Universidade de São Paulo
FBA0201 – Bromatologia Básica

USO DE MÉTODOS OFICIAIS

ERIC DE CASTRO TOBARUELA
Farmacêutico – UFC
Mestrado – Ciência dos Alimentos – USP
Doutorando – Ciência dos Alimentos – USP

TÓPICOS

- MÉTODOS DE ANÁLISE
- ORGÃOS DE NORMATIZAÇÃO
  - ADOLFO LUTZ
  - AOAC
- AOAC OFFICIAL METHODS
- ESCOLHA DO MÉTODO
- MÉTODOS UTILIZADOS
- FATORES QUE DIFICULTAM A ANÁLISE DE ALIMENTOS

- Conjunto de etapas fundamentais que compõem um processo analítico;

MÉTODO ANALÍTICO ≠ TÉCNICA ANALÍTICA

- Procedimento pelo qual os dados analíticos são obtidos;
- Instrumentação específica para a obtenção dos dados analíticos;

PORQUE ESCOLHEMOS OS MÉTODOS QUE USAMOS?

Padronização de dados

Confiabilidade do resultado

INFOODS

TBCA
Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

PORQUE ESCOLHER MÉTODOS “OFICIAIS”?

Estabelecer e aplicar procedimentos que possuem a garantia de serem válidos para os fins desejados.

MÉTODOS DE ANÁLISE

MÉTODOS OFICIAIS **X** MÉTODOS NÃO-OFICIAIS

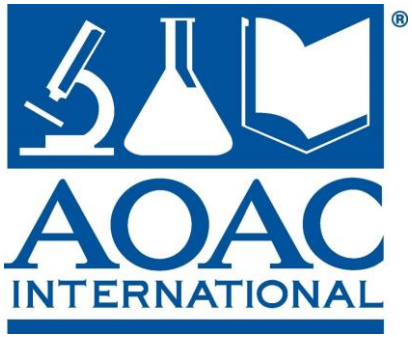
MÉTODOS CONVENCIONAIS **X** MÉTODOS INSTRUMENTAIS

- Métodos rápidos
- Métodos automatizados
- Métodos modificados

MÉTODOS OFICIAIS

- Instituto Adolfo Lutz

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC)
- American Association of Cereal Chemists (AACC)
- American Oil Chemists' Society (AOCS)



Métodos físico-químicos para análise de alimentos

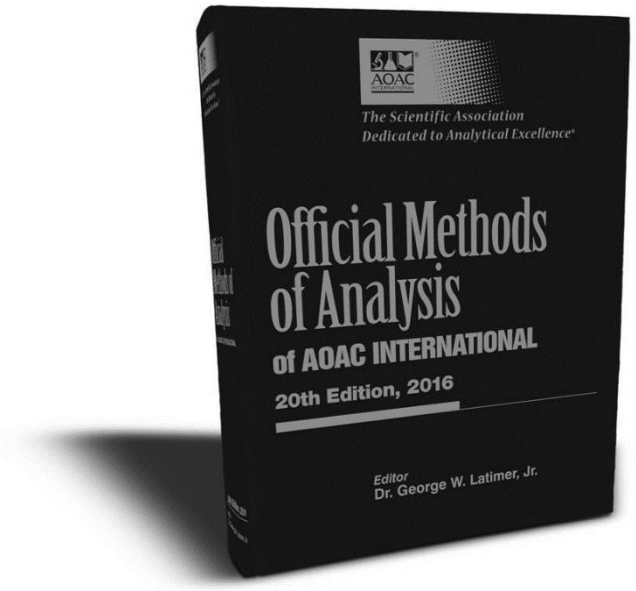
edição IV

1ª Edição Digital

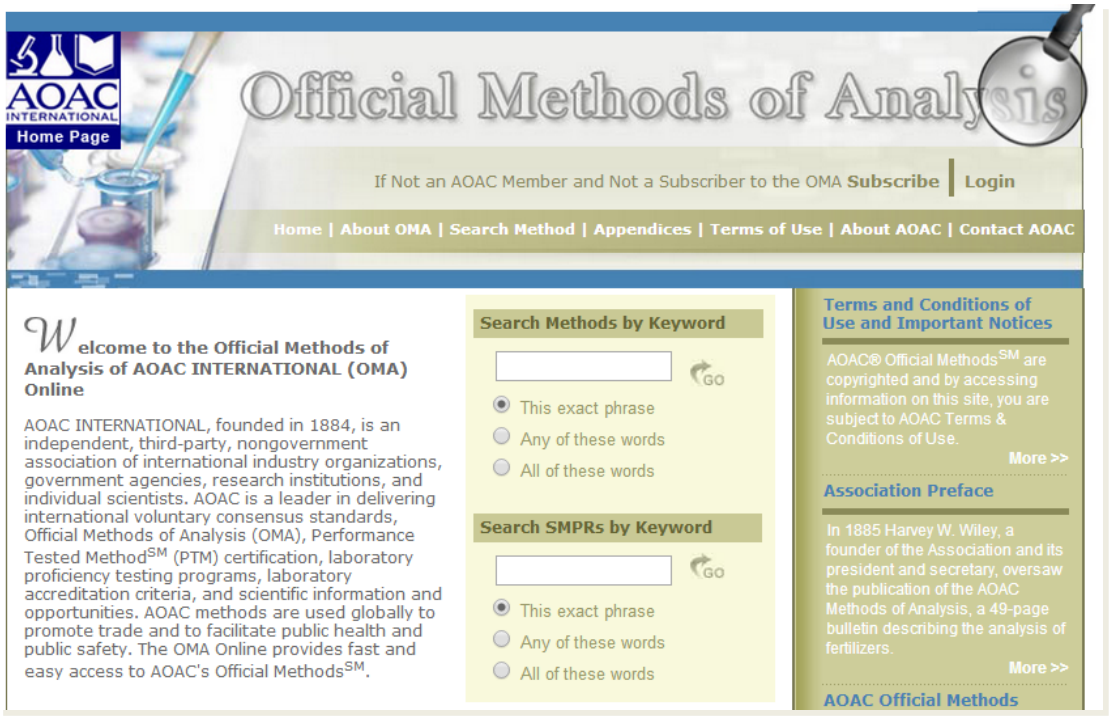
AOAC Official Methods of Analysis

- AOAC INTERNATIONAL ORGANIZATION;
- 125 anos;
- Desenvolv dos oficiais;
- Validação
- É a coleçã l de métodos c sponíveis no mundo
- Referenciado nas normas alimentares do Codex.

AOAC Official Methods of Analysis



Edição Impressa

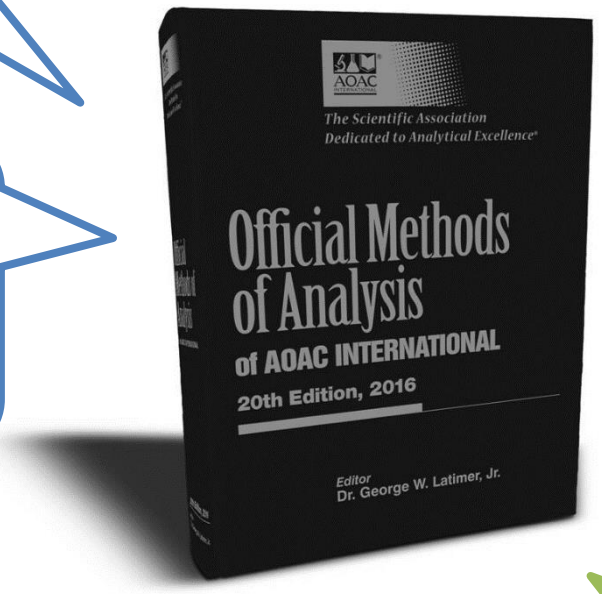


Edição Online
(http://www.eoma.aoac.org/)

AOAC Official Methods of Analysis

2939 métodos

71 guias para avaliação de desempenho



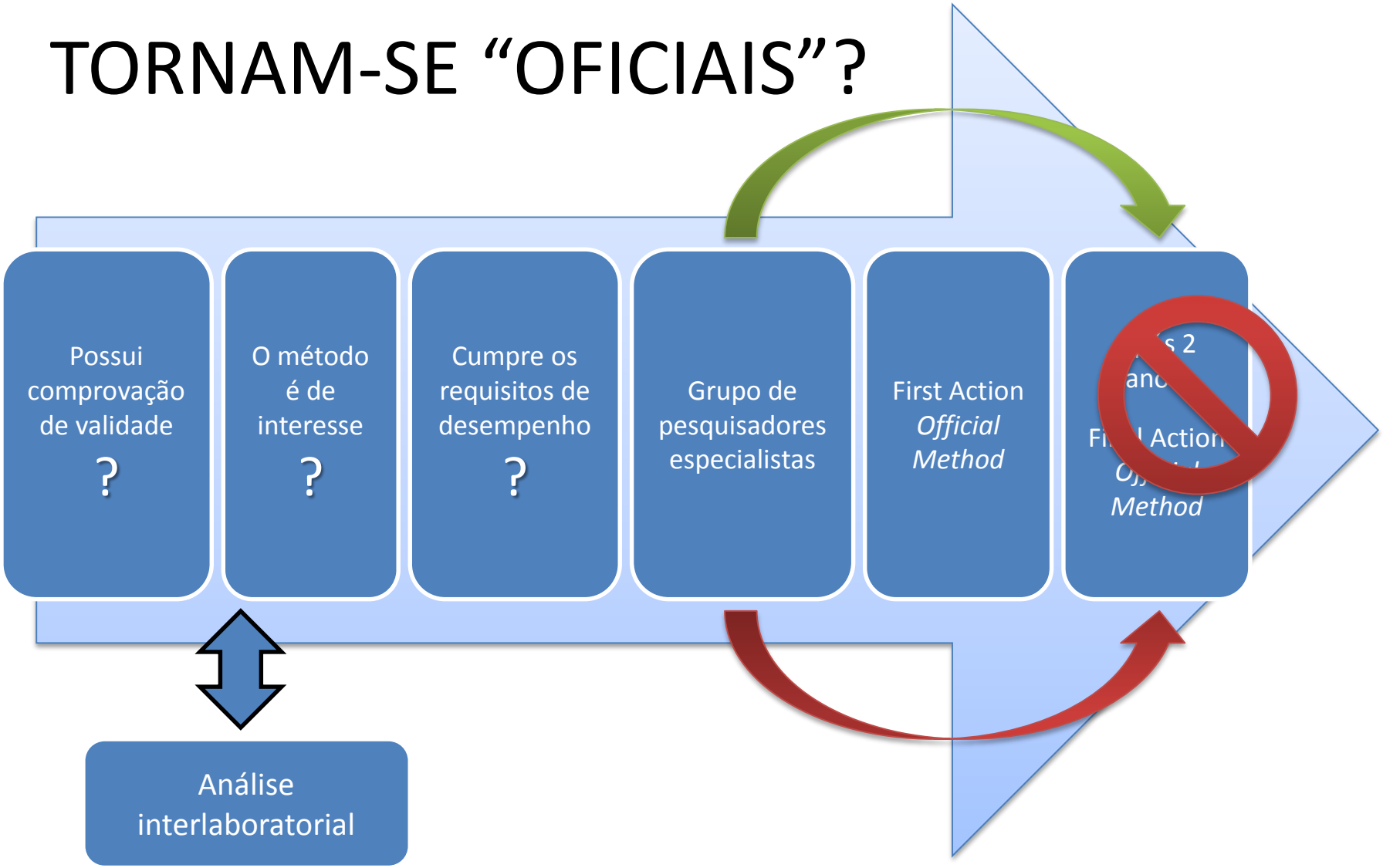
Definições

Segurança no laboratório

Valores de referência

Validação

COMO OS MÉTODOS TORNAM-SE “OFICIAIS”?



VALIDAÇÃO

Processo que “garante” que um método analítico pode produzir resultados confiáveis e reprodutíveis e que o mesmo é apropriado para o fim pretendido.

Os parâmetros avaliados são associados às características de desempenho do método, juntamente com robustez, repetibilidade e reprodutibilidade.

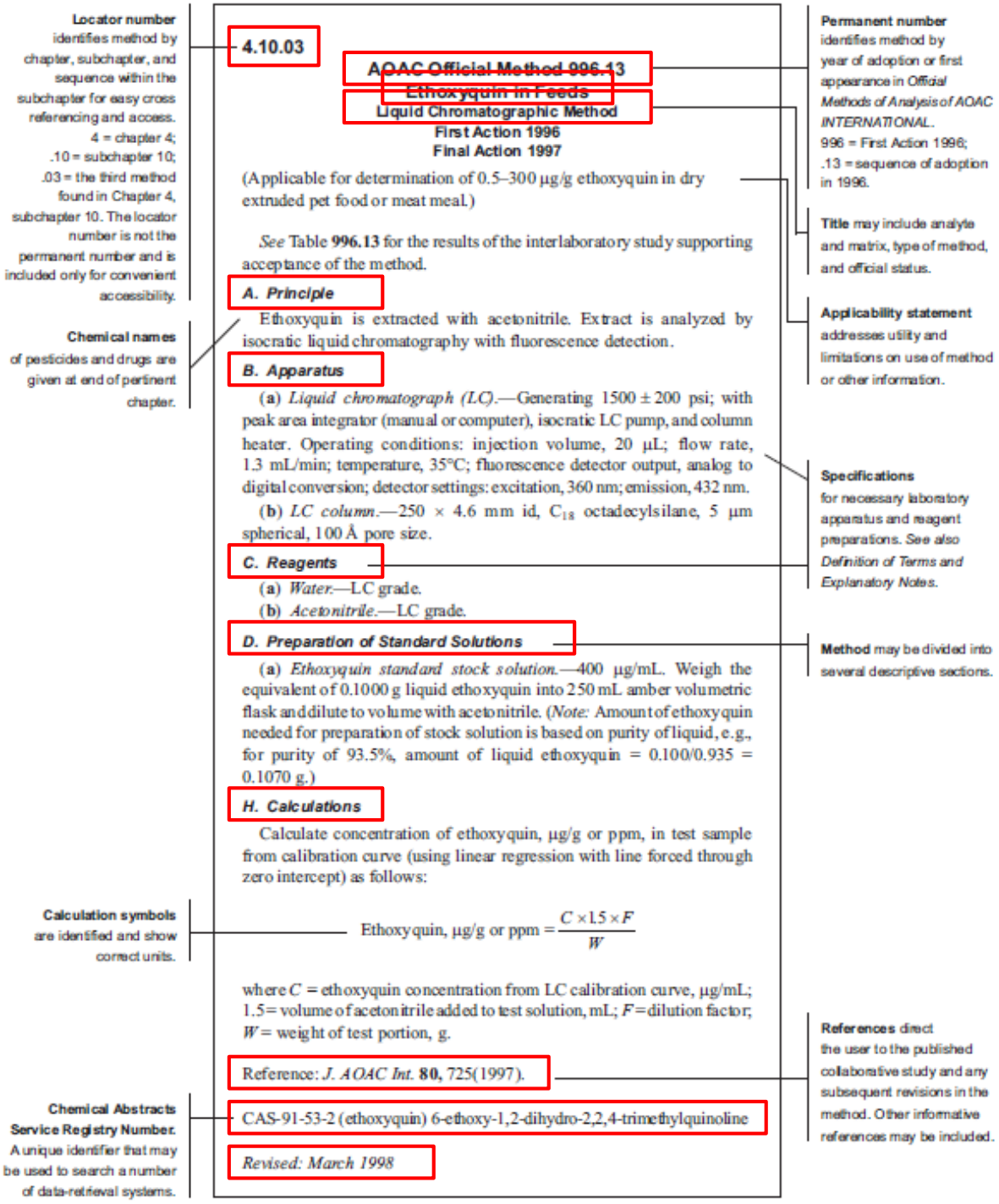
PARÂMETROS REQUERIDOS PARA MÉTODOS QUANTITATIVOS

- Intervalo analítico
- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Repetibilidade
- Recuperação
- Reprodutibilidade

All parameters have a minimum requirement set by the Working Group

4. Method Performance Requirements

Analytical range	0.01–5.0[a]	
Limit of detection (LOD)	≤0.004[a]	
Limit of quantitation (LOQ)	≤0.01[a]	
Repeatability (RSD_r)	0.01[a]	≤15%
	0.2[a]	≤7%
	0.5[a]	
	5.0[a]	
Recovery	0.01[a]	90–110%
	0.2[a]	
	0.5[a]	
	5.0[a]	
Reproducibility (RSD_R)	0.3	≤11%
	0.6	
	1.0	
	2.5	
	5.0	
Concentrations apply to (*1*) "ready-to-feed" liquids "as is"; (*2*) reconstituted powders (25 g into 200 g water); and (*3*) liquid concentrates diluted 1:1 by weight.		
[a] µg/100 g expressed as cyanocobalamin in reconstituted final product.		



LOCALIZADOR

IDENTIFICADOR

APLICAÇÃO

PRINCÍPIO ANALÍTICO

PRINCÍPIO DO MÉTODO

MATERIAIS

REAGENTES

PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO

CÁLCULOS

REFERÊNCIA

CAS

(REGISTRO QUÍMICO DO COMPOSTO)

REVISÃO

AOAC JOURNAL

FOOD COMPOSITION AND ADDITIVES

Determination of Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber (CODEX Definition) by Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography: Collaborative Study

Barry V. McCleary
Megazyme International, Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland
Jonathan W. DeVries
Medallion Laboratories/General Mills, 9000 Plymouth Ave N, Golden Valley, MN 55427
Jeanne I. Rader
U.S. Food and Drug Administration, 5100 Paint Branch Pkwy, College Park, MD 20740
Gerald Cohen
Kraft Foods (*retired*), 12 Sundbury Dr, New City, NY
Leon Prosky
U.S. Food and Drug Administration (*retired*), 10265 Nolan Dr, Rockville, MD 20850-3507
David C. Mugford
BRI Australia Pty. Ltd, PO Box 7, North Ryde, NSW, Australia 1670
Martine Champ
UMR PhAN, INRA, CRNH, Hôtel-Dieu, Place Alexis Ricordeau, 44093, Nantes, Cedex 1, France
Kazuhiro Okuma
Matsutani Chemical, Research Laboratory, Itami City, Hyogo 664-8508, Japan

Collaborators: T. Bajoras, M. Barata; S. Bhandari; K. Brunt; M. Camire; S. Cui; J. DeVries; M.P. Dougherty; A. Draga; V. Ernste-Nota; A. Evans; T. Gallegos; G. Carlo Gatti; J. Hollmans; Y. Jin; K. Kanaya; M. Leijdekkers; K. Liu; M. Marshak; H. Nagata, U. Neese; U. Nienaber; T. Nishibata; S. Pasaribu; H. Salman; P. Sanders; A. Santi; N. Sloane; M. Steegmans; R. Sublett; A. Tervilä-Heikkinen; H. Themeier; J. van de Laar; J. van de Ven-Borgmans; S.I. Whitaker; G. Zielinski

A method for the determination of insoluble (IDF), soluble (SDF), and total dietary fiber (TDF), as defined by the CODEX Alimentarius, was validated

and gravimetric procedures of AOAC 985.29 (and its extensions 991.42 and 993.19) and 991.43 results in quantitation of IDF and soluble dietary

AOAC OFFICIAL METHOD

AOAC Official Method 2011.25
Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods

Enzymatic-Gravimetric-Liquid Chromatography
First Action 2011

[Applicable to plant material, foods, and food ingredients consistent with CODEX Alimentarius Commission Definition adopted in 2009 and modified slightly in 2010 (ALINORM 09/32/REP and ALINORM 10/33/REP, respectively), including naturally occurring, isolated, modified, and synthetic polymers meeting that definition.]

See Tables **2011.25A–H** for the results of the interlaboratory study supporting acceptance of the method.

A. Principle

A method is described for the measurement of insoluble, soluble, and total dietary fiber (IDF, SDF, and TDF, respectively), inclusive of the resistant starch (RS) and the water:alcohol soluble nondigestible oligosaccharides and polysaccharides of DP ≥3. The method combines the key attributes of AOAC *Official Methods of Analysis*℠ **985.29** (and its extensions, **991.42** and **993.19**), **991.43**, **2001.03**, and **2002.02**. Duplicate test portions are incubated with pancreatic α-amylase and amyloglucosidase (AMG) for 16 h at 37°C in sealed 250 mL bottles while mixing with sufficient vigor to maintain continuous suspension. During this step, nonresistant starch is solubilized and hydrolyzed to glucose and maltose by the combined action of the two enzymes. The reaction is terminated by pH adjustment and temporary heating. Protein in the sample is then digested with protease. For the measurement of IDF, the digestate is filtered and the IDF is determined gravimetrically after correction for any protein or ash in the residue. For the measurement of the water soluble, but water:alcohol insoluble dietary fiber (SDFP), ethanol is added to the filtrate of the IDF; the precipitated SDFP is captured by filtration and determined gravimetrically after correction for any protein or ash in the precipitate. Nonprecipitable, water:alcohol soluble dietary fiber (SDFS) in the filtrate is recovered

polypropylene caps.

(**c**) *Fritted crucible.*—Gooch, fritted disk, Pyrex® 50 mL, pore size, coarse, ASTM 40–60 µm (Corning No. 32940-50C® or equivalent; http://www.labplanet.com/corning-crucible-gooch-high-c-50-ml-32940-50c.html). Prepare four for each sample as follows: Ash overnight at 525°C in muffle furnace. Cool furnace to 130°C before removing crucibles to minimize breakage. Remove any residual Celite and ash material by using a vacuum. Soak in 2% cleaning solution, **C**(**i**), at room temperature for 1 h. Rinse crucibles with water and deionized water. For final rinse, use 15 mL acetone and air dry. Add approximately 1.0 g Celite to dried crucibles and dry at 130°C to constant weight. Cool crucible in desiccators for approximately 1 h and record mass of crucible containing Celite.

(**d**) *Filtering flask.*—Heavy-walled, 1 L with side arm.

(**e**) *Rubber ring adaptors.*—For use to join crucibles with filtering flasks.

(**f**) *Vacuum source.*—Vacuum pump or aspirator with regulator capable of regulating vacuum.

(**g**) *Water bath(s).*—Rotary motion, large-capacity (20–24 L) with covers; capable of maintaining temperature of 37 ± 1°C and 60 ± 1°C; equipped with automatic timers for on-off operation or equivalent (e.g., Grant® OLS 200 shaking incubation bath; http://www.bioresearchonline.com/product.mvc/Grant-OLS200-Orbital-Shaking-Water-Bath-0001). Ensure that shaking action/sample agitation in water bath used is sufficient to maintain sample solids in suspension and no residue build-up or rings of sample material form in the digestion bottle during the enzymatic digestions. A linear motion (back and forth shaker) can be used if the bottles are placed at 45° to ensure adequate agitation (if the bottles are vertical or horizontal there will not be sufficient agitation to ensure that the sample remains suspended). Alternatively, a 2 mag Mixdrive 15 submersible magnetic stirrer apparatus (http://www.2mag.de/english/stirrer/multiple/stirrer_multiple_04_mixdrive6_15.html) can be used in a water bath maintained at 37 ± 1°C with a Julabo

MEGAZIME KIT

Megazyme

INTEGRATED TOTAL DIETARY FIBRE ASSAY PROCEDURE

INCLUDING
RESISTANT STARCH
AND NON-DIGESTIBLE
OLIGOSACCHARIDES

K-INTDF 06/13

AOAC Method 2009.01 & 2011.25

&

AACC Method 32-45.01 & 32-50.01

(100 Assays per Kit)

[UPDATED FORMAT, 2013]

1976[3] to:

"Dietary fibre consists of the remnants of edible plant cells, polysa
lignin, and associated substances resistant to digestion by the alime
enzymes of humans."

This definition defines a macro constituent of foods which includes
hemicellulose, lignin, gums, modified celluloses, mucilages, oligosacc
pectins and associated minor substances such as waxes, cutin, and

On the basis of this definition[3], appropriate methodology for
measurement of DF was developed by a consortium of resea
in Europe and USA. This led to AOAC Official Method 985.2
Prosky method),[4,5] and to subsequent modifications of this m
including AOAC Official Method 991.43[4] in which the buffers
were changed. The aim of these methods was to give an accu
measurement of the content of total dietary fibre in plant pro
and food materials. More specifically, the methodology aimed
hydrolysing and removing starch and protein. Fats were remo
by the solvents employed to recover the non-hydrolysed mat
From the outset, it was realised that all protein was not hydr
so each sample was then analysed in duplicate and residues re
and weighed. One of these residues is analysed for ash conte
and the other for protein. These weights are subtracted from
average of the residue weights. It was also realised that, in th
analytical procedure, starch also was not completely hydrolys
removed. This in turn led to the discovery of so-called "resis
starch (RS)". The question then was, "*should RS be measured*
added to the total dietary fibre value, or should it be analytically re
and ignored?" Since RS escapes digestion in the human small i
the general consensus is that it should be accurately measure
and included. Research in the 1990's showed that AOAC Of
Method 991.43 underestimates RS, so alternative methods fo
measurement of this component were developed and evaluat
While most of these new methods gave similar results for a r

codex alimentarius commission

I. LIST OF METHODS FOR DIETARY FIBRE

(at Step 8 of the Procedure)

Standard	Provisions	Method	Principle	Type
General methods that do not measure the lower molecular weight fraction (i.e. monomeric units<=9)[2]				
All foods [1]	Dietary fibre based on precipitation in 4 parts alcohol and 1 part water. Resistant insoluble and soluble polysaccharides, lignin, and plant cell wall. [4]	AOAC 985.29	Enzymatic gravimetric	III
All foods [1]	Dietary fibre based on precipitation in 4 parts alcohol and 1 part water. Resistant insoluble and soluble polysaccharides, lignin, and plant cell wall [4].	AOAC 991.43	Enzymatic gravimetric	III
All foods [1]	Dietary fibre based on precipitation in 4 parts alcohol and 1 part water. Resistant insoluble and soluble polysaccharides, lignin, and plant cell wall [4].	AOAC 992.16	Enzymatic gravimetric	III
All foods [1]	Dietary fibre in food and food products with less than 2% starch [4].	AOAC 993.21	Non-enzymatic gravimetric	III
All foods [1]	Dietary fibre based on precipitation in 4 parts alcohol and 1 part water, quantitated as component neutral sugars, uronic acids, plus Klason lignin. [4]	AOAC 994.13	Enzymatic chemical	III
General methods that measure both the higher (monomeric units > 9) and the lower molecular weight fraction (monomeric units <=9) [2]				
All foods [1]	Dietary fibre based on precipitation in 4 parts alcohol and 1 part water. Resistant insoluble and soluble polysaccharides, resistant malto-dextrins, lignin, and plant	AOAC 2001.03	Enzymatic gravimetric and Liquid chromatography	III

CODEX ALIMENTARIUS

TIPO I Métodos de definição

Método que determina um valor que só pode ser obtido pela utilização do mesmo. Por definição, deve ser o único método para determinação do valor aceito para o parâmetro medido.

TIPO II Métodos de referência

Métodos de referência utilizados nos casos em que os métodos do Tipo I não se aplicam. Recomendados para fins de calibração.

TIPO III Métodos alternativos aprovados

Métodos que satisfazem aos critérios exigidos pelo Comitê do Codex. Métodos utilizados para controle, inspeção ou outros propósitos regulatórios.

TIPO IV Métodos de tentativa

Métodos tradicionalmente utilizados ou recentemente introduzidos que não foram avaliados pelo Comitê do Codex.

(FAO, 2011)

ESCOLHA DO MÉTODO

Matriz

- Simples?
- Complexa?
- Interferentes?

Componente

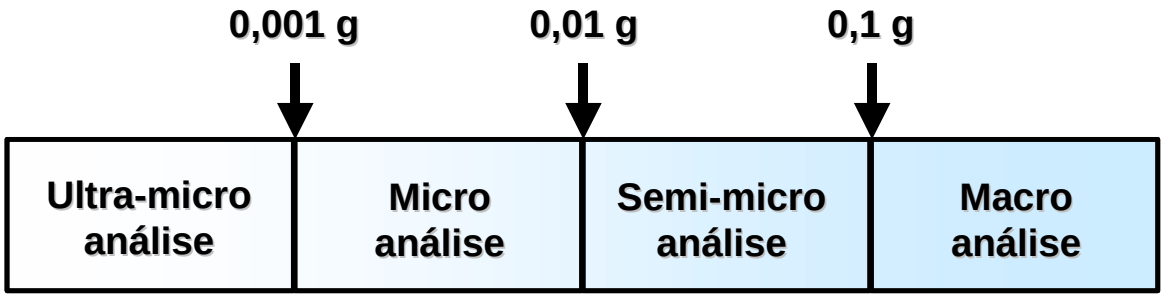
- Específico?
- Grupo?

Maiores: >1%

Menores: 0,01 – 1%

Micro: <0,01%

Traço: (ppm e ppb)



ESCOLHA DO MÉTODO

- Finalidade
- Quantidade de amostra disponíveis
- Quantidade do componente analisado
- Exatidão requerida
- Composição química da matriz
- Recursos disponíveis
- Número de amostras

MÉTODOS AOAC ADOTADOS

Composição Centesimal

	Geral	Frutas
UMIDADE	AOAC 925.45b	AOAC 934.06
PROTEÍNAS	AOAC 960.52	AOAC 960.52
LIPÍDIOS	AOAC 920.39	AOAC 920.39
CINZAS	AOAC 923.03	AOAC 940.26

MÉTODOS AOAC ADOTADOS

Carboidratos

AMIDO RESISTENTE	▶	AOAC 2002.02
FIBRA ALIMENTAR	▶	AOAC 991.53
	▶	AOAC 2009.01
	▶	AOAC 2011.25
FRUTANOS	▶	AOAC 999.03

FATORES QUE DIFICULTAM A ANÁLISE DE ALIMENTOS

- Complexidade das amostras
- Número de substâncias presentes
- Distribuição não uniforme
- Perecibilidade
- Variabilidade de amostras do mesmo alimento

SEGURANÇA NO LABORATÓRIO

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO







EXPLOSIVE
1
2
2
RADIOACTIVE
7
SPONTANEOUSLY
COMBUSTIBLE
4
4
4
5.1
9
6

OBRIGADO!

erictobaruela@usp.br

Universidade de São Paulo

FBA0201 – Bromatologia Básica

ORIENTAÇÕES PARA SEMINÁRIOS

2015

Slide Introdutório	Cabeçalho Título do seminário Nome dos alunos
Agenda	Temas abordados
Introdução	Breve introdução ao tema
Slides intermediários	Objetivos Desenvolvimento do tema
Conclusões/considerações finais	Aprendizado obtido Comentários Etc
Referências	

Slides

A metamorfose

- Normalmente as metamorfoses
  habitar ou de hábitos podendo,
- Alguns exemplos de metamorfo
  alguns tipos de pães mofados, s
  libélulas são insetos aquáticos d
  voadores na idade adulta. As rãs
  girino aquático até um anfíbio (f
  invertebrados aquáticos que nad
  fixando-se em seguida a um sub
  locomoção, como é o caso dos u
  fase larval têm peças bucais mas
  voadores com essas peças espec
- O tipo de metamorfose sem que
  habitats é ilustrado por muitas e
  metamorfoses físicas até ao esta
  habitat do animal se mantém in
  metamorfose seguia uma série d
  espécie em questão ao longo da
  sabe que é uma formulação inco

Escolhas alimentares

- Normalmente
- Alguns exemplos
- O tipo de metamorfose
- Sem que haja mudanças
- Há décadas



Slides

Ácido ascórbico
Vitamina C

Sensibilidade	Estabilidade	F enc
Temp. elevadas Soluções alcalinas		Ácido
Temp. elevadas Soluções alcalinas		Ácido dehid
		Ácido

Preparo da amostra

Método fluorimétrico: ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico + o-fenilenodiamina = derivado fluorescente

Método espectrofotométrico: ácido ascórbico + Cu+2 num meio bifásico = cuproína (em meio ácido)

CONCLUSÕES

- Vitaminas hidrossolúveis => baixa quantidade
- Matrizes complexas
- Presentes em mais de uma forma
- Método microbiológico => AOAC
- HPLC => muito utilizado

[Texto]

Solução de dúvidas

	Outubro	
4/10	Definição e métodos AOAC de fibra alimentar Determinação de fibra alimentar	Prof. Eduardo MSc Eric Tobaruela
11/10	Determinação de fibra alimentar	Prof. Eduardo
18/10	Determinação de fibra alimentar Solução de dúvidas - Seminários	Prof. Eduardo Monitores
25/10	Teoria da análise de vitaminas e minerais	Prof. Eduardo
	Novembro	
1/11	Entrega e apresentação de seminários (grupos 1 a 6)	Profa. Elizabete
8/11	Entrega e apresentação de seminários (grupos 7 a 10) Avaliação dos resultados de composição teórica e química	Profa. Elizabete
22/11	Prova (peso 2)	Monitores

Observações:

1. A média ponderada das avaliações corresponde a 80% da nota final
Avaliação 1 (peso1) e avaliação 2 (peso 2)

2. A média dos relatórios e seminários corresponde a 20% da nota final
Relatórios de aulas práticas (peso 1) e seminários (peso 2)

OBRIGADO!

1ª JORNADA

CIÊNCIALIMENTA

05 e 06 de setembro de 2016
Faculdade de Ciências Farmacêuticos - USP

TEMA I
Qualidade dos alimentos:
do genótipo ao fenótipo

TEMA II
Alimentos e sensações

TEMA III
O microbioma humano

TEMA IV
Alergia e intolerância alimentar

INSCRIÇÕES GRATUITAS!*
ciencialimenta@usp.br

Público alvo:
Graduandos de Farmácia e Nutrição
*VAGAS LIMITADAS!

ciencialimenta@usp.br /ciencialimentaUSP

USP FoRC FOOD RESEARCH CENTER