

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL

DISCIPLINA: BROMATOLOGIA BÁSICA (FBA-200)

Determinação de lipídios em alimentos

O que são lípidios?

Compostos geralmente solúveis em solventes orgânicos mas pouco solúveis ou insolúveis em água

Por que são importantes?



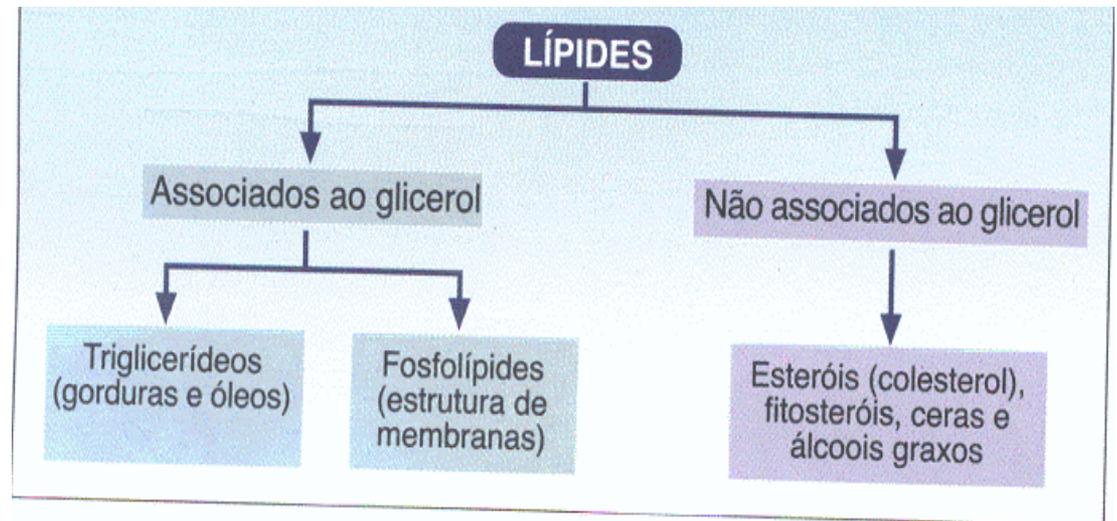
Fonte de energia

Sabor

Fonte de nutrientes essenciais (AG e vitaminas)

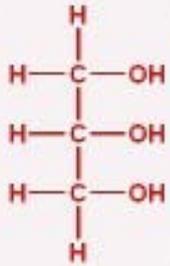
Tipos de lípidios :

**ÓLEOS x
GORDURAS**



TRIACILGLICERÓIS

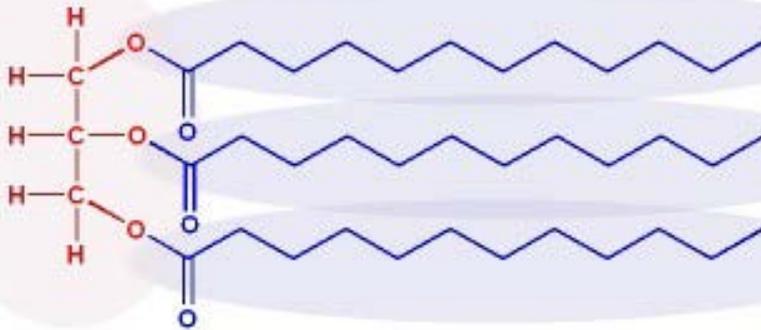
Glycerol



A "free" Fatty Acid

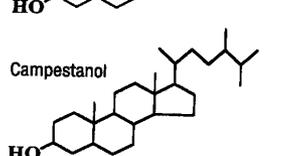
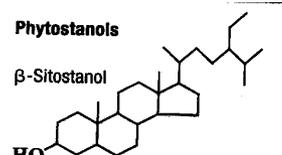
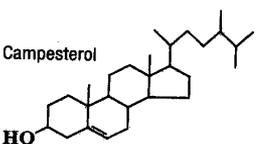
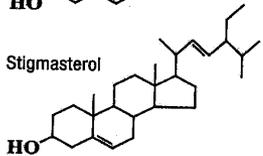
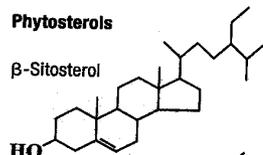
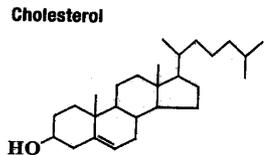
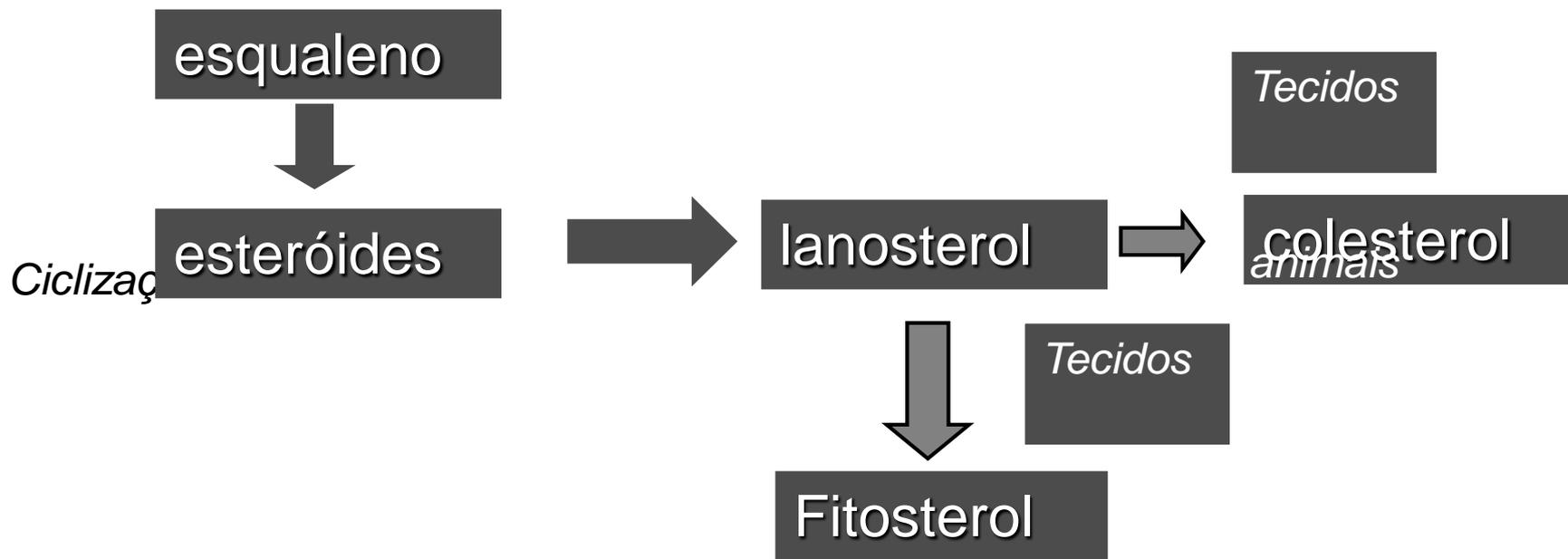


Triglyceride



O carbono no qual o AG se liga
vai determinar suas
propriedades físicas e
nutricionais

ESTERÓIS



Estigmasterol

Campesterol

β -Sitosterol

Ergosterol

Fig. 1—Structures of cholesterol and common phytosterols and phytostanols.

Importância da análise

- Rotulagem
- Padrões de identidade do alimento
- Pesquisa: efeitos das gorduras e dos óleos sobre as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos.
- Etapa prévia para caracterização de lipídios por cromatografia à gás.

Importância da análise

Rotulagem

86,6 % água
4,1% gordura
3,6 % proteína
5,0 % lactose
0,7 % cinzas

Produzido por: S/A FÁBRICA DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS VIGOR - ENTREPÓSITO URB
Rua Joaquim Carlos, 998 São Paulo C.M.P.J. N.º 01.116.331/0001-80
Registro no Ministério de Agricultura BIF/DIPOA sob N.º 0273/1023

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL

PORÇÃO DE 200ml (1 Copo)

Quantidade por porção		%VD (*)
VALOR CALÓRICO	120 kcal	6
CARBOIDRATOS	9 g	2
PROTEÍNAS	6 g	12
GORDURAS TOTAIS	7 g	9
GORDURAS SATURADAS	4 g	16
COLESTEROL	25 mg	6
FIBRA ALIMENTAR	0 g	0
CÁLCIO	230 mg	20
FERRO	** mg	**
SÓDIO	180 mg	8

* VALORES DIÁRIOS DE REFERÊNCIA COM BASE EM UMA DIETA DE 2.500 CALORIAS
** QUANTIDADE NÃO SIGNIFICATIVA

ESTE PRODUTO NÃO DEVE SER USADO COMO ÚNICA FONTE DE ALIMENTAÇÃO DO LACTENTE, SALVO SOB ORIENTAÇÃO DO MÉDICO OU NUTRICIONISTA



Importância da análise

Padrões de identidade do alimento

EX: LEITE DE VACA

Requisitos	Leite Integral	Leite Semi ou Parcialmente Desnatado	Leite Desnatado	Métodos de Análise
Matéria Gorda% m/v	Min. 3,0	0,6 a 2,9	Máx.de 0,5	FIL 1C: 1987
Acidez g ac.				
Lático/100 ml	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18	AOG 15 ^a ed. 947.05
Estabilidade ao etanol 68% (v/v)	Estável	Estável	Estável	FIL 48: 1969
Extrato seco desengordurado % (m/m)	Min. 8,2	Min. 8,3	Min. 8,4	

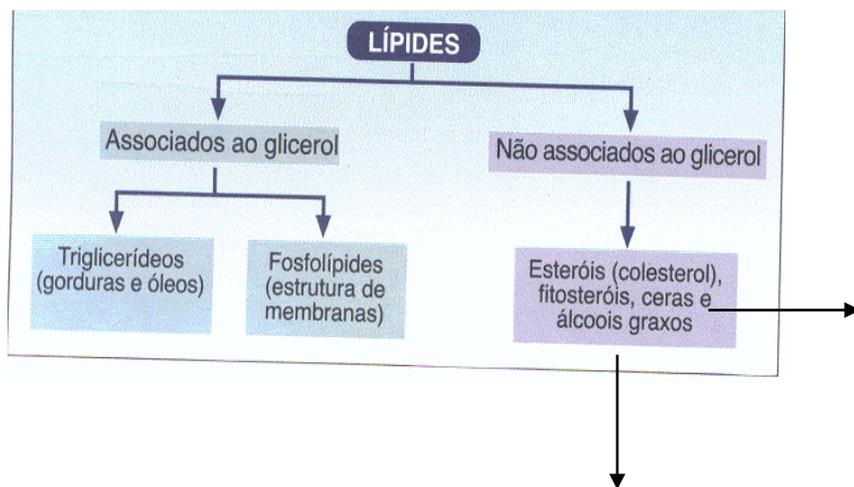
Importância da análise

Pesquisa: efeitos das gorduras e dos óleos sobre as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos

Type of Fat	Dietary Sources	Total Cholesterol	LDL-cholesterol	HDL-cholesterol	Triglycerides
Saturated Fat	Red meat, cheese, butter, commercially fried foods and baked goods	Increase	Increase	No effect	No effect
Trans Fats	Commercially fried foods and commercially prepared snacks and baked goods	Increase	Increase	Slight Decrease	No effect
Monounsaturated Fats	Nuts, olives, avocados, olive & canola oils	Decrease	Decrease	No effect	No effect
Polyunsaturated Fats : Omega-6	Corn, soybean and safflower margarine & oils	Decrease	Decrease	Decrease	Unknown
Omega-3	Salmon, mackerel, herring, flaxseed, walnuts, walnut oil, soybean and soybean oil	Decrease	Decrease	No effect	Decrease

Importância da análise

Etapa prévia para caracterização de lípidios por cromatografia à gás.



Os ácidos graxos e os esteróis (colesterol o mais comum) podem ser analisados por cromatografia a gás.

Outros componentes, como as vitaminas lipossolúveis podem ser analisados por cromatografia líquida de alta performance (do inglês HPLC – *high performance liquid chromatography*).

Tipos de solventes

Éter de petróleo

Éter etílico

Clorofórmio

Acetona

Benzeno e outros

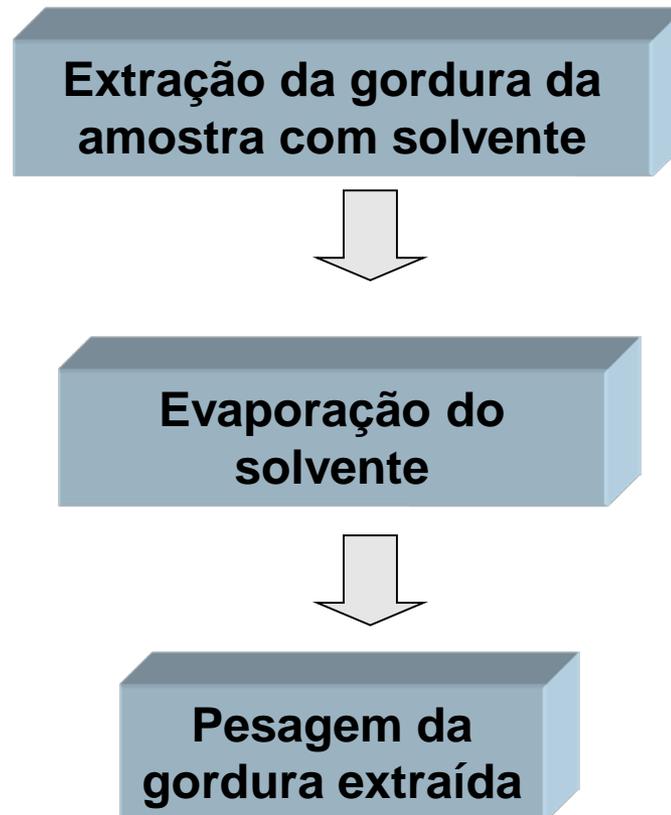
Características ideais do solvente:

1. *Alto poder solvente*
2. *Não solubilizar proteínas, aminoácidos e carboidratos*
3. *Evaporar rapidamente*
4. *Penetrar rapidamente nas partículas da amostra*
5. *Não inflamável*
6. *Atóxico*
7. *Barato*
8. *Não higroscópico*

Metodologia de análise

O método mais comumente empregado é o gravimétrico após a extração por meio de solventes orgânicos

1. Extração com solvente a quente



Método Soxhlet



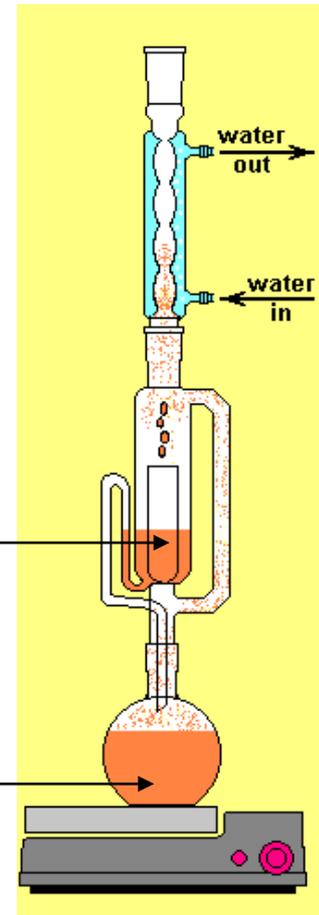
SOXHLET Franz Von
1848- 1926

Princípio: Utiliza um aparato que permite a extração de lipídios através da contínua passagem de um solvente através da amostra.

Preparo da amostra:
Secar em estufa e triturar permitindo assim o máximo contato com o solvente

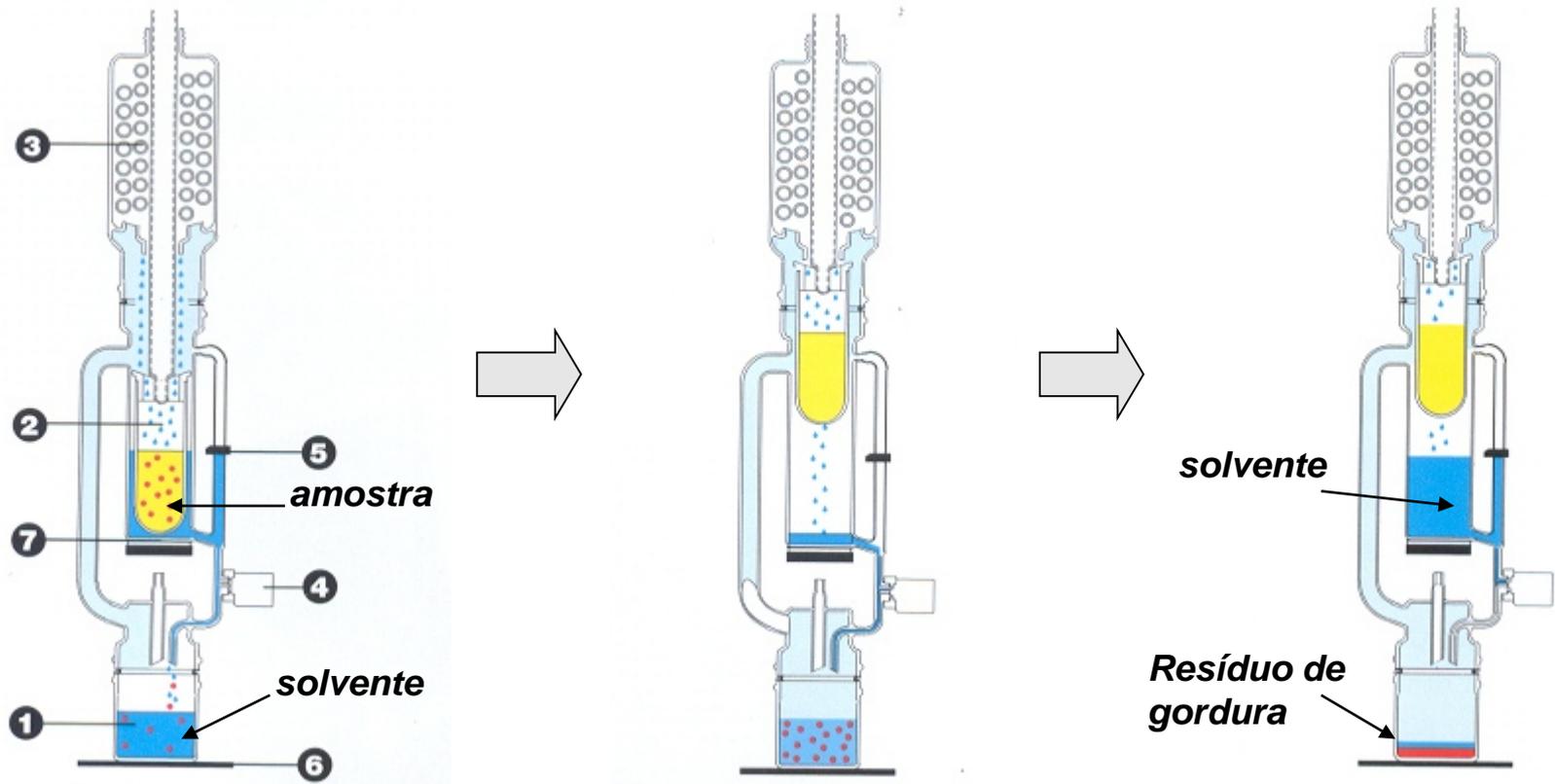
**Amostra
homogeneizada**

solvente



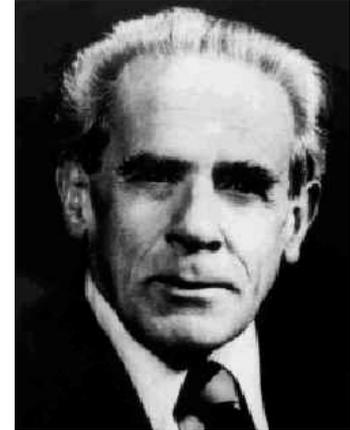
Características:

- O extrator utiliza o refluxo do solvente
- Só pode ser usado com amostras sólidas
- A amostra não fica em contato direto com o solvente em ebulição
- A quantidade de solvente deve ser suficiente para atingir o sifão



2. Extração com solvente a frio

Despite the early use of chloroform in extracting lipids (*Bornmann JH, Assoc Off Agric Chem 1931, 14, 489*), the greatest improvement of the extraction of polar lipids from animal tissues was made when **Folch** described in 1957 his classical extraction procedure (see [Folch biography](#)). This procedure remains one of the best described and the most commonly used by lipidologists around the world. Some other procedures were proposed by Bligh and Dyer (1959) and Sheppard (1963), which also used solvent mixtures made of chloroform/methanol and ethanol/diethyl ether, respectively.



J. Folch
25 March 1911 - 3 October 1979

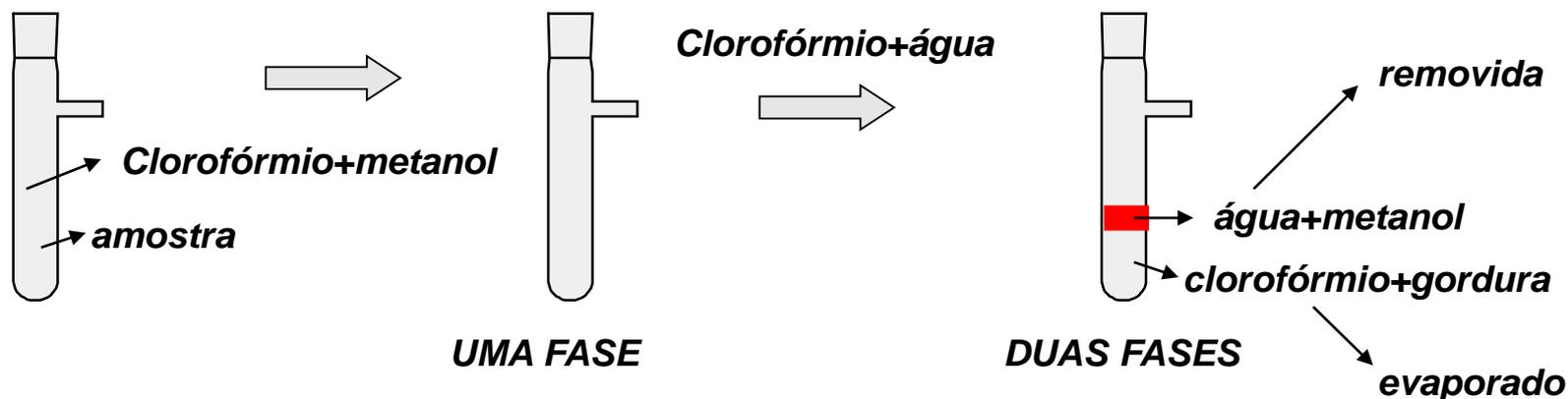
**A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION
OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES**
By JORDI FOLCH, M. LEES, AND G.H. SLOANE STANLEY

Journal of Biological Chemistry 1957, 226, 497-509

2. Extração com solvente a frio

Método Bligh-Dyer

Princípio: Utiliza uma mistura a frio de três solventes: clorofórmio-metanol-água



Características:

- A extração é a frio \Rightarrow para amostras que serão avaliadas quanto ao nível de peroxidação e perfil de ácidos graxos
- Pode ser usado para qualquer tipo de amostra (seca ou úmida)

reference: *Canadian J. Biochem.* 37: 911-917, 1959

3. Extração de gordura ligada a outros compostos

Hidrólise ácida \Rightarrow Processo de Gerber

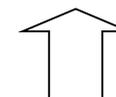
Método de rotina usado para leite e produtos lácteos



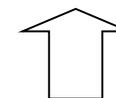
Centrifugação direta
no butirômetro a 71°C



Digestão protéica



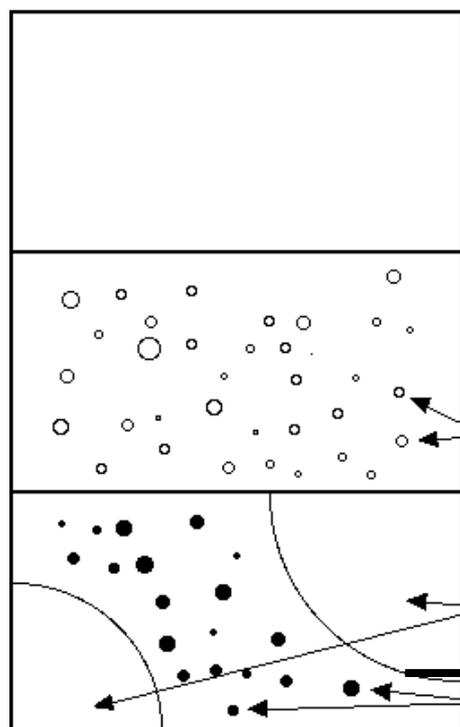
Ácido sulfúrico
($d=1,82$) e
álcool isoamílico



Precisa ser rompido
para liberar a gordura

Milk Structure

Emulsão: óleo em água



x1 Opaque liquid

x1000 Fat emulsion

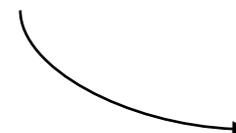
fat globules

x10,000 Casein suspension

fat globules

casein micelles

Filme protéico



Exemplo de determinação do teor lipídico de alimentos

1. Extração com solvente a quente - Soxhlet



Pesar o balão previamente dessecado

Ex: Peso inicial = 120.703g

Pesar a amostra no papel de filtro

Ex: Peso amostra = 1.965g

Colocar a amostra no extrator

Extrair por 8 horas

Secar o solvente (éter)

Pesar o balão

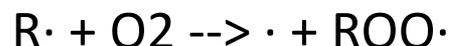
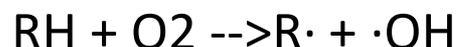


Ex: Peso final = 121.212g

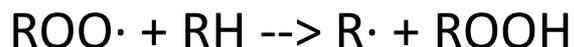
Oxidação Lipídica



• Iniciação:



• Propagação:



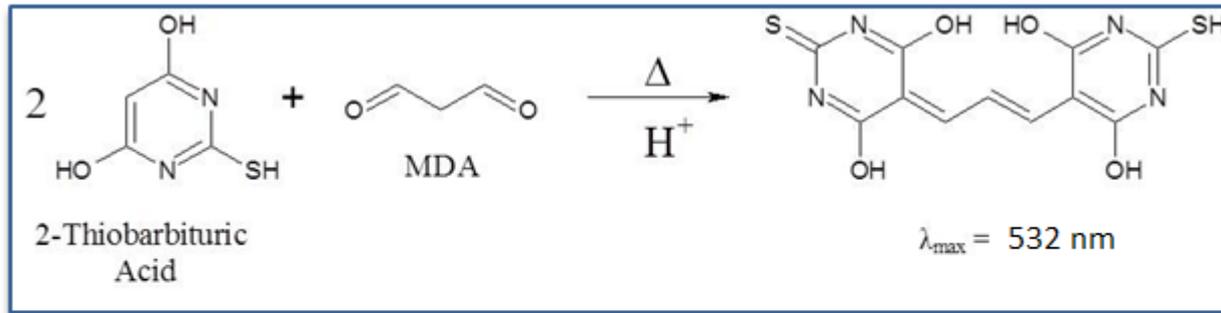
Terminação:



• Onde:

- RH é um ácido graxo insaturado;
- R· é um radical livre formado pela remoção de um hidrogênio de um carbon adjacente a uma dupla ligação
- ROOH é um hidroperóxido, produto majoritário inicial da oxidação que se decompõe para formar outros compostos responsáveis por odores estranhos ao óleo ou gordura (*off-flavors*).
- Tais produtos incluem o hexanal, pentanal e malonaldeído.

Método do ácido tibarbitúrico

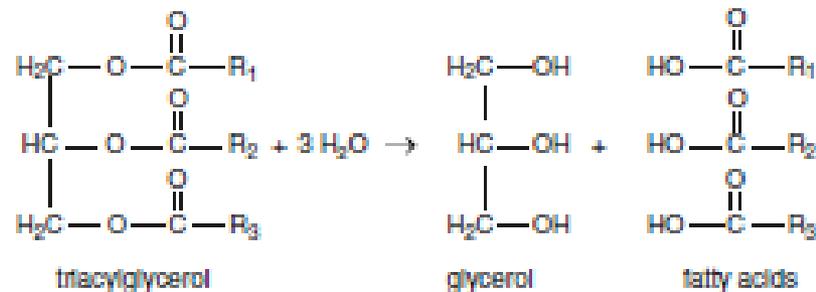


MDA = malondialdeído – Produto de terminação da oxidação Lipídica

Acidez de óleos

Mede o teor de ácidos graxos livres

- Se o teor é alto pode indicar um processo de hidrólise de triacilgliceróis.
- No refino do óleo, mede a perda durante as etapas. Um alto nível de acidez, na fabricação, indica um refino mal feito
- Pode indicar também um processo de deterioração do óleo (contaminação por microrganismos)

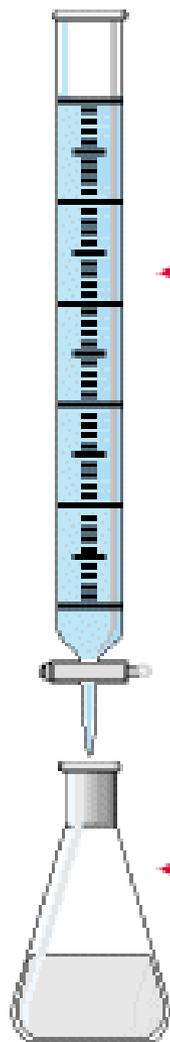


Volumetria



- Técnica analítica utilizada para determinar a concentração de um determinado reagente
- Também chamada de Análise Volumétrica

Volumetria



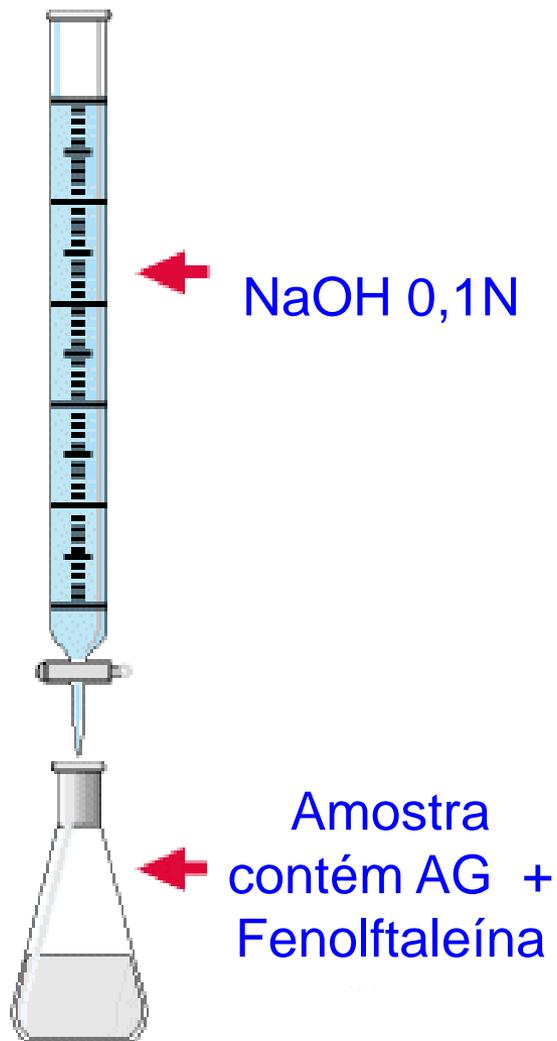
← Bureta contém o Titulante

← Frasco contém a amostra a ser Titulada + um indicador

Titulante = Solução padrão de um reagente de Concentração conhecida

Indicador = Substância que sofre mudança de cor quando é atingido o PONTO DE EQUIVALÊNCIA entre o Titulante e a Amostra

Volumetria



1º passo: Despejar lentamente o conteúdo da bureta sobre a amostra agitando esta última constantemente.

2º passo: Quando ocorrer a mudança de incolor para rosa claro, a titulação terá atingido o ponto de equivalência entre a base e o ácido



3º passo: Anotar o volume de Titulante gasto e calcular a concentração do Titulado.

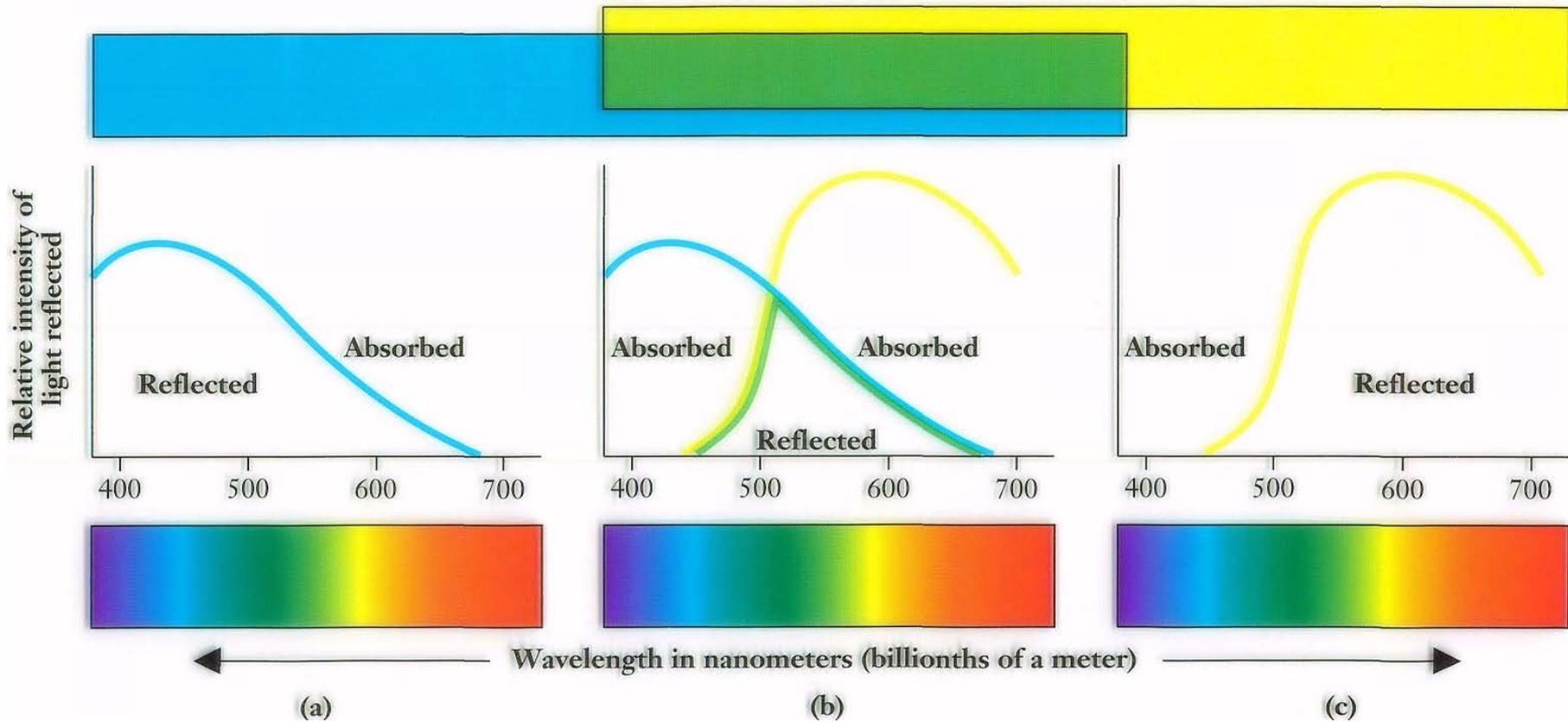
Análise Espectrofotométrica

**Por que enxergamos
cores?**

Absorção

Enxergamos cores, pois as moléculas absorvem parte da luz visível e refletem outra parte. A parte refletida é captada pelo olho humano e interpretada pelo nosso aparato visual

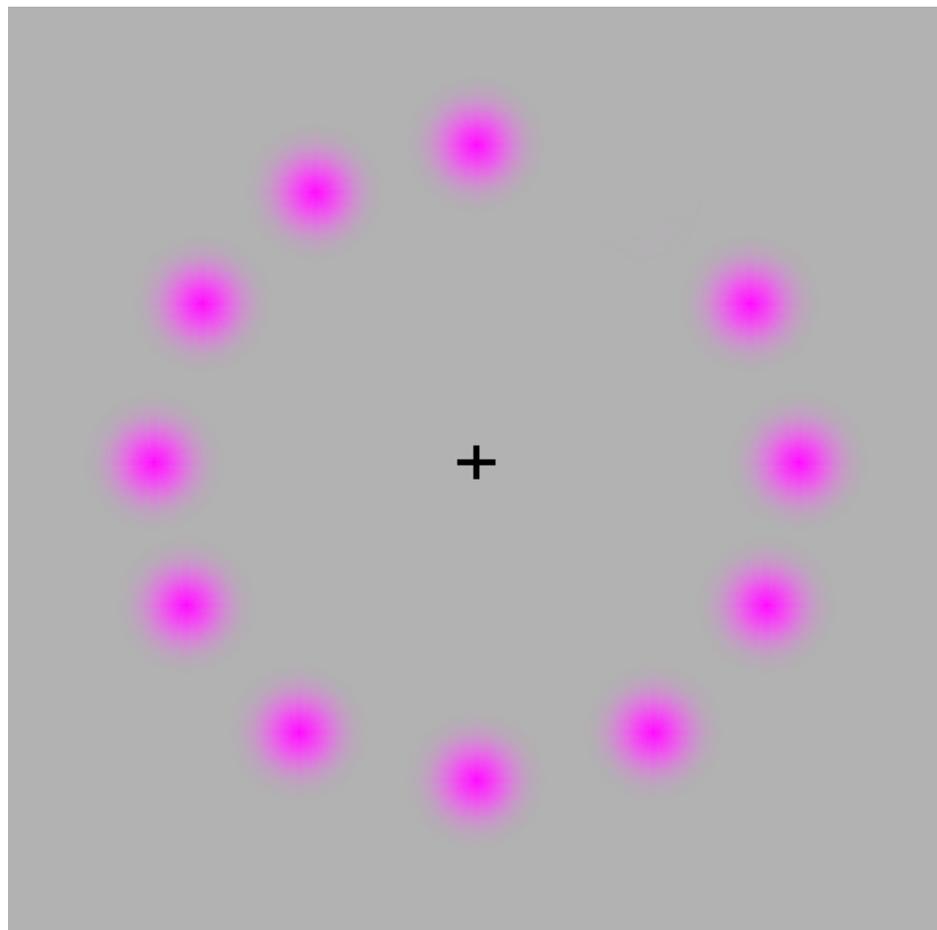
As espécies que absorvem luz são chamadas substâncias cromóforas.

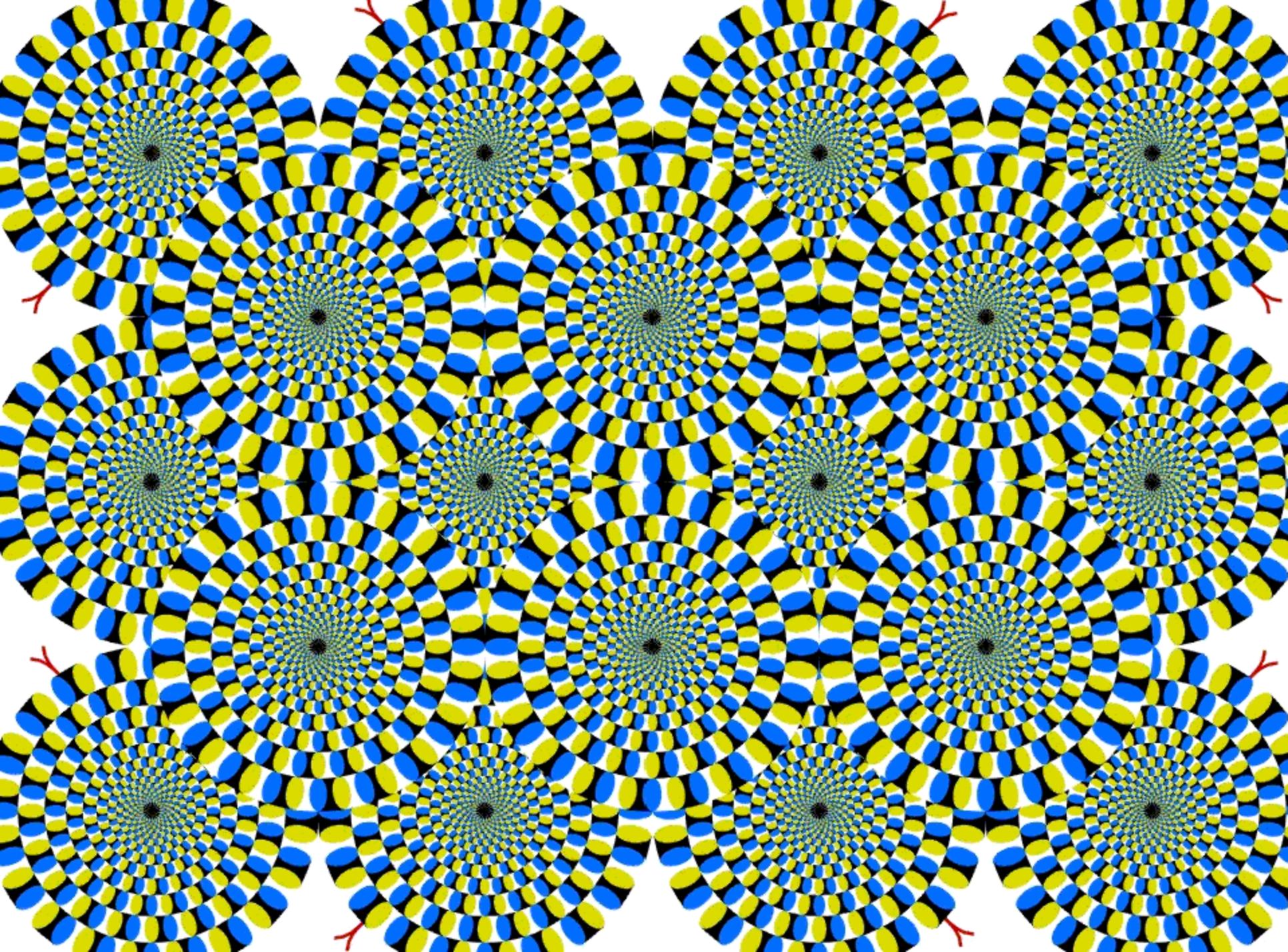


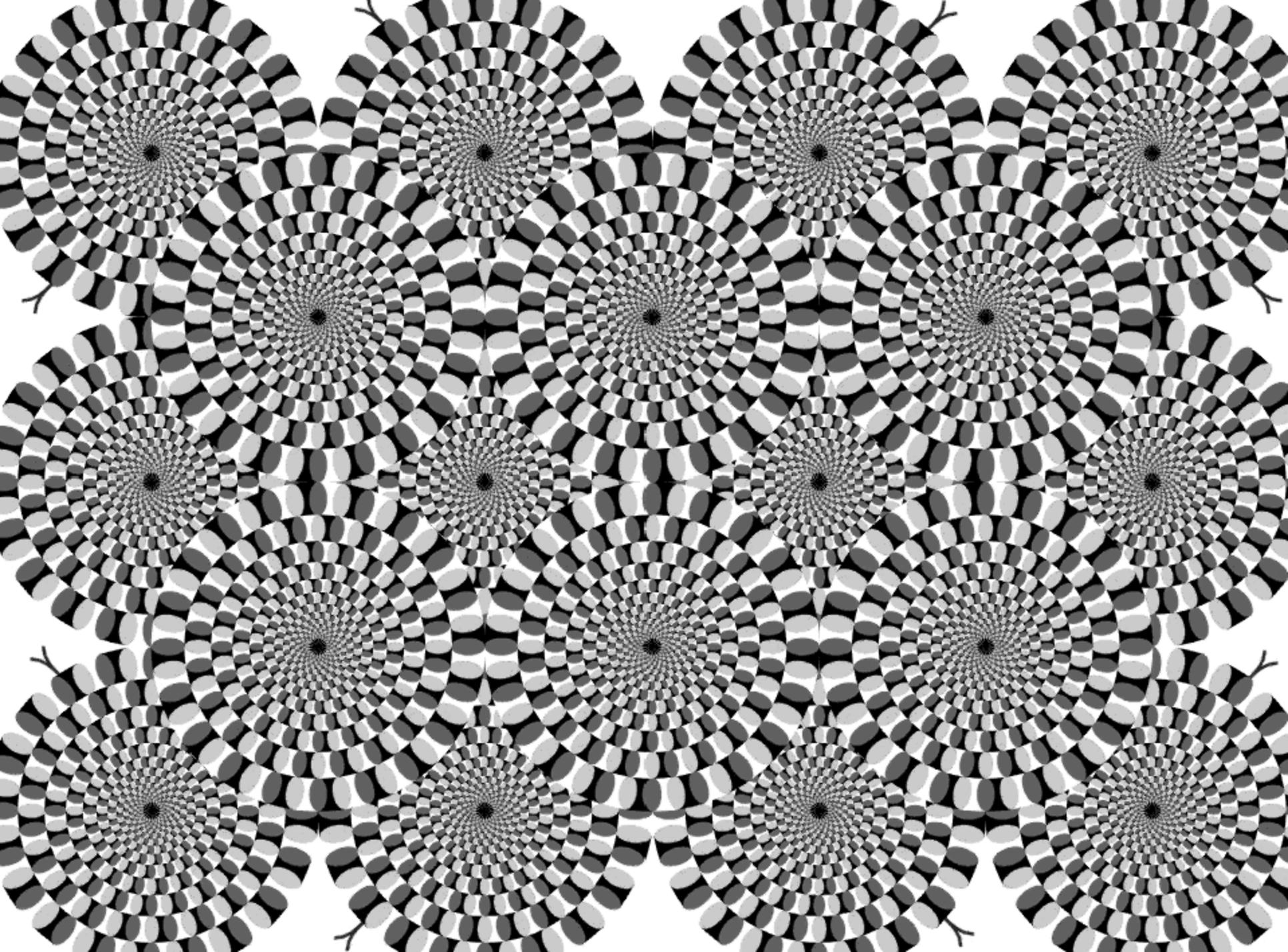


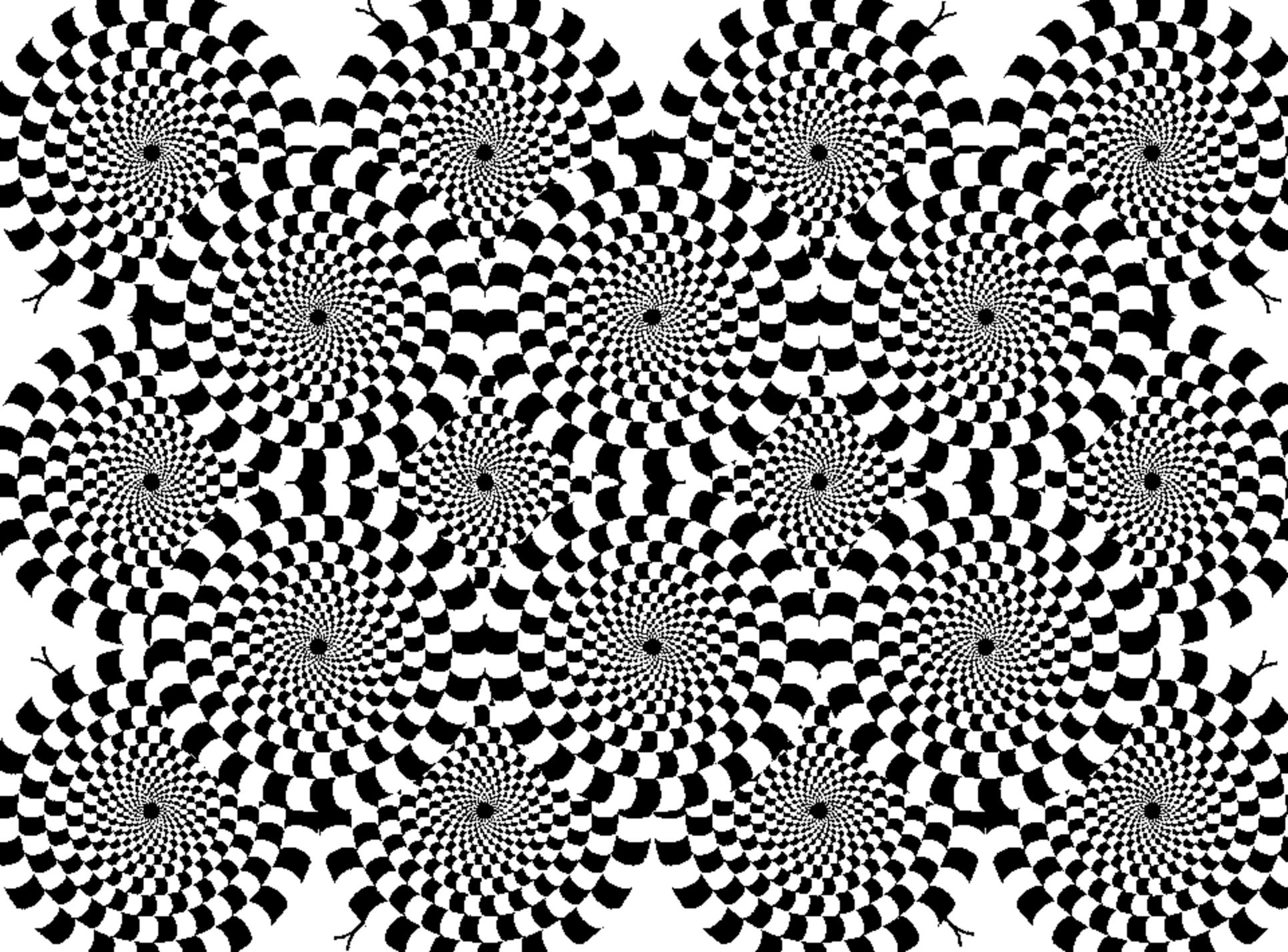
Soluções de um corante vermelho

Porém, podemos nos enganar com as cores....





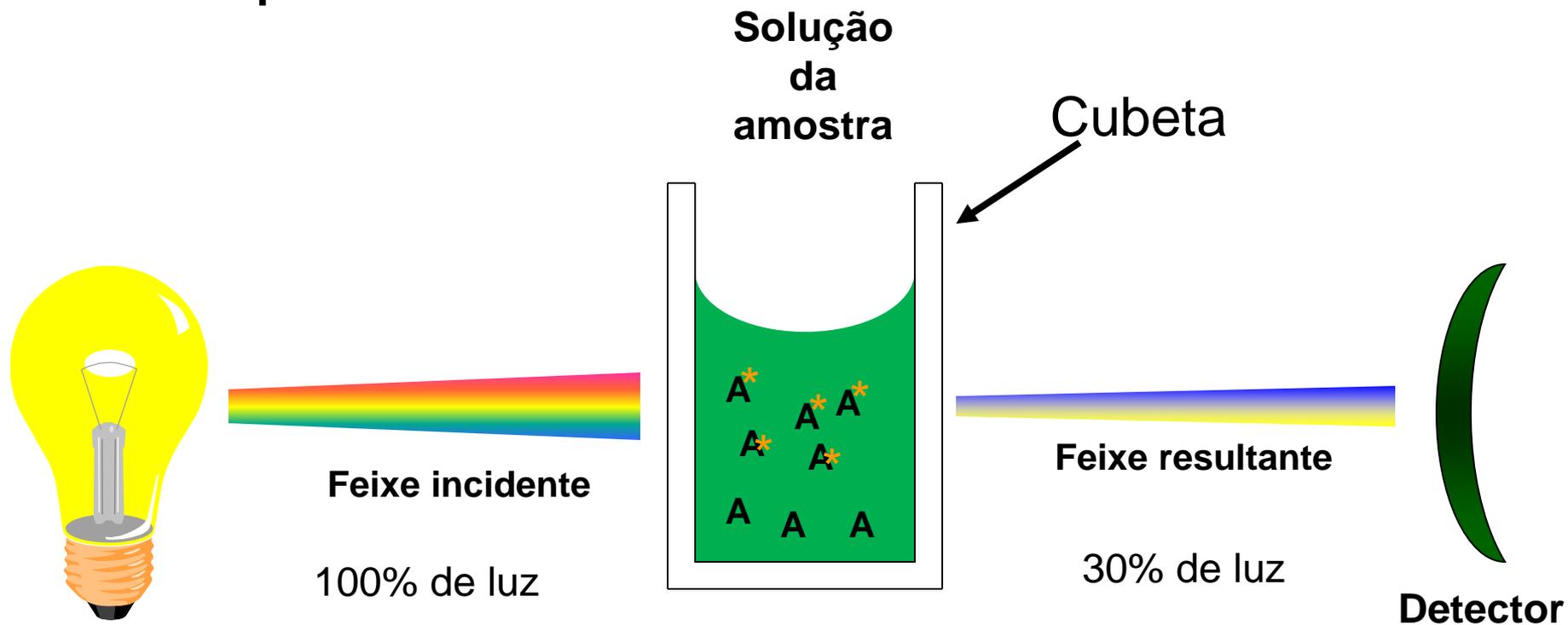




Como medir a concentração de uma substância sem depender de nossa análise visual?

Atribuindo um valor numérico a quantidade de luz absorvida.

Princípio



Análise espectrofotométrica

Determinar a concentração de um dado analito em uma solução da amostra.

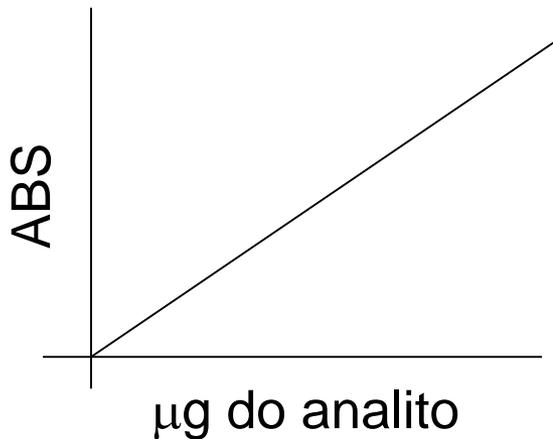
Princípio

A determinação é baseada na medida da quantidade de luz que é absorvida a partir de um feixe que passa por uma solução da amostra

Análise espectrofotométrica

Requerimento básico:

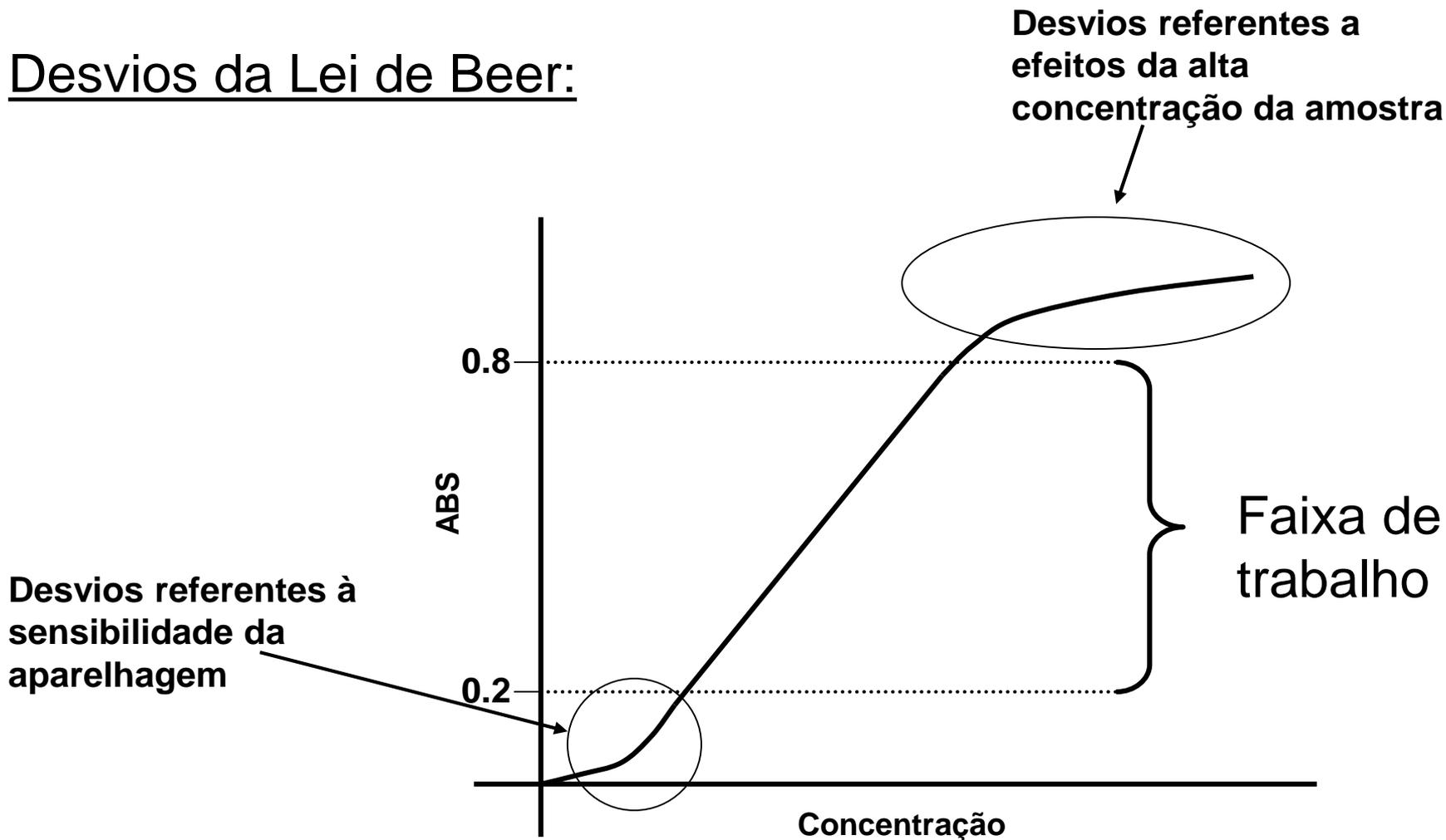
Proporcionalidade entre Absorbância e Concentração
“Lei de Beer (ou Lambert-Beer)”



No entanto, esta proporcionalidade é válida apenas em um intervalo de Absorbância denominado Faixa de trabalho ou Faixa de aplicabilidade.

Análise espectrofotométrica

Desvios da Lei de Beer:



A faixa de trabalho é variável. Depende do método empregado

Como fazer uma análise espectrofotométrica?



Análise espectrofotométrica

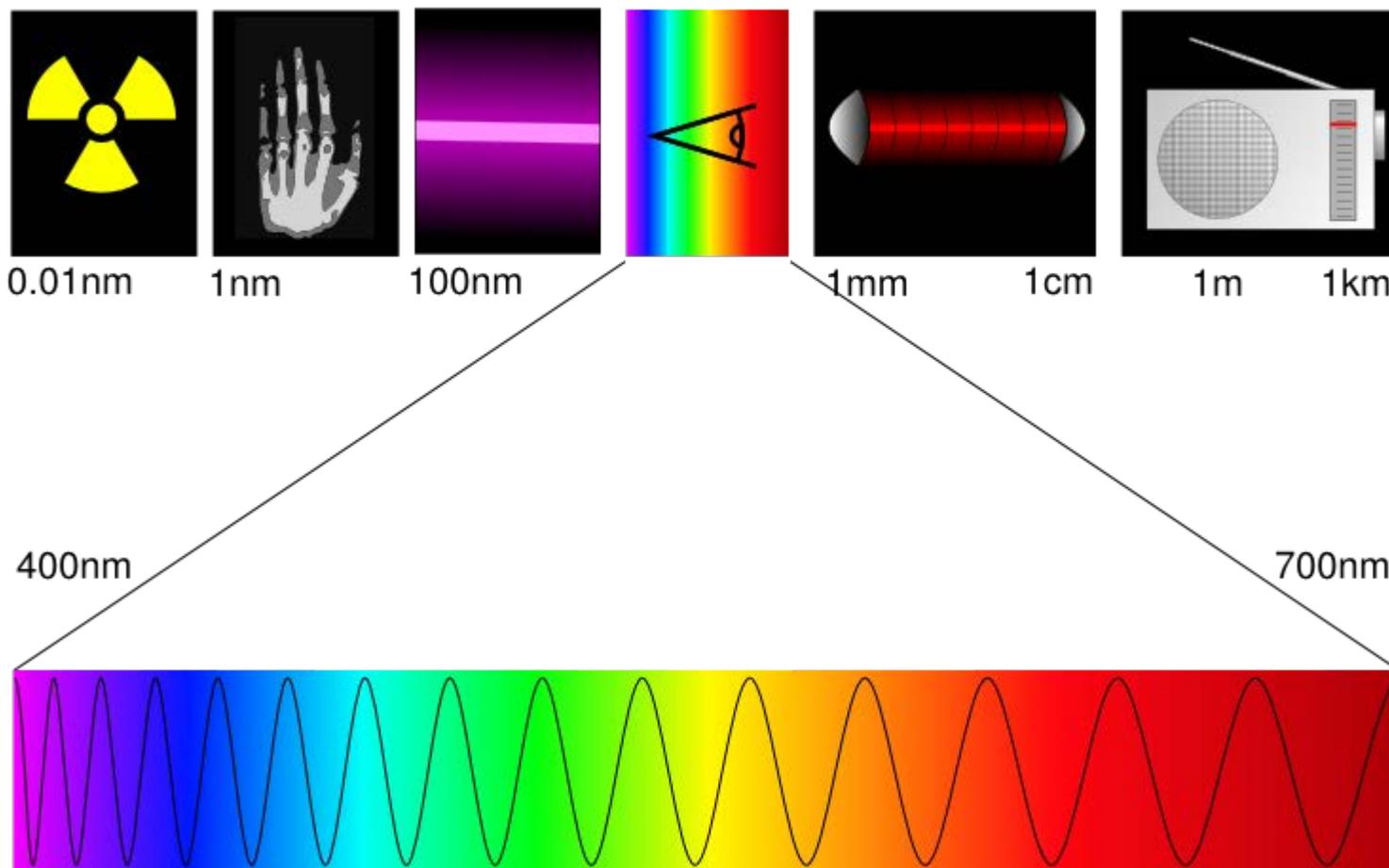
1) O analito deve ser uma substância cromófora

Caso o analito de interesse não absorva luz na região do Visível, este deve ser convertido em outras espécies químicas que absorvam luz nessa região. A amostra deve se encontrar em uma solução homogênea.

2) Deve-se fazer a análise em um comprimento de onda específico para a substância.

Análise espectrofotométrica

Radiações eletromagnéticas



Análise espectrofotométrica

3) O aparelho deve ser zerado.

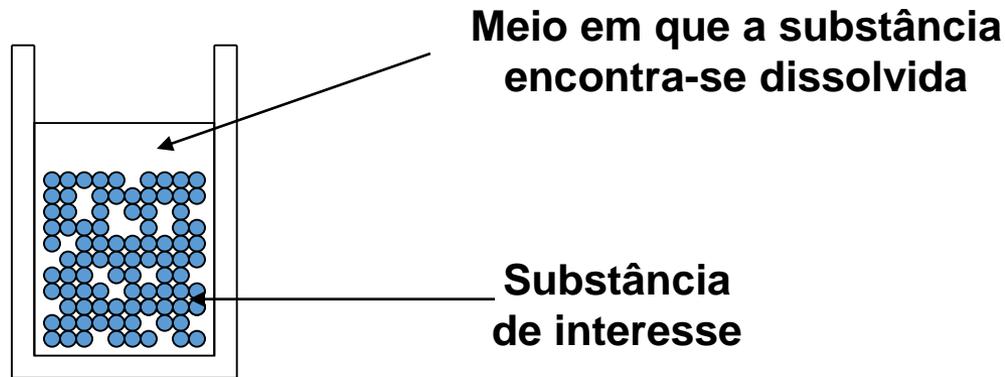
Toda substância possui um certo nível de absorção de luz.

Desta forma todo o meio em que se encontra a substância de interesse responde por uma certa porcentagem da Absorbância registrada em uma análise.

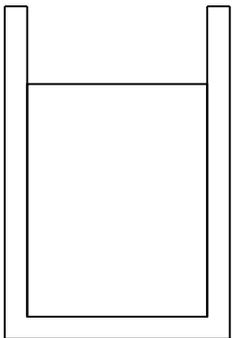
Assim sendo é necessário descontar o valor desta Absorbância antes de proceder as leituras da amostra.

Análise espectrofotométrica

Como isto é feito?



Realizando uma medida de Absorbância de uma solução que contenha apenas os componente do meio em que a substância se encontra, **sem** a substância.



O valor encontrado é descontado do valor de ABS das amostras e dos padrões

Os espectrofotômetros fazem esse processo automaticamente.

Isso é o que se chama zerar o aparelho com um **branco** da amostra.

Análise espectrofotométrica

4) Necessário a construção de uma curva-padrão.

É necessário que se faça uma medida de soluções contendo concentrações conhecidas da substância que será analisada.

Desta forma, as Absorbâncias obtidas a partir destas soluções servirão de base para o cálculo da concentração da substância na amostra.

Curva-padrão

Quantidade do padrão	Absorbância
----------------------	-------------

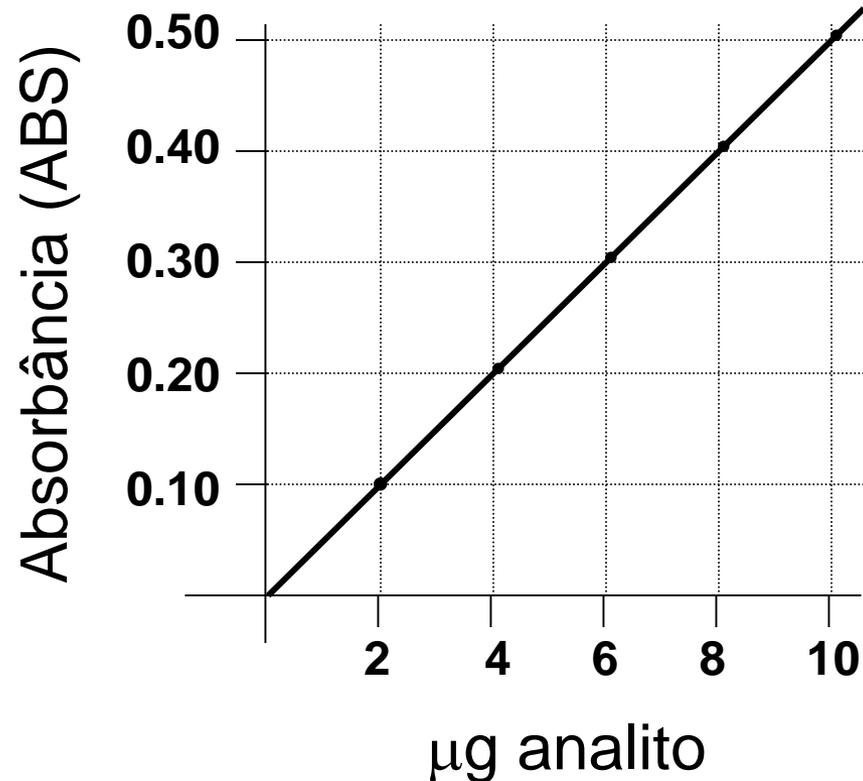
2 μg	0.10
-----------------	------

4 μg	0.20
-----------------	------

6 μg	0.30
-----------------	------

8 μg	0.40
-----------------	------

10 μg	0.50
------------------	------



A faixa de concentração do padrão deve fornecer sinais de Absorbância que fiquem na faixa de linearidade previsto pela Lei de Beer (0.2-0.8 para a maioria dos casos)

Análise espectrofotométrica

5) A quantidade de amostra analisada deve ficar dentro da curva padrão

As leituras da amostra deverão apresentar valores de Absorbância dentro do intervalo estabelecido na curva-padrão.

Caso as ABS fiquem acima do valor superior da curva, a amostra deverá ser adequadamente diluída.

Caso as ABS fiquem abaixo do menor valor, será necessário empregar maior quantidade de amostra na análise.

Análise espectrofotométrica

Requerimentos:

- 1) O analito deve ser uma substância cromófora.
- 2) Deve-se fazer a análise em um comprimento de onda específico para a substância.
- 3) O aparelho deve ser zerado.
- 4) Pode ser necessário a construção de uma curva-padrão.
- 5) A quantidade de amostra analisada deve ficar dentro da curva padrão
- 6) Ou pode-se se utilizar como uma medida comparativa...

Como é o caso do Valor de TBARS...

$$\text{Valor de TBARS} = \frac{A}{P}$$

Onde

A = Absorbância

P = Peso da amostra em gramas

Neste caso, o resultado obtido só terá sentido comparativo, ou seja, ele deve ser interpretado em relação a valores de referência ou numa comparação entre amostras