitador de manteiga durante 15 minutos, mantendo a mistura a 55°C.

5. Adicionar 100ml de solução aquosa de Na_4EDTA a 20%.

6. Agitar e ajustar a mistura para pH 8 com NH_4OH ou HCl diluído (1 + 2).

7. Lavar os lados do béquer para retirar as partículas de queijo aderidas, com água a cerca de 60°C.

8. Manter o pH 8 por adição de NH_4OH e continuar a adição de água a 60°C para diluir a mistura para cerca de 3 litros.

9. Se formar espuma, tampar com papel de pergaminho vegetal úmido, anteriormente denominado PATAPAR, de 27 lb., ou parafilme M, deixando uma abertura no topo do béquer para acomodar as lâminas do agitador.

10. Continuar a agitação até o queijo tornar-se bem disperso.

11. Resfriar a dispersão até 40°C e ajustar para pH 8 com NH_4OH ou HCl (1 + 2).

12. Adicionar 300ml de solução de pancreatina 10% (para ricota usar 600ml)(ver item 5(l)).

13. Deixar a mistura dissolver à temperatura inferior a 40°C, com agitação contínua durante cerca de 1,5h, mantendo o pH 8 por adição de NH_4OH.

14. Após a diluição, colocar o béquer em chapa de aquecimento e aquecer a 65-68°C com agitação mecânica.

15. Ajustar o pH a 6,0 ± 0,2, com HCl (1 + 2). Ajustar cuidadosamente a lâmina do agitador próxima ao fundo do béquer, para que nenhuma partícula de queijo fique sedimentada.

16. Continuar a agitação durante 15 minutos ou até o queijo parecer completamente solubilizado.

17. Lavar o interior do béquer e as lâminas do agitador com água a aproximadamente 65°C.

18. Filtrar em papel de filtro riscado usando água a 65°C e a seguir enxaguar o béquer com álcool.

19. Se a filtração se tornar lenta (por exemplo: para creme de queijo), deixar o filtro drenar, lavar com álcool e usar um papel adicional.

20. A mistura filtrará mais facilmente se for colocada malha da peneira n°60 (cerca de 5cm de θ) embaixo do papel de filtro, deixando que pequena quantidade da mistura drene por sucção antes de prosseguir a filtração.

21. Examinar o papel de filtro sob microscópio.

e. Queijos contendo fungos e condimentos

Reagentes:

- Solução de ácido fosfórico: 1 + 49 (H_3PO_4: 1 + 49)
- Heptano comercial contendo menos que 8% de tolueno
- Álcool a 60% em água

Materiais:

- Peneira n° 140

- Béquer de 2 litros
- Frasco-armadilha de 1 litro
- Funil de Büchner
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Bomba ou trompa de vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Dispersar o queijo como no método nº 960.49 C ou 960.49D (item 1 ao 10).

2. Passar em peneira nº140, lavando vigorosamente com jatos forçados de água aquecida (70°C).

3. Transferir o material retido na peneira para béquer de 2 litros.

4. Adicionar 200ml de H_3PO_4 (1 + 49) e aquecer até que o resíduo granuloso (compacto) se dissolva.

5. Passar novamente em peneira nº140 e lavar bem com fluxo forte de água quente.

6. Transferir o material retido na peneira com cerca de 200ml de álcool a 60%, para frasco-armadilha de 1 litro e esfriar.

7. Extrair, usando heptano e água.

8. Filtrar em funil de Büchner sob vácuo.

9. Examinar sob microscópio.

f. Caseína

Reagente:

- Solução de etileno diamino tetracetato tetrassódico - (Na_4 EDTA a 20%)

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Peneira nº230
- Funil de Büchner
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 50g de amostra em béquer de 1 litro.
2. Misturar vagarosamente 170ml de solução de Na_4EDTA a 20% até que a amostra esteja bem homogeneizada.
3. Com agitação constante, completar o volume para 1 litro com água aquecida (55-70°C).
4. Colocar em peneira de nº230 e lavar com forte jato de água aquecida até remover a espuma.
5. Lavar o que restou na peneira recolhendo em béquer.
6. Filtrar em funil de Büchner com papel de filtro riscado.
7. Examinar o papel sob microscópio.

B. Sujidades leves em queijos - método de peneiragem alternativo

Ref. A.O.A.C. nº 994.05, 17ª ed., 2000.

Aplicável a queijos duros, semiduros, semimacios, macios e processados, contendo ao menos um dos seguintes componentes: soro, gomas de plantas ou emulsificantes (ex.: fosfato de sódio, citrato de sódio).

Não aplicável a queijos com película aveludada (ex. brie), queijos defumados e queijos contendo tecidos de plantas, ervas e condimentos.

Reagentes:

- Emulsificantes: Igepal CO-730 e Igepal DM –710, ou equivalente
- Agente umectante: Sulfato de sódio tetradecil (Tergitol Aniônico 4, Sigma Chemical Co, ou equivalente)
- Solução detergente: lauril sulfato de sódio

Materiais:

- Béquer de 400ml e 2 litros
- Peneira nº 230
- Funil de Büchner
- Papel de filtro de rápida filtração (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Vidro de relógio

Equipamentos:

- Funil de Büchner
- Microscópio estereoscópico
- Placa de agitação e aquecimento (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Bomba ou trompa a vácuo

Procedimento:

1. Remover toda a cera, etiquetas, fungos, etc. da superfície do queijo.

2. Colocar 225g da amostra em béquer de 2L, procedendo como segue:

   - Cortar o queijo em cubos de 13mm.
   - Cortar em pedaços de cerca de 5mm produtos que endureceram, produtos feitos de soro e produtos processados contendo um ou mais dos seguintes ingredientes: soro, gomas de plantas, ou emulsificantes (ex: fosfato de sódio, citrato de sódio).
   - Ralar produto usualmente ralado para uso (ex: Parmesão, Romano)

3. Usar colher de sopa para amostra ralada ou pulverizada.

4. Adicionar 1L de água aquecida (> 50°C) e 60 ml HCl (37%) ao béquer com a amostra.

5. Adicionar 5ml de Igepal CO-730, e 10ml Igepal DM-710.

6. Cobrir o béquer com vidro de relógio e levar a mistura à ebulição, com uso de agitação magnética.

7. Remover o vidro de relógio e ferver a mistura durante 30min com agitação magnética, de modo que o topo do bastão de agitação seja visível ao fundo do redemoinho.

8. Peneirar em água em porções adequadas (ver técnicas especiais - item a) em peneira nº 230 de malha plana (ver item 4. Mat e Equip.)), com jato forte de água aquecida, até que a espuma seja mínima ou ausente.

9. Adicionar cerca de 10ml de Tergitol Aniônico 4 e gentilmente peneirar em água até que a espuma desapareça.

10. Colocar a peneira (submersa o suficiente para cobrir o resíduo) em um recipiente com lauril sulfato de sódio, mantido a 65-75°C (usar placa de aquecimento para aquecer a solução).

11. Gentilmente agitar o resíduo para dispersar e então deixar o recipiente nesta solução por 10min.

12. Lavar os lados da peneira cuidadosamente com água aquecida e então peneirar gentilmente o resíduo em água (ver técnicas especiais - item a.) com água aquecida.

13. Repetir as lavagens com tergitol/ lauril sulfato de sódio, até que o resíduo seja reduzido a quantidades filtráveis. Não exceder a 4 lavagens.

14. Transferir o resíduo com água para béquer de 400ml.

15. Filtrar o conteúdo do béquer com sucção através de papel de filtro com rápida filtração (ver item 4. Mat e Equip.), em funil de Büchner.

16. Lavar o béquer com água e filtrar as águas de lavagens.

17. Examinar sob microscópio estereoscópico em aumento de cerca 30X.

7.7. Nozes (noz, castanha, avelã, caju, etc.) e produtos derivados (exceto pecã)

Ref. A.O.A.C. nº 968.33, 17ª ed., 2000.

A. Sujidades pesadas por sedimentação

Reagentes:

- Éter de petróleo

- Clorofórmio p.a ($CHCl_3$)
- Tetracloreto de Carbono (CCl_4)

Materiais:

- Papel de filtro sem cinzas
- Béquer de 600ml
- Cadinho

Equipamentos:

- Balança analítica
- Balança semi-analítica
- Mufla

Procedimento:

1. Pesar 100g da amostra em béquer de 600ml.

2. Adicionar cerca de 350ml de éter de petróleo e ferver por 30min, adicionando éter de petróleo para manter o volume original.

3. Decantar o solvente, tomando o cuidado para não perder nenhum tecido grande de noz e descartar.

4. Adicionar cerca de 300ml $CHCl_3$ ao béquer e deixar descansar por 10-15min.

5. Retirar as nozes que flutuam e cerca de 2/3 do $CHCl_3$ e descartar.

6. Repetir a separação com volumes menores da mistura $CHCl_3$ e CCl_4 (1 + 1), até que o resíduo no béquer seja relativamente livre de partículas de nozes.

7. Transferir o resíduo do béquer para papel de filtro sem cinzas e examinar para sujidades pesadas.

8. Se quantidade apreciável de areia e solo estiver presente, queimar o papel em cadinho tarado, muflar à cerca de 500° C e pesar.

B. Sujidades leves por flutuação

Reagentes:

- Clorofôrmio p.a ($CHCl_3$)
- Ácido clorídrico fumegante p.a (HCl)
- Óleo mineral
- Solução alcoólica de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) a 60%
- Isopropanol p.a

Materiais:

- Béquer de 1 litro

- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Tecido de seda
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Espátula
- Barra magnética
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação
- Bomba a vácuo
- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

Preparo da solução álcool 60% - $CaCl_2$

Para cada 3 litros de álcool a 60% (quantidade para uma análise), adicionar 200g de $CaCl_2$ anidro. Agitar até dissolver o sal. A turbidez causada por traços de $CaCl_2$ desaparecerá durante a análise quando a solução estiver acidificada.

1. Pesar 100g da parte comestível do fruto em béquer de 1,5 litro. Adicionar 600ml de $CHCl_3$ e ferver durante 15 minutos (em capela).

2. Preparar o papel de filtro com diâmetro maior ou igual a 24cm para ser usado em funil de Büchner de 100mm de q. Para tal, umedecer com água e formatar o papel em volta da base de béquer de 1 litro.

3. Colocar um disco de tecido de 7cm de diâmetro (o tamanho da abertura não é muito importante) em funil de Büchner, colocar o filtro de papel, aplicar vácuo e pressionar o papel úmido até obter uma boa vedação.

4. Lavar o papel de filtro com isopropanol.

5. Transferir quantitativamente as nozes e o $CHCl_3$ para o papel previamente preparado. Manter a sucção durante 5 minutos após cessado o gotejamento.

6. Desligar o vácuo, adicionar isopropanol até cobrir os frutos, deixar em repouso por alguns minutos e religar o vácuo até o gotejamento cessar.

7. Repetir o processo de lavagem com isopropanol e deixar o vácuo atuar durante 5 minutos após o fim do gotejamento.

8. Transferir quantitativamente o material do papel de filtro para um frasco-armadilha de 2 litros, raspando todas as partículas do papel de filtro com espátula e então lavar bem o papel com a solução álcool 60% $CaCl_2$.

9. Completar o volume para 1 litro com a solução anterior e adicionar 50ml de HCl.

10. Agitar moderadamente com barra magnética sob forte fervura.

11. Transferir imediatamente o frasco para chapa fria com agitação e adicionar 40ml de óleo mineral, fazendo-o escorrer pela haste.

12. Agitar magneticamente durante 2 minutos.

13. Encher com solução álcool 60%-$CaCl_2$ e agitar cuidadosamente durante 5-10 segundos, com o bastão de agitação.

14. Deixar em repouso durante 2 minutos e proceder à extração.

15. Adicionar 25ml de óleo mineral, agitar manualmente com cuidado durante 30 segundos e deixar em repouso durante 10 minutos.

16. Repetir a extração.

17. Lavar o gargalo do frasco cuidadosamente com isopropanol e transferir as águas de lavagem para o béquer com o material extraído.

18. Filtrar em papel riscado e examinar sob microscópio.

7.8. Pecã

Ref. A.O.A.C. nº 968.34,.17ª ed., 2000.

A. Sujidades leves

Reagentes:

- Clorofórmio p.a. ($CHCl_3$)
- Ácido clorídrico (HCl) fumegante p.a
- Isopropanol p.a
- Óleo mineral
- Solução álcool 60%-cloreto de cálcio ($CaCl_2$)

Materiais:

- Béquer 1-1,5 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Tecido de seda
- Frasco-armadilha 2 litros
- Barra magnética
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Bomba a vácuo

- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Usando papel de filtro de 32cm de diâmetro, dar forma ao copo de papel, com o auxílio de béquer de 1-1,5 litro.

2. Pesar 100g da amostra no copo preparado e colocar em béquer de 1,5 litro.

3. Adicionar 400ml de $CHCl_3$ e ferver durante 5 minutos, em capela.

4. Após resfriar por alguns minutos, suspender o papel e drenar o líquido.

5. Ferver novamente por mais 5min e drenar com duas porções adicionais de 400ml de $CHCl_3$.

6. Proceder como no item 3 do Método 7.5-B

B. Pecã (em pedaços)

Gorgulho (larva)

Reagente:

- Isopropanol p.a

Materiais:

- Béquer de 1,5 litro
- Barra magnética
- Bastão de vidro
- Peneira nº12

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa com agitação magnética

Procedimento:

1. Pesar 115g de amostra em béquer de 1,5 litro e agitar com barra magnética.

2. Adicionar 300ml de isopropanol não diluído e agitar magneticamente durante 5-10 segundos.

3. Adicionar água (200ml se os pedaços forem todos pequenos e 300ml para maiores ou heterogêneos) e agitar durante 5-10 segundos com agitador magnético.

4. Após poucos segundos, agitar cuidadosamente as amêndoas sedimentadas com um bastão de vidro para liberar algum gorgulho preso.

5. Remover todo o material flutuante e examinar quanto à presença de larvas.

6. Recuperar a solução de flutuação passando-a através de peneira nº12 e usá-la somente para mais uma análise.

7.9. Coco picado

Sujidades leves - método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 978.19, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Heptano comercial contendo menos que 8% de tolueno
- Óleo mineral
- Isopropanol a 40% em água
- Solução detergente: Dissolver separadamente 20g de lauril sulfato de sódio e 10g de tetraborato de sódio ($Na_2B_40_7.10H_2O$) em água, combinar e diluir para 1 litro.

Materiais:

- Béquer 1,5-2 litros
- Peneira nº 230
- Funil de haste larga
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Colher comum
- Papel de filtro riscado

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Banho de vapor
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Chapa de agitação a frio
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 100g de amostra em béquer de 1,5 litro ou 2 litros e adicionar 1 litro de solução detergente.

2. Aquecer durante10 minutos em banho de vapor, agitando imediatamente e após cerca de 5 minutos.

3. Despejar a amostra em peneira nº 230 lavando o béquer com água aquecida para retirar todo o material e adicione o enxágüe à peneira.

4. Lavar a peneira com jato forte de água quente até desaparecer toda a espuma e, então, lavar bem com isopropanol a 40% e deixar drenar.

5. Colocar um funil de haste larga em um frasco-armadilha de 2 litros e transferir a amostra para o frasco com o auxílio de uma colher.

6. Lavar o material que resta na peneira com água aerada e transferir quantitativamente para frasco-armadilha com isopropanol a 40%.

7. Diluir para 1 litro com isopropanol a 40% e agitar com magneto em chapa quente.

8. Adicionar 40ml (8:15) de óleo mineral e agitar vigorosamente durante 1 minuto.

9. Com velocidade de agitação baixa, adicionar 50ml de HCl e aquecer até fervura vigorosa Cuidado: a solução pode espumar violentamente quando atingir o ponto de ebulição, resultando em grande aquecimento.

10. Colocar o frasco na chapa de agitação a frio agitando durante 3 minutos. Deixar em repouso durante 2 minutos e, então, vagarosamente encher o frasco com isopropanol a 40%, deixando-o escorrer pelo bastão, para trazer a interface do óleo 1cm acima do nível que atinge a rolha, quando posicionada para extração.

11. Trazer a interfase de óleo para 1cm acima do nível que atinge a rolha quando posicionada para a extração.

12. Levar a rolha para o meio do frasco, prender a haste e deixar em repouso durante 2 minutos.

13. Proceder a extração transferindo o extrato para o béquer, lavando em seguida o gargalo do frasco com isopropanol a 40%.

14. Adicionar 25ml de óleo mineral e heptano (85 + 15) e agitar manualmente vigorosamente por um minuto.

15. Ajustar o nível do óleo como no item 10 e deixar em repouso durante 10 minutos.

16. Extrair para um outro béquer lavando bem o gargalo do frasco com isopropanol.

17. Filtrar as 2 extrações em papéis de filtro separados e identificados, lavando os béqueres com isopropanol.

18. Examinar sob microscópio em aumento de 30X.

7.10. Pasta de amendoim

Sujidades leves - método de flutuação e sedimentação

Ref. A.O.A.C. nº 968.35, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Ácido clorídrico fumegante p.a (HCl)
- Óleo mineral
- Álcool a 55% ou isopropanol a 40% em água
- Solução detergente: Dissolver separadamente 20g de lauril sulfato de sódio e 10g de tetraborato de sódio ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) em água, combinar e diluir para 1 litro.

Materiais:

- Béquer de 1,5 litro
- Peneira nº 230
- Aerador de água
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Banho de vapor
- Placa de aquecimento com agitação
- Chapa de agitação a frio
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 100g de amostra em béquer de 1,5 litro e aquecer em banho de vapor até a pasta amolecer.

2. Adicionar 1 litro de solução detergente quente filtrada, agitar bem e aquecer 10 minutos em banho de vapor.

3. Agitar bem, colocar em porções na peneira nº 230 e lavar com forte corrente de água aerada (55-70ºC).

4. Quando a espuma terminar, transferir o material da peneira para um frasco-armadilha de 2 litros com álcool a 55% ou isopropanol a 40% e completar o volume para 1 litro.

5. Adicionar 50ml de HCl e ferver durante 10 minutos, usando chapa de aquecimento com agitação magnética em baixa velocidade.

6. Colocar o frasco na chapa de agitação a frio e imediatamente adicionar 40ml de óleo mineral fazendo-o escorrer pela haste do bastão de agitação e agitar magneticamente durante 2 minutos.

7. Encher com álcool desaerado a 55% ou isopropanol a 40% e agitar com cuidado durante 5-10 segundos, com a rolha da haste.

8. Deixar em repouso durante 5 minutos e extrair a camada oleosa.

9. Adicionar 25ml de óleo mineral, agitar devagar manualmente durante 30 segundos e deixar em repouso durante 5 minutos.

10. Repetir a extração e lavar o gargalo do frasco cuidadosamente com isopropanol.

11. Filtrar em papel de filtro riscado e examinar sob microscópio.

7.11. Grãos e sementes

Sujidades leves externas - método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 950.86, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Álcool 40% em água
- Heptano comercial contendo menos que 8% de tolueno

Materiais:

- Frasco-armadilha de 2 litros
- Funil de Büchner

- Proveta
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Transferir 225g de amostra para frasco-armadilha de 2 litros.
2. Adicionar 600ml de álcool a 40% e ferver lentamente 5 minutos com agitação freqüente.
3. Resfriar a amostra à temperatura ambiente e proceder à extração usando heptano e álcool a 40%.
4. Filtrar e examinar sob microscópio.

a. Trigo - Infestação interna

Sujidades leves - método da quebra e flutuação
Ref. A.O.A.C. nº 982.31, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Solução de Tween-80 isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Solução de etileno diamino tetracetato tetrassódico (Na_4EDTA)-isopropanol a 40%(ver item 5. Reagentes)
- Isopropanol a 40% em água (se usar óleo de rícino mudar a diluição para isopropanol 30% em água)
- ÓLeo mineral (óleo de rícino)
- Ácido clorídrico fumegante p.a (HCl)

Materiais:

- Homogeneizador "Jones" ou similar (Figura 7)
- Peneira nº 12
- Béquer de 2 litros
- Barra magnética
- Peneira nº 100
- Aerador de água
- Papel indicador
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Proveta
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

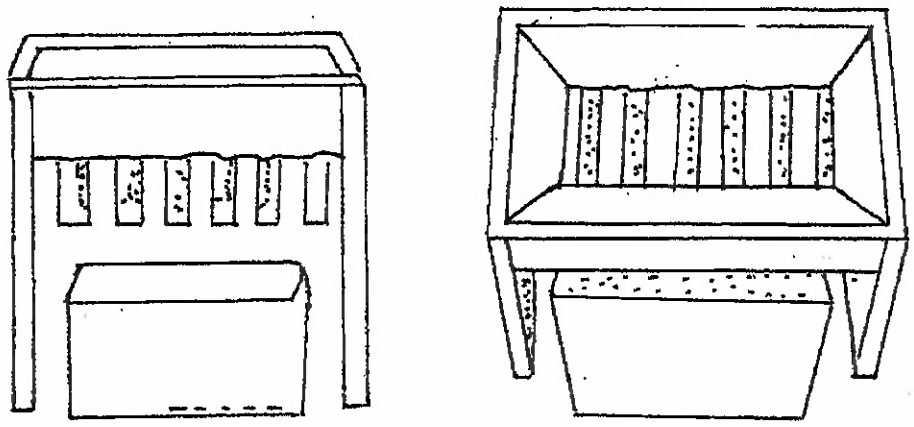


FIGURA 7. Homogeneizador "Jones"

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Misturar os grãos passando-os 6 vezes através do homogeneizador de Jones, recombinando-os separados antes de cada passada.

2. Separar uma porção um pouco maior do que 50g e pesar 50g.

3. Transferir a amostra pesada em pequenas porções de cada vez para peneira nº12 (diâmetro de 5" a 8") e com a ajuda de um pincel de cerdas duras force para que o máximo de insetos presentes passe através da peneira.

4. Triturar a amostra em moinhos de facas, calibrados para 0,061 polegadas. Secar os grãos úmidos e parcialmente úmidos em estufa de circulação forçada, durante 1 hora, a 70-80°C ou durante duas horas em estufa sem circulação de ar.

5. Transferir os grãos quebrados e secos, incluindo o resíduo do moinho para béquer de 2 litros, contendo barra de agitação magnética e mistura de 600ml de água e 50ml de HCl.

6. Ferver durante 15 minutos com agitação lenta.

7. Transferir a amostra para peneira nº 100 com o auxílio de corrente branda de água aquecida (cerca de 70°C).

8. Lavar a amostra retida na peneira com jatos brandos de água aquecida (55-70°C), até que não apresente mais acidez (teste com fita de papel indicador).

9. Adicionar barra de agitação magnética no frasco-armadilha de 2 litros e transferir o resíduo da peneira para o frasco com isopropanol 40%.

10. Adicionar isopropanol 40% até completar o volume de 800ml.

11. Prender o bastão de agitação de modo que a rolha fique acima do nível do líquido (manter o frasco nesta posição por uma noite).

12. Ferver com agitação magnética suave durante 7 minutos e 10s. Retirar o frasco da chapa de aquecimento e lavar as paredes do frasco com pequena quantidade de isopropanol 40%.

13. Adicionar imediatamente 100ml de mistura (1 + 1) de solução de Tween-80-isopropanol 40% e solução de Na_4EDTA-isopropanol 40%, deixando fluir lentamente pelo bastão de agitação.

14. Agitar manualmente durante 1 minuto e deixar em repouso durante 3 minutos.

15. Adicionar 50ml de óleo mineral, deixando-o fluir pelo bastão de agitação, e agitar 5 minutos, com agitação magnética sem aquecimento.

16. Deixar em repouso durante 3 minutos.

17. Encher o frasco com isopropanol 40%, adicionando-o lentamente pelo bastão de agitação, para evitar mistura ou agitação do conteúdo do frasco.

18. Deixar em repouso durante 20 minutos.

19. Coletar a camada oleosa em béquer de 250ml, lavando as paredes do gargalo do frasco com isopropanol 40%.

20. Adicionar 35ml de óleo mineral no frasco-armadilha e agitar manualmente durante 1 minuto.

21. Prender o bastão de agitação de maneira que a rolha fique à meia altura do frasco. Deixar em repouso durante 5 minutos.

22. Girar o bastão para soltar o material assentado na rolha e completar o volume até o gargalo com isopropanol 40%.

23. Deixar em repouso durante 15 minutos.

24. Coletar a camada oleosa, lavar as paredes do gargalo do frasco com isopropanol 40% e juntar ao béquer juntamente com as outras porções coletadas.

25. Filtrar as porções coletadas em papel de filtro riscado, lavando bem o béquer com isopropanol.

26. Examinar o papel de filtro em aumento de 15X, contando somente insetos inteiros, cabeças de insetos, pele de castas e cápsulas de cabeças.

b. Farinha de trigo

Sujidades leves - método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 972.32, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Solução de ácido clorídrico: 3+97 (HCl: 3+97)
- Óleo mineral (ver item 5. Reagentes)

- Álcool
- Lauril sulfato de sódio 5% em H_2O

Materiais:

- Béqueres de 1 litro e de 2 litros
- Percolador
- Bastão de vidro
- Papel de filtro (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Autoclave
- Barra magnética
- Bastão de agitação
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Colocar 50g de farinha para digerir em béquer de 2 litros com cerca de 600ml de HCl (3+97) em autoclave a 121°C durante 5 minutos.

2. Transferir imediatamente o digerido para béquer de 1 litro, usando HCl (3+97) à temperatura ambiente para ajudar na transferência.

3. Adicionar 50ml de óleo mineral e agitar magneticamente durante 5 minutos.

4.Colocar HCl 3% no percolador (5cm).

5. Transferir o material do béquer para percolador e reter o béquer (Figura 8).

6. Deixar em repouso durante 30 minutos agitando com bastão de vidro, cuidadosamente durante os primeiros 10 minutos.

7. Drenar a camada inferior até cerca de 3cm da interface, lavar os lados do percolador com água morna e deixar as camadas separarem por cerca de 2-3 minutos.

8. Repetir a drenagem e o enxágüe com água até que a camada inferior se torne límpida.

9. Após a lavagem final, drenar a camada de óleo para o béquer que ficou retido, enxaguando as paredes do percolador com água e álcool.

10. Se tiver muito resíduo adicionar cerca de 3% (v/v) de HCl e ferver durante 3-4 minutos em placa quente.

11. Filtrar a solução quente através de papel de filtro riscado, lavar cuidadosamente o béquer e o funil com água, álcool e solução detergente (lauril sulfato de sódio) a 5%.

12. Filtrar cada material de lavagem separadamente através do mesmo papel de filtro e examinar sob microscópio.

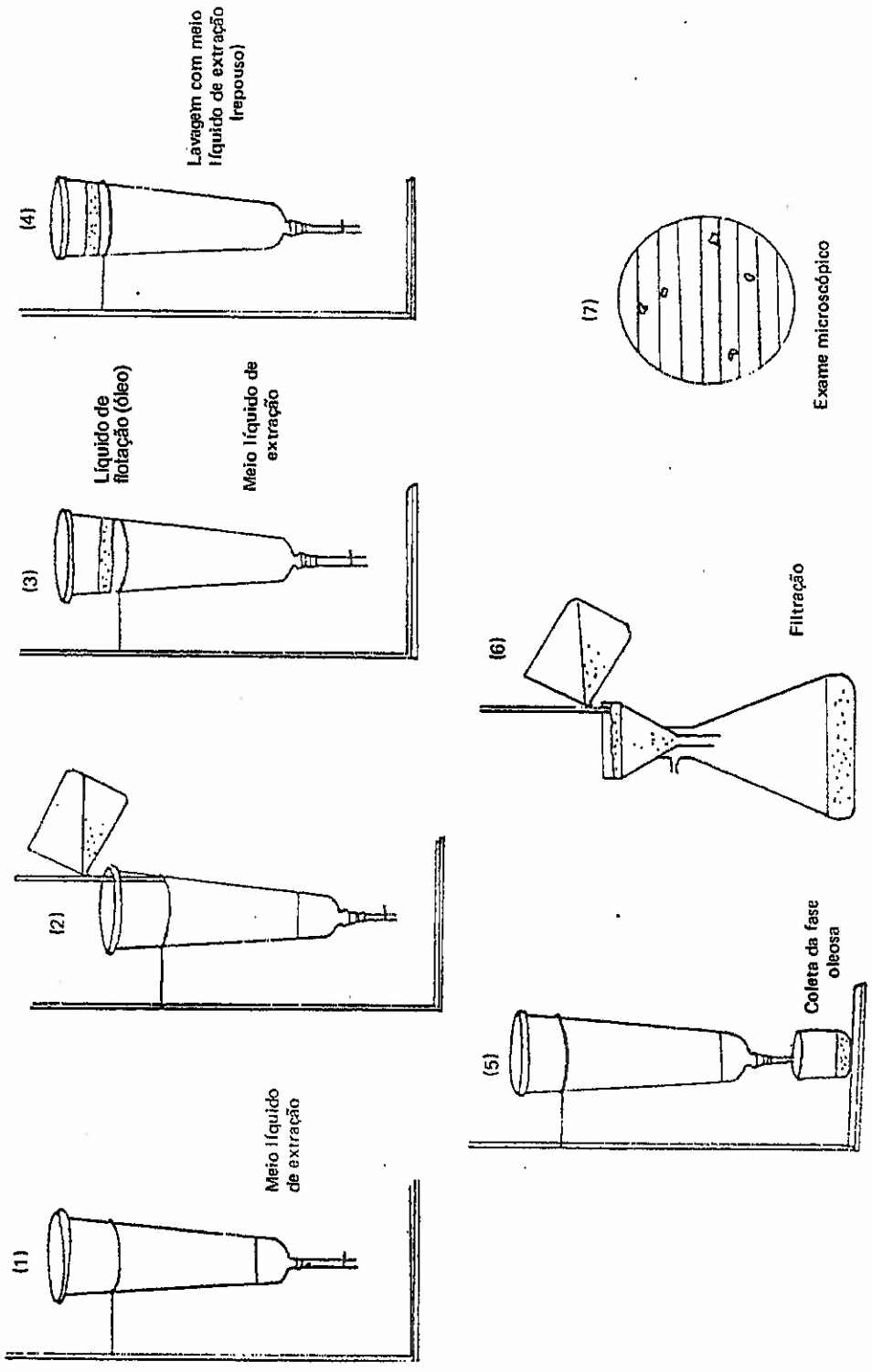


FIGURA 8. Técnica de extração com percolador

c. Farinha de Trigo Integral

Sujidades leves - método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 993.26, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Solução de HCl a 3% (adicionar 24ml de HCl a 776ml de H_2O)
- Solução de isopropanol a 100%
- Solução aquosa de isopropanol a 40%
- Óleo mineral (ver item 5. Reagentes)
- Solução de Tween 80 - isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Solução de Na_4EDTA - isopropanol (ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Béquer de 250 ml e de 2 litros
- Peneira n º 230
- Vidro de relógio
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Frasco-armadilha
- Aparato de refluxo (consiste de um suporte o qual sustenta balão volumétrico de 1 litro com tampa de borracha com dois orifícios. Cada orifício contém um tubo de vidro acoplado a uma mangueira de borracha. Uma mangueira é conectada à fonte de água fria e se presta à saída da vazão. Com água fria circulando pelo frasco, o qual é inserido dentro do béquer de 1 litro contendo a amostra, o solvente é aquecido até a ebulição e retorna para a amostra, durante um período de tempo. Múltiplas unidades podem ser montadas em paralelo, usando conectores em "T" em vez de em série, porque o aumento da temperatura no final da série pode afetar a eficiência do processo de refluxo).

Equipamentos:

- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Balança semi-analítica

Procedimento:

1. Adicionar 800ml de solução de HCl a 3% ao béquer de 2L.
2. Levar para placa pré-aquecida e agitar magneticamente em velocidade que o bastão de agitação seja visível no redemoinho.
3. Pesar acuradamente 50g de farinha de trigo integral em béquer de 250ml.
4. Transferir a farinha, em porções, para a solução de HCl.
5. Lavar as paredes do frasco de 250ml com solução de HCl proveniente de uma pisseta e adicionar as lavagens ao béquer de 2 litros.
6. Cobrir o béquer com vidro de relógio e aquecer até a fervura em placa de aquecimento.
7. Remover o vidro de relógio e ferver gentilmente durante 15 minutos, com agitação magnética.

8. Peneirar com água, em porções, em peneira nº 230 , aplicando jatos suaves de água aquecida (50-70ºC), até que a água saia clara. Recomenda-se o uso de um suporte para peneira. Separar o béquer inicial.

9. Lavar o resíduo das bordas da peneira com água aquecida e enxaguar o resíduo com isopropanol 100%.

10. Transferir o resíduo para o béquer inicial lavando com isopropanol a 100%.

11. Adicionar isopropanol 100% , elevando o volume no béquer para 400ml.

12. Ferver gentilmente durante 5 minutos, usando aparato de refluxo inserido no topo do béquer.

13. Remover o béquer do aparato de refluxo e transferir o conteúdo do béquer para a peneira.

14. Peneirar com água usando jatos suaves de água aquecida, até que a água saia clara.

15. Molhar o resíduo na peneira com isopropanol 40% e transferir o resíduo para frasco-armadilha, usando isopropanol a 40%.

16. Diluir a 600ml com isopropanol a 40% e ferver gentilmente durante 5 minutos, com agitação magnética.

17. Remover do aquecimento, adicionar 65ml de óleo mineral e agitar magneticamente durante 3 minutos.

18. Deixar em repouso durante 1-2 minutos.

19. Adicionar mistura de 5ml de solução de Tween80-isopropanol 40% e 5ml de solução de Na_4EDTA-isopropanol 40%, lentamente pelo bastão de agitação.

20. Agitar manualmente por 30 segundos, com movimentos rotativos.

21. Deixar em repouso por 1-2 minutos.

22. Completar o volume do frasco com isopropanol 40%, fixar o bastão e deixar em repouso por 30 minutos, agitando o conteúdo do fundo a cada 5 minutos durante os primeiros 20 minutos e deixando em repouso total nos 10 minutos finais.

23. Girar a rolha do bastão para eliminar eventuais resíduos aderidos e coletar a camada de óleo em béquer de 400ml, usando isopropanol a 40% para lavar o gargalo do frasco.

24. Adicionar 40ml de óleo mineral ao frasco e agitar gentilmente manualmente durante 15 segundos, com movimentos para cima e para baixo.

25. Completar o volume do frasco com isopropanol a 40% e deixar em repouso por 20 minutos.

26. Girar a tampa do bastão e coletar a camada oleosa, como anteriormente, lavando o gargalo do frasco com isopropanol a 100%.

27. Filtrar o conteúdo do béquer em papel de filtro riscado e examinar sob microscópio em aumento de 30X.

d. Fubá

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 965.39, 17ª ed., 2000.

d.1. Método de digestão com pancreatina

Reagentes:

- Solução de formol (HCHO) a 37%

- Ácido clorídrico (HCl) fumegante p.a.
- Solução fosfato de sódio (Na_3PO_4) a 5% em H_2O
- Solução de pancreatina (5g/100ml de água)
- Querosene desodorizado

Materiais:

- Béquer 600ml
- Funil de Büchner
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Frasco-armadilha de 2 litros

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Potenciômetro
- Placa de aquecimento
- Bomba ou trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 50g de fubá em 1 béquer de 600ml e agitar até formar uma pasta, com 50ml de solução de pancreatina (solução de pancreatina: 5g/100ml de água à temperatura próxima a 40 °C) diluída com 100ml de água.

2. Complêtar o volume com água para aproximadamente 400ml e ajustar o pH para 8 com solução de Na_3PO_4 a 5%.

3. Reajustar o pH após 15 minutos e outra vez após 45 minutos.

4. Adicionar, com agitação, 3 gotas de solução de HCHO (formol) e fazer a digestão por 16-18 horas à temperatura ambiente ou igual ou inferior a 40°C.

5. Transferir para o frasco-armadilha de 2 litros e extrair como descrito no item 6 - Técnicas especiais b, usando 30 e 20ml de querosene desodorizado e água como solvente.

6. Combinar as extrações e enxaguando o béquer, transferir para frasco-armadilha de 2 litros e extrair como descrito anteriormente.

7. Se o material extraído apresentar muitos grumos de amido, adicionar quantidade suficiente de HCl para fazer uma solução de HCl a 1-2%.

8. Levar à ebulição e filtrar enquanto quente (se for material coloidal ou gorduroso retardar a filtração, adicionar água quente sobre o papel durante o processo).

9. Examinar o papel sob microscópio.

d.2. Método de digestão ácida

Reagentes:

- Solução de ácido clorídrico: 5+95 (HCl: 5+95)
- Querosene
- Óleo mineral (ver item 5. Reagentes)
- Solução detergente (lauril sulfato de sódio) a 5%

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Funil de Büchner
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Percolador

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento
- Bomba ou trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 50g de farinha em béquer de 1 litro com 400ml de HCl (5+95) e 20ml de óleo mineral.

2. Colocar em chapa de aquecimento e ferver com agitação durante 10 minutos.

3. Remover do aquecimento e transferir o material para o percolador, lavando o béquer e o bastão com volume igual ou inferior a 50ml de água quente, transferindo as águas do enxágüe para o percolador e reter o béquer e o bastão.

4. Encher o percolador com água fria até cerca de 3cm do topo.

5. Deixar sedimentar durante 30 minutos e drenar cuidadosamente sem formar redemoinho, até que a camada superior esteja a 5cm do fundo.

6. Adicionar 25ml de querosene no percolador e drenar a camada oleosa, no béquer retido.

7. Se a quantidade de amido separada com a camada oleosa for excessiva, hidrolisar com 100-200ml de HCl (5+95) antes de continuar o método.

8. Lavar as paredes do percolador com solução detergente a 5% e juntar o enxágüe ao béquer.

9. Filtrar o conteúdo do béquer através de papel de filtro riscado, em funil de Büchner, lavando o béquer com solução detergente a 5%.

10. Examinar sob microscópio com aumento de 30X.

e. Amido

Sujidades leves - método de peneiragem

Ref. A.O.A.C. nº 972.35, 17ª ed., 2000.

Reagente:

- Solução de ácido clorídrico: 1+9 (HCl: 1 + 9)

Materiais:

- Béquer de 2 litros
- Proveta
- Peneira nº 230
- Aerador de água

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 225g em béquer de 2 litros, adicionar 1,2 litro de água fria e agitar bem até dispersar os grumos.

2. Despejar em peneira nº 230 e lavar com jato forçado de água morna, usando aerador.

3. Se excesso de resíduo permanecer na peneira, lavar com água transferindo para o béquer e adicionar HCl (proporção de 1 parte de HCl para 9 partes de água) e levar à ebulição.

4. Repetir a peneiragem.

5. Transferir o resíduo da peneira para um béquer.

6. Filtrar em papel de filtro riscado e examinar sob microscópio.

f. Farinha de milho (branca e amarela)

Sujidades leves - método de flutuação em salmoura

Ref. A.O.A.C. nº 981.19, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Álcool
- Salmoura (dissolver 360g de sal) em pedra (não marinho), água dura e água mole ou equivalente, por litro de água e filtrar)
- Óleo de oliva
- $CHCl_3$

Materiais:

- Béquer de 600 ml
- Peneira nº 230
- Suporte de anel
- Chave de pinça
- Tubo de borracha de 15cm comprimento e 0,6cm
- Bastão de 15cm comprimento e 0,3cm
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Frasco armadilha de 2 litros

Equipamentos:

- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Percolador
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 50g da amostra em béquer de 600ml, adicionar o bastão de agitação e 300-400ml de álcool.

2. Ferver durante 2-3min em placa de aquecimento, com agitação magnética constante.

3. Transferir para peneira nº 230, lavar com cerca de 100ml de álcool e com água a 80º C e então com salmoura.

4.Transferir para frasco-armadilha de 2 litros e diluir para 800ml com salmoura.

5. Adicionar 30ml de óleo de oliva e agitar magneticamente por 10min.

6. Remover do agitador, inserir o bastão do frasco-armadilha, lavar as paredes do frasco com salmoura e deixar descansar por 3-5min.

7. Encher o frasco bem lentamente (cerca de 50ml/min), com água, através do bastão. O método do percolador, descrito a seguir, é o meio mais eficiente para se fazer essa operação.

Assentar o frasco-armadilha na base de um suporte de anel e suspender o percolador no anel diretamente acima, de modo que o topo fique a cerca de 50cm da base. Anexar ao topo um tubo de borracha de 15cm de comprimento, com 0,6cm de diâmetro interno, e fechar com chave de pinça capaz de ajustar o fluxo. Inserir o bastão do frasco-armadilha dentro do tubo e após encher o percolador com água, abrir a chave de pinça levemente e deixar a água fluir para dentro do frasco. Colocando-se um bastão de cerca de 15cm de comprimento e 0,3cm de diâmetro (pode-se usar carga de caneta esferográfica) dentro do tubo do frasco, elimina-se a tendência do fluxo de água sair fora do bastão da armadilha.

8. Após encher o frasco, agitar a camada inferior da salmoura com movimentos de rotação, para soltar o óleo aderido. Não agitar todo o conteúdo do frasco, porque é desejável nessa fase manter a integridade das duas camadas de salmoura e água.

9. Deixar o frasco em repouso por 30min antes de proceder a extração.

10. Extrair a camada de óleo e enxaguar o gargalo do frasco com água.

11. Adicionar 35ml de óleo de oliva e agitar.

12. Repetir a extração, agitando todo o conteúdo do frasco manualmente, com um êmbolo, com movimento rotativo, para soltar o óleo aderido às paredes do frasco.

13. Deixar em repouso por 30min e extrair a camada de óleo, juntando-a ao béquer contendo a primeira extração.

14. Enxágüe o gargalo do frasco, o bastão e o êmbolo com álcool, depois com $CHCl_3$, para remover todo o óleo aderido.

15. Filtrar em papel riscado, enxaguando o béquer como descrito anteriormente e examinar microscopicamente.

7.12. Produtos de confeitaria

a. Pão e produtos com alto teor de fibras (bolachas ou biscoitos)

Sujidades leves - método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 972.36, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Ácido clorídrico fumegante p.a. (HCl)
- Antiespumante (ver item 5. Reagentes)
- Álcool comercial a 95% ou isopropanol p.a.
- Clorofórmio p.a. ($CHCl_3$)
- Solução ácido-álcool:1+9 (HCl + etanol a 60% ou HCl + isopropanol a 40%)
- Óleo mineral
- Solução detergente-(lauril sulfato de sódio a 5% em água)

Materiais:

- Balança semi-analítica
- Béquer de 2 litros
- Proveta de 1 litro e de 50ml
- Peneira nº 140
- Barra magnética
- Percolador
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Autoclave

- Bomba ou trompa a vácuo
- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Adicionar 225g da amostra em béquer de 2 litros contendo 1 litro de água e 50ml de HCl. Mexer bem e adicionar 1ml de antiespumante ou 1ml de éter etílico.

2. Autoclavar durante 20 minutos como descrito no item 4.h.1, ou por cerca de 15 minutos como em 4.h.2

3. Transferir o digerido em pequenas porções para uma peneira nº140 com água aquecida (55-70ºC) e lavar a amostra até que o teor de resíduo permaneça constante.

4. Colocar a peneira em uma vasilha, cobrir o resíduo até uma profundidade de cerca de 2cm com álcool ou isopropanol (em capela), deixar em repouso durante 5 minutos e drenar.

5. Repetir esta fase 3 vezes com clorofórmio (em capela), e mais 2 vezes com álcool ou isopropanol e drenar completamente.

6. Transferir imediatamente o material da peneira para um béquer de 1 litro com solução ácido-álcool e diluir com esta solução até cerca de 600ml. Adicionar 50ml de óleo mineral e agitar magneticamente durante 5 minutos.

7. Transferir o conteúdo do béquer para o percolador, retendo o béquer. Deixar em repouso durante 30 minutos, agitando ocasionalmente a cada 5 minutos, com bastão de vidro longo, durante os primeiros 20 minutos. Drenar o conteúdo até cerca de 250ml.

8. Adicionar a solução ácido-álcool até cerca de 3cm da borda superior e deixar em repouso por mais 30 minutos, mexendo ocasionalmente.

9. Drenar novamente até cerca de 250ml. Encher o funil com água morna, deixar decantar cerca de 15 minutos e drenar até 250ml. Continuar drenando e completando o volume até que a fase aquosa mais baixa fique clara e livre de material em suspensão.

10. Após a última lavagem, drenar a camada de óleo para o béquer retido e lavar as paredes do percolador com porções de 50 a 100ml de água aquecida, isopropanol ou álcool e solução detergente (lauril sulfato de sódio a 5%), se necessário.

11. Filtrar em papel riscado, lavando bem o béquer como descrito anteriormente.

12. Examinar o papel sob microscópio.

b. Massas alimentícias (macarrão)

Sujidades leves - método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 969.41,17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Solução antiespumante (ver item 5. Reagentes)
- Óleo mineral (ver item 5. Reagentes)
- Álcool comercial 95% ou isopropanol p.a.

- Solução de ácido clorídrico: 3 + 97 (HCl: 3 + 97)
- Solução detergente (lauril sulfato de sódio a 5%)

Materiais:

- Béqueres de 1 e 2 litros
- Provetas de 1 litro e de 50ml
- Barra magnética
- Peneira nº 230
- Percolador
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Autoclave
- Agitador magnético
- Placa de aquecimento
- Bomba ou trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 225g de amostra em 1 béquer de 2 litros, adicionar 1 litro de solução de HCl (30+ 970) e 0,3ml de solução antiespumante. Para espaguete, quebrar em pedaços de comprimento tal que não fiquem aderidos ao fundo do béquer.

2. Autoclavar durante 30 minutos a 121 °C, como descrito no item 4.h.1, ou 4.h.2.

3. Peneirar o material autoclavado em pequenas porções em peneira nº 230 usando água quente (50-70°C), para remover todo o material líquido original e o máximo de material fino.

4. Retornar o material retido na peneira ao béquer original, com água aquecida (60-100° C), diluindo até cerca de 1 litro.

5. Adicionar 30ml de HCl e 50ml de óleo mineral e agitar com agitador magnético durante 6 minutos.

6. Transferir rapidamente para o percolador contendo cerca de 250ml de água. Lavar o béquer com água aquecida transferindo a água de lavagem para o percolador e completar o volume até 1700ml.

7. Após 3 minutos drenar a interface de óleo até que atinja aproximadamente a marca de 250ml.

8. Descartar os drenados e tornar a encher o percolador com água aquecida, pelas paredes, até a marca de 1700ml.

9. Após 2-3 minutos drenar e reencher por mais 2 vezes (após a última lavagem, a camada inferior deverá estar quase livre de material suspenso. Se não estiver, continuar lavando por um ou mais ciclos).

10. Finalmente drenar a interface óleo-água até a marca de 250ml, transferir para o béquer original e drenar. Lavar as paredes do percolador com porções sucessivas de 50ml de água aquecida, isopropanol ou álcool e água aquecida. Usar solução detergente a 5%, se necessário.

11. Filtrar todo o material em papel de filtro riscado, lavando o béquer com porções de no mínimo 50ml de água aquecida, álcool ou isopropanol, e água ou detergente.

12. Observar sob microscópio.

7.13. Cevada, aveia e mistura de cereais desidratados para alimento infantil

Sujidades leves - método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 980.27, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Ácido clorídrico fumegante p.a. (HCl)
- Lgepal DM-710 ou lauril sulfato de sódio a 2%
- Isopropanol p.a.
- Isopropanol a 40% em água
- Óleo mineral
- Solução de Tween-80-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Solução de etileno diamino tetracetato tetrassódico (Na_4EDTA)-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Béquer de 2 litros
- Proveta
- Barra magnética
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Peneira nº 230
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 50g de amostra num béquer de 2 litros.

2. Adicionar 1 litro de água aquecida (55-70ºC) com jatos forçados nas paredes do béquer.

3. Adicionar 80ml de HCl.

4. Se o produto contiver óleo vegetal na lista de ingredientes, adicionar 20ml de Igepal DM-710 (ou solução aquosa de lauril sulfato de sódio a 2%).

5. Colocar barra magnética no béquer e levá-lo para chapa de agitação magnética pré-aquecida, passando para aquecimento máximo.

6. Inicialmente agitar vigorosamente para evitar que a amostra queime, depois vagarosamente conforme a mistura dilui, enquanto aquece durante 20 minutos.

7. Se o produto escurecer, reduzir o aquecimento para a graduação próxima.

8. Peneirar com água, em peneira n ° 230, usando jatos forçados de água aquecida até que a água de lavagem se torne clara.

9. Conduzir o resíduo para um lado da peneira.

10. Embeber o resíduo com isopropanol e deixar drenar.

11. Formatar copo de papel de filtro pelo empacotamento de papel de filtro nº 588 da S&S de 32cm, ou equivalente, em volta de um béquer de 600ml e forçando-o dentro de béquer de 1 litro.

12. Remover o béquer de 600ml do copo de papel e deixar o copo no béquer de 1 litro.

13. Usando um funil de haste larga para ajudar na transferência, passar o resíduo da peneira para dentro do copo de papel, lavando-o com isopropanol.

14. Adicionar isopropanol para elevar o volume até 400ml.

15. Aquecer lentamente em chapa de aquecimento pré-aquecida, durante 10 minutos (em capela).

16. Drenar o isopropanol do copo de papel por gravidade ou vácuo (não deixar o resíduo secar).

17. Descartar o isopropanol.

18. Molhar as paredes do frasco-armadilha de 2 litros com isopropanol a 40%. Colocar um funil de haste larga no gargalo do frasco e lavar o resíduo do copo de papel para dentro do frasco, com isopropanol a 40%.

19. Completar o volume do frasco até 800ml com isopropanol a 40%.

20. Adicionar 50ml de óleo mineral e agitar 3 minutos.

21. Depois da agitação, adicionar 50ml da mistura (1 + 1) de solução deTween-80-isopropanol 40% e solução de Na_4EDTA-isopropanol 40%, colocando-as pelo bastão de agitação.

22. Não misturar e deixar em repouso durante 5 minutos.

23. Encher o frasco-armadilha com isopropanol a 40%, derramando-o vagarosamente pelo bastão de agitação.

24. Deixar em repouso 20 minutos e coletar a camada oleosa num béquer.

25. Adicionar 35ml de óleo mineral e agitar lentamente (manualmente) 30 segundos e deixar em repouso durante 10 minutos.

26. Repetir a extração da camada oleosa, filtrar em papel de filtro riscado e examinar sob microscópio com aumento de 30X.

7.14. Geleiada e geléia

Sujidades leves – método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 950.89, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Ácido clorídrico fumegante (HCl)
- Heptano comercial contendo menos que 8% de tolueno.

Materiais:

- Recipiente (prato)
- Béquer
- Frasco-armadilha de 1 litro
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento
- Bomba ou trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

a. Geleiada

1. Despejar o conteúdo do pote (copo) em um recipiente e misturar bem.
2. Pesar 100g em béquer e adicionar 200ml de água aquecida (cerca de 50°C).
3. Transferir para um frasco-armadilha de 1 litro.
4. Adicionar 10ml de HCl e ferver durante 5 minutos.
5. Resfriar à temperatura ambiente, adicionar 25ml de heptano e agitar completamente.
6. Extrair, filtrar e examinar sob microscópio.

b. Geléia

1. Despejar o conteúdo do pote (copo) em um recipiente e misturar bem.
2. Pesar 100g em béquer e adicionar 300-400ml de água aquecida.
3. Aquecer o béquer com agitação, até que a gelatina dissolva.
4. Filtrar e examinar sob microscópio.
5. Quando pequenas quantidades de geléia contendo tecidos de fruta não passarem através do papel de filtro, proceder como em (a).

7.15. Sucos cítricos e de abacaxi (enlatados)

Ref. A.O.A.C. nº 970.72, 17ª ed., 2000.

a. Ovos e larvas de insetos - método de filtração

Reagentes:

- Corante azul F D& C nº 1
- Ácido acético

Materiais:

- Funil de Büchner
- Tecido de seda 10 XX
- Tela de metal

Equipamentos:

- Placa de aquecimento
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Preparação do filtro de tecido de seda:
   a. Adquirir o tecido de seda cuja malha tenha a mesma abertura (mesh) e espessura usada nos moinhos de farinha, ou seja, 10XX (ver item 4. Mat. e Equip.).
   b. Ferver os quadrados de seda.
   c. Esfriar e cortar círculos de 85mm de diâmetro e esticá-los. Alisar os círculos a ferro e riscar linhas distantes de 5-7mm com tinta que não descore. Obs.: Quando necessário, tingir o círculo riscado colocando-o em solução quente (80-85°C) de 50g de corante azul FD&C em 1 litro de água contendo 2,5mg de ácido acético, com agitação freqüente. Lavar e guardar no escuro.

2. Colocar o filtro de seda previamente preparado como acima em funil Büchner. Para facilitar a filtração, pode-se colocar uma tela de metal sob a seda.

3. Filtrar 250ml da amostra bem misturada. Despejar lentamente, para evitar acúmulo de excesso de polpa sobre o tecido (2 ou 3 filtros de seda podem ser necessários).

4. Examinar os filtros sob microscópio.

b. Sujidades leves - método de flutuação

Reagente:

- Óleo de rícino clarificado

Materiais:

- Proveta
- Funil Büchner

- Frasco-armadilha de 2 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Colocar 250ml do suco em um frasco-armadilha de 2 litros.

2. Adicionar 15ml de óleo de rícino.

3. Encher o frasco com água aquecida (cerca de 70°C).

4. Agitar vigorosamente para trazer a camada de óleo para o gargalo do frasco.

5. Deixar em repouso durante 30 minutos e extrair a fase oleosa.

6. Filtrar e examinar sob microscópio.

7.16. Açúcar e produtos de açúcar

Sujidades em balas - método de flutuação
Ref. A.O.A.C. nº 971.34, 17ª ed., 2000.

a. Balas duras, gomas, gomas de mascar, amido ou balas à base de pectina

Reagente:

- Solução aquosa de ácido clorídrico (HCl: 1 + 70)

Materiais:

- Béquer
- Proveta
- Funil de Büchner
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 225g de amostra e dissolver em solução fervente de HCl (1 + 70).

2. Filtrar em papel de filtro de filtração rápida em funil de Büchner.

3. Examinar sob microscópio.

b. Balas duras de difícil filtração (exemplo: bala de alcaçuz)

Proceder como em (c).

c. Balas insolúveis em água

Todas as balas insolúveis em água, exceto aquelas contendo confeitos de flocos de milho, farelo de trigo ou outro cereal de enchimento, e aquelas cujo maior constituinte, excluindo coberturas de chocolate, consistem principalmente de nozes finamente moídas (exemplo: pasta de amendoim, pasta de amêndoas, etc.).

Reagentes:

- Solução de Tergitol 5%
- Isopropanol 40%
- Óleo mineral leve (ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Béquer de 2 litros
- Barra magnética
- Peneira nº 230
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 225g de amostra em béquer de 2 litros.
2. Adicionar 1 litro de solução de Tergitol 5%.
3. Aquecer 10 minutos em banho-maria.
4. Agitar magneticamente durante 5-10 minutos com aquecimento.
5. Peneirar em porções em peneira nº 230.
6. Se a quantidade de resíduo na peneira for pequena, transferir diretamente para papel de filtro riscado.

7. Caso contrário, transferir para frasco-armadilha de 2 litros, usando isopropanol a 40%.

8. Completar o volume para 1 litro com isopropanol 40%.

9. Adicionar 50ml de HCl.

10. Agitar gentilmente com agitação magnética até fervura completa.

11. Transferir imediatamente o frasco para chapa fria e adicionar 40ml de óleo mineral leve.

12. Agitar magneticamente por 2 minutos e deixar 1 minuto em repouso.

13. Encher o frasco cuidadosamente com isopropanol 40%, deixando o líquido escorrer pelo bastão da armadilha e mantendo o topo da rolha logo acima do líquido.

14. Agitar gentilmente, por 5-10 segundos, o material sedimentado, com o bastão de agitação.

15. Deixar em repouso durante 2 minutos e imediatamente extrair a camada oleosa.

16. Adicionar 25ml de óleo mineral leve, agitar manualmente 30 segundos e deixar em repouso por 10 minutos.

17. Repetir a extração da camada oleosa, lavar o gargalo do frasco com isopropanol 40% e transferir os enxágües para o béquer contendo o material extraído.

18. Filtrar em papel de filtro riscado e examinar sob microscópio.

d. Balas insolúveis em água contendo confeitos de flocos de milho

Farelo de trigo ou outro cereal de enchimento e aquelas cujo maior constituinte, excluindo coberturas de chocolate, constituem-se principalmente de nozes finamente moídas (por exemplo: pasta de amendoim, pasta de amêndoas, etc.)

Reagentes:

- Isopropanol p.a.
- Clorofórmio p.a. ($CHCl_3$)
- Líquido de flotação (ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Peneira nº 230
- Béquer de 600ml e de 1 litro
- Copo de papel de filtro
- Funil de Büchner
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação

- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Proceder como em (c) até o item 5.

2. Lavar o resíduo e peneira com isopropanol.

3. Formar copo de papel de filtro usando béquer de 600ml e béquer de 1 litro (ver item 4. Mat. e Equip.). Umedecer com água para facilitar a moldagem.

4. Colocar o copo de papel em funil de Büchner, lavar com isopropanol e aspirar até quase secar.

5. Transferir o resíduo da peneira para o copo de papel com isopropanol e adicionar isopropanol suficiente para cobrir todo o resíduo.

6. Depois de 1 minuto aplicar o vácuo até cessar o gotejamento.

7. Colocar o copo de papel contendo o resíduo em um béquer de 1 litro e adicionar 200ml de $CHCl_3$.

8. Ferver durante 5 minutos em banho de vapor .

9. Deixar esfriar por alguns minutos, levantar o copo de papel, drenar o $CHCl_3$ e descartá-lo.

10. Colocar mais 200ml de $CHCl_3$, ferver por 5 minutos e drenar.

11. Retornar o copo de papel para o funil de Büchner e aplicar vácuo até cessar o gotejamento.

12. Cobrir o resíduo com isopropanol e deixar 1 minuto em repouso.

13. Aplicar o vácuo até 5 minutos após cessar o gotejamento

14. Proceder como em (c) item 7, exceto depois de ferver, resfriar a temperatura ambiente em banho de água fria e usar líquido de flotação em vez de óleo mineral.

e. Balas com cobertura de chocolate

Reagente:

- Diclorometano (CH_2Cl_2) p.a.

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Cesta de arame com alça (cerca de 8cm de diâmetro x 3cm de altura, confeccionada com malha de peneira nº8)
- Peneira nº 140
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Placa de aquecimento

- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Aquecer 400ml de CH_2Cl_2 em béquer de 1 litro até a temperatura de 30-35°C e manter nessa temperatura.

2. Colocar uma porção de balas na cesta de arame. Mover a cesta para cima e para baixo através do CH_2Cl_2 até dissolver a cobertura de chocolate.

3. Lavar o centro de cada bala com jato fino de CH_2Cl_2 (com piceta) e guardar esta parte central.

4. Repetir com o restante da amostra.

5. Agitar a suspensão de CH_2Cl_2-chocolate e despejar em peneira nº 140 e lavar com água.

6. Transferir o resíduo da peneira para papel de filtro riscado e examinar sob microscópio.

7. Examinar os centros das balas pelo método apropriado: (a), (b), (c) ou (d).

7.17 Xaropes, melaço e mel

Sujidades - métodos de filtração

Ref. A.O.A.C. nº 945.79, 17ª ed., 2000.

a. Método de filtração com ácido

Reagente:

- Ácido nítrico (HNO_3)

Materiais:

- Béquer de 600ml ou de 1 litro
- Funil de Büchner
- Papel de filtro de filtração rápida riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento
- Bomba ou trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópio

Procedimento:

1. Misturar a amostra e dissolver 200g em 200ml de água aquecida acidificada com 5ml de HNO_3.

2. Filtrar imediatamente em papel de filtro de filtração rápida em funil de Büchner.

3. Lavar com porção mínima de água aquecida e examinar sob microscópio.

b. Método alternativo

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Filtro de tecido de malha 10XX (fervido)
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento
- Bomba ou trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Dissolver 200g da amostra em 500ml de água aquecida (cerca de 70°C).
2. Filtrar imediatamente através de filtro de tecido de malha 10XX, em funil de Büchner.
3. Lavar com porção mínima de água aquecida e examinar sob microscópio estereoscópico.

7.18. Açúcar

Sujidades - método de filtração
Ref. A.O.A.C. nº 945.80,17ª ed., 2000.

Material:

- Béquer
- Funil de Büchner
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento
- Bomba ou trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Dissolver 100g da amostra em cerca de 200ml de água aquecida (cerca de 70°C).
2. Ferver e filtrar imediatamente através de papel de filtro de rápida filtração em funil de Büchner.
3. Examinar sob microscópio.

7.19. Alimento infantil (purê)

Ref. A.O.A.C. nº 970.73, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Heptano comercial contendo menos 8% de tolueno
- Óleo mineral específico

Materiais:

- Tecido de pano 10XX
- Frasco-armadilha de 1 litro
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Bomba ou trompa a vácuo
- Microscópio estereoscópico

a. Sujidades leves – método de filtração

Procedimento:

1. Transferir o conteúdo de 2 potes (cerca de 250g) do purê para um frasco-armadilha de 1 litro, previamente lavado com água.

2. Misturar com agitação cerca de 20ml de óleo (especificado na tabela a seguir).

3. Encher o frasco com água desaerada à temperatura ambiente ou a 50-70°C.

4. Deixar a mistura repousar durante 30 minutos, agitando 4-6 vezes durante este período, para liberar as sujidades do alimento.

5. Extrair o óleo, filtrar e examinar sob microscópio.

Nota: Usar o óleo e a temperatura indicados a seguir:

Alimento	Óleo	Temperatura
Espinafre	Óleo mineral leve	50-70°C
Polpas	Óleo de rícino	50-70°C
Todas as frutas Aspargos Beterrabas Cenouras Vagens Ervilhas	Óleo mineral leve	Ambiente

b. Ovos e larvas de moscas - método de sedimentação

Procedimento:

1. Transferir o resíduo do frasco-armadilha do método anterior (item a) para um percolador de 2 litros.

2. Adicionar cerca de 100ml de heptano comercial (com menos 8% de tolueno) e agitar vigorosamente.

3. Deixar o material decantar cerca de 2 horas, agitando ocasionalmente a camada superficial para permitir que os ovos e as larvas sedimentem.

4. Remover cerca de 200ml do fundo do percolador.

5. Filtrar este material através de filtro de tecido 10XX (ver item 4. Mat. e Equip.), usando diversos filtros se houver um acúmulo grande de sedimentos.

6. Examinar sob microscópio em aumento de 15-20X.

7.20. Cogumelos

Sujidades

Ref. A.O.A.C. nº 967.24, 17ª ed., 2000.

Para larvas, ácaros, etc. em produtos enlatados, frescos congelados, secos refrigerados e desidratados.

Reagentes:

- Solução de cristal de violeta aquosa saturada (dissolver 10g do corante, cor nº 42555, em 100ml de álcool e filtrar)
- Solução comercial de NaOCl 5,25%

Materiais:

- Béquer de 600ml
- Peneiras nºs 8 (ou 12), 20, 40 e 140
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)
- Aerador de água

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Microscópio estereoscópico
- Homogeneizador
- Bomba a vácuo

A. Insetos

a. Cogumelos enlatados

Procedimento:

1. Despejar o conteúdo do frasco uniformemente em peneira nº 8 previamente pesada. Usar peneira nº 8 para recipientes com peso líquido inferiores a 1,4kg e peneira nº 12 para recipientes maiores.

2. Drenar durante 2 minutos e pesar novamente a peneira com os cogumelos para determinar o peso dos cogumelos drenados.

3. Enxaguar o recipiente e usar o enxágüe e várias porções adicionais de H_2O para lavar os cogumelos na peneira (total de cerca de 500ml).

4. Combinar o líquido drenado com os enxágües e filtrar em papel de filtro riscado.

5. Examinar o papel sob microscópio e determinar o número total de larvas no líquido.

6. Colocar 100g do cogumelo drenado em homogeneizador de alta velocidade.

7. Adicionar 300ml de água e homogeneizar por 30-45 segundos a 3000rpm. Fragmentos de cogumelos, após a homogeneização, devem apresentar 3-5mm de comprimento.

8. Despejar a mistura em um conjunto de peneiras acopladas nºs 20, 40 e 140.

9. Lavar o material durante 2-3 minutos com jatos de água do aerador.

10. Descartar o material da peneira nº 20.

11. Transferir o material da peneira nº 40 pára béquer de 600ml, usando água e levar o volume para cerca de 100ml.

12. Adicionar 5ml de solução de cristal de violeta aquosa saturada e aquecer até a ebulição.

13. Despejar a mistura corada em peneira nº 40.

14. Lavar os tecidos do cogumelo e as larvas, se presentes, para a margem da peneira e remover o excesso de corante com água do aerador.

15. Alternativamente, pulverizar os tecidos com jatos suaves de água do aerador e de solução comercial de NaOCl 5,25%, contida em uma pisseta, até remover o corante dos tecidos do cogumelo.

16. Transferir os tecidos para béquer de 600ml, com água, e transferir para papel de filtro riscado, usando vácuo. Evitar confundir as larvas com tecidos do cogumelo. Não serão necessários mais do que 2-3 papéis.

17. Transferir o resíduo da peneira nº140 para o béquer de 600ml com água e repetir a coloração, branqueamento e filtração, como anteriormente.

18. Examinar os papéis quanto à presença de larvas e outros materiais estranhos em microscópio em aumentos de 10-30X. As larvas adquirem coloração violeta escura.

19. Determinar o número de larvas em 100g de cogumelos drenados e adicionar a esse valor o número em quantidade proporcional de líquido drenado, calculado como segue:

(100/total de cogumelos drenados(g) x nº total de larvas no líquido).

b. Cogumelos frescos, congelados, secos refrigerados e desidratados

Procedimento:

1. Para cogumelos frescos e congelados pesar 170g da amostra e para cogumelos desidratados pesar 15g da amostra em recipiente apropriado.

2. Adicionar água suficiente para imergir os cogumelos.

3. Deixar de molho por várias horas para amaciar os tecidos, ou alternativamente aquecer em banho

de vapor ou ferver gentilmente por 11/2 a 2h, conforme a necessidade, seguindo por resfriamento por 30-60 minutos para reidratar completamente.

4. Transferir o conteúdo para homogeneizador de alta velocidade e homogeneizar por 30-45 segundos a cerca de 3000rpm e proceder como em (a), a partir do item 8.

B. Sujidades leves

Reagentes:

- Heptano (ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Papel de filtro
- Frasco-armadilha (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Banho de vapor
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Misturar bem a amostra e pesar 15g.

2. Transferir os cogumelos para frasco-armadilha, adicionar água e deixar em repouso por várias horas, preferencialmente durante a noite em banho de vapor, ou ferver 30 minutos.

3. Esfriar à temperatura ambiente e adicionar 30ml de heptano.

4. Bater fortemente o conteúdo, socando os cogumelos contra o fundo do frasco, movimentando verticalmente a tampa de borracha.

5. Coletar a camada oleosa duas vezes, filtrar e examinar sob microscópio.

7.21. Especiarias e condimentos

Inteiros, triturados ou em pedaços

Sujidades

Ref. A.O.A.C. nº 965.40, 17ª ed., 2000.

Pimenta-da-jamaica, anis, alcaravia, semente de aipo, cravo-da-índia, coentro, cominho, semente de endro, erva-doce, gengibre, flor de noz-moscada, mostarda, pimenta preta, pimenta branca, semente de papoula e açafrão.

Determinação:

Pesar 25g de amostra em béquer de 400ml e proceder como em 975.48 (a) e (b), exceto que

usa-se mais reagente e quando for necessário. Usar frasco-armadilha de 2 litros e 35ml de heptano em vez de 25ml.

Para manjerona e segurela inteira ou em pedaços, adicionar 400ml de água aquecida e 20ml de HCl.

Especiarias e condimentos (moídos)

Método de peneiragem

Ref. A.O.A.C. nº 960.51, 17ª ed., 2000.

Pimenta-da-jamaica, anis, caril em pó, erva-doce, semente de papoula, segurela. Sujidades pesadas somente em: semente de alcaravia, cardamomo, mostarda, orégano, alecrim, sálvia, tomilho.

Determinação:

1. Peneirar 200-400g de especiaria moída em peneira nº 20.
2. Transferir os insetos e outras sujidades retidas na malha da peneira para placa de Petri.
3. Examinar em microscópio estereoscópico.

Especiarias e condimentos sem método específico

Sujidades pesadas e leves

Ref. A.O.A.C. nº 975.48, 17º ed., 2000.

a. Sujidade pesada e areia

Reagentes:

- Éter de petróleo p.a.
- Clorofórmio p.a. ($CHCl_3$)
- Tetracloreto de carbono (CCl_4)

Materiais:

- Béquer de 250ml
- Proveta
- Funil de Büchner
- Papel de filtro
- Papel de filtro isento de cinzas
- Cápsula de porcelana tarada

Equipamentos:

- Balança analítica
- Placa de aquecimento

- Capela
- Mufla
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 10g da amostra num béquer de 250ml.

2. Adicionar 150ml de éter de petróleo e ferver durante 15 minutos, em banho de vapor em capela.

3. Ocasionalmente, adicionar éter de petróleo para manter o volume constante.

4. Despejar o éter sobre o papel de filtro de 7cm em funil de Büchner.

5. Adicionar 150ml de $CHCl_3$ ao béquer e deixar em repouso durante 30 minutos, agitando ocasionalmente.

6. Despejar a especiaria e o $CHCl_3$ sobre o papel de filtro, deixando o resíduo pesado de areia e terra (se houver), no fundo do béquer.

7. Se considerável resíduo de tecido de especiaria permanecer no fundo do béquer, adicionar porções sucessivas de $CHCl_3$ misturado com CCl_4, para aumentar a densidade específica até todo o tecido vegetal flutuar.

8. Transferir o resíduo do béquer para papel de filtro isento de cinzas e examinar sob microscópio. Se houver quantidade apreciável de resíduo, colocar o papel de filtro em cápsula de porcelana tarada, incinerar e pesar a areia e a terra.

b. Sujidades leves

Reagente:

- Heptano comercial contendo menos 8% de tolueno

Materiais:

- Espátula
- Frasco-armadilha de 1 litro
- Proveta
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Transferir todo o material seco do funil de Büchner, incluindo material fino aderido ao papel de filtro, o qual deve ser raspado, para frasco-armadilha de 1 litro.

2. Adicionar 150ml de água, aquecer até a ebulição e deixar ferver lentamente 15 minutos com agitação magnética.

3. Lavar as paredes do frasco com água e resfriar para < 20°C.

4. Adicionar 25ml de heptano, agitar magneticamente e deixar em repouso durante 5 minutos.

5. Encher o frasco com água e deixar em repouso durante 30 minutos, agitando a cada 5 minutos.

6. Coletar a camada de heptano e filtrar em papel de filtro riscado.

7. Adicionar 15ml de heptano, misturar bem (manualmente), deixar em repouso durante 15 minutos e extrair novamente a camada de heptano.

8. Filtrar em papel de filtro riscado. Se a segunda extração tiver quantidade apreciável de sujidades, retirar a maior parte do líquido do frasco-armadilha, adicionar 15ml de heptano e proceder à terceira extração. Filtrar e examinar os papéis sob microscópio.

Especiarias e condimentos

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 975.49, 17ª ed., 2000.

(Consultar a Tabela 1 para a aplicação de parâmetros específicos para cada especiaria)

Formar copo de papel de filtro com béqueres de 400ml e de 1 litro e pesar a amostra neste copo.

A. Pré-tratamento

a. Extração com isopropanol

Reagente:

- Isopropanol p.a.

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Proveta
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Capela
- Placa de aquecimento

Procedimento:

1. Pesar a amostra no copo de papel.

2. Adicionar 400ml de isopropanol no béquer contendo o copo de papel.

3. Ferver em placa de aquecimento durante 10 minutos.

4. Transferir o copo para funil de Büchner e aspirar para diminuir o gotejamento.

5. Repetir mais duas vezes com 400ml de isopropanol. Proceder ao isolamento como especificado na Tabela 1.

b. Extração clorofórmio-isopropanol

Reagentes:

- Clorofórmio p.a. ($CHCl_3$)
- Isopropanol p.a.

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Copo de papel de filtro
- Proveta
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Placa de aquecimento
- Capela

Procedimento:

1. Adicionar 400ml de $CHCl_3$ no béquer de 1 litro contendo o copo de papel com a amostra.
2. Ferver gentilmente em chapa de aquecimento durante 10 minutos, em capela.
3. Transferir o copo de papel para funil de Büchner e aspirar para diminuir o gotejamento.
4. Repetir mais duas vezes, com 400ml de $CHCl_3$ de cada vez.
5. Desligar o vácuo, cobrir a amostra com isopropanol e deixar em repouso durante 1 minuto.
6. Voltar o vácuo para diminuir o gotejamento.
7. Repetir a extração com isopropanol.
8. Proceder ao isolamento indicado na Tabela 1.

c. Pimenta-vermelha triturada

Reagente:

- Isopropanol

TABELA 1. Métodos para especiarias e condimentos Produtos não listados nesta tabela usar Ref. nº975.48 (a) e (b) para os produtos moídos.

Condimento	Forma	Amostra (g)	Pré-tratamento 975.49A	Isolamento 975.49B	Método - Sujidades Pesadas	Leves
Alfafa	Inteiro	10			975.48(a)	975.37
Pimenta-da-jamaica	Moída	10			975.48(a)	981.21
Anis	Moída	10			975.48(a)	975.48 (b)
Urucum	Moída	25			———	978.20
Manjericão	Inteiro (1)	25	b	a		
Folhas de louro	Inteiro (1)	25	b	a		
Pimenta-da-guiné [a]		25			978.21	978.22
Semente de alcaravia	Moída (4)	10	d	d		
Cardamomo	Moída	10			975.48(a)	977.24
Folha de aipo	Inteira	25	b	a		
Semente de aipo	Moída				975.48(a)	977.24
Cebolinha	Inteira (1)	5	a	a		
Canela	Moída	Veja método			968.38(a)	968.38(b)
	Não moída	100				969.43
Cravo da índia	Moído (1)	10	a	b		
Sementes p/ condimento	Inteira	200			945.84(excreta)	
Coentro	Moído	10			975.48(a)	977.24
Cominho	Moído (1)	10	a	b		
Caril em pó	Pó	10			975.48(a)	975.48(b)
Erva-doce	Moída	10			975.48(a)	975.48(b)
Endro-semente	Moído	10			975.48(a)	975.48(b)
Endro-erva	Inteiro (1)	25	b	a		
Alho	Pó	50			975.50(a)	975.50(b)
Gengibre	Moída	10				977.24
Noz-moscada (flor)	Moída (4)	10	d	d		
Manjerona	Moída (1)	10	b	b		
	Não moída	10				985.39
Hortelã	Flocos (1)	25	a	a		
Semente de mostarda	Moída (1)	10	a	b		
Noz-moscada	Moída	10				979.26
Noz-moscada	Recondicionada	Veja método				971.35
Cebola	Pó	50			975.50(a)	975.50(b)
Orégano [a]	Moído (1)	10	b	b		
	Não moído	10				969.44
Páprica	Moída	25				977.25B
Salsa	Inteira (1)	10	a	a		
Pimenta-preta	Moída	Ver método			972.40B	972.40A
Pimenta-branca	Moída	Ver método			972.40B	977.24
Pimenta-vermelha	Triturada (2)	25	c	c		
Semente de papoula	Moída	10			975.48	975.48(b)
Alecrim	Moída (1)	10	a	b		
	Inteira (1)	25	b	a		
Salva	Moída (1)	10	b	b		
	Picada	25				979.25
	Picada e	10				985.38
	Moída	10			975.48(a)	975.48(b)
Segurelha	Moída	10			975.48(a)	975.48(b)
Hortelã-folhas	Inteira	5				985.37
Estragão	Inteiro (1)	10	a	a		
Tomilho	Moído (1)	10	a	b		
	Inteiro (1)	25	a	a		
Açafrão	Moída (3)	10	a ou e	b		
Vegetais	Flocos	25	a	a		

[a] Excluindo páprica Ref. JAOAC: (l):58, 447(1975); (2):58, 445(1975); (3):58, 451(1975); (4):59, 27(1976).

Materiais:

- Béquer de 250ml
- Copo de papel de filtro
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento
- Capela

Procedimento:

1. Pesar 25g da amostra em copo de papel formado em béquer de 250ml.
2. Colocar em banho-maria (80-85°C) ou no topo de banho de vapor.
3. Adicionar 100ml de isopropanol e aquecer durante 5 minutos. Suspender o copo de papel e deixar drenar.
4. Descartar o líquido drenado (evitar contato com este líquido).
5. Adicionar 100ml de isopropanol e repetir a extração e a drenagem.
6. Colocar o copo de papel em funil de Büchner, lavar com cerca de 100ml de isopropanol.
7. Aspirar até quase secar.

d. Flor de noz-moscada e semente de alcaravia moída

Reagentes:

- Clorofórmio p.a. ($CHCl_3$)
- Isopropanol p.a.

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Copo de papel de filtro
- Funil de Büchner

Equipamentos:

- Placa de aquecimento
- Capela

Procedimento:

1. Adicionar 400ml de $CHCl_3$ no béquer de 1 litro contendo o copo de papel com a amostra.

2. Ferver gentilmente na chapa de aquecimento durante 10 minutos, em capela.

3. Transferir o copo de papel para funil de Büchner e aspirar para diminuir o gotejamento.

4. Retornar o copo de papel para o béquer vazio, adicionar 400ml de isopropanol, ferver durante 5 minutos.

5. Transferir o copo de papel para funil de Büchner e aspirar para diminuir o gotejamento.

B. Isolamento

a. Óleo mineral e n-heptano (85 partes de óleo para 15 partes de n-heptano)

Reagentes:

- Isopropanol 40%
- Solução de Tween-80-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Solução de Na_4EDTA-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Líquido de flotação (ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Frasco-armadilha de 2 litros
- Proveta
- Barra magnética
- Béquer de 250ml
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Placa de aquecimento com agitação
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Transferir a amostra desengordurada para frasco-armadilha de 2 litros com auxílio de isopropanol 40%.

2. Diluir o volume até 400ml com isopropanol 40%, ferver durante 10 minutos com agitação magnética.

3. Resfriar em banho de água até temperatura de 20-25°C.

4. Adicionar 50ml de solução de Tween-80-isopropanol 40% e 50ml de solução de Na_4EDTA-isopropanol 40%, derramando lentamente pelo bastão de agitação (omitir para salsa, alecrim e folhas de louro).

5. Agitar manualmente durante 1 minuto com movimento de rotação e deixar em repouso durante 5 minutos.

6. Elevar o volume para 800ml com isopropanol 40%.

7. Adicionar 50ml de líquido de flotação e agitar magneticamente durante 5 minutos.

8. Completar o volume do frasco com isopropanol 40% e deixar em repouso durante 30 minutos agitando ocasionalmente.

9. Coletar a camada oleosa em béquer de 250ml, enxaguando o gargalo do frasco com isopropanol 40%.

10. Adicionar 35ml de líquido de flotação e agitar manualmente os sólidos do fundo com vigorosos movimentos rotatórios.

11. Encher o frasco com isopropanol 40% e deixar em repouso durante 20 minutos.

12. Coletar a camada oleosa no béquer de 250ml, enxaguar o gargalo com isopropanol e filtrar as duas porções coletadas em papel de filtro riscado.

13. Examinar sob microscópio em aumento de 30X.

b. Isolamento com óleo mineral

Reagentes:

- Isopropanol 40%
- Solução de Tween-80-isopropanol 40 (ver item 5. Reagentes)
- Solução de Na_4EDTA-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Óleo mineral

Materiais:

- Peneira nº 230
- Aerador de água
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Colocar o copo de papel com a amostra numa peneira nº 230.

2. Lavar a amostra suavemente com jato suave de água aquecida.

3. Descartar o copo de papel depois de retirar toda a amostra.

4. Peneirar a amostra com jatos fortes de água aquecida (55-70°C), usando aerador, até que as águas de lavagem saiam limpas.

5. Molhar o resíduo da peneira com isopropanol 40%.

6. Transferir o resíduo para frasco-armadilha de 2 litros com o auxílio de isopropanol 40%.

7. Elevar o volume para 400ml com isopropanol 40%.

8. Ferver durante 10 minutos com agitação magnética.

9. Remover do aquecimento e adicionar imediatamente 50ml da mistura Tween-80-isopropanol 40% e 50ml de solução de Na_4EDTA-isopropanol 40%, derramando lentamente pelo bastão de agitação.

10. Agitar manualmente durante 1 minuto com movimentos rotatórios e deixar em repouso durante 5-10 minutos.

11. Completar o volume até 800ml com isopropanol 40%.

12. Adicionar 50ml de óleo mineral e agitar magneticamente durante 3 minutos.

13. Completar o volume do frasco com isopropanol 40%.

14. Deixar em repouso durante 30 minutos, agitando ocasionalmente.

15. Coletar a camada oleosa e repetir a extração como em (a), usando 35ml de óleo mineral na segunda extração.

16. Filtrar as camadas coletadas em papel de filtro riscado e observar sob microscópio.

c. Pimenta-vermelha triturada

Reagentes:

- Isopropanol 40%
- Líquido de flotação
- Solução de Tween-80-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Solução de etileno diamino tetracetato tetrassódico (Na_4EDTA-isopropanol 40%)(ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Frasco-armadilha de 2 litros
- Espátula
- Proveta
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Transferir toda a amostra do copo de papel diretamente para o frasco-armadilha de 2 litros, raspando

o material fino com espátula. Completar a transferência lavando o copo de papel com isopropanol 40% e diluir até cerca de 800ml.

2. Aquecer com agitação, deixando em ebulição vigorosa por cerca de 5 minutos (cuidado com a formação de espuma excessiva. Controlar a espuma com água fria, usando uma pisseta).

3. Resfriar em banho-maria até a temperatura de 20-25°C.

4. Adicionar 40ml de 1 líquido de flotação e agitar magnéticamente durante 5 minutos.

5. Deixar em repouso durante 5 minutos.

6. Enquanto espera, misturar 50ml de solução de Tween-80-isopropanol 40% com 50ml de solução de Na_4EDTA-isopropanol 40% e 200ml de isopropanol 40%.

7. Adicionar lentamente a mistura deixando escorrer vagarosamente pelo bastão de agitação, mantendo o topo da rolha logo abaixo da superfície do líquido.

8. Agitar lentamente a porção de líquido superior, com muito cuidado para não movimentar o material sedimentado.

9. Deixar em repouso durante 5 minutos.

10. Levantar o bastão e girar lentamente a rolha para liberar o material suspenso.

11. Com o topo da rolha logo acima da fase oleosa, encher lentamente o frasco com isopropanol 40%.

12. Agitar a porção líquida superior evitando movimentar o material sedimentado.

13. Prender o bastão de modo que a rolha fique na altura média do frasco.

14. Deixar em repouso durante 5 minutos, girar a rolha para deslocar o material sedimentado.

15. Deixar em repouso durante 20-30 minutos.

16. Coletar a fase oleosa e lavar o gargalo do frasco com isopropanol 40%.

17. Adicionar 35ml de líquido de flotação e agitar rapidamente para suspender o material vegetal sem incorporar ar.

18. Deixar em repouso cerca de 20 minutos.

19. Coletar a fase oleosa e filtrar em papel de filtro riscado juntamente com a primeira porção coletada.

20. Examinar sob microscópio com aumento de 30X.

Pimenta-da-jamaica

Sujidades leves - método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 981.21, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Isopropanol 40% em H_2O
- Ácido clorídrico fumegante p.a. (HCl)
- Solução de Tween-80-isopropanol 40%(ver item 5. Reagentes)

- Solução de etileno diamino tetracetato tetrassódico (Na_4EDTA)-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Óleo mineral (Ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Proveta
- Peneira nº 230
- Aerador de água
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Barra magnética
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 10g de amostra em béquer de 1 litro.
2. Adicionar 500ml de isopropanol 40%-HCl (93 partes de isopropanol para 7 partes de HCl).
3. Ferver lentamente em vapor durante 10 minutos.
4. Transferir o material para peneira nº 230 usando jatos suaves de água aquecida (50-70°C).
5. Peneirar a amostra com jatos forçados de água aquecida, até que as águas de lavagem saiam limpas.
6. Molhar o resíduo da peneira com isopropanol 40%.
7. Transferir o resíduo da peneira para frasco-armadilha de 2 litros usando isopropanol 40%.
8. Elevar o volume para 400ml com isopropanol 40%.
9. Ferver lentamente em chapa de aquecimento, com agitação magnética, durante 10 minutos.
10. Remover do aquecimento e adicionar imediatamente, escorrendo pelo bastão de agitação, 100ml de mistura (1 + 1) de solução Tween-80-isopropanol 40% e solução de Na_4EDTA-isopropanol 40%.
11. Agitar manualmente durante 1 minuto, com movimentos rotatórios suaves.
12. Deixar em repouso durante 10 minutos.
13. Elevar o volume para 800ml com isopropanol 40%.
14. Adicionar 50ml de óleo mineral e agitar magneticamente durante 3 minutos com velocidade que produza redemoinho, visualizando-se apenas a superfície superior do bastão de agitação.

15. Completar o volume do frasco com isopropanol 40% e deixar em repouso durante 30 minutos, com agitação intermitente.

16. Coletar a camada oleosa em béquer, lavando o gargalo do frasco com isopropanol 40%.

17. Repetir a extração usando 35ml de óleo mineral e agitar manualmente o conteúdo da base, com movimentos rotativos.

18. Adicionar isopropanol suficiente para trazer a fase oleosa para o gargalo do frasco.

19. Deixar em repouso durante 30 minutos e coletar a camada oleosa lavando o gargalo do frasco com isopropanol 40%.

20. Filtrar todo o conteúdo do béquer em papel de filtro riscado e examinar sob o microscópio com aumento de 30X. Se excessiva quantidade de tecido vegetal estiver presente, fazer o clareamento como descrito no item 7.2 deste manual (Ref. AOAC 965.38B(d).

Urucum (moído)

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 978.20, 17ª ed., 2000.

Ver Ref. n º978.22

Pimenta-da-guiné (moída)

Sujidade pesada

Ref. A.O.A.C. nº 978.21, 17ª ed., 2000.

(Aplicável à pimenta vermelha e cayenne, chili em pó, etc.)

Reagentes:

- Éter de petróleo p.a.
- Tetracloreto de carbono p.a. (CCl_4)

Materiais:

- Peneira nº 10
- Béquer de 600ml
- Proveta
- Papel de filtro 15cm
- Funil de Büchner
- Cápsula de porcelana
- Papel de filtro isento de cinzas

Equipamentos:

- Balança

- Placa de aquecimento
- Capela
- Microscópio estereoscópico
- Mufla

Procedimento:

a. Para sujidade pesada e areia

Isolar a sujidade grosseira tal como: larvas, insetos adultos, pedaços de tecido e excreta de insetos e roedores, passando a pimenta através de peneira nº 10.

1. Pesar 50g da amostra peneirada em béquer de 600ml.

2. Adicionar 400ml de éter de petróleo.

3. Ferver lentamente durante 30 minutos, adicionando éter de petróleo ocasionalmente para manter volume constante.

4. Despejar o éter de petróleo sobre papel de filtro (15cm) em funil de Büchner.

5. Adicionar 400ml de CCl_4 e deixar em repouso durante 30 minutos com agitação ocasional.

6. Despejar a pimenta e o solvente sobre o mesmo papel de filtro no funil de Büchner, deixando o resíduo pesado de terra e areia no fundo do béquer.

7. Se necessário, repetir a decantação com CCl_4 para garantir praticamente a separação completa dos tecidos vegetais do resíduo pesado.

8. Transferir o resíduo do béquer para papel de filtro isento de cinzas e examinar sob microscópio.

9. Se houver quantidade apreciável de resíduo, colocar o papel de filtro em cadinho tarado, incinerar e determinar o peso de areia e terra.

Pimenta-da-guiné

Sujidades leves - (Não se aplica à paprica)

Ref. A.O.A.C. nº 978.22, 17ª ed., 2000

(Completar a análise sem interrupção durante a noite).

Pré-tratamento:

Proceder como na Ref. nº 975.49(a), usando 25g de amostra.

Reagentes:

- Álcool a 60% em H_2O
- Líquido de flotação (ver item 5. Reagentes)
- Solução de Tween-80-álcool 60% (ver item 5. Reagentes)

- Solução de Na_4EDTA-álcool (ver item 5. Reagentes)
- Álcool comercial a 95% ou isopropanol p.a.

Materiais:

- Peneira nº 230
- Funil
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Béquer
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Peneirar com água em peneira nº 230, usando água aquecida, até que as águas de lavagem saiam limpas.

2. Transferir a amostra com auxílio de uma colher e funil de boca larga para o frasco-armadilha de 2 litros.

3. Lavar o material remanescente na borda da peneira e transferir todo o material para o frasco-armadilha com álcool 60%.

4. Diluir o volume para 600ml com álcool 60%.

5. Ferver lentamente em chapa de aquecimento durante 10 minutos. Alternativamente, colocar o frasco em chapa pré-aquecida, levar à ebulição e depois transferir para banho-maria com 3-4cm de água e deixar ferver lentamente durante 10 minutos. Esta técnica evita o excesso de espuma formada com o método de fervura na chapa de aquecimento.

6. Resfriar para temperatura $>$ ou $=$ a 20°C e $<$ 25° C em banho de água fria.

7. Remover do banho e adicionar 40ml de líquido de flotação.

8. Elevar o volume para 800ml com álcool 60% e agitar magneticamente durante 5 minutos.

9. Adicionar 100ml da mistura (1:1) de solução de Tween-80-álcool 60% e solução de Na_4EDTA-álcool e misturar gentilmente girando o bastão de agitação durante 1 minuto.

10. Deixar em repouso durante 3 minutos.

11. Adicionar vagarosamente álcool 60%, derramando-o lentamente pelo bastão de agitação e mantendo a rolha acima da fase oleosa, até que a fase oleosa alcance o gargalo do frasco.

12. Girar a rolha do bastão através da porção inferior do frasco para suspender o material sedimentado.

13. Adicionar álcool 60%, derramando-o lentamente pelo bastão, para elevar a fase oleosa.

14. Prender o bastão de agitação de modo que a rolha fique na altura média do frasco.

15. Deixar em repouso durante 15 minutos.

16. Girar a rolha gentilmente através da metade superior do líquido para que as bolhas de óleo ascendam mais rapidamente.

17. Deixar em repouso durante 15 minutos e depois coletar a camada oleosa em béquer, lavando o gargalo do frasco com álcool 60%.

18. Filtrar em papel riscado.

19. Adicionar 30ml de líquido de flotação e agitar manualmente durante 1 minuto.

20. Prender o bastão na altura média do frasco e deixar em repouso durante 10 minutos.

21. Girar gentilmente o bastão na metade superior do líquido e ajustar o nível do óleo, de modo que fique no topo do gargalo do frasco, com álcool 60%.

22. Deixar em repouso durante 15 minutos.

23. Coletar a camada oleosa e lavar o gargalo do frasco com álcool 95% ou isopropanol.

24. Filtrar em um segundo papel de filtro riscado e examinar os papéis sob microscópio com aumento de 30X.

Cardamomo, sementes de aipo, coentro, gengibre e pimenta branca

Sujidades leves - método de flutuação

Ref. A.O.A.C. nº 977.24, 17ª ed., 2000 (aplicável para condimentos moídos).

Reagentes:

- Isopropanol p.a.
- Ácido clorídrico fumegante p.a. (HCl)
- Líquido de flotação (ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Béquer de 1 litro
- Barra magnética
- Peneira nº 230
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Proveta

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 10g de amostra (25g para pimenta-branca) em béquer de 1 litro contendo 400ml de isopropanol.

2. Adicionar barra magnética e agitar durante 6 minutos, mantendo todos os sólidos em movimento.

3. Despejar a mistura sobre peneira nº 230 e lavar o resíduo com água até que as águas dos enxágües saiam limpas.

4. Transferir o resíduo da peneira para frasco-armadilha de 2 litros, com auxílio de isopropanol 40%.

5. Adicionar 760ml de isopropanol 40% e 40ml de HCl.

6. Aquecer até a ebulição vigorosa em chapa de aquecimento com agitação magnética.

7. Resfriar para 20-25ºC em banho de água fria.

8. Adicionar 40ml de líquido de flotação e agitar magneticamente durante 5 minutos.

9. Deixar em repouso durante 5 minutos.

10. Encher lentamente o frasco com isopropanol 40%, escorrendo o líquido pelo bastão de agitação, mantendo a rolha do bastão logo abaixo da camada de óleo.

11. Ressuspender o material do fundo do frasco sem perturbar a fase oleosa.

12. Deixar em repouso durante 20 minutos, agitando o fundo ocasionalmente.

13. Coletar a camada oleosa num béquer.

14. Adicionar 30ml de líquido de flotação e agitar magneticamente durante 30 segundos, enquanto empurra o óleo para dentro da camada aquosa inferior. Continuar agitando por mais 4,5min.

15. Deixar em repouso durante 15 minutos.

16. Extrair a camada oleosa e filtrar as porções coletadas em papel de filtro riscado. Se a filtração tornar-se demorada, usar novo papel de filtro.

17. Examinar sob microscópio com aumento de 30X.

Canela (moída)

Sujidades pesadas e leves

Ref. A.O.A.C., nº 968.38, 17ª ed., 2000.

a. Sujidades pesadas e areia

Reagente:

- Tetracloreto de carbono (CCl_4).

Materiais:

- Tubo de centrífuga 50ml
- Proveta

- Papel de filtro isento de cinzas
- Cápsula de porcelana tarada

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Centrífuga
- Mufla
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 2g da amostra em tubo de centrífuga de 50ml.

2. Adicionar cerca de 45ml de CCl_4.

3. Centrifugar durante 5 minutos a 800 r.p.m.

4. Agitar a fase superior do liquido e repetir a centrifugação.

5. Retirar cerca de 2/3 do líquido e a camada flutuante.

6. Adicionar 45ml de CCl_4, misturar bem e centrifugar novamente.

7. Retirar tanto quanto possível do líquido e da camada flutuante, de modo que não perturbe o resíduo no tubo da centrífuga.

8. Lavar o resíduo sobre o papel de filtro de 11cm isento de cinzas, com CCl_4.

9. Examinar sob o microscópio. Se houver uma quantidade apreciável de resíduo, colocar papel de filtro em cápsula de porcelana tarada, incinerar e pesar a areia e a terra.

b. Sujidades leves (onde estiver especificado álcool e álcool 60%, pode-se substituir por isopropanol e isopropanol 40%, respectivamente. Usar o mesmo álcool em todo o método).

Reagentes:

- Ácido clorídrico fumegante p.a. (HCl)
- Isopropanol
- Isopropanol 40% em água
- Óleo mineral

Materiais:

- Béquer de 1 litro e de 2 litros
- Proveta
- Barra magnética
- Peneira nº 230

- Aerador de água
- Percolador de 2 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 50g de amostra em béquer de 1 litro.

2. Adicionar 500ml de água aquecida (55-70°C) e 50ml de HCl.

3. Agitar em alta velocidade, em barra magnética com aquecimento, por vários minutos, mantendo a temperatura sem atingir a ebulição, até dispersar o gel (a suspensão deve se tornar menos viscosa e o redemoinho se tornar mais pronunciado).

4. Despejar em porções sobre peneira nº 230, lavando com jatos forçados de água aquecida (usando aerador).

5. Depois que todo o material fino passar através da peneira, lavar o resíduo alternadamente com álcool e água aquecida até que a maior parte da espuma e da cor tenha passado.

6. Transferir o resíduo para béquer de 2 litros com álcool 60%, usando uma colher para ajudar na transferência.

7. Elevar o volume para 1 litro com álcool 60%.

8. Adicionar 50ml de HCl e aquecer com agitação magnética, sem atingir a ebulição para prevenir a carbonização.

9. Quando a mistura estiver aquecida (cerca de 55°C), adicionar 50ml de óleo mineral e agitar magneticamente durante 4 minutos.

10. Transferir o conteúdo do béquer para percolador de 2 litros, lavando o béquer muito bem com álcool 60%.

11. Levar o volume do percolador para cerca de 1,7 litros com álcool 60%.

12. Ressuspender o material do percolador, agitando vigorosamente com um bastão de vidro.

13. Lavar o bastão de vidro dentro do percolador com álcool 60%.

14. Deixar decantar durante 3 minutos e drenar imediatamente o material do percolador até cerca de vários centímetros abaixo da camada oleosa.

15. Encher novamente o percolador com água aquecida, adicionando a água rapidamente para ressuspender o material do percolador.

16. Deixar decantar durante 3 minutos e drenar novamente.

17. Repetir as lavagens com água aquecida até que o meio aquoso fique praticamente livre de material suspenso, com no máximo 7 lavagens.

18. Descartar as águas de lavagem.

19. Drenar a camada de óleo mineral para dentro de béquer de 1 litro e lavar as paredes do percolador com enxágües alternados de álcool 95% e água aquecida (55-70°C), coletando-os no béquer.

20. Filtrar o óleo mineral e as porções de líquido de enxágües das paredes do percolador em papel de filtro riscado e examinar sob microscópio.

Canela (não moída, natural ou reconstituída)

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 969.43, 17ª ed., 2000.

Se a amostra for reconstituída, ou se os pedaços não estiverem enrolados e possuírem 8cm de comprimento, pesar 100g da amostra diretamente em béquer de 2 litros.

Se a amostra consistir de cascas, quebrar as cascas abertas em pedaços de 8cm e transferir os pedaços quebrados, incluindo o pó e partículas pequenas para béquer de 2 litros.

Reagentes:

- Ácido clorídrico fumegante p.a. (HCl)
- Óleo mineral
- Álcool comercial a 95% ou isopropanol p.a.

Materiais:

- Béquer de 2 litros
- Proveta
- Peneira nº 6 conjugada com a de nº 230
- Aerador de água
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Barra magnética
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar a amostra em béquer de 2 litros.

2. Adicionar 1 litro de água aquecida (55 – 70°C) e 50ml de HCl.

3. Aquecer em chapa de aquecimento até cerca de 60°C.

4. Despejar em porções sobre peneira nº6 conjugada com a nº 230 (peneira nº 6 sobre a nº 230).

5. Lavar a amostra da peneira com jatos forçados de água aquecida, usando aerador, virando os pedaços maiores com um bastão de vidro, para melhor lavagem.

6. Descartar o material da peneira nº 6 e transferir o resíduo da peneira nº 230 para frasco-armadilha de 2 litros, com auxílio de água aquecida e, se necessário, uma colher.

7. Elevar o volume do frasco para 1 litro com água e adicionar 50ml de HCl.

8. Aquecer com agitação magnética até cerca de 60-70°C.

9. Adicionar 50ml de óleo mineral e agitar durante 2 minutos.

10. Completar o volume do frasco com água, deixar em repouso durante 5 minutos.

11. Coletar a camada oleosa em béquer de 250ml.

12. Adicionar 25ml de óleo mineral e agitar gentilmente com o bastão durante 1 minuto.

13. Deixar em repouso durante 5 minutos e coletar novamente a camada oleosa.

14. Lavar o gargalo do frasco com álcool ou isopropanol.

15. Filtrar o material coletado em papel de filtro riscado e examinar para insetos e outros artrópodes, cabelos, excrementos, etc.

Sementes de condimentos

Excrementos de roedores e de insetos - método de sedimentação

Ref. A.O.A.C. nº 945.84, 17ª ed., 2000.

Reagente:

- Meio líquido - preparar líquido com densidade aparente de 1,16-1,19, misturando $CHCl_3$ ou CCl_4 com álcool ou éter de petróleo.

Materiais:

- Proveta
- Percolador de drogas (adaptado) de 1 litro
- Papel de filtro

Equipamento

- Balança semi-analítica

Procedimento:

1. Misturar 200g de amostra com 500-700ml de meio líquido em percolador de drogas (adaptado - veja Figura 9).

2. Deixar em repouso durante 30 minutos, agitando a intervalos de 5 minutos.

3. Aprisionar o sedimento na parte inferior do percolador com a tampa de cortiça do bastão.

4. Remover a rolha inferior de modo a liberar todo o sedimento para um béquer.

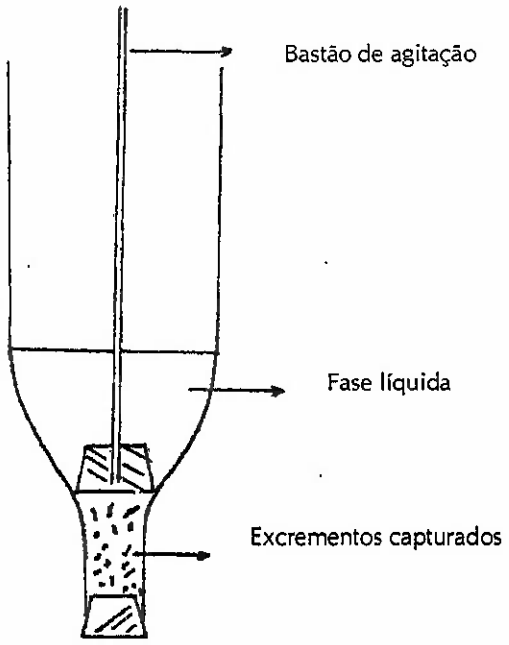


FIGURA 9. Percolador de drogas (adaptado).

5. Levantar a rolha superior levemente e lavar o tubo e a rolha, permitindo a passagem de pequenas porções de líquido.

6. Agitar a camada superior e fazer mais duas separações a intervalos de 5 minutos.

7. Transferir o conteúdo do béquer para papel de filtro, drenar o líquido e examinar.

8. Separar os excrementos de roedores e de insetos, secar e pesar separadamente, expressando em mg.

Alho e cebola em pó

Sujidades pesadas e leves

Ref. A.O.A.C. nº 975.50, 17ª ed., 2000.

a. Sujidades pesadas e areia

Reagente:

- Tetracloreto de carbono (CCl_4)

Materiais:

- Béquer de 250ml
- Proveta
- Funil de Büchner
- Papel de filtro 15cm e papel de filtro isento de cinzas
- Cápsula de porcelana

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Microscópio estereoscópico
- Mufla

Procedimento:

1. Pesar 50g de amostra em béquer de 250ml.

2. Adicionar 200ml de CCl_4 e agitar bem.

3. Deixar em repouso durante 30 minutos, com agitação ocasional.

4. Decantar o tecido vegetal em papel de filtro de 15cm em Büchner.

5. Adicionar 100ml de CCl_4 e repetir a decantação até que praticamente não permaneça tecido vegetal com areia e terra no fundo do béquer.

6. Transferir o resíduo do béquer para papel isento de cinzas, utilizando jatos de CCl_4 de uma pisseta.

7. Examinar sob microscópio. Se houver quantidade apreciável de resíduo, colocar o papel em cápsula de porcelana tarada, incinerar e pesar a areia e a terra.

b. Sujidades leves

Reagentes:

- Solução de Tween-80-álcool 60% (ver item 5. Reagentes)
- Heptano comercial contendo menos 8% tolueno

Materiais:

- Frasco-armadilha de 2 litros
- Proveta
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Microscópio estereoscópico
- Funil de Büchner

Procedimento:

1. Secar o resíduo de tecido vegetal do funil de Büchner, (a), por uma noite à temperatura ambiente ou 1 hora em estufa a 80°C.

2. Transferir para frasco-armadilha de 2 litros.

3. Adicionar 250ml de solução de Tween-80-álcool 60% e misturar bem.

4. Deixar em repouso durante 15-30 minutos.

5. Adicionar álcool 60% até volume de 800ml e fazer a extração em frasco-armadilha duas vezes com 75ml e 35ml de heptano, respectivamente, e álcool 60% como meio líquido (ver item 6 (b)-Técnicas Especiais).

6. Deixar em repouso 1 a 1,5 horas para cada extração e evitar agitar, exceto poucos movimentos circulares ascendentes, imediatamente após encher o frasco com álcool 60%.

7. Filtrar em papel riscado e examinar sob microscópio.

Sálvia (triturada)

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 979.25, 17ª ed., 2000

Reagentes:

- $CHCl_3$ - clorofórmio p.a.
- Isopropanol p.a.
- Álcool comercial a 95%
- Isopropanol 40% em água
- Solução de Tween-80-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Solução de Na_4 EDTA-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Óleo mineral

Materiais:

- Papel de filtro 32cm
- Béqueres 400ml e de 1 litro
- Proveta
- Funil de haste larga
- Funil de Büchner
- Peneira nº 230
- Aerador de água
- Barra magnética
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Capela
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

A. Pré-tratamento

1. Formar copo de papel com papel de filtro de 32cm em béquer de 400ml, inserindo-o no béquer de 1 litro. Retirar o béquer de 400ml e pesar 25g da amostra no copo de papel formado.

2. Adicionar 400ml de $CHCl_3$ de modo a ficar igualmente distribuído entre o copo de papel e o béquer.

3. Ferver lentamente durante 10 minutos sobre a chapa de aquecimento em capela. (Alternativamente, levar ao ponto de ebulição em placa de aquecimento e continuar o aquecimento em banho de vapor por 10min).

4. Transferir o copo para funil de Büchner e aspirar para diminuir o gotejamento.

5. Retornar o copo para o béquer de 1 litro e repetir a extração com duas porções de 400ml de $CHCl_3$.

6. Depois da terceira aspiração de $CHCl_3$, desligar o vácuo, cobrir a amostra com isopropanol e deixá-la em repouso durante 1 minuto.

7. Aspirar até diminuir o gotejamento.

8. Repetir mais uma vez a extração com isopropanol.

B. Isolamento

1. Transferir a amostra do copo de papel para peneira nº 230, com jatos suaves de água aquecida.

2. Lavar com jatos forçados de água aquecida (55-70°C) até que as águas de lavagem saiam limpas.

3. Lavar com cerca de 100ml de álcool de uma pisseta e deixar em repouso durante 1 minuto.

4. Lavar novamente o resíduo da peneira com água aquecida até que a lavagem saia limpa (sem cor).

5. Depois molhar bem com isopropanol 40%.

6. Adicionar barra magnética no frasco-armadilha de 2 litros, colocar um funil de haste larga na abertura do frasco e transferir o resíduo da peneira para o frasco com uma colher. Enxágüe o material remanescente nas bordas da peneira com jatos do aerador e transferir para o frasco com isopropanol 40% (total de 400ml).

7. Agitar gentilmente durante a fervura em chapa de aquecimento por 10 minutos. (Alternativamente, ferver em chapa de aquecimento e continuar aquecendo durante 10 minutos em banho-maria com cerca de 40mm de água em ebulição).

8. Remover do aquecimento e adicionar imediatamente 100ml de mistura (1 + 1) de solução de Tween-80-isopropanol 40% e solução de Na_4EDTA-isopropanol 40%, derramando lentamente pelo bastão de agitação.

9. Agitar manualmente durante 1 minuto.

10. Resfriar em banho de água à temperatura de 20-25°C.

11. Adicionar 50ml de óleo mineral. Elevar o volume até 800ml com isopropanol 40%, adicionando-o lentamente pelo bastão, evitando mistura ou agitação do conteúdo do frasco.

12. Agitar magneticamente durante 5 minutos e deixar em repouso durante 3 minutos.

13. Adicionar 100ml da mistura (1 + 1) de solução de Tween-80-isopropanol 40% e solução de Na_4EDTA-isopropanol 40% e agitar gentilmente o líquido da superfície durante 1 minuto.

14. Encher o frasco com isopropanol 40%, derramando lentamente pelo bastão de agitação para minimizar a agitação do líquido.

15. Deixar em repouso durante 20 minutos.

16. Coletar a camada oleosa em béquer, lavar o gargalo do frasco com isopropanol 40%, adicionando ao béquer.

17. Adicionar 35ml de óleo mineral e agitar manualmente durante 1 minuto.

18. Deixar em repouso cerca de 1 minuto e lentamente encher o frasco com isopropanol 40%.

19. Deixar em repouso durante 7 minutos. Girar a rolha para livrá-la dos sedimentos.

20. Ajustar o nível de óleo no gargalo do frasco com isopropanol 40%, até cerca de 1cm acima da rolha totalmente erguida .

21. Deixar em repouso durante 8 minutos.

22. Coletar a camada oleosa, lavando bem o gargalo do frasco com isopropanol.

23. Filtrar o material coletado em papel de filtro riscado, lavando bem o béquer com isopropanol. Examinar sob o microscópio com aumento de 30X.

Noz-moscada (moída)

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 979.26, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Clorofórmio p.a. ($CHCl_3$)
- Isopropanol p.a.
- Isopropanol 40%. em água
- Óleo mineral

Materiais:

- Copo de papel de filtro
- Béquer de 500ml e de 1000ml
- Peneira nº 230
- Barra magnética
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica

- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

A. Pré-tratamento

1. Formar copo para desengordurar a amostra, com papel de filtro de 32cm, em béquer de 500ml e 1 litro. Remover o béquer de 500ml.

2. Pesar 10g de amostra dentro do copo de papel.

3. Adicionar 400ml de $CHCl_3$.

4. Ferver lentamente durante 10 minutos.

5. Drenar (por gravidade) ou aspirar sob vácuo e descartar o $CHCl_3$.

6. Retornar o copo de papel no béquer e adicionar 400ml de isopropanol.

7. Aquecer até ebulição vigorosa.

B. Isolamento

1. Peneirar com água imediatamente a amostra do item 7, em peneira nº 230, até que as águas de lavagem saiam limpas.

2. Lavar o material retido na peneira com isopropanol 40% e deixar drenar.

3. Transferir o material para frasco-armadilha de 2 litros com isopropanol 40% e diluir o volume até 800ml.

4. Adicionar barra magnética e aquecer até ebulição vigorosa com agitação.

5. Adicionar 40ml de óleo mineral e continuar aquecendo até ebulição vigorosa.

6. Transferir o frasco para chapa de agitação fria e agitar durante 5 minutos.

7. Retirar da chapa e encher o frasco com isopropanol 40%, derramando lentamente pelo bastão de agitação, até trazer a camada oleosa para o gargalo do frasco.

8. Agitar para suspender todo o material sedimentado durante 5 minutos. Depois prender o bastão na altura média do frasco.

9. Após 5 minutos, ajustar o nível do óleo com isopropanol 40%, de modo que fique 1cm acima da rolha totalmente levantada e agitar a interface.

10. Deixar em repouso durante 5 minutos e coletar a camada oleosa em béquer.

11. Lavar o gargalo do frasco com isopropanol 40% e coletar no mesmo béquer.

12. Adicionar 30ml de óleo mineral e agitar manualmente durante 1 minuto.

13. Deixar em repouso durante 10 minutos e coletar a camada oleosa no béquer, lavando o gargalo do frasco com isopropanol 40%.

15. Filtrar sobre papel de filtro riscado e examinar sob microscópio.

Noz-moscada (reconstituída)

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 971.35, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Clorofórmio p.a. ($CHCl_3$)
- Isopropanol
- Solução álcool 60%- $CaCl_2$ (ver item 5. Reagentes)
- Óleo mineral

Materiais:

- Béquer de 2 litros
- Proveta
- Papel de filtro S&S de 32cm
- Tecido de seda
- Funil de Büchner
- Peneira nº 230
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Barra magnética
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 100g de amostra no béquer de 2 litros (50g se o produto usado estiver finamente moído).

2. Adicionar 400ml de $CHCl_3$ e ferver durante 5 minutos.

3. Preparar um papel de filtro de 32cm S&S, umedecendo-o com água e moldando-o ao redor da base de um béquer de 1 litro.

4. Colocar um disco de 7cm de tecido de seda (o tamanho da abertura não é crítico) em um funil de Büchner com prato perfurado de 10cm de diâmetro, colocar o papel de filtro, aplicar o vácuo, e pressionar o papel umedecido até obter uma boa vedação.

5. Lavar o papel de filtro com isopropanol e aspirar até quase secar.

6. Transferir a noz-moscada para o papel e aspirar para retirar o $CHCl_3$.

7. Transferir o papel contendo tecidos do condimento para o béquer original.

8. Adicionar 400ml de $CHCl_3$ e ferver durante 5 minutos.

9. Resfriar por alguns minutos, suspender o papel, drenar e descartar o $CHCl_3$.

10. Recolocar o papel no béquer, adicionar 400ml de $CHCl_3$ e repetir pela terceira vez a fervura durante 5 minutos.

11. Colocar o papel em Büchner e aspirar o $CHCl_3$, manter a sucção durante 5 minutos após cessar o gotejamento.

12. Desligar o vácuo e adicionar isopropanol o suficiente para cobrir o condimento, deixar em repouso por alguns minutos e aplicar vácuo novamente até cessar o gotejamento.

13. Repetir a lavagem com isopropanol e aspirar até cerca de 5 minutos depois que cessar o gotejamento.

14. Transferir o condimento retido para peneira nº 230, usando jatos de água aquecida (55 – 70°C) em abundância.

15. Lavar o material na peneira com jatos forçados de água aquecida, usando aerador, até que o resíduo se mantenha constante.

16. Transferir o material retido na peneira para frasco-armadilha de 2 litros, usando inicialmente uma colher e depois com solução alcoólica de $CaCl_2$ contida em uma pisseta.

17. Adicionar barra magnética e levar o volume do frasco para 1 litro com solução álcool 60%-$CaCl_2$.

18. Adicionar 50ml de HCl.

19. Aquecer até ebulição completa com agitação magnética lenta.

20. Após a ebulição transferir imediatamente o frasco para chapa de agitação fria e adicionar 40ml de óleo mineral, derramando-o lentamente pelo bastão de agitação.

21. Agitar magneticamente durante 2 minutos.

22. Completar o volume do frasco com solução álcool 60%-$CaCl_2$ e agitar gentilmente durante 5-10minutos com o bastão de agitação.

23. Deixar em repouso durante 2 minutos e coletar a camada oleosa em um béquer.

24. Adicionar 35ml de óleo mineral e agitar manualmente 30 segundos.

25. Deixar em repouso durante 10 minutos.

26. Repetir a extração da camada oleosa.

27. Lavar o gargalo do frasco com isopropanol e transferir o enxágüe para o mesmo béquer.

28. Filtrar em papel de filtro riscado e examinar sob microscópio.

Orégano (moído)

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 969.44, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Álcool a 15% (preparar previamente cerca de 1700ml por amostra)

- Álcool a 60% em água
- Solução Tween-80-álcool 60% (ver item 5. Reagentes)
- Solução Na_4EDTA-álcool 60% (ver item 5. Reagentes)
- Óleo mineral

Materiais:

- Frasco-armadilha de 2 litros
- Proveta
- Béquer de 250 ml
- Placa de Petri
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 10g de amostra no frasco-armadilha de 2 litros.

2. Adicionar 400ml de álcool a 60%.

3. Ferver gentilmente durante 10 minutos, girando ocasionalmente o frasco gentilmente e/ou usando o bastão de agitação para evitar o acúmulo de material nas paredes do frasco acima da superfície do líquido.

4. Retirar do aquecimento e adicionar imediatamente 100ml da mistura (1 + 1) de solução Tween-80-álcool 60% e solução de Na_4EDTA – álcool 60%.

5. Girar o frasco algumas vezes, usando o bastão para retirar material aderido nas paredes do frasco.

6. Deixar em repouso durante 10 minutos em banho de água fria.

7. Elevar o volume para 800ml com álcool 15%.

8. Adicionar 50ml de óleo mineral e agitar magneticamente durante 2 minutos.

9. Completar o volume do frasco com álcool 15% e agitar manualmente a intervalos de 2-3 minutos durante 20 minutos.

10. Prender o bastão de agitação de modo que a rolha fique acima do material sedimentado na base do frasco.

11. Deixar o frasco em repouso durante 10 minutos.

12. Coletar a camada oleosa e filtrar em papel riscado.

13. Examinar sob microscópio.

Páprica

Contaminação grosseira - ver Ref. A.O.A.C. nº 960.51, 17ª ed., 2000.

Sujidades leves (Páprica moída)
Ref. A.O.A.C. nº 977.25, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Isopropanol p.a.
- Isopropanol 40% em água
- Solução de Tween-80-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Solução de Na_4EDTA-isopropanol 40% (ver item 5. Reagentes)
- Óleo mineral

Materiais:

- Papel de filtro de 32cm
- Béquer de 500ml e de 1 litro
- Proveta
- Funil de Büchner
- Peneira nº 230
- Aerador de água
- Frasco-armadilha
- Barra magnética
- Papel de filtro riscado (ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética
- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

A. Pré-tratamento

1. Formar copo com papel de filtro de 32cm (filtração rápida), moldando-o na base do béquer de 500ml e colocando este dentro de béquer de 1 litro.

2. Remover o béquer de 500ml, deixando o copo de papel no béquer de 1 litro.

3. Adicionar 25g da amostra.

4. Despejar 400ml de isopropanol dentro do béquer, distribuindo-os uniformemente dentro e fora do copo de papel.

5. Colocar em chapa de aquecimento previamente aquecida e ferver gentilmente durante 10 minutos exatamente.(Alternativamente, levar à ebulição em chapa de aquecimento e continuar a fervura em banho de vapor aberto, durante 10 minutos).

6. Remover o copo de papel do béquer e deixar drenar por gravidade ou colocá-lo em funil de Büchner e aspirar para diminuir o gotejamento.

7. Descartar o líquido. Voltar o copo de papel para o béquer de 1 litro e repetir mais duas vezes a extração com 400ml de isopropanol.

B. Isolamento

1. Transferir a amostra do copo para peneira nº 230 com jatos de água, evitando respingos e a perda de amostra.

2. Peneirar lavando a amostra com jatos forçados de água aquecida, usando aerador, até que as águas de lavagem saiam limpas (ignorar a espuma produzida pela ação forte dos jatos de água sobre a páprica).

3. Colocar 400ml de isopropanol 40% numa piceta e deixar reservado.

4. Colocar um funil de boca larga no gargalo do frasco-armadilha e transferir a massa de amostra retida na peneira com jatos de isopropanol 40% da pisseta.

5. Lavar o material restante na peneira para a borda com água aquecida e completar a transferência para o frasco-armadilha com jatos de isopropanol 40% (da pisseta). Lavar as paredes do frasco com isopropanol 40%.

6. Despejar o que restou dos 400ml de isopropanol 40% da piceta no frasco-armadilha.

7. Colocar em chapa de aquecimento e ferver gentilmente durante 10 minutos.

8. Girar o frasco para retirar o material que fica aderido nas paredes (não deixar o material acumular e secar nas paredes do frasco).

9. Remover o frasco do aquecimento e adicionar imediatamente 100ml da mistura (1 + 1) da solução de Tween-80-isopropanol 40% e solução de Na_4EDTA-isopropanol 40%.

10. Agitar gentilmente cerca de 1 minuto e deixar em repouso durante 10 minutos.

11. Elevar o volume para 800ml com isopropanol 40%, adicionando-os lentamente pelo bastão posicionado com a rolha logo acima do nível do líquido.

12. Adicionar 50ml de óleo mineral e agitar magneticamente por 3 minutos com a rolha do bastão de agitação localizada acima do nível do líquido.

13. Adicionar isopropanol 40% lentamente pelo bastão, até trazer o óleo para o gargalo do frasco.

14. Deixar em repouso cerca de 10 minutos.

15. Levantar a rolha para a altura média do frasco e girar gentilmente para movimentar o líquido da camada superior e acelerar a subida das gotas de óleo dispersas.

16. Lavar o bastão de agitação com isopropanol 40% e prendê-lo de modo que a rolha fique na altura média do frasco.

17. Adicionar isopropanol 40% pelo bastão, elevando o nível inferior da camada de óleo cerca de 1cm acima da extremidade superior da rolha completamente levantada.

18. Deixar em repouso durante 10 minutos e girar o frasco gentilmente.

19. Deixar em repouso completo durante 10 minutos e extrair a camada oleosa em béquer.

20. Adicionar cerca de 35ml de óleo mineral e agitar manualmente durante 1 minuto, com velocidade suficiente para movimentar o óleo pelo frasco-armadilha.

21. Adicionar cerca de 20ml de isopropanol 40% e agitar a intervalos de 5 minutos durante 20-25 minutos.

22. Deixar em repouso durante 5-10 minutos.

23. Extrair a camada oleosa em um segundo béquer e lavar o gargalo do frasco com álcool ou isopropanol não diluído.

24. Filtrar as soluções dos dois béqueres em funil de Büchner, separadamente, em papéis de filtro riscados, lavando cada béquer cuidadosamente com isopropanol.

25. Examinar sob microscópio em aumento de 30X.

Pimenta-preta (somente para pimenta-preta moída)

Sujidades leves

Ref. A.O.A.C. nº 972.40 A, 17ª ed., 2000.

Reagentes:

- Isopropanol p.a.
- Isopropanol 40% em H_2O
- Líquido de flotação (ver item 5. Reagentes)

Materiais:

- Béquer de 400ml
- Peneira nº 230
- Aerador de água
- Proveta
- Frasco-armadilha de 2 litros
- Barra magnética
- Papel de filtro riscado.(ver item 4. Mat. e Equip.)

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Placa de aquecimento com agitação magnética

- Capela
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 50g de amostra (ou usar o material vegetal que flutuou no método Ref. nº 972.40B), em béquer de 400ml e adicionar água aquecida (55-70°C) suficiente para obter uma pasta fina.

2. Despejar a pasta em peneira nº 230 e lavar com jatos de água aquecida, usando aerador até o efluente ficar claro.

3. Lavar o resíduo na peneira com cerca de 100ml de isopropanol e deixar drenar.

4. Transferir o resíduo da peneira para frasco-armadilha de 2 litros, usando isopropanol a 40%.

5. Elevar o volume para 800ml com isopropanol 40% e aquecer até a ebulição com agitação magnética.

6. Esfriar a temperatura ambiente em banho-maria. Adicionar 40ml de líquido de flotação e agitar durante 3 minutos.

7. Deixar a fase oleosa separar durante 5 minutos e depois encher o frasco com isopropanol 40%, escorrendo o líquido pelo bastão de agitação

8. Deixar em repouso durante 20 minutos com agitação suave a intervalos de 5 minutos.

9. Coletar a fase oleosa em béquer de 250ml.

10. Repetir a extração com 20ml de líquido de flotação, agitando gentilmente após a adição (manualmente), evitando distúrbio na camada do fundo.

11. Deixar em repouso durante 10 minutos e coletar a fase oleosa.

12. Filtrar em papel de filtro riscado e examinar sob microscópio.

Pimenta-preta e branca moída

Sujidades pesadas e areia

Ref. A.O.A.C. nº 972.40 B, 17ª ed., 2000.

Reagente:

- Tetracloreto de carbono (CCl_4)

Materiais:

- Béquer de 600ml
- Proveta
- Papel de filtro (15cm)
- Funil de Büchner
- Papel de filtro isento de cinzas
- Cápsula de porcelana tarada

Equipamentos:

- Balança semi-analítica
- Capela
- Mufla
- Microscópio estereoscópico

Procedimento:

1. Pesar 50g de amostra em béquer de 600ml.

2. Adicionar 400ml de CCl_4 e deixar o béquer em repouso por no mínimo 1 hora, agitando ocasionalmente.

3. Despejar a pimenta e o solvente sobre o papel de filtro (15cm) em funil de Büchner, deixando o resíduo pesado de areia e terra (se houver) no béquer.

4. Repetir a decantação com CCl_4, se for necessário, para assegurar a separação do tecido vegetal de sujidades pesadas.

5. Transferir o resíduo do béquer para papel de filtro isento de cinzas e examinar sob microscópio. Se houver quantidade de resíduo apreciável, colocar o papel de filtro em cápsula de porcelana tarada, incinerar e pesar a areia e a terra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DENT, RG. Elements of Filth Detection. IN: GORHAN, J.R. (Ed.). **Principles of food analysis for fith, decomposition and foreing matter.** Washington: U.S. Departament of Heath and Human Services, Public Health Service Food and Dug Administration, 1986. Chapter 10, p. 173-180. (FDA Technical Bulletin, 1).

KRAMER, A.; TWIGG, B. **Quality Control for the Food Industry,** 3rd ed., Westport, AVI, 1970. V.1, p.155-172.

NATIONAL CANNERS AND PROCESSORS. **Laboratory Manual for Food Canners and Processors,** 3rd ed., Westport, AVI, 1968. 336p, V. 1.

VASQUEZ, A.W. Hairs. IN: GORHAM, J.R. (Ed.). **Principles of Food Analysis for Filth, Decomposition and Foreign Matter.** Washington: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Food and Drug Administration, 1986. Chapter 9, p. 125-170. (FDA Technical Bulletin, 1).

YOKOMIZO, Y. Identificação e detecção de adulteração nos condimentos. **Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 12, p. 11-26, 1967.

ZIOBRO, G.C. (Ed.). Extraneous Materials: Isolation. IN: HORWITZ, W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 17th ed. Arlington: AOAC, 2000 Chap., 16, p. 1-76

BIBLIOGRAFIA PARA CONSULTA

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. approved methods of the AACC. **St. Paul. American Association of Cereal Chemists, Inc. 10th Ed. 2000. v1.**

GENTRY, J.W.; HARRIS, K.L.; GENTRY Jr., J.W. Microanalytical Entomology for Food Sanitation Control. **Florida. LithoGraphics Altamonte Springs. 1991. 2v.**

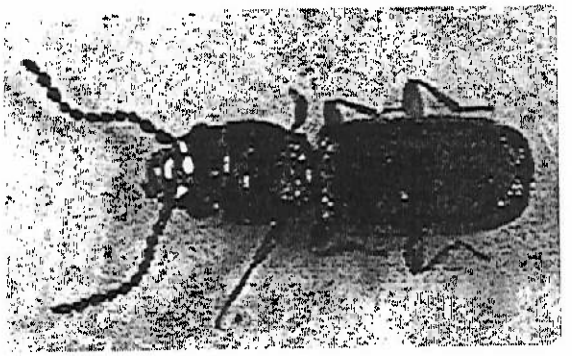
PEACE, D. McC.; GARDINER, M.A. Extraneous Matter in Foods: **Detection, Identification and Evaluation. Canada. Polyscience Publications Inc. 1990. 67p.**

PEACE, Mc. M.D. Key for identification of mandibles of stored-food insects. **Arlington: AOAC, 1985. 169p.**

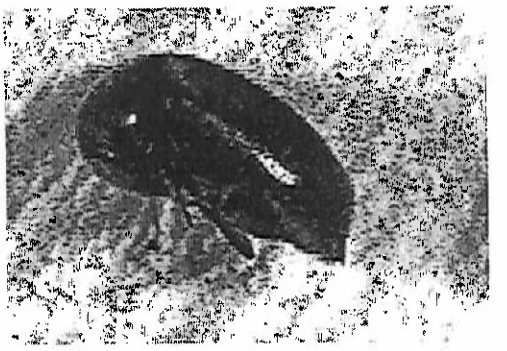
U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. The Food Defect Action Levels. **Levels of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans. Disponível em: <http//www.fda.gov>. Acesso em 06 set. 2000.**

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Technical Bulletin 5: macroanalytical procedures manual, 1984.** U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition. Eletronic Version **1998. Data de acesso 06/09/00. Disponível em: <http//www.fda.gov>. Acesso em 06 set. 2000.**

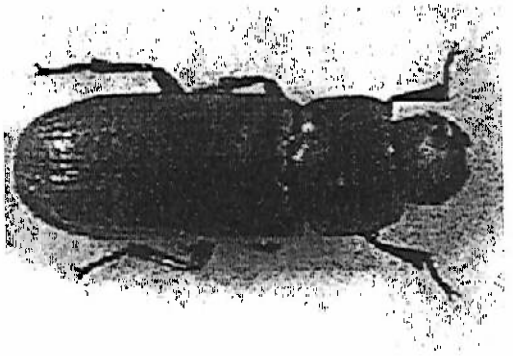
APÊNDICE



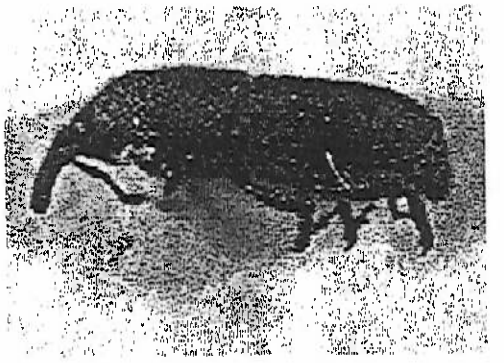
Cryptolestes sp.



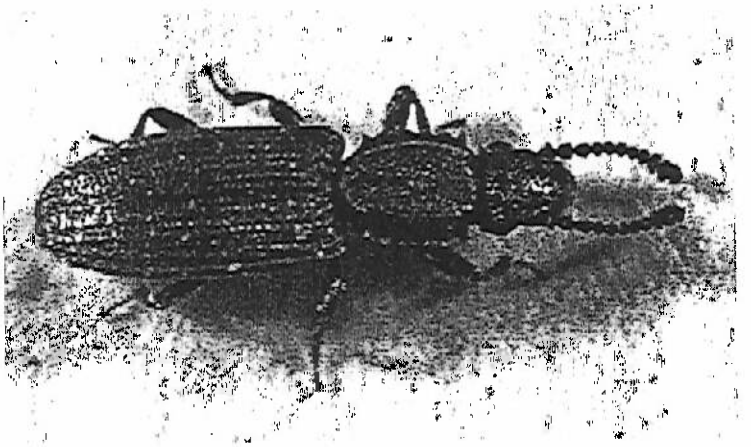
Lasioderma serricorne (Fabr.)



Tribolium sp.

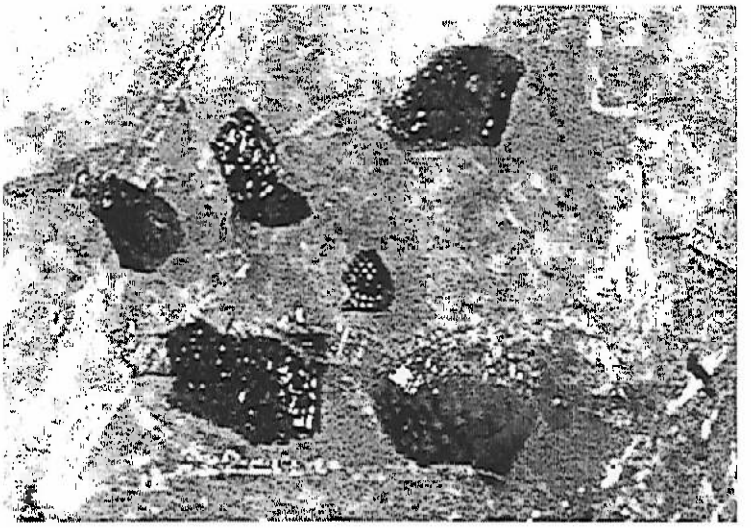


Sitophilus sp.

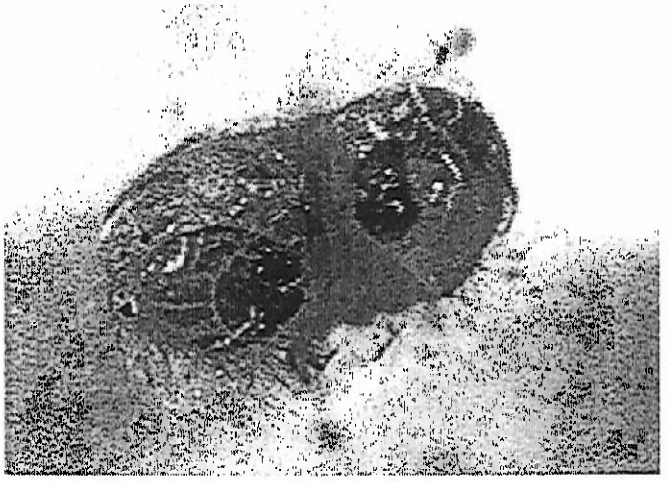


Oryzaephilus sp.

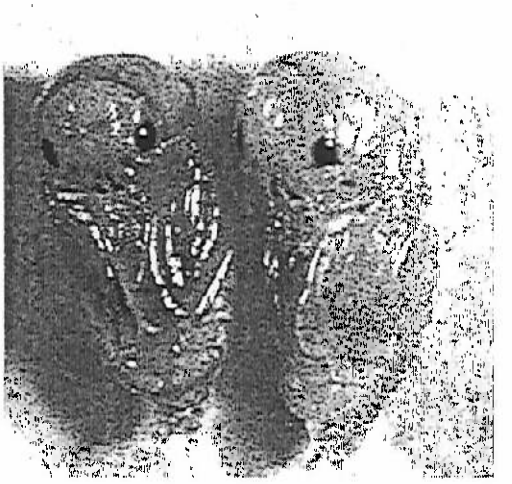
FIGURA 1. Coleópteros adultos.



Fragmentos de insetos

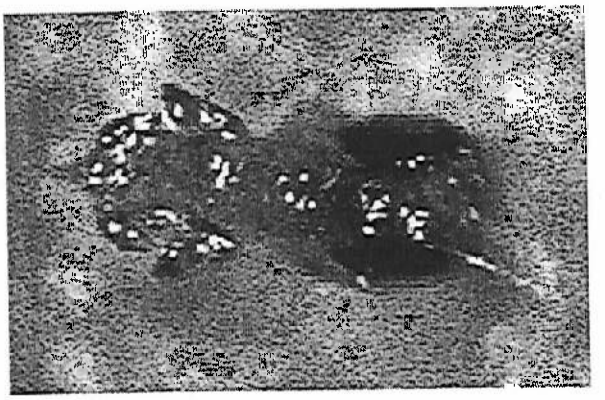


Araecerus fasciculatus (DeGeer) - larva



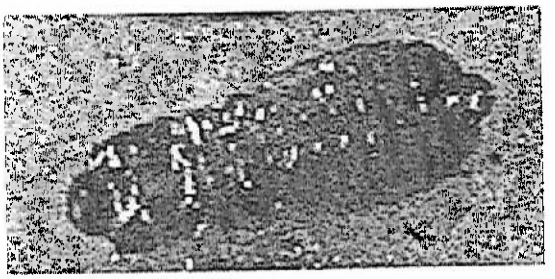
Lasioderma serricorne (Fabr.) - pupas

FIGURA 2. Fragmentos de insetos, larva e pupas.

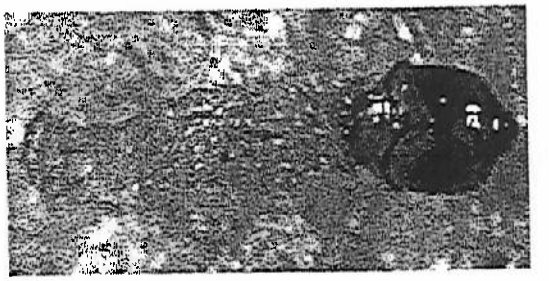


Ácaro

Pêlos de roedor

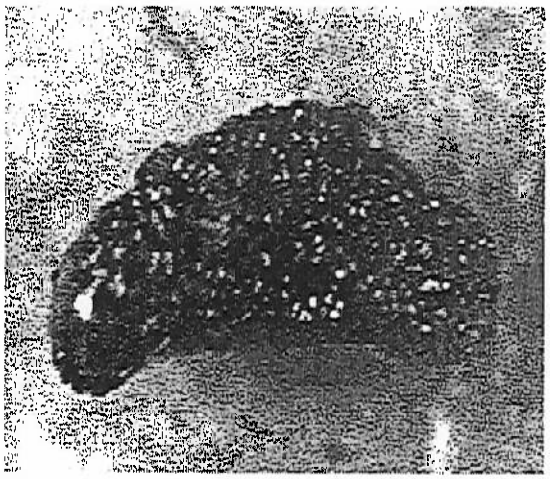


Larva

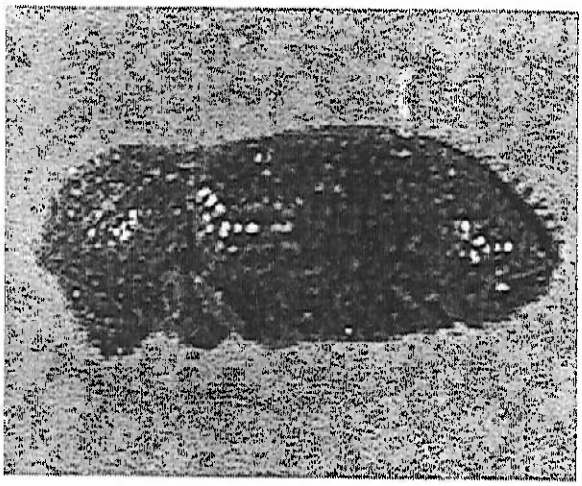


Larva

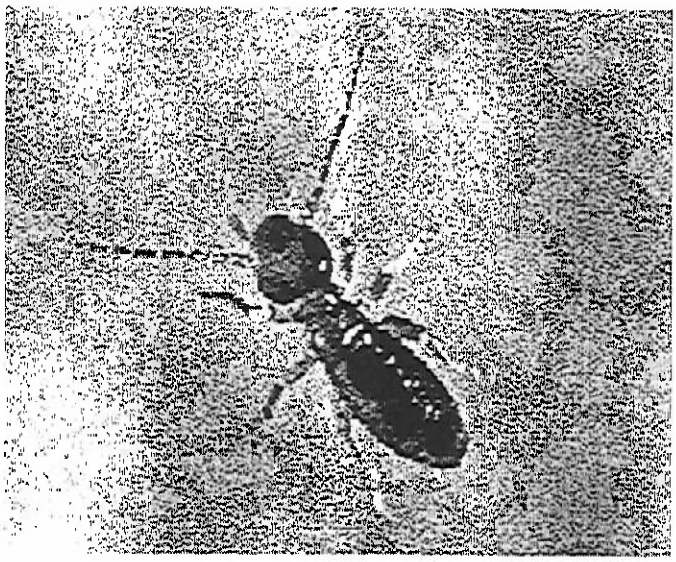
FIGURA 3. Sujidades encontradas em alimentos.



Hypothenemus hampei (Ferr) - larva

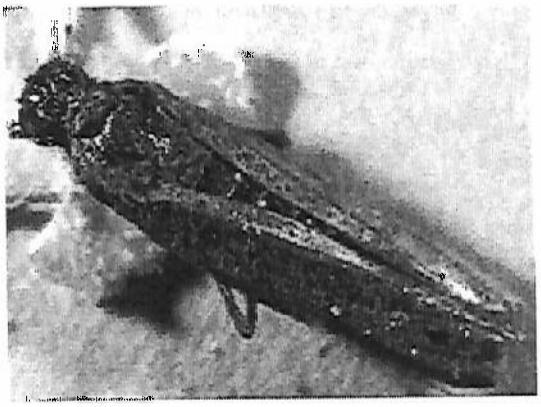


Hypothenemus hampei (Ferr.) - adulto

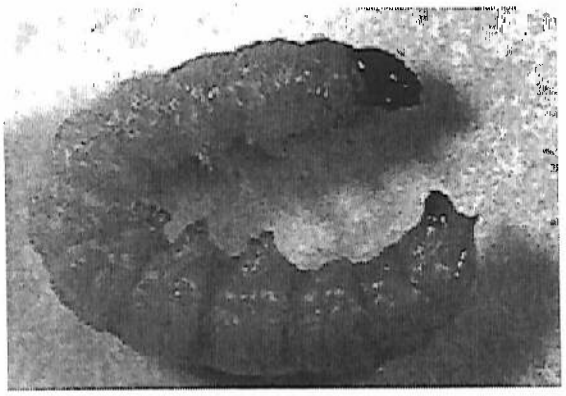


Liposcelides sp.

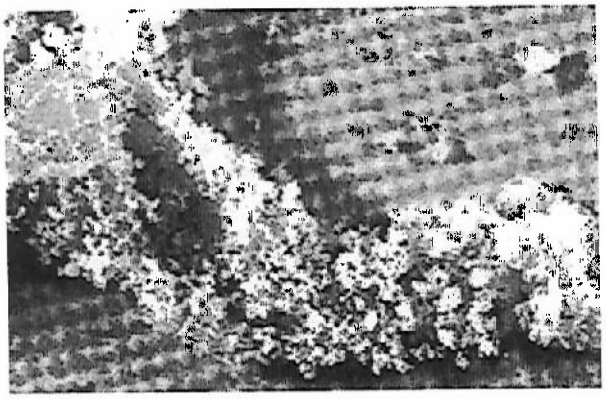
FIGURA 4. Broca do fruto do café – *H. hampei* - adulto e larva encontrados em café torrado e moído e *Liposcelides* sp. encontrado em café cru.



Lepidoptera - adulto



Plodia interpunctella (Hübner) - lagarta



Teia de Lepidoptera

FIGURA 5. Lepidoptera - adulto, lagarta e teia.

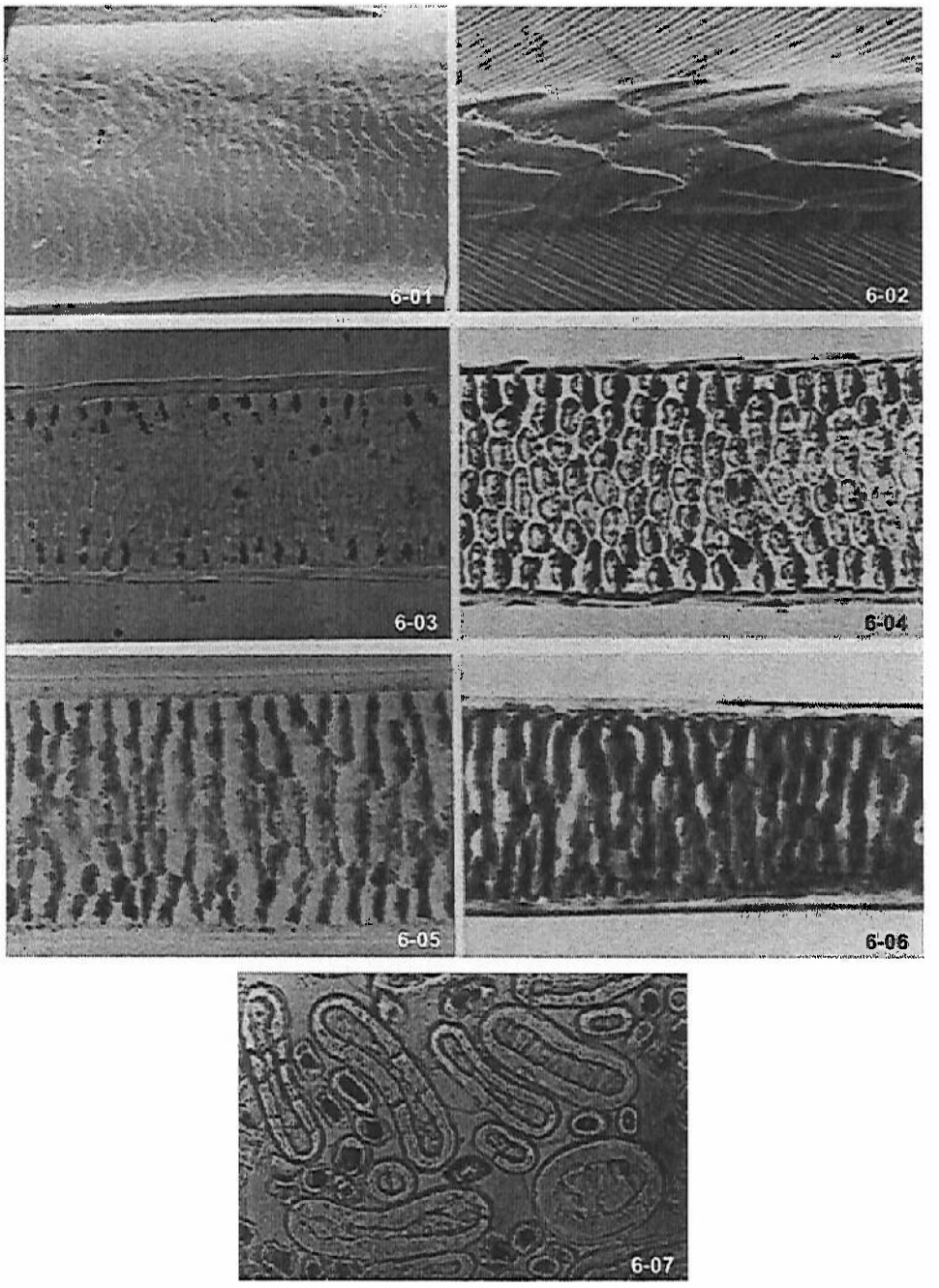


FIGURA 6-01. Pêlo de defesa de ratazana (*Rattus norvegicus*); escama de defesa padrão; **6-02.** Pêlo de defesa de ratazana; setas das escamas; **6-03.** Pêlo de defesa de ratazana; área mediana (salicilato de metila); **6-04.** Pêlo de defesa de ratazana; área mediana (água); **6-05.** Pêlo de defesa de ratazana; área distal de proteção (salicilato de metila); **6-06.** Pêlo de defesa de ratazana; área distal de proteção (água); **6-07.** Pêlos de defesa de ratazana; seções transversais de pêlos representativos.

Fonte: VAZQUES(1985).

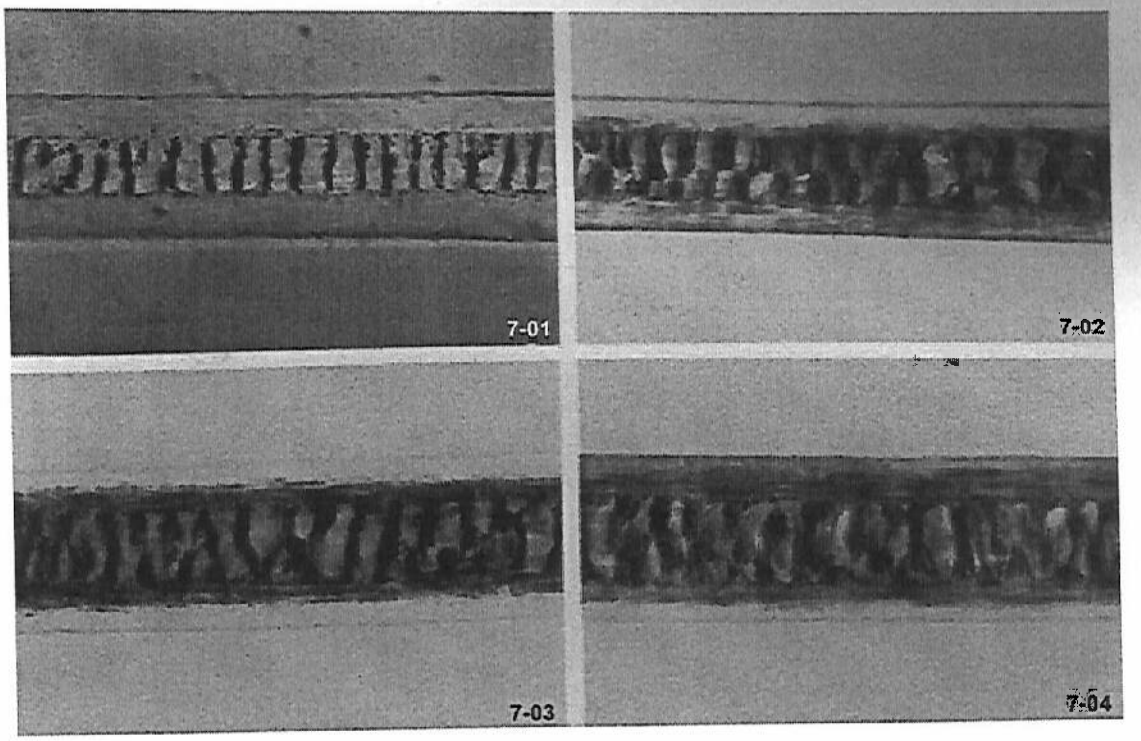


FIGURA 7-01. Pêlo de defesa de ratazana (*Rattus norvegicus*); porção proximal; (salicilato de metila); **7-02.** Pêlo de defesa de ratazana; porção proximal (água); **7-03.** Pêlo de defesa de ratazana; porção distal (salicilato de metila); **7-04.** Pêlo de defesa de ratazana; porção distal (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

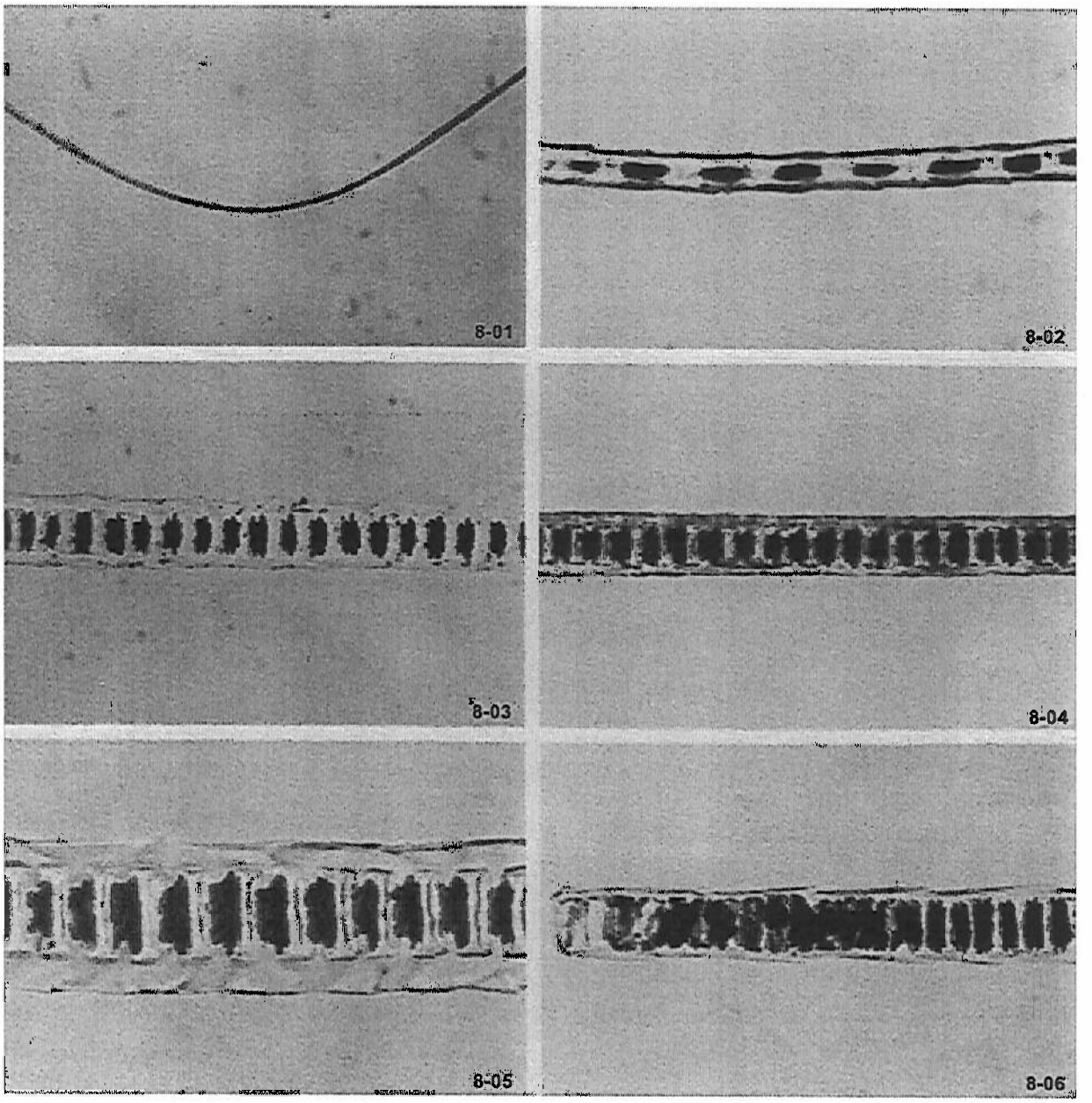


FIGURA 8-01. Pêlo de ratazana (*Rattus norvegicus*);constrição entre dois nódulos distais; (água); **8-02.** Pêlo de ratazana;estrutura medularde área comprimida; **8-03.** Pêlo de ratazana;nódulo subterminal; (salicilato de metila); **8-04.** Pêlo de ratazana;nódulo subterminal; (água); **8-05.** Pêlo de ratazana ;estrutura medular; (imersão em óleo); **8-06.** Pêlo de ratazana; área digerida sugerindo origem fecal do fragmento de pêlo.

Fonte: VAZQUES (1985).

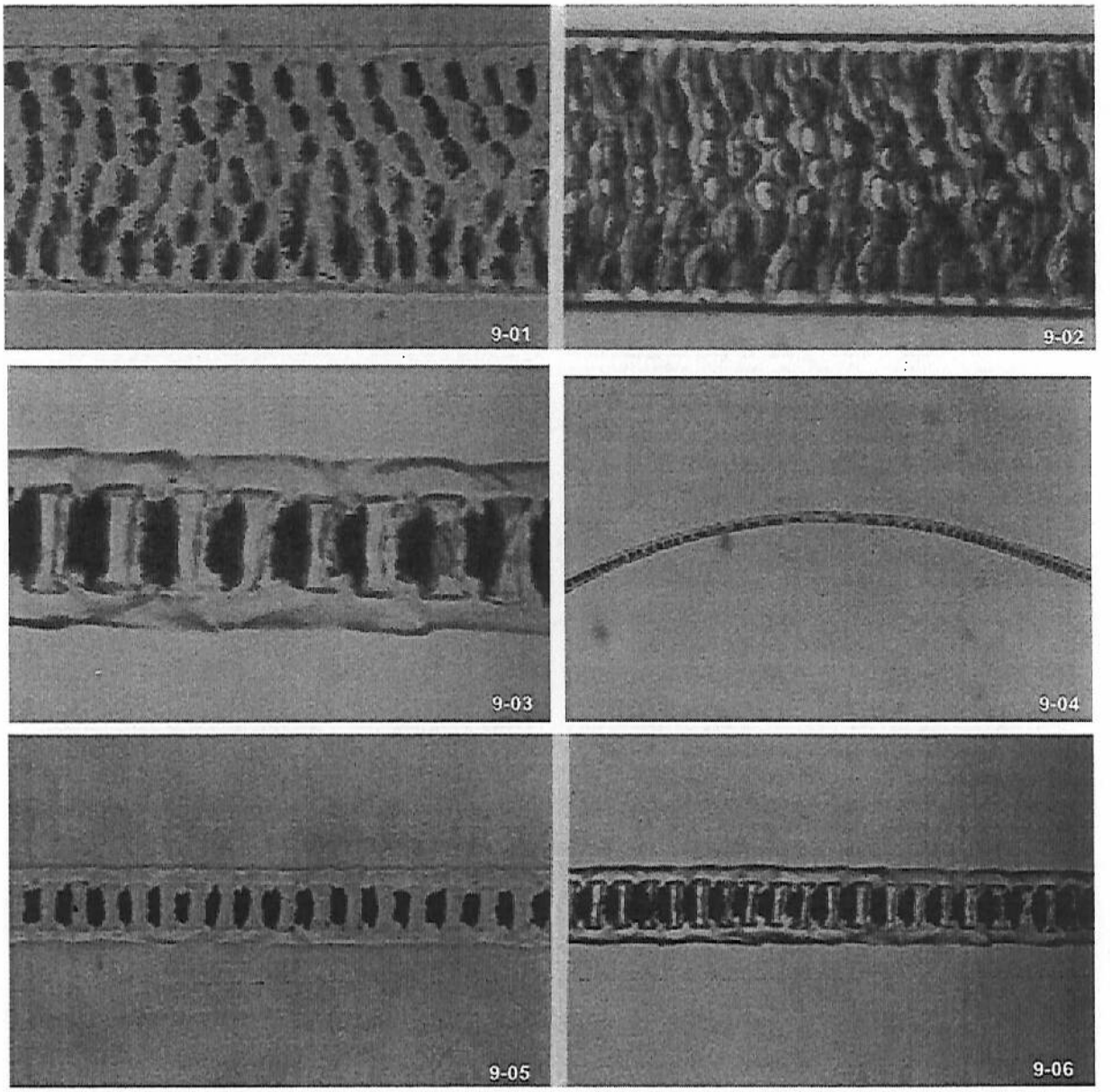


FIGURA 9-01. Pêlo de defesa de rato de telhado (*Rattus rattus*); área central; (salicilato de metila); **9-02.** Pêlo de defesa de rato de telhado; área central; (água); **9-03.** Pêlo de rato de telhado em grande aumento (água); **9-04.** Pêlo de rato de telhado; internódulo ou constrição entre dois nódulos distais; verifica-se a falta de célula medular à esquerda do centro; (salicilato de metila); **9-05.** Pêlo de rato de telhado; nódulo subterminal; (salicilato de metila); **9-06.** Pêlo de rato de telhado; nódulo subterminal; (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

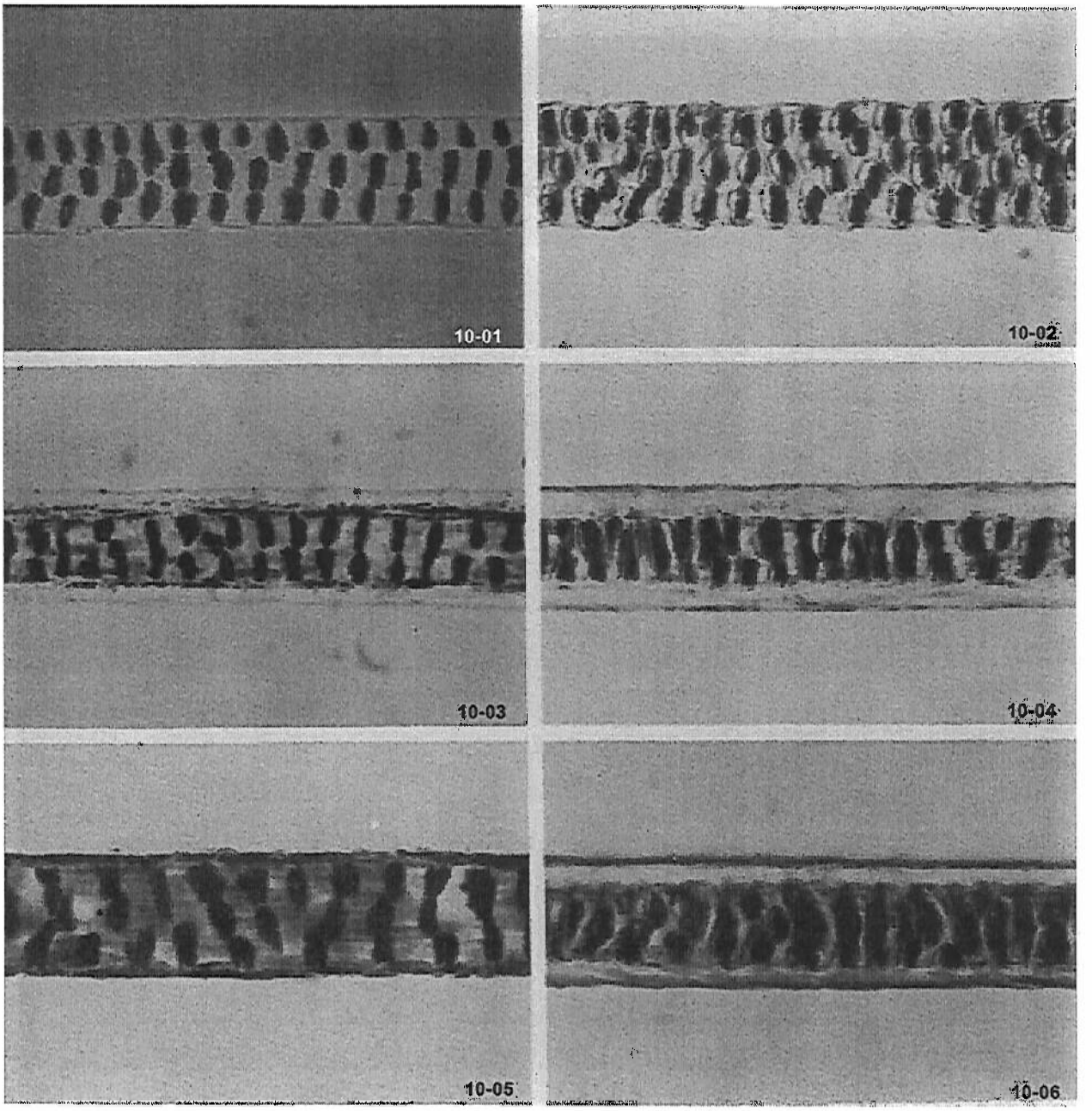


FIGURA 10-01. Pêlo de defesa de camundongo (*Mus musculus*); área central; (salicilato de metila); **10-02.** Pêlo de defesa de camundongo; área central; (água); **10-03.** Pêlo sensorial de camundongo; porção proximal; (salicilato de metila); **10-04.** Pêlo sensorial de camundongo; porção proximal; (água); **10-05.** Pêlo sensorial de camundongo; porção distal; (salicilato de metila); **10-06.** Pêlo sensorial de camundongo; porção distal; (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

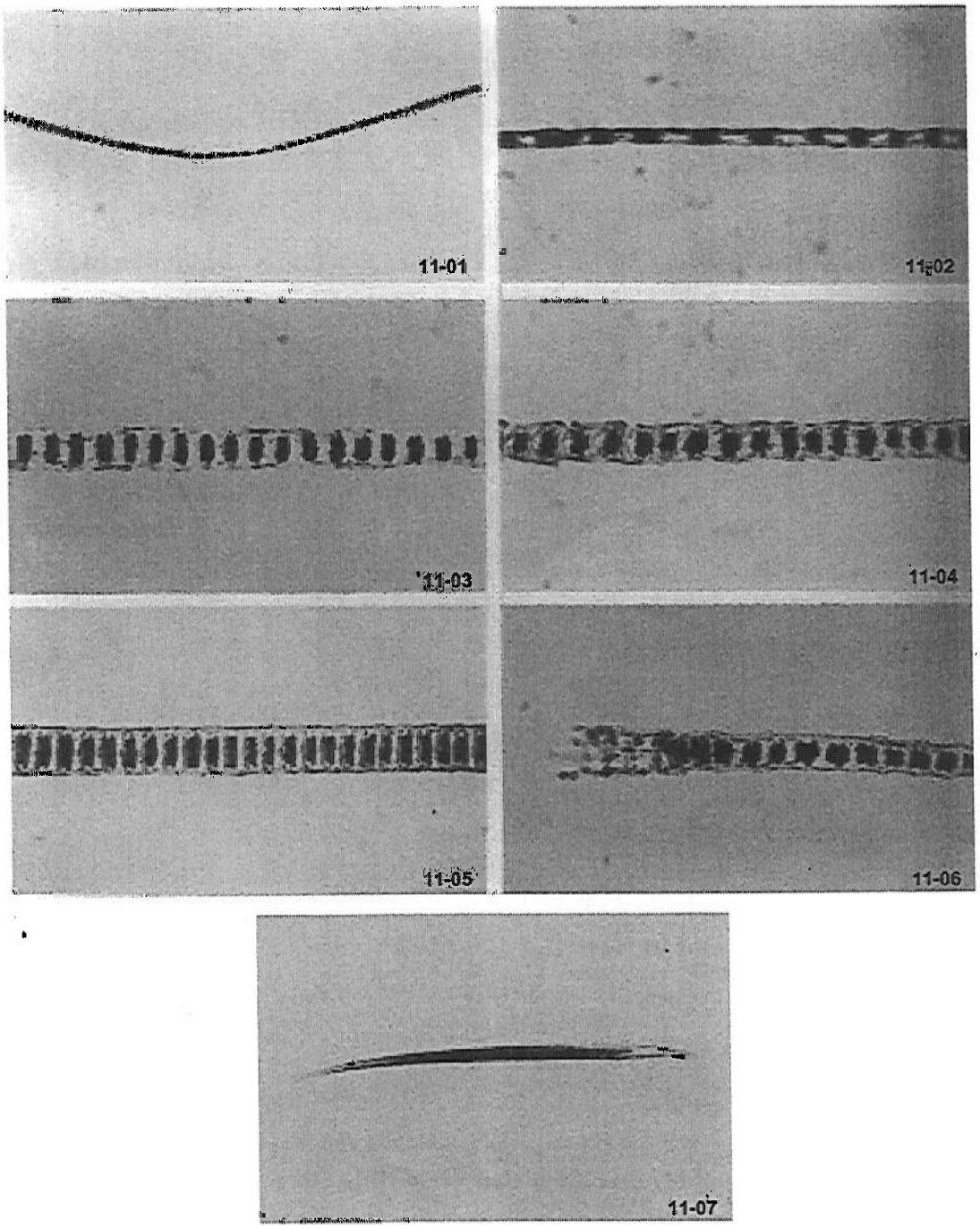


FIGURA 11-01. Pêlo de camundongo *(Mus musculus)*; constrição entre dois nódulos distais; (salicilato de metila); **11-02.** Pêlo de camundongo; estrutura medular de área constrita; (água); **11-03.** Pêlo de camundongo; nódulo subterminal; (salicilato de metila); **11-04.** Pêlo de camundongo; nódulo subterminal; (água); **11-05.** Pêlo de camundongo; notam-se as células medulares excepcionalmente extensas; (água); **11-06.** Pêlo de camundongo; área digerida; (água); **11-07.** Pêlo de pé de camundongo; (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

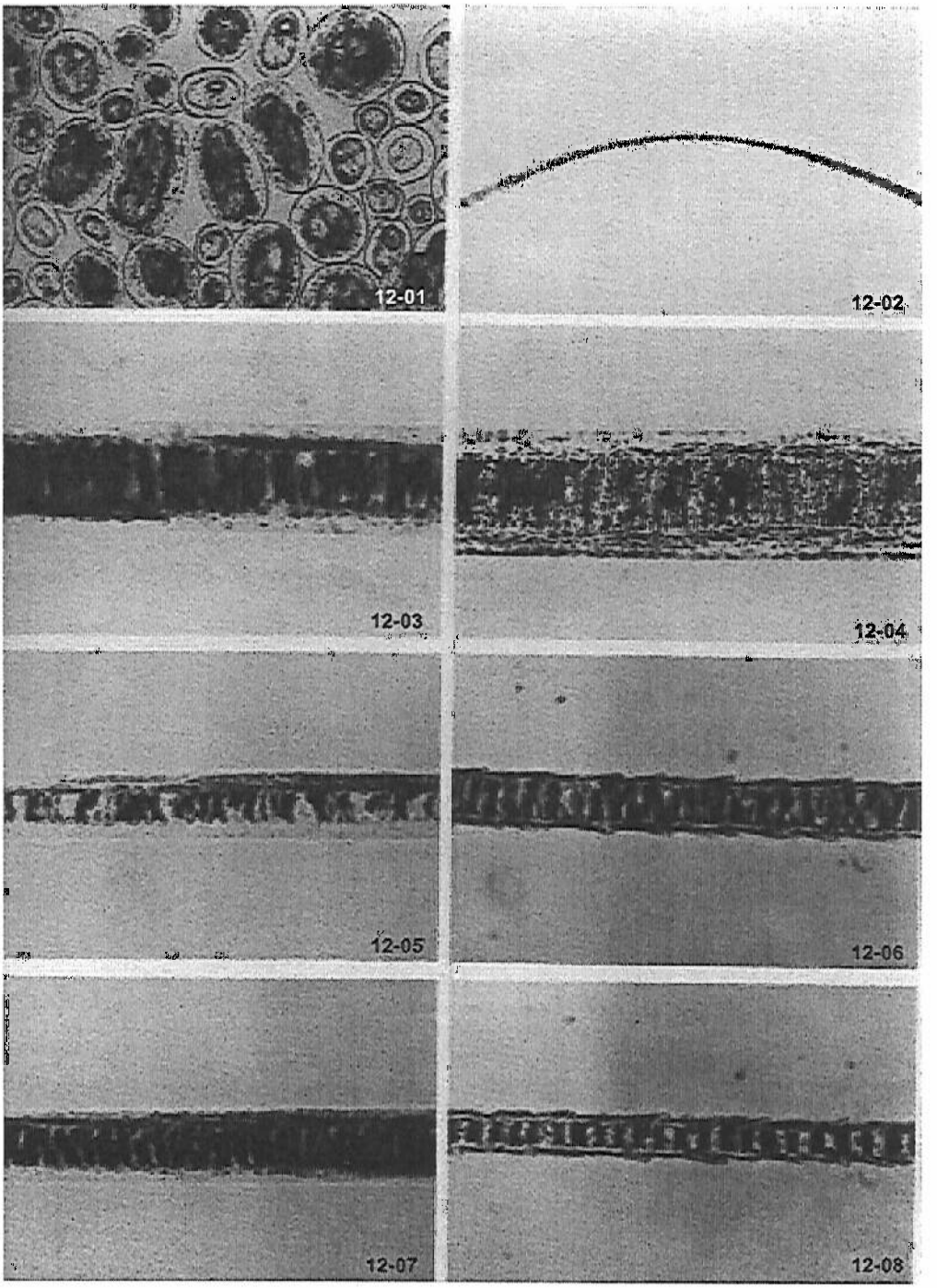


FIGURA 12-01. Pêlos de gato (*Felis catus*); seções transversais características; **12-02.** Pêlo de gato; constrições proeminentes como esta não são muito comuns; **12-03.** Pêlo de defesa de gato; (salicilato de metila); **12-04.** Pêlo de defesa de gato (água); **12-05.** Pêlo de gato; (salicilato de metila); **12-06.** Pêlo de gato; (água); **12-07.** Pêlo de gato; (salicilato de metila); **12-08.** Pêlo de gato; (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

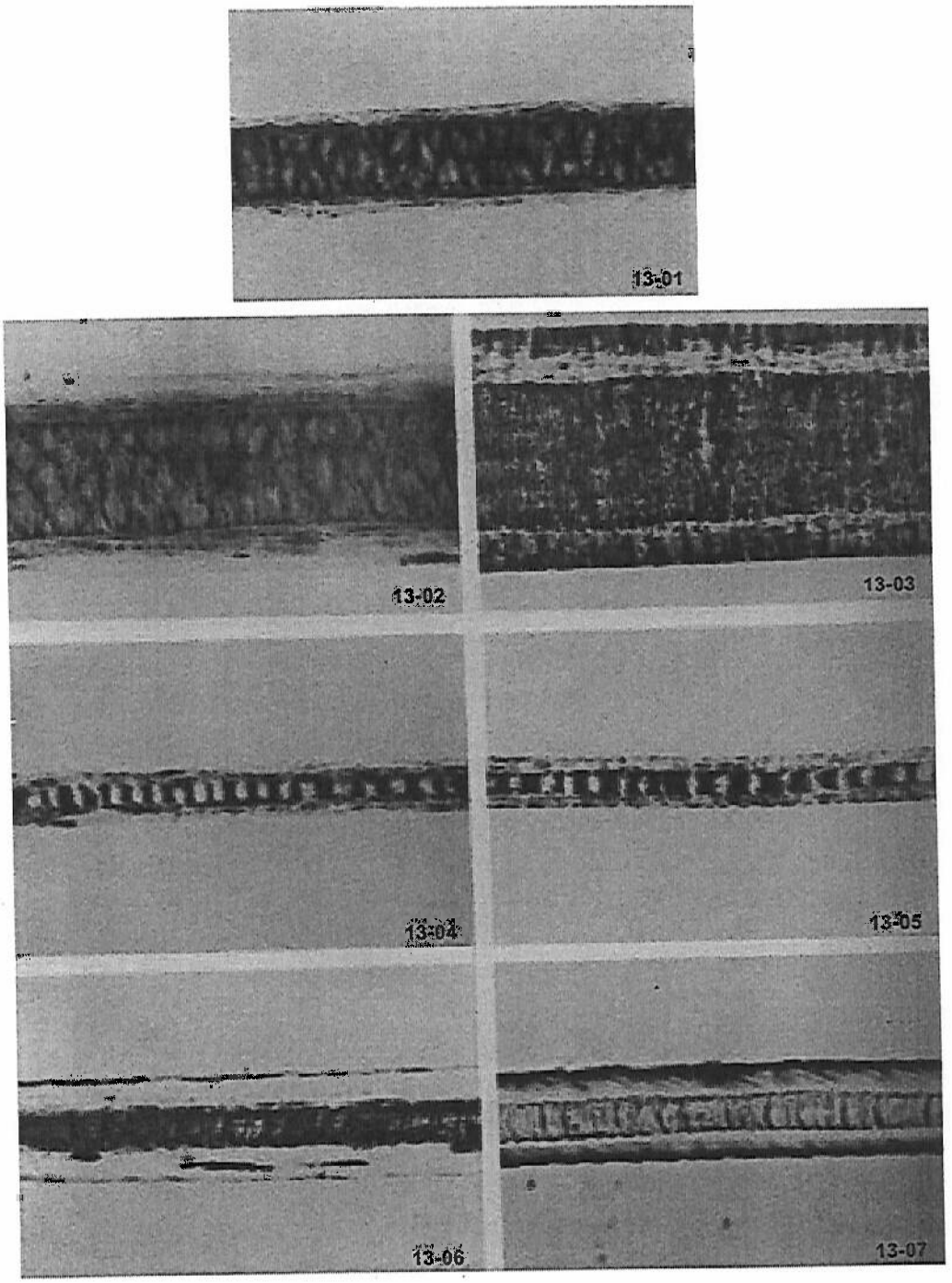


FIGURA 13-01. Pequeno pêlo de defesa de cão (*Canis familiaris*); (salicilato de metila); **13-02.** Pêlo de defesa de cão; notar vacúolos redondos proeminentes; (salicilato de metila); **13-03.** Pêlo de defesa de cão; notar lacuna lenticular próxima ao centro do pêlo (água); **13-04.** Pêlo de cão; (salicilato de metila); **13-05.** Pêlo de cão; (água); **13-06.** Pêlo de cão; notam-se grandes pigmentos corticais fusiformes agregados (água); **13-07.** Pêlo de cão; área levemente pigmentada; (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

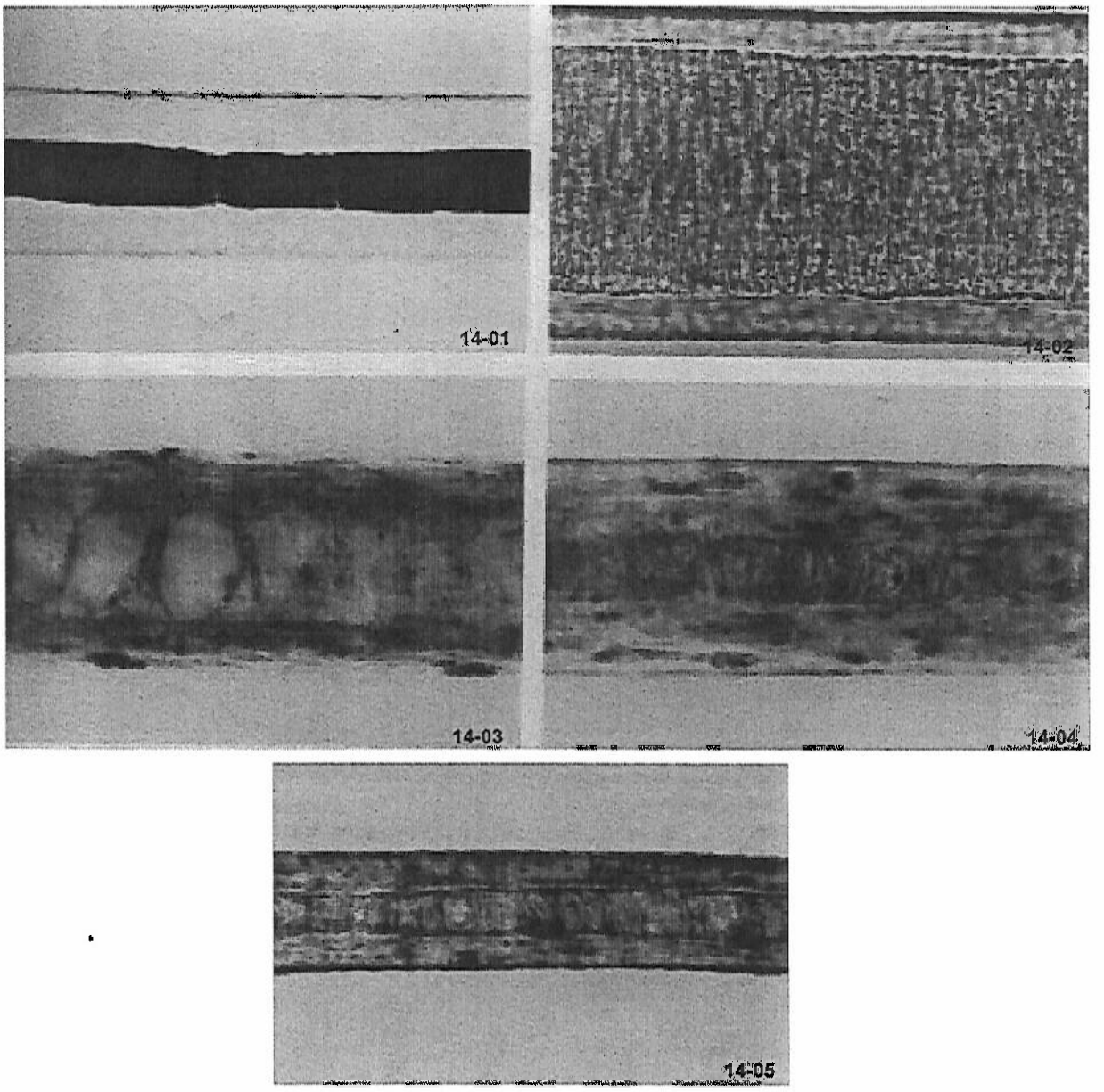


FIGURA 14-01. Pêlo de boi (*Bos taurus*) com medula cheia de ar mostrando sulcos de paredes lisas; **14-02.** Pêlo grande de boi; (água); **14-03.** Pêlo de boi mostrando grandes espaços abertos na medula; (salicilato de metila); **14-04.** Pêlo de boi de tamanho médio com muitos pigmentos ovóides grandes agregados ao córtex; (água); **14-05.** Pêlo fino de boi; (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

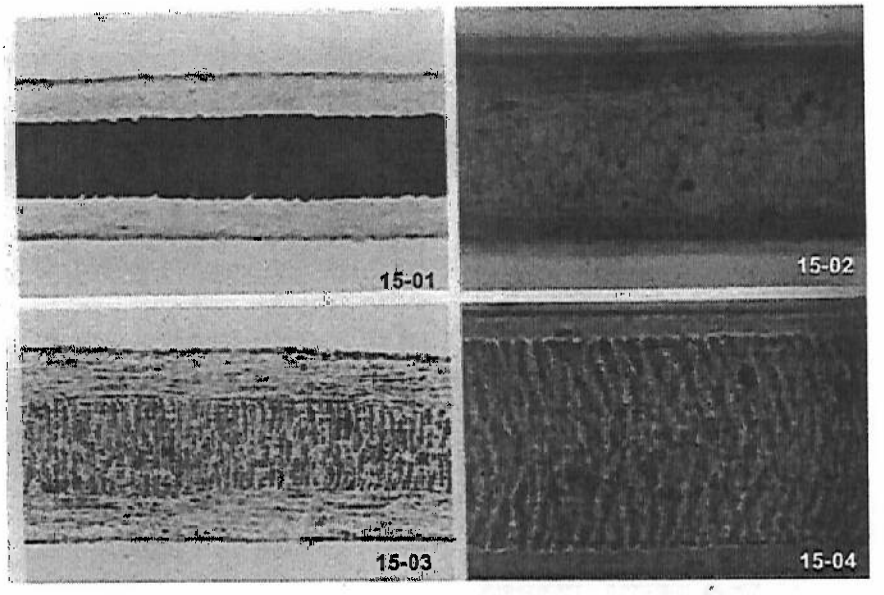


FIGURA 15-01. Pêlo de cabra (*Capra hircus*) com medula cheia de ar mostrando paredes serreadas conspícuas; **15-02.** Pêlo grosso de cabra; (salicilato de metila); **15-03.** Pêlo fino de cabra; (água); **15-04.** Pêlo grosso de cabra; (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

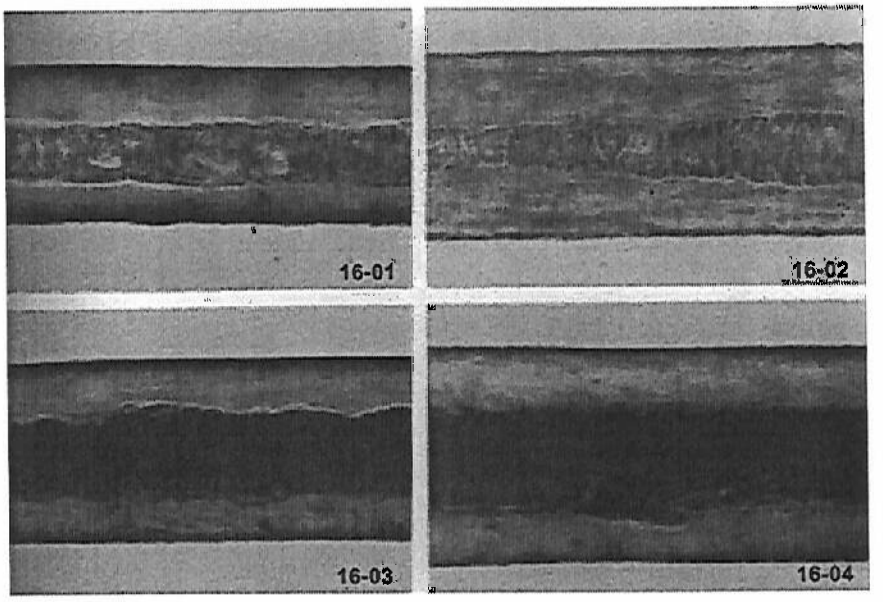


FIGURA 16-01. Pêlo de suíno (*Sus scrofa*); (água); **16-02.** Pêlo de suíno; (água); **16-03.** Pêlo de suíno; (salicilato de metila); **16-04.** Pêlo de suíno; notar evaginação da medula na forma de dedo; (salicilato de metila).

Fonte: VAZQUES (1985).

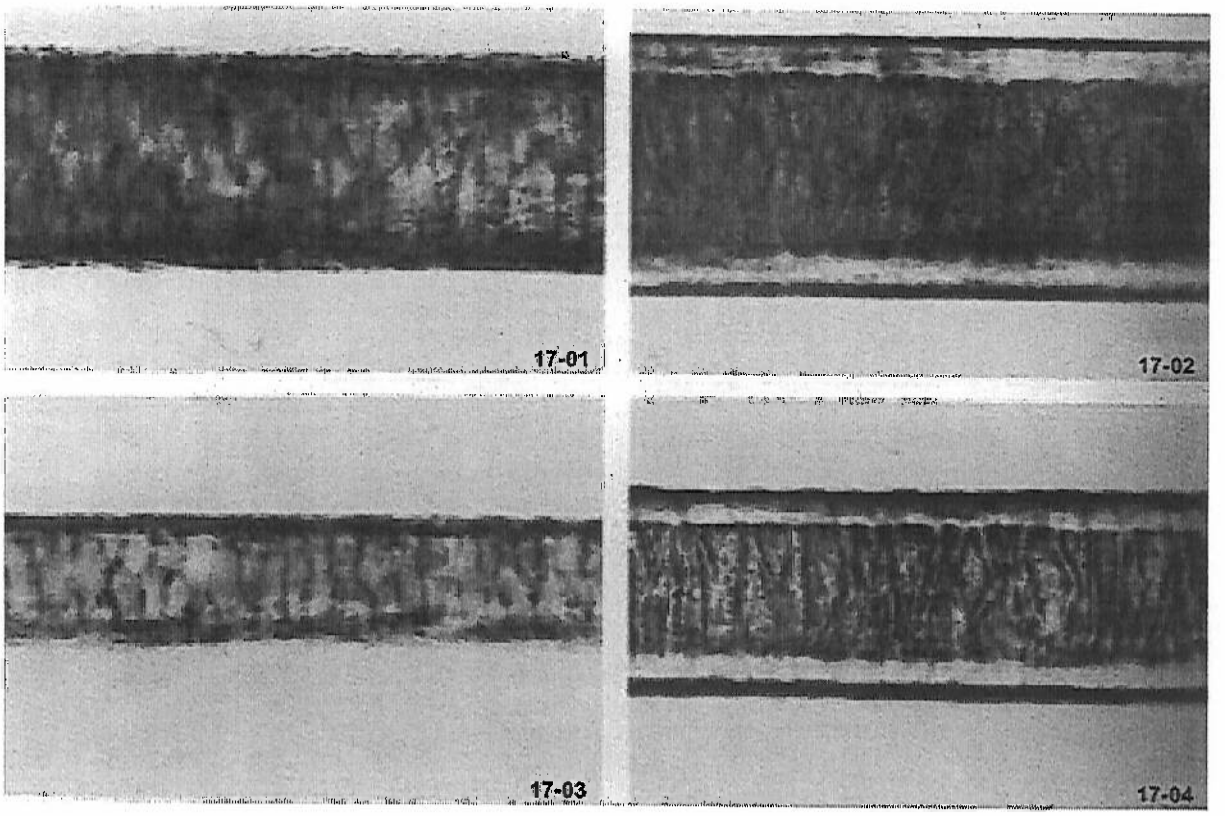


FIGURA 17-01. Pêlo grosso de cavalo (*Equus caballus*); (salicilato de metila); **17-02.** Pêlo grosso de cavalo; (água); **17-03.** Pêlo fino de cavalo; (salicilato de metila); **17-04.** Pêlo fino de cavalo; (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

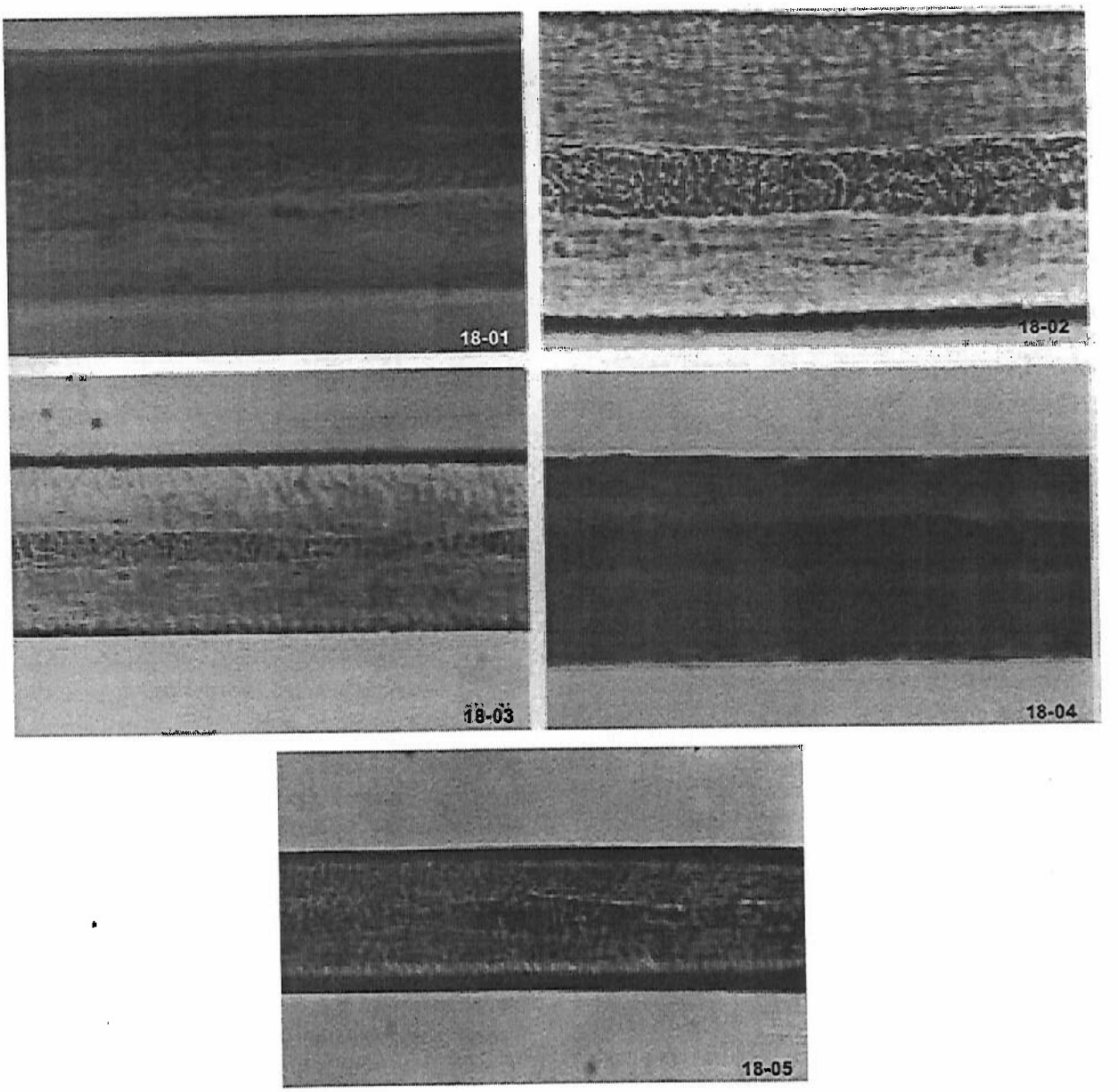


FIGURA 18-01. Pêlo de barba humana mostrando duas matizes de distribuição pigmentar; cutícula espessa com escamas justapostas visíveis, na parte superior da figura; (salicilato de metila); **18-02.** Cabelo humano; (água); **18-03.** Cabelo humano loiro mostrando fuso cortical; pequena mancha fusiforme alongada próxima à medula; (água); **18-04.** Pêlo pubiano mostrando cutícula espessa, ampla medula nodosa e pigmentação irregular; (salicilato de metila); **18-05.** Cabelo humano castanho com medula fragmentária; (água).

Fonte: VAZQUES (1985).

REALIZAÇÃO

APOIO

ISBN 85-7029-043-8
9 788570 290434

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO