

Análise de Alimentos II

Capítulo 1: Aspectos gerais

Profª Drª Rosemary Aparecida de Carvalho



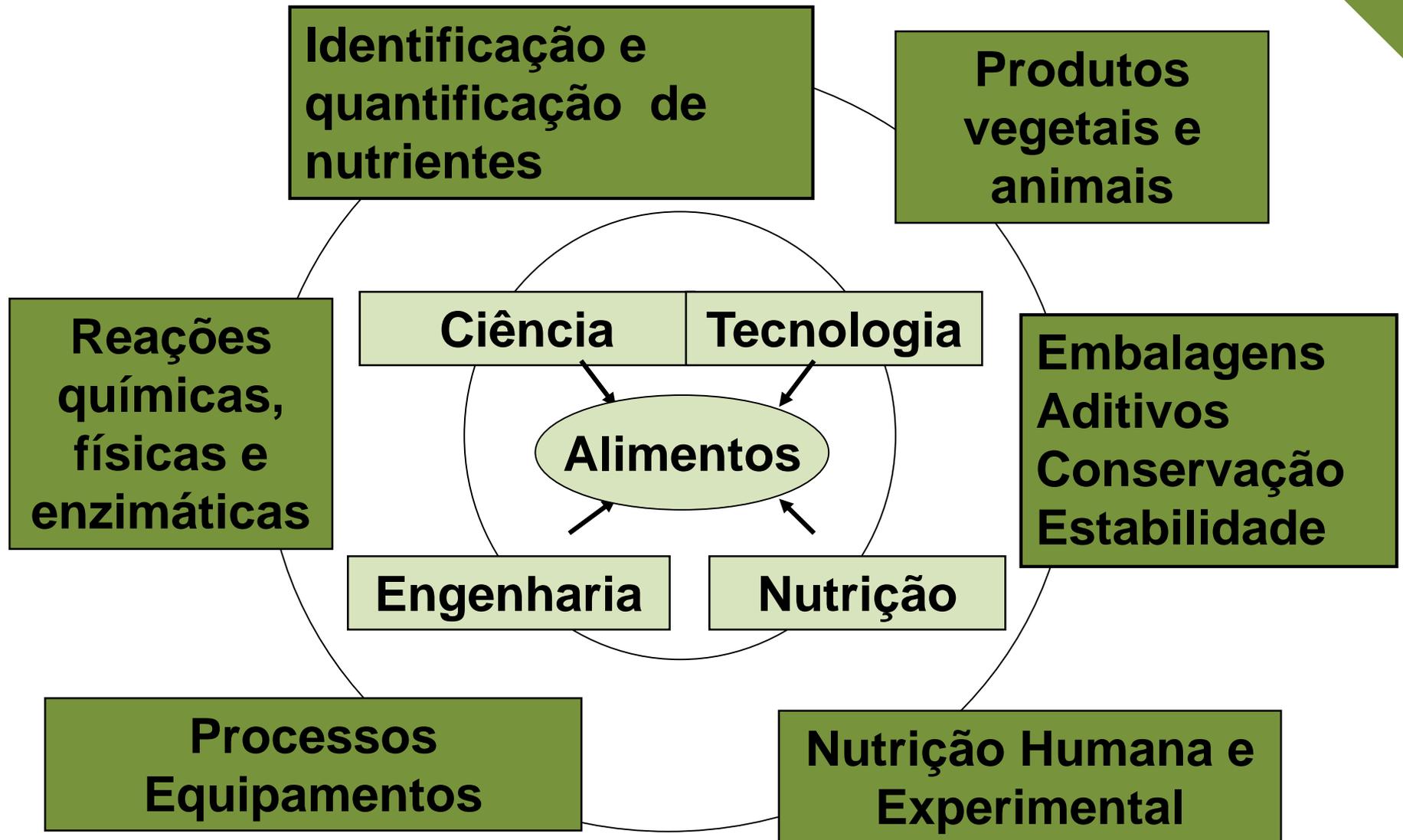
Pirassununga/SP

Visão geral

➔ Análise de alimentos II ↔ Análise Química Analítica

- Envolve: separação, identificação e quantificação de componentes de uma amostra.
- Desenvolvimento de métodos: determinação da composição química de materiais (amostras) e estudo da teoria envolvida.

Análise de Alimentos

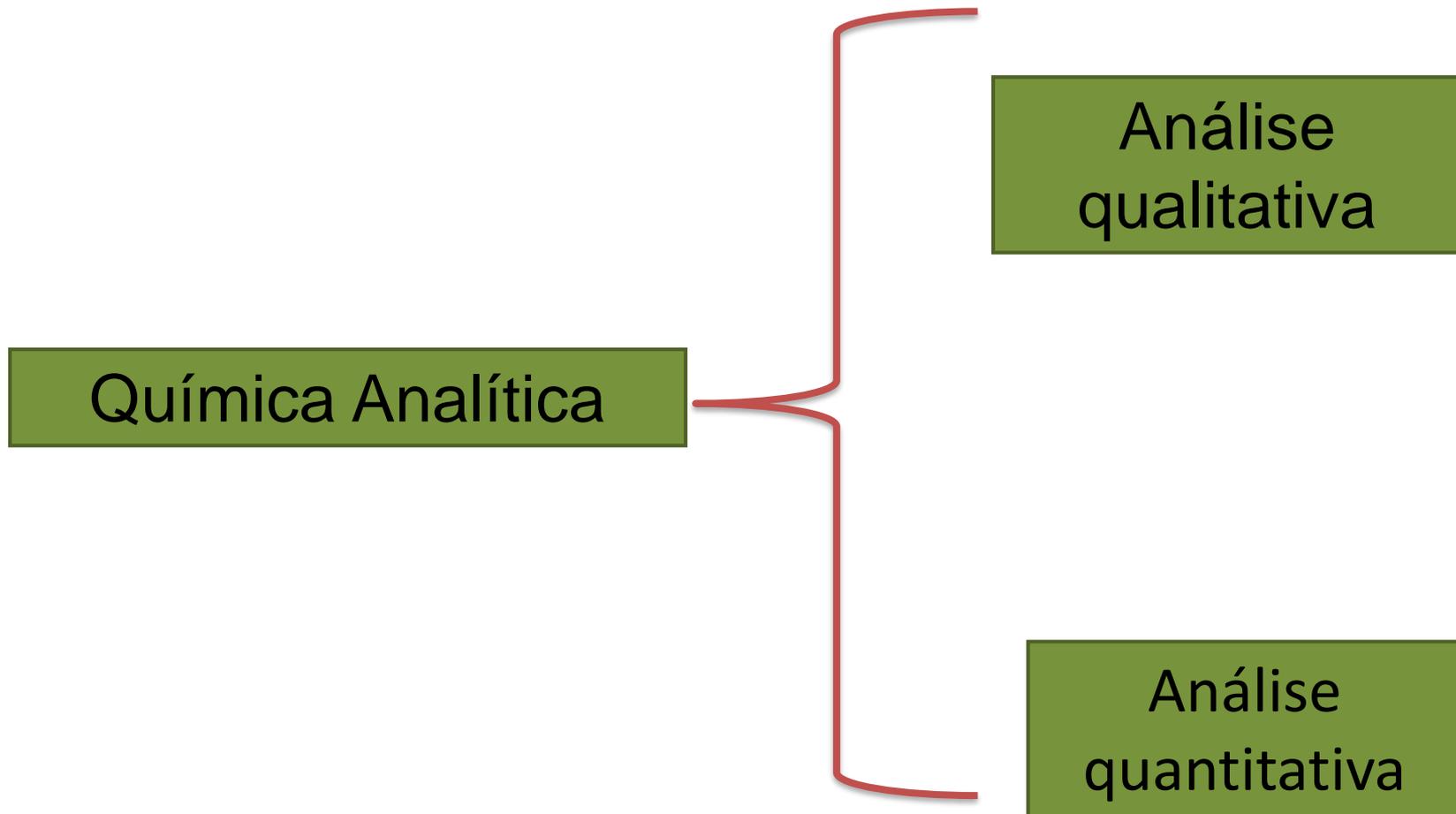




Aplicações

- Controle de qualidade (fabricação e estocagem do alimento processado).
- Caracterização de alimentos *in natura*: alimentos novos e desconhecidos
- Pesquisa de novas metodologias analíticas.
- Pesquisa de novos produtos.
- Controle de qualidade dos produtos existentes.

Tipos de análise





Tipos de análise

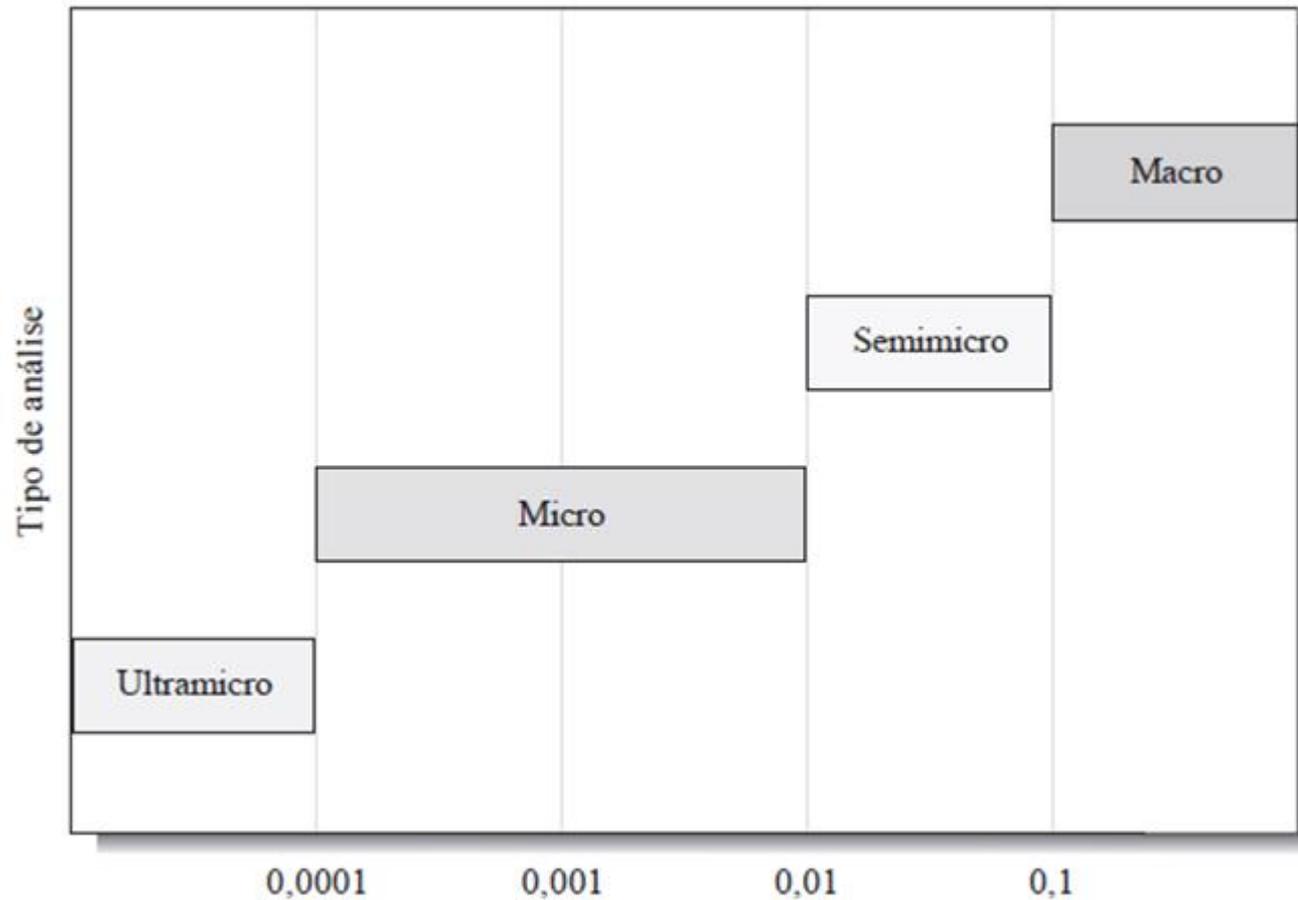
Exercício extra sala

Análise
qualitativa

Análise
quantitativa

- Procurar em artigos científicos ou análises de rotina em indústrias
- Preparar um slide por grupo – contendo referências utilizadas
- Será escolhido um membro do grupo para apresentação

Análises classificadas de acordo com a dimensão da amostra



Análises classificadas de acordo com a concentração do analito

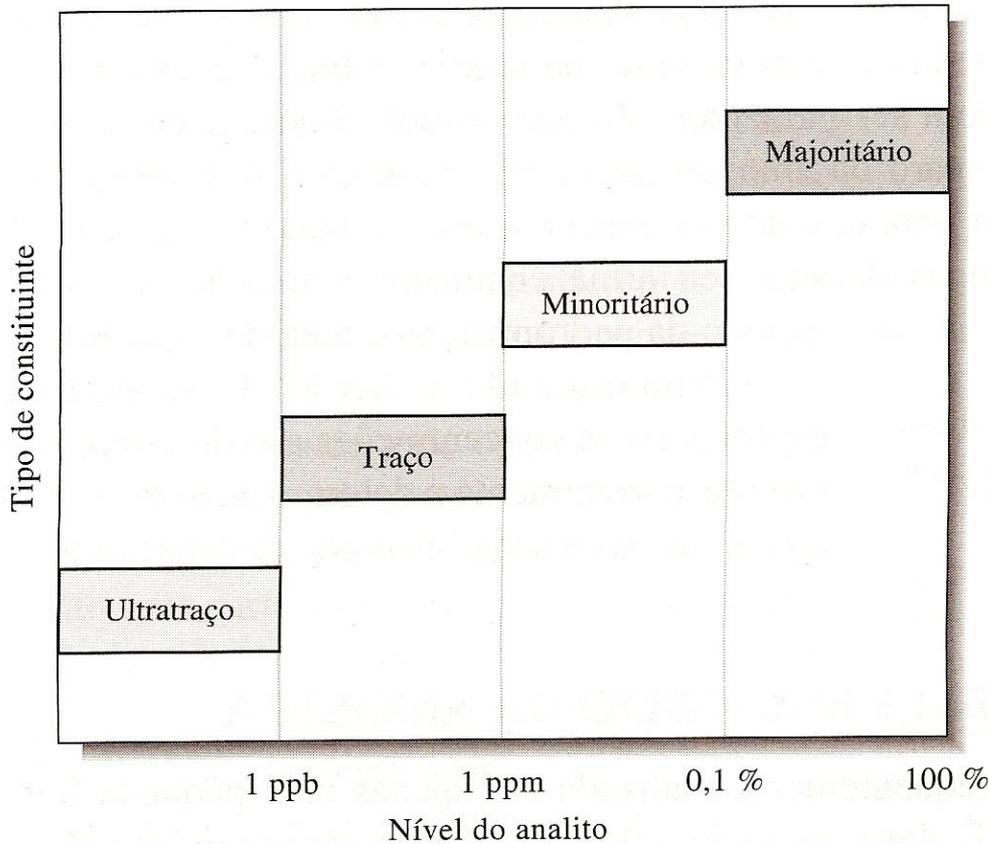


Tabela 3. Deposição de resíduos de aflatoxina, no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá, alimentados por 45 dias no experimento I, e por 35 dias no experimento II, com rações com diferentes concentrações (ppb kg^{-1} de ração) de um pool de aflatoxinas.

Tecido analisado	Resíduo de aflatoxina B1 (ppb kg^{-1} de tecido)			
	Experimento I			
	0	41	90	204
Fígado	Nd	Nd	Nd	Nd
Carcaça	Nd	Nd	1,0	6,1
	Experimento II			
	0	350	757	1.177
Fígado	Nd	1,6	4,0	12,9
Carcaça	Nd	1,8	3,1	6,7

(1) Não detectado.

Fonte: LOPES et al., 2005.

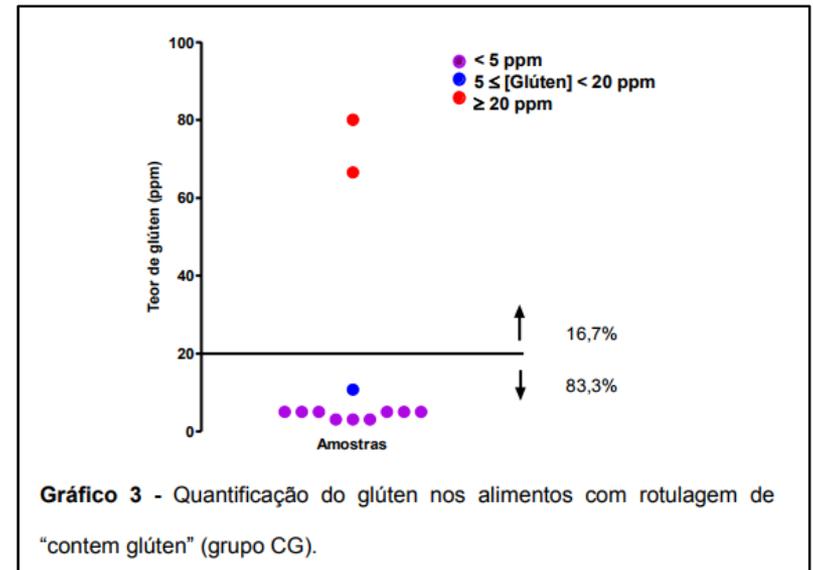
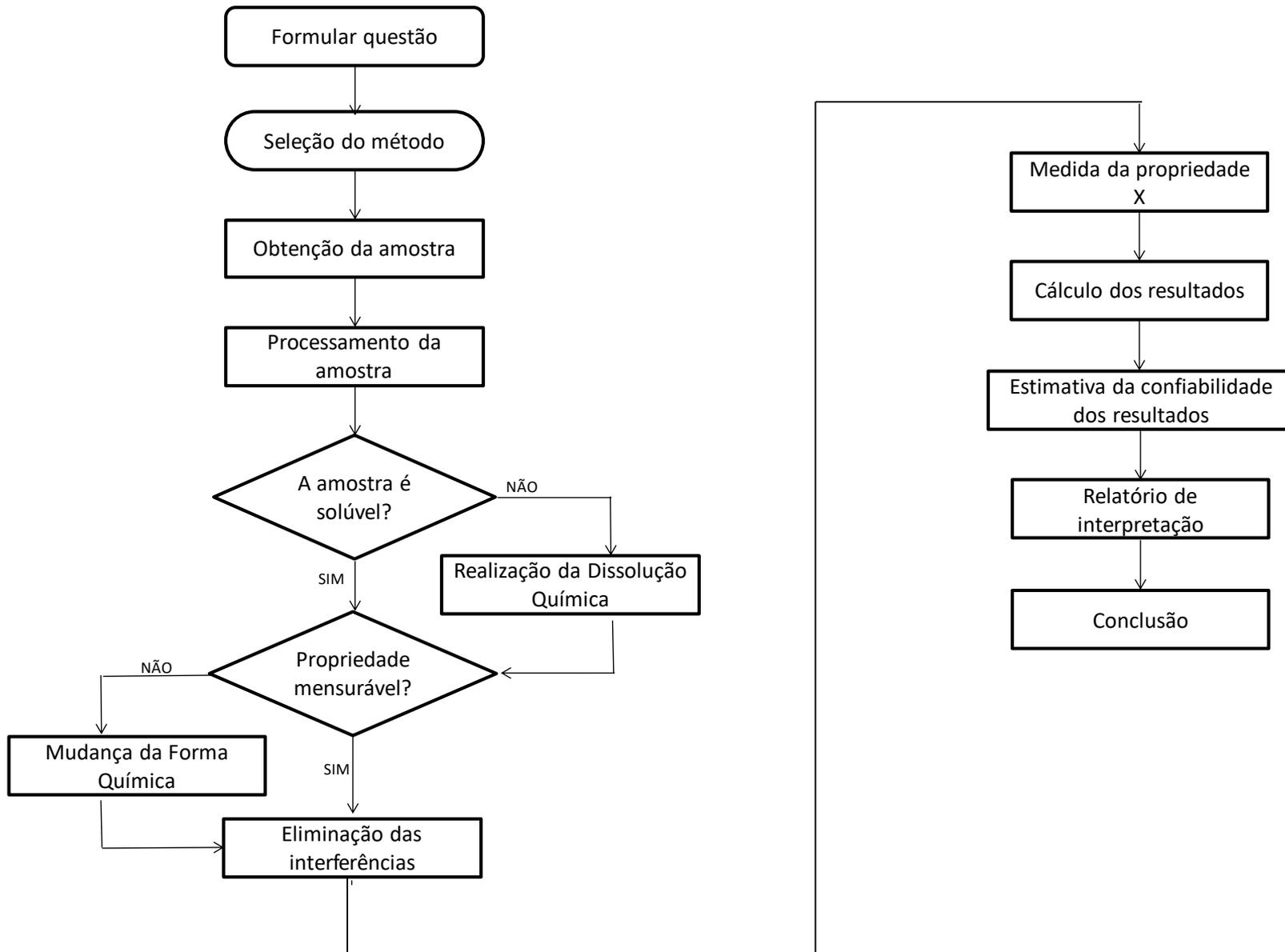


Gráfico 3 - Quantificação do glúten nos alimentos com rotulagem de "contem glúten" (grupo CG).

Fonte: SILVA, 2010.

Etapas gerais em uma análise química



Formular a questão

Propriedades Físicas



<http://envolverde.cartacapital.com.br/onu-e-governos-combatem-ingestao-de-sodio-e-alimentos-processados/>

Análises Químicas



Concentração de ferro



Concentração de sódio



Concentração de vitaminas



Concentração de proteínas



<http://envolverde.cartacapital.com.br/onu-e-governos-combatem-ingestao-de-sodio-e-alimentos-processados/>



<http://envolverde.cartacapital.com.br/onu-e-governos-combatem-ingestao-de-sodio-e-alimentos-processados/>

Selecionar procedimentos analíticos

1. Quantidade de amostra disponível:

Classificação para os métodos analíticos de acordo com o tamanho da amostra:

Classificação	Tamanho da amostra	Tipo de métodos
Macro	$\geq 0,1$ g	Convencionais
Meso (Semimicro)	10 – 100 mg	Instrumentais
Micro	1,0 – 10 mg	
Submicro	0,1 – 1 mg	
Ultramicro	$\leq 0,1$ mg	
Traços	100 a 10000 μm (ppm)	
Microtraços	10^{-7} – 10^{-4} μm	
Nanotraços	10^{-10} – 10^{-7} μm	

2. Quantidade do componente analisado:

Classificação dos componentes em relação ao peso total da amostra:

- Maiores: **>1%**
- Menores: **0,01 – 1%**
- Micro: **<0,01%**
- Traços: **(ppm e ppb)**

**Métodos
Convencionais**



gravimetria e
volumetria

**Métodos
Instrumentais**



equipamentos (pHmetro,
espectrofotômetro,
HPLC, GC, NIRs...)

3. Exatidão requerida:

Métodos clássicos: exatidão de até **99,9%** quando o analito encontra-se em mais de 10% na amostra.

Em quantidades <10% a exatidão cai significativamente, necessitando de **Métodos mais exatos e sofisticados.**

4. Composição química da amostra: presença de interferentes.

- Determinação de um componente predominante não oferece grandes dificuldades.
- Material de composição complexa necessidade de efetuar a separação dos interferentes potenciais antes da medida.

5. Recursos disponíveis: nem sempre é possível utilizar o melhor método:

\$ Custo

📄 Equipamento

🕒 Tempo

🗑 Reagente

👤 Pessoal especializado

6. Número de amostras a analisar:

Muitas amostras – pode-se escolher métodos que requerem operações mais demoradas e trabalhosas, como a calibração de equipamentos, montagem de aparelhos e a preparação de reagentes, pois o custo destas operações se distribui sobre o grande número de amostras a analisar;

Poucas amostras – são preferíveis os métodos analíticos que permitem reduzir ao mínimo os preparativos preliminares e o custo da análise, ainda que o mesmo seja mais trabalhoso.

Exemplo de metodologias padronizadas

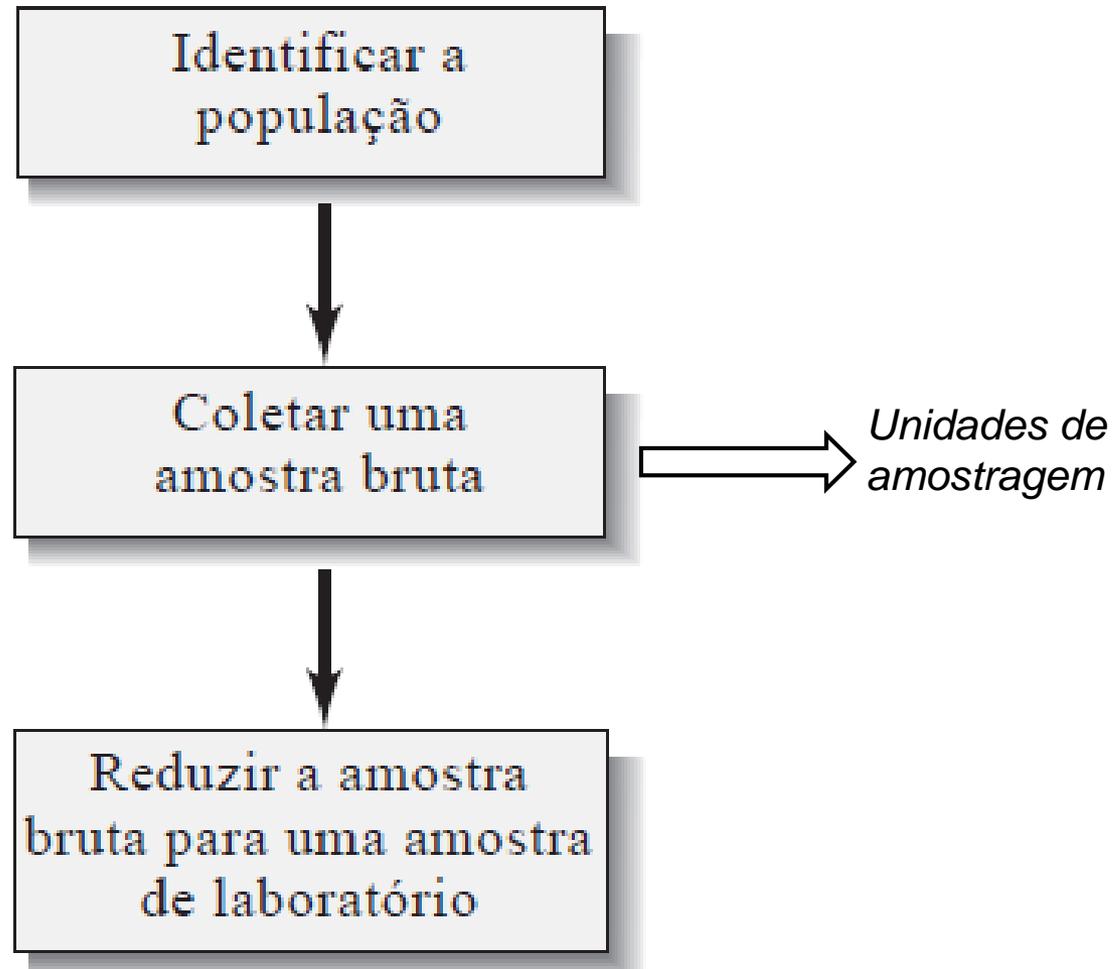
- AOAC (*Official Analytical Chemists International*): consiste no mais conhecidos e um dos mais completos *compendium* de análise de alimentos, o qual contém praticamente todo o tipo de análise (engloba produtos em geral) que se deseja realizar em alimentos;
- AACCC (*American Association of Cereal Chemists*): consiste no compendium específico de análise de cereais e seus subprodutos;
- AOCS (*American Oil Chemists' Society*): consiste no *compendium* específico de análise de óleos, gorduras e seus subprodutos;

- 
- Standart Methods for the Examination of Dairy Products: consiste no *compendium* específico de análise de leite e seus subprodutos;
 - Standart Methods for Examination of Water and Wastewater: consiste no *compendium* específico de análise de água e resíduos aquosos.
 - Instituto Adolfo Lutz
 - LANARA (Laboratório Nacional de Referência Animal)
 - Metodologias específicas descritas em Resoluções e Instruções Normativas (Ministério da Agricultura, Ministério da Saúde e ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária)

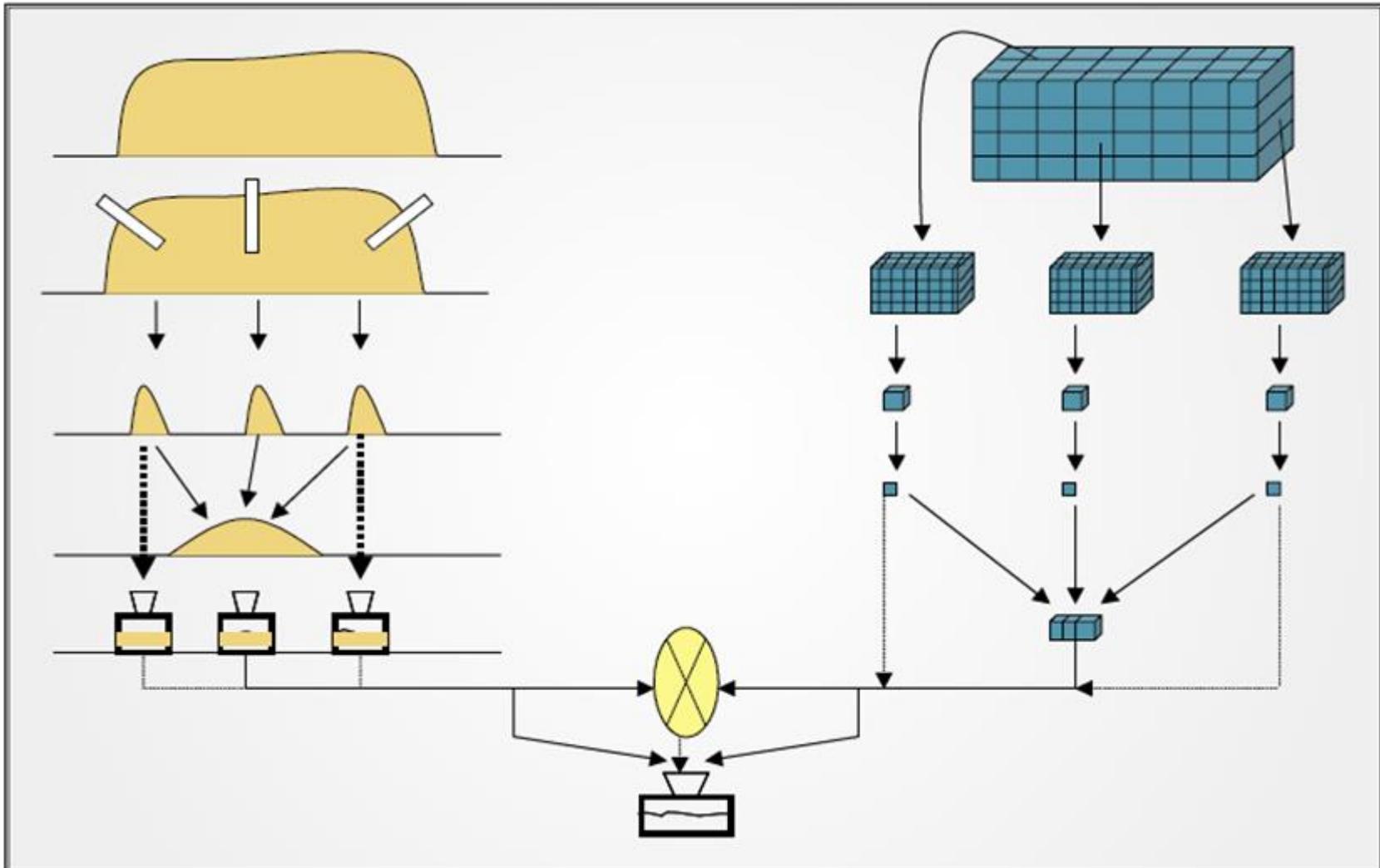
Amostragem

- Objetivo: coletar uma porção representativa para análise (uma imagem mais próxima do universo estudado);
- Simples ou complexa: certeza de que a amostra de laboratório é representativa do todo antes de realizar a análise”
- Etapa mais difícil e a fonte dos maiores erros. A confiabilidade dos resultados finais da análise nunca será maior que a confiabilidade da etapa de amostragem”

Amostragem



Amostragem



Preparação da Amostra

Exemplo 1: Determinação de carotenóides em amostra de abóbora



- Análise em espectrofotômetro (450 nm)
- Curva de calibração utilizando β -caroteno como padrão
- Resultados expressos em base seca (mg de β -caroteno /100 g de amostra)

Preparação da Amostra

Exemplo 2: Extração de capsaicina em pimenta chili

Extração em fase sólida

<https://www.youtube.com/watch?v=CYyDVZPaZng>

Relatório de Interpretação dos resultados

A obtenção de resultados analíticos confiáveis não representa o final da análise química: o objetivo da análise é sempre alcançar alguma interpretação ou decisão.

Importante: replicatas para análises químicas devem sempre ser realizadas.

Table 5
The antioxidant capacities of mango seed kernel obtained from different extraction and hydrolysis conditions.^A

Conditions	Antioxidant efficiency Ferric thiocyanate method ($1/AA_{50}$)	Antiradical activity DPPH ($A_{AK}, 1/EC_{50}$)	ABTS activity (mmol of trolox/g)
Shaking (method 1)	0.014 ± 0.000^a	1.75 ± 0.15^a	1.03 ± 0.02^a
Refluxing (method 2)	0.016 ± 0.000^b	2.00 ± 0.24^a	1.14 ± 0.02^b
Acid hydrolysis (method 3)	0.019 ± 0.000^c	4.16 ± 0.51^c	1.41 ± 0.01^c

Means of three replicates \pm SD (standard deviation).

In each column, different superscripts mean significant differences ($P < 0.05$) between conditions.

^A Dry weight basis of the original sample of plant parts.

Valor

\pm

Desvio Padrão

Erros analíticos

- Toda medida possui uma incerteza → Erro experimental
- Resultados podem ser expressos com alto ou baixo grau de confiança, mas nunca com completa certeza

Erros sistemáticos
(determinados)

Erros aleatórios
(indeterminados)

Erros sistemáticos ou determinados

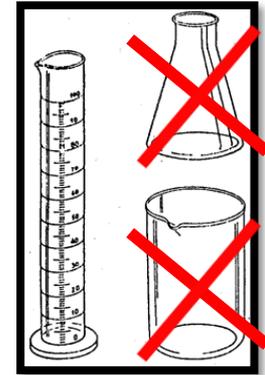
- Resultantes de desvios constantes nos resultados num mesmo sentido
- Podem ser: **DETERMINADOS, EVITADOS** ou **CORRIGIDOS**

Aditivos → Constantes qualquer que seja o valor medido
Proporcionais → Proporcionais ao valor medido

Erros sistemáticos

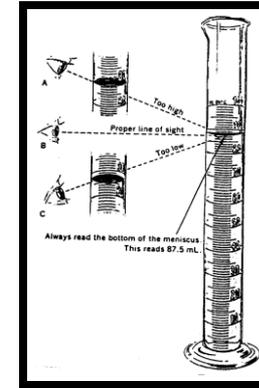
Erro do Método

Reações incompletas e/ou paralelas
Co-precipitação
Indicador



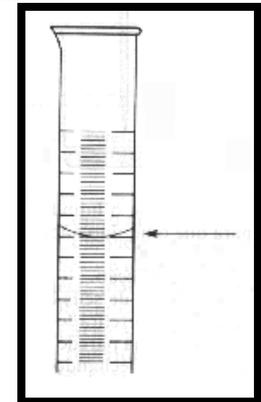
Erros operacionais e pessoais

Técnica correta e experiência do analista minimizam



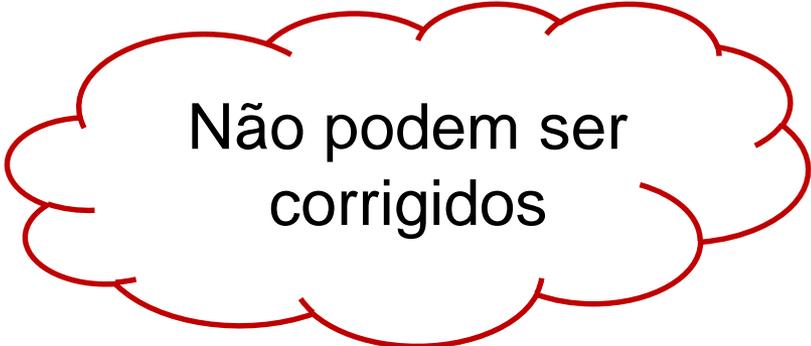
Erros Instrumentais e erros de reagentes

Falhas nos equipamentos e vidraria volumétrica
Equipamentos não calibrados ou com calibração imprópria
Reagente com impurezas



Erros aleatórios ou indeterminados

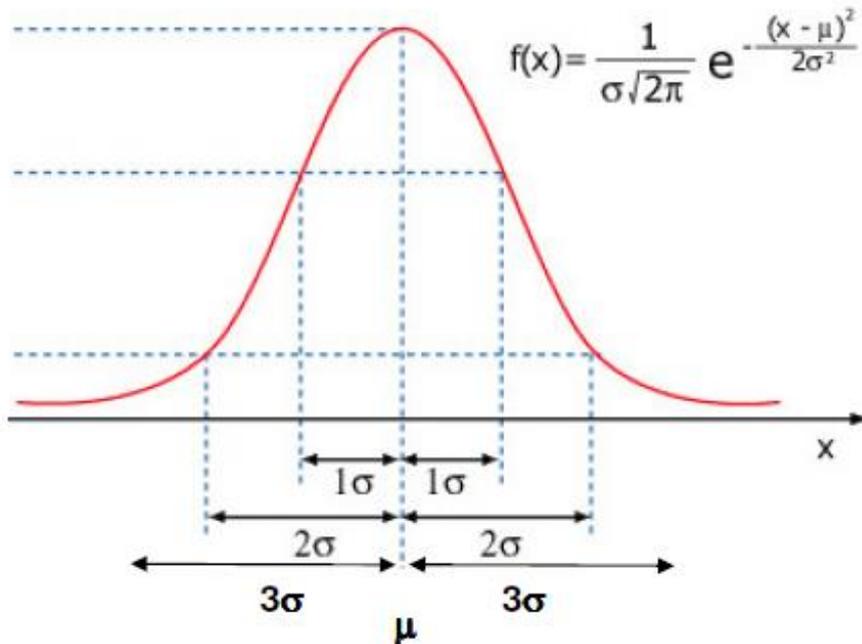
- Resultantes de efeitos de variáveis descontroladas nas medidas
- Variações são **INERENTES AO SISTEMA, IRREGULARES** e resultam em **VARIABILIDADE**



Não podem ser corrigidos

Tratamento estatístico de erros aleatórios

- Tratamento estatístico → Permite saber qual o valor mais provável e a precisão de uma série de medidas
- Distribuição de réplicas de dados → Aproxima da **curva gaussiana**



Na ausência de erros sistemáticos, a média da população (μ) é o valor verdadeiro para a quantidade medida

1. Valor médio (\bar{X})

É a soma dos valores medidos dividida pelo número de medidas (n)

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

2. Desvio padrão (S)

Mede a proximidade dos valores agrupados em torno da média. Assim, quanto menor for o desvio-padrão, mais perto os dados estarão agrupados em torno da média

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$



3. Coeficiente de variância (CV) ou desvio-padrão relativo percentual (DPR)

Representa o desvio-padrão relativo em termos de porcentagem. Estima a precisão de uma medida

$$CV \text{ ou } DPR = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

4. Variância (S²)

Representa o quadrado do desvio-padrão

Precisão e Exatidão

Exatidão

Refere-se a concordância da medida com um nível de referência ou valor conhecido (veracidade das medidas). Quanto menor o erro relativo, maior a exatidão

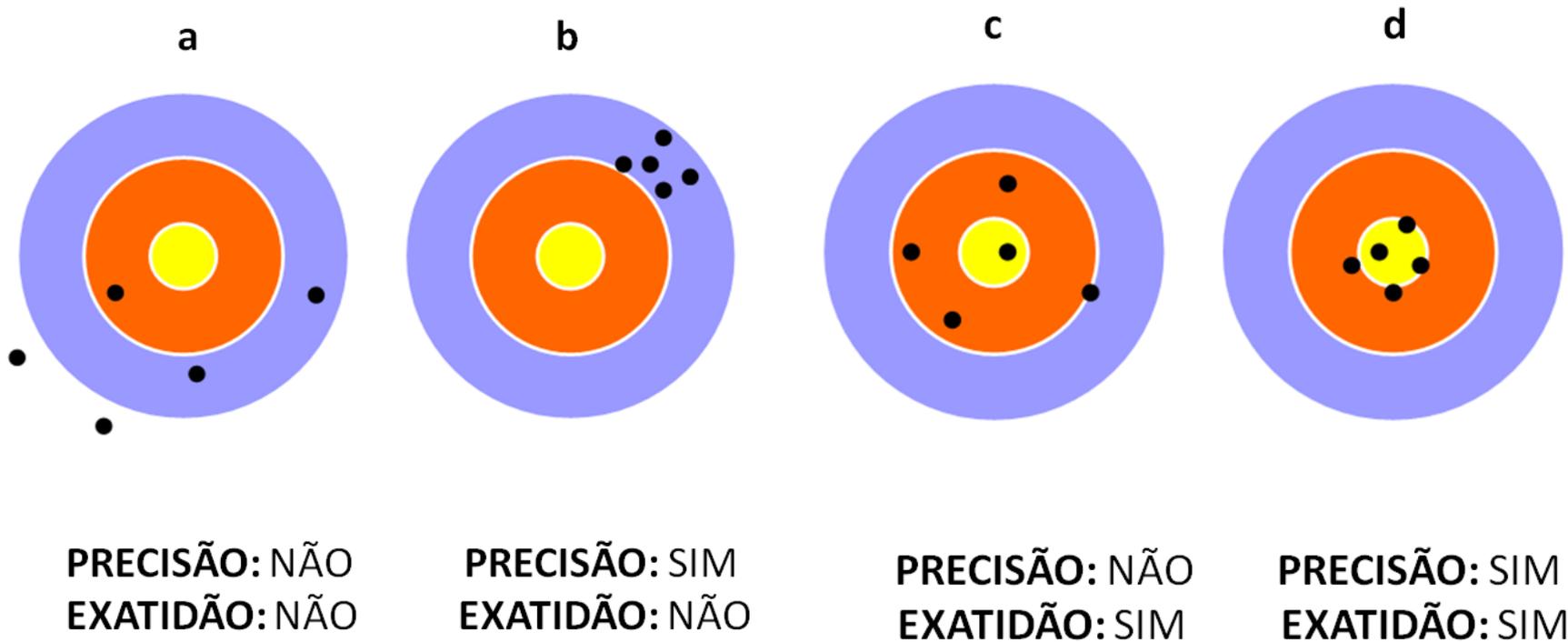
$$\text{Erro relativo} = \frac{(\text{Valor}_{\text{medido}} - \text{Valor}_{\text{referência}})}{(\text{Valor}_{\text{referência}})} \cdot 100$$

Precisão

Refere-se ao grau de concordância mútua entre as medidas individuais, ou seja, a reprodutibilidade da medida. Quanto maior a dispersão dos valores menor a precisão

$$\text{CV ou DPR} = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

Precisão e Exatidão



Exemplo: O carboidrato presente em uma planta foi determinado pela análise de 5 réplicas da amostra, obtendo-se os seguintes resultados: 11,9; 13,0; 12,7; 12,5 e 12,6 mg/g.

Avaliação de resultados

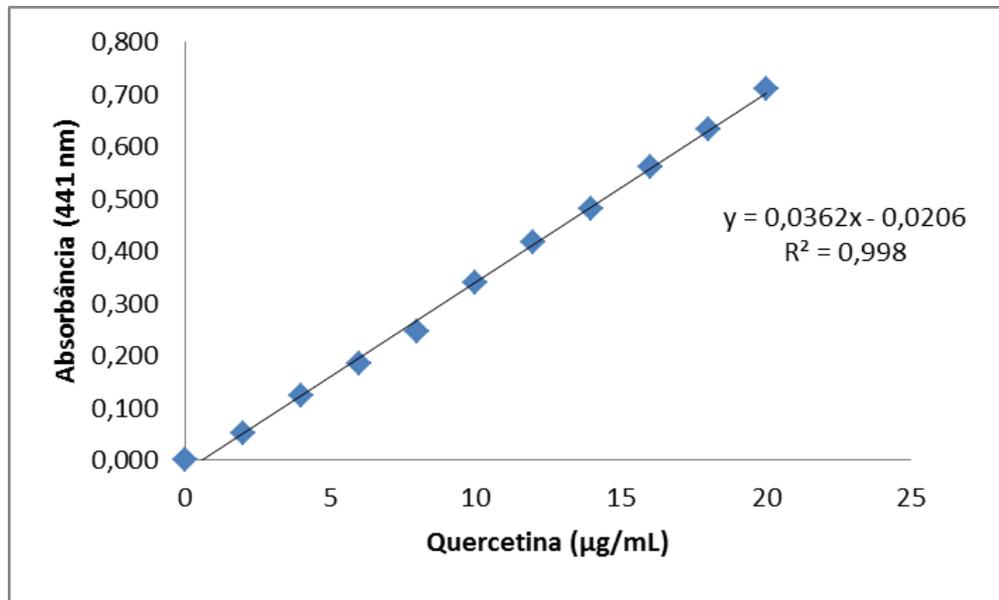
1. Confiabilidade dos Resultados
2. Comparação dos resultados com um valor verdadeiro ou com outros conjuntos de dados



Curvas de calibração

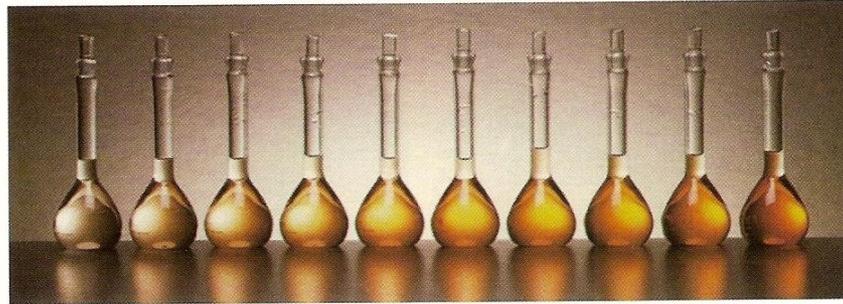
A - Padrão externo

- Preparado separadamente
- Calibrar instrumentos e procedimentos
- Não há efeitos de interferência de componentes da matriz

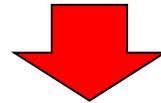


Exemplo: curva de calibração para análise de flavonoides utilizando quercetina como padrão.

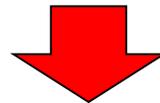
A - Padrão externo



Série de padrões externos contendo o analito
(concentrações conhecidas)

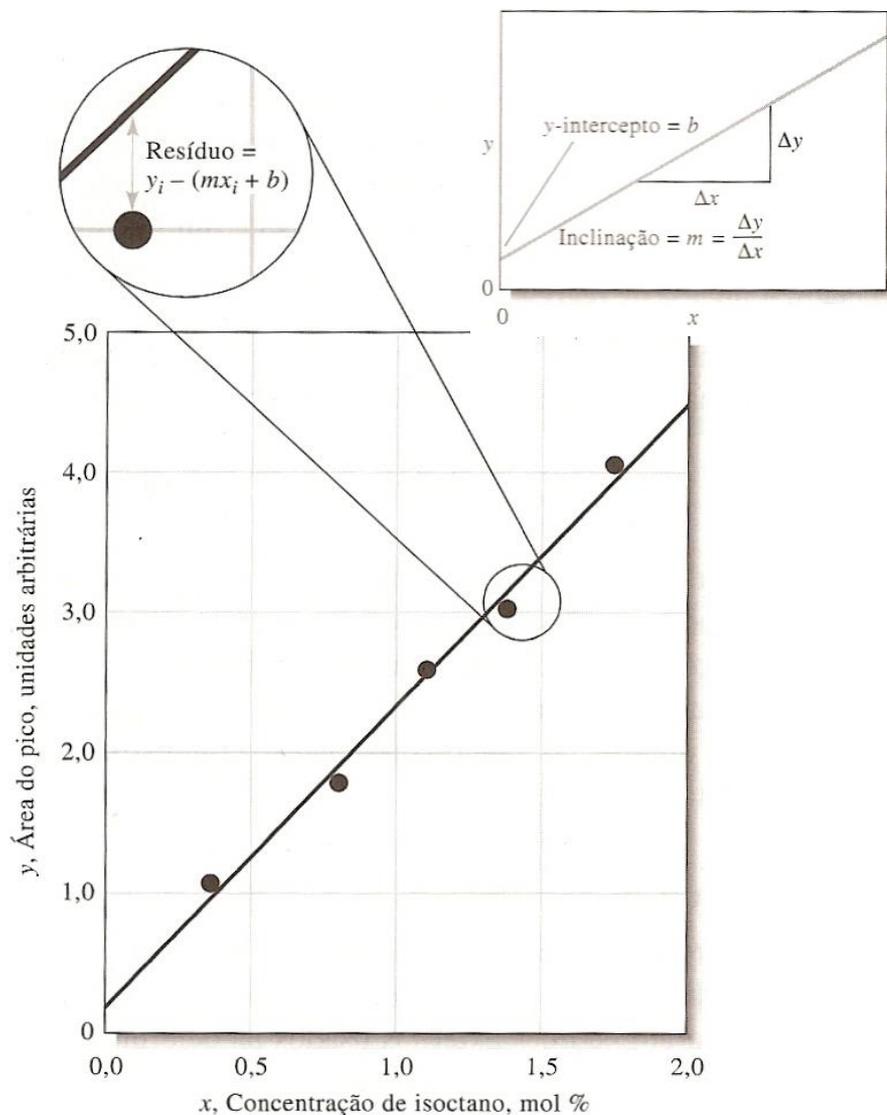


A calibração é realizada obtendo-se o sinal
(absorbância, área do pico, altura, outros)



Curva de calibração é preparada
(forma: gráfico ou ajuste por meio de equação matemática)

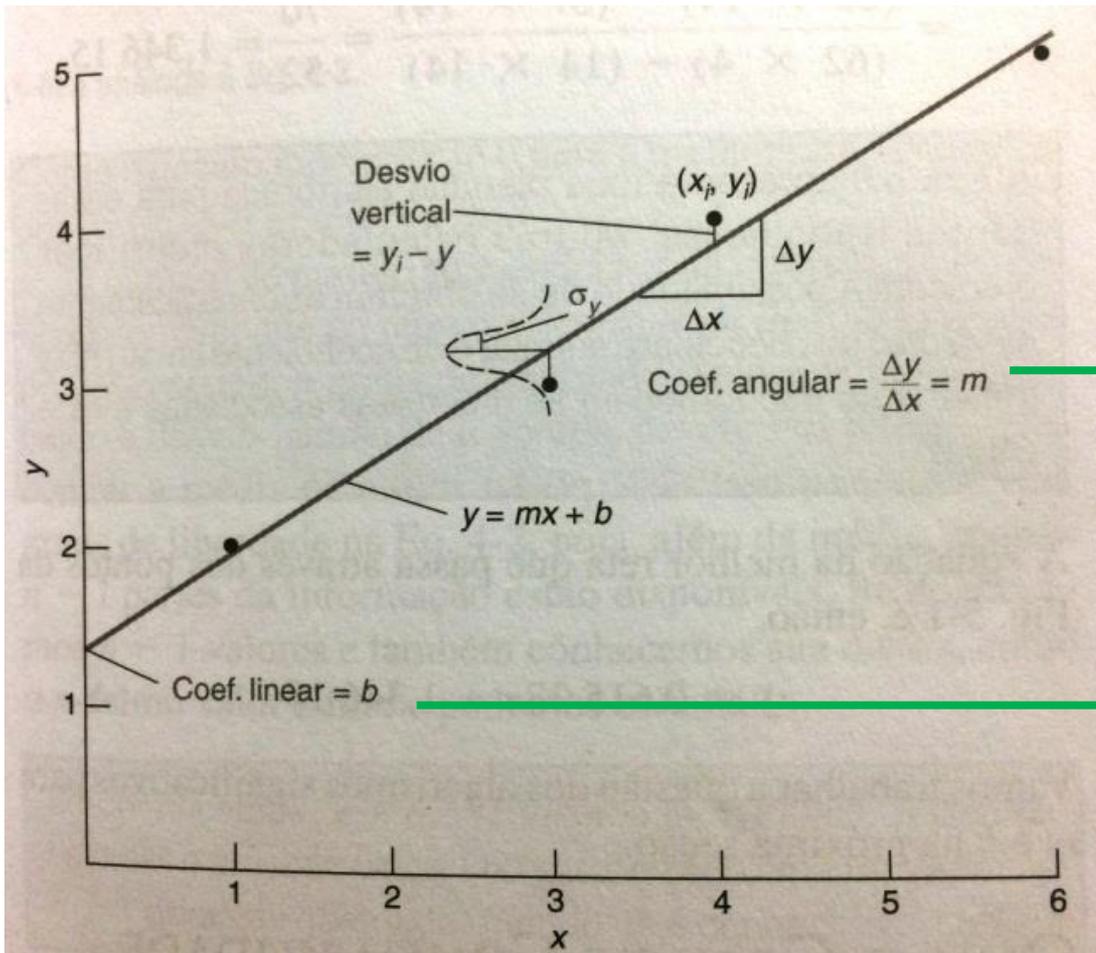
Método dos mínimos quadrados



CONSIDERAÇÕES

- ✓ Existe uma relação verdadeiramente linear entre a resposta medida e a concentração do padrão.
- ✓ Qualquer desvios de pontos individuais da linha reta é decorrente de erros na medida.

Quantidades úteis

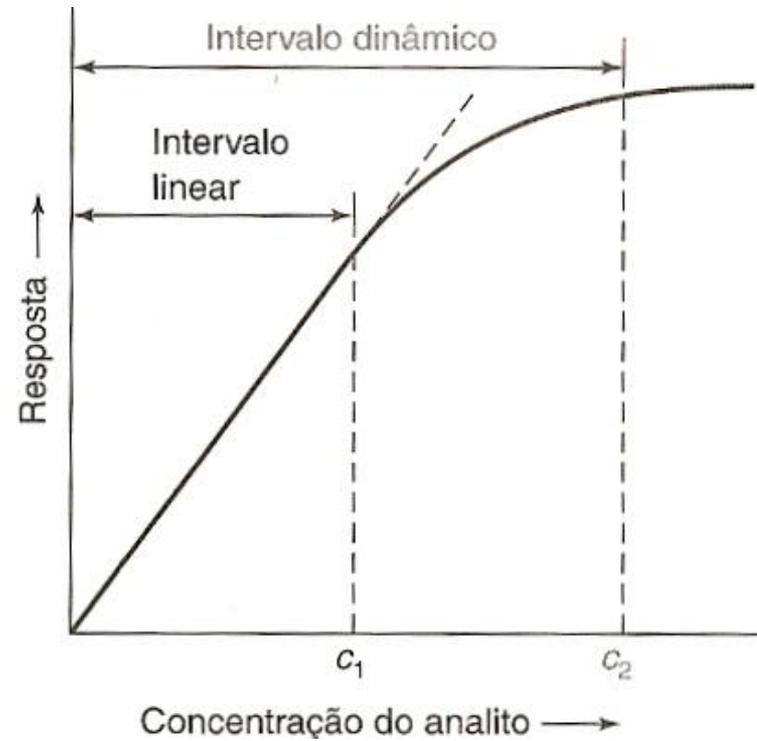
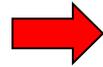


$$m = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

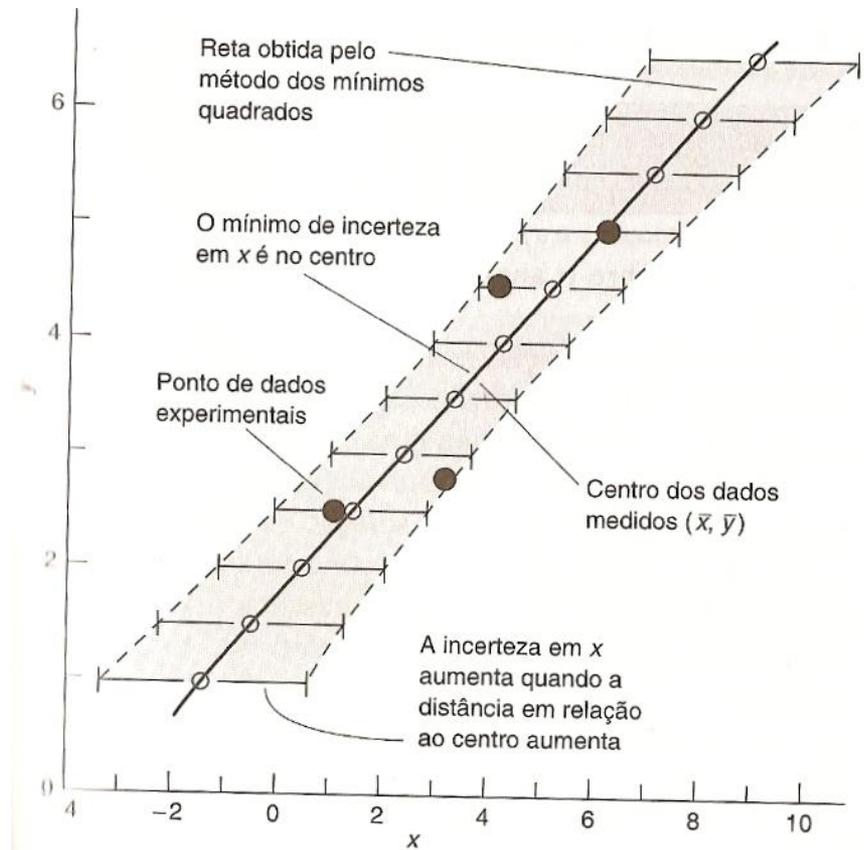
Considerações

Normalmente prefere-se procedimentos de calibração com uma resposta linear



Considerações

Existe alguma restrição para o cálculo de uma concentração de analito desconhecida utilizando-se uma curva de calibração?



B - Adição de padrão

- Quando adiciona-se um volume pequeno de padrão concentrado a uma amostra desconhecida, a concentração da matriz não muda.
- A partir do aumento de sinal deduzimos quanto de analito estava presente na amostra original.
- Extremamente útil quando a composição da amostra é desconhecida ou complexa e afeta o sinal do analito.

→ **Matriz:** tudo que existe na amostra além do analito.

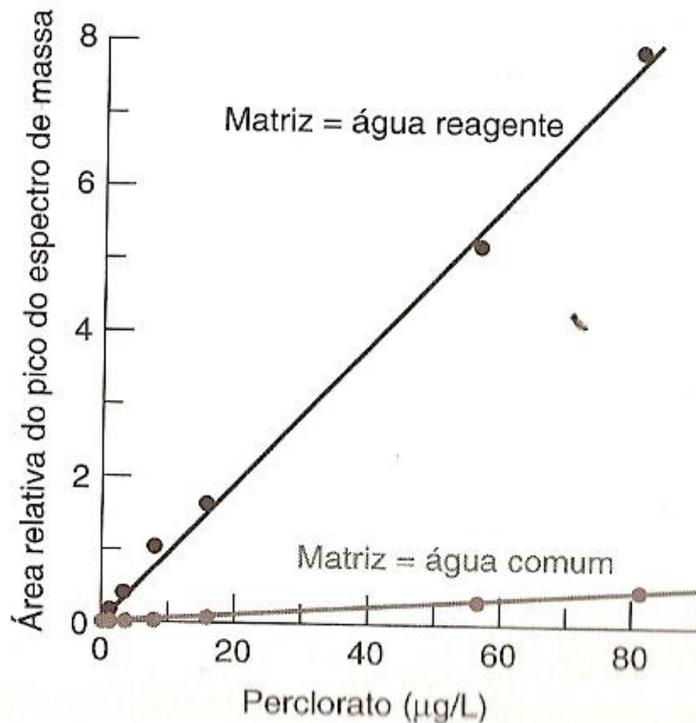
→ **Efeito da matriz:** mudança no sinal analítico causado por qualquer coisa na amostra diferente do analito.

B – Adição de Padrão

Exemplo do efeito de matriz: análise de perclorato (ClO_4^-)

➔ Concentração de perclorato $> 1,8\mu\text{g/L}$: pode reduzir a produção do hormônio da tireóide.

Considerações



- ✓ Águas provenientes de diferentes fontes possuem concentrações diferentes de ânions.
- ✓ Não existe uma maneira de produzir, para esta análise, uma curva de calibração que se aplique a qualquer tipo de água

B – Adição de Padrão

Tipos de métodos de adição do padrão

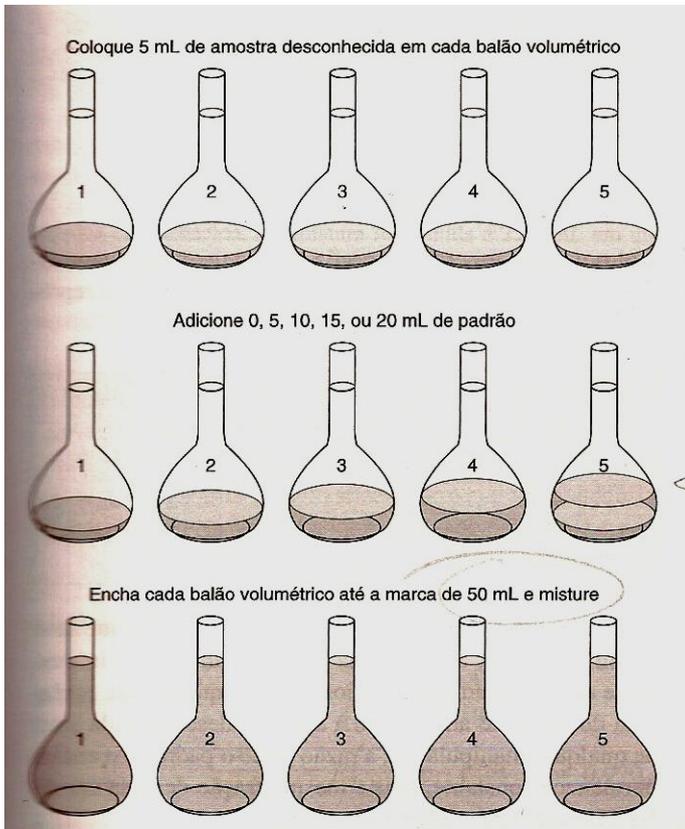
A) Método de adição de padrão de um único ponto.

- Amostra com concentração inicial desconhecida de analito $[X_i]$: intensidade do sinal I_x
- Concentração conhecida de padrão (S) é adicionada a uma alíquota da amostra: intensidade do sinal I_{S+x} é observada.

$$\frac{\text{concentração de analito na solução inicial}}{\text{concentração de analito mais padrão na solução final}} = \frac{\text{senal da solução inicial}}{\text{senal da solução final}}$$

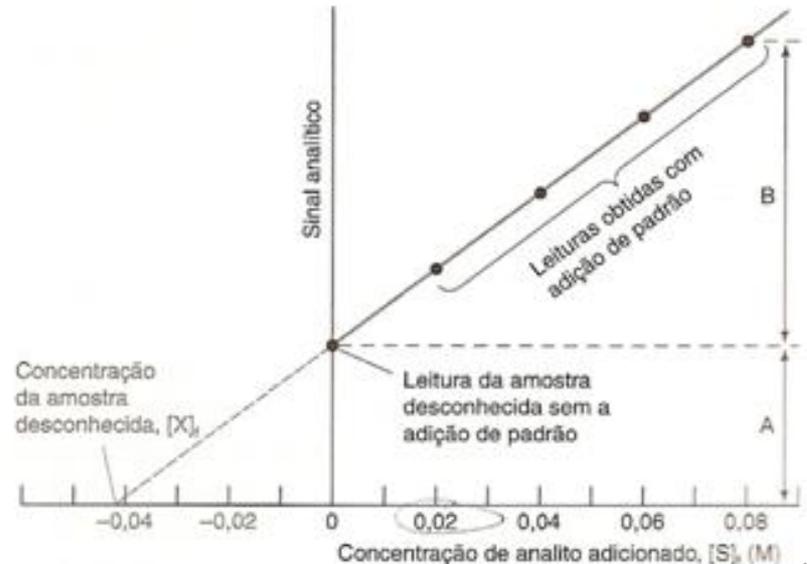
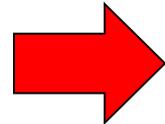
B – Adição de Padrão

B) Método das adições múltiplas.



$$C_{\text{padrão}} = 0,200\text{M}$$

- Adição de quantidades conhecidas de uma solução padrão em várias porções da amostra para um volume constante.



C – Padrão Interno

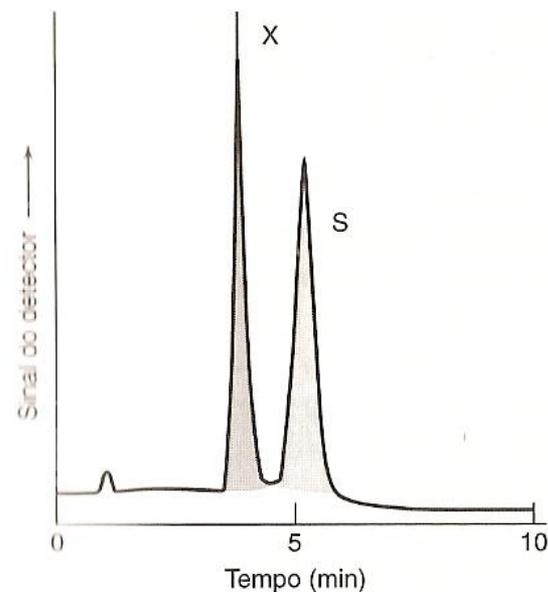
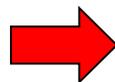
- ✓ Quantidade conhecida de uma espécie que atua como referência é adicionada a todas as amostras, padrões e brancos.
- ✓ São especialmente úteis para análises em que a quantidade de amostra analisada ou a resposta do instrumento varia ligeiramente a cada análise por razões difíceis de se controlar.
- ✓ Quando a resposta relativa de um instrumento ao analito e ao padrão permanece constante num determinado intervalo dizemos que a resposta é linear

C – Padrão Interno

- ✓ Pode ter vários tipos de erros sistemáticos e aleatórios.
- ✓ Se os sinais do analito e do padrão interno respondem proporcionalmente às flutuações aleatórias do método instrumental, a razão entre esses sinais é independente destas flutuações.
- ✓ Se os dois sinais são afetados da mesma maneira pelos efeitos da matriz, o efeito da matriz também é minimizado.

C – Padrão Interno

Separação cromatográfica da amostra desconhecida (X) e padrão interno (S).



Fator de resposta:

$$\frac{\text{Área do sinal do analito}}{\text{Concentração do analito}} = F \left(\frac{\text{área do sinal do padrão}}{\text{concentração do padrão}} \right)$$

$$\frac{A_X}{[X]} = F \left(\frac{A_S}{[S]} \right)$$

Considerações sobre Padrões

	Diferenças
Padrão externo	<ul style="list-style-type: none">- Apenas o padrão utilizado para construção da curva de calibração.
Adição de padrão	<ul style="list-style-type: none">- O padrão é a mesma substância que o analito.- Quantidades conhecidas do padrão são adicionados a amostra.
Padrão interno	<ul style="list-style-type: none">- O padrão é uma substância diferente do analito.- O padrão é adicionado a amostra desconhecida- O sinal do analito é comparado com o sinal do padrão interno.