



USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

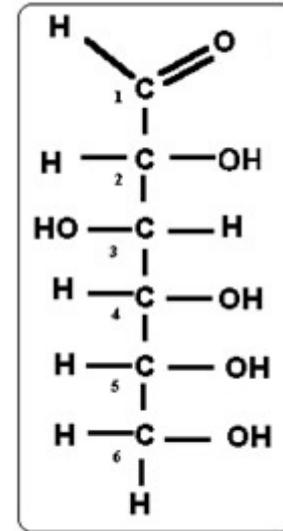
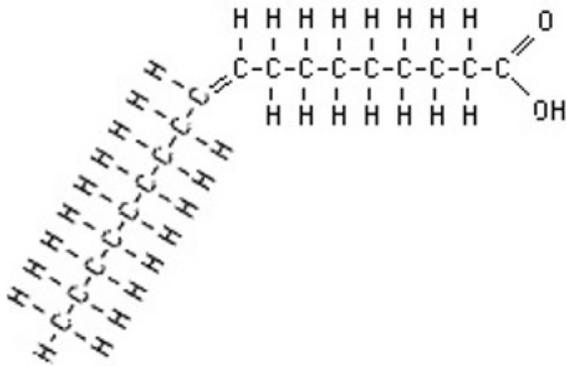
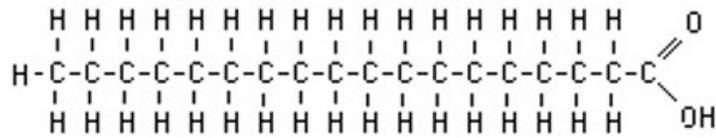
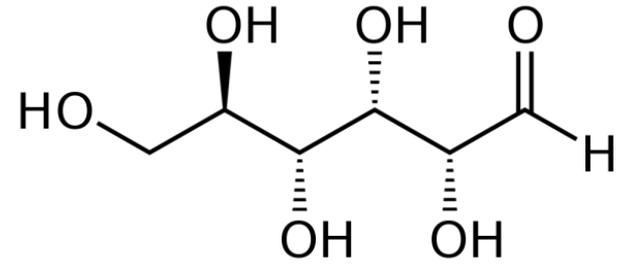
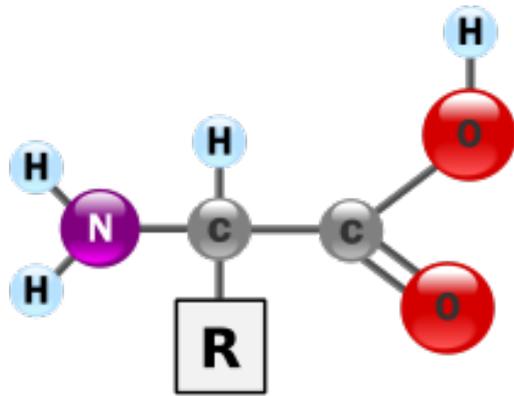
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

FBA – 0201
Bromatologia

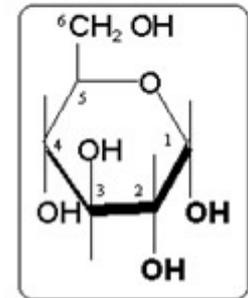
DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS
ALIMENTOS

Prof. Dr. João Paulo Fabi

Setembro de 2018



forma linear



forma cíclica

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS

- Determinação de um elemento químico elementar (C, N);
- Determinação de grupo específico da proteína (aminoácido, ligação peptídica). A conversão para conteúdo de proteína é feita através de um fator.

ANÁLISES ELEMENTARES

A. Análise de carbono

- digestão mais fácil do que para o nitrogênio;
- menores erros no resultado por causa da maior quantidade em relação ao nitrogênio;
- fator de correção mais constante do que o nitrogênio;
- **Desvantagem: maior dificuldade em separar os carbonos pertencentes à proteína dos carbonos de outros componentes.**

B. Análise de nitrogênio

- é a determinação mais utilizada;
- considera que as proteínas têm 16% de nitrogênio em média (vai depender do tipo de proteína);
- fator geral na transformação de nitrogênio para proteína é de 6,25.

Este fator de conversão gera erros quando o conteúdo em N de um alimento é muito diferente de 16%. Nestes casos, existem os fatores de conversão específicos para cada alimento

Método de Kjeldahl

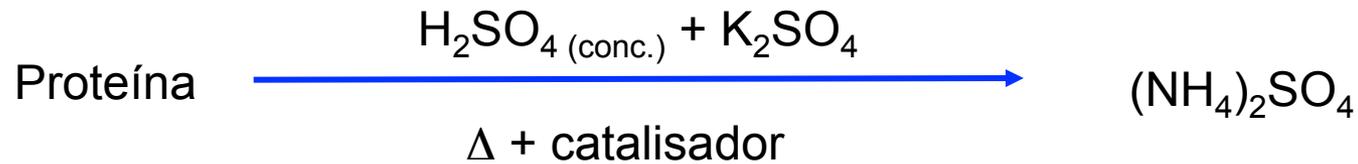


Johann Kjeldahl
(1849-1900)

Desenvolveu em 1883 o processo básico para determinação de nitrogênio orgânico total. Os passos incluem:

- Digestão: H_2SO_4 (conc.) a $350\text{-}400^\circ\text{C}$ + catalisador
- Neutralização e Destilação
- Titulação
- Conversão do teor de N total para teor de proteína

Método de Kjeldahl



K_2SO_4 : Aumenta o Ponto de Ebulição do H_2SO_4 (de 337 para mais de 400°C)



Digestão mais eficiente

CuSO_4 : Catalisador. Acelera o processo de oxidação da matéria orgânica



Amostra ANTES da digestão



Amostra DEPOIS da digestão



Método de Kjeldahl

Neutralização e Destilação

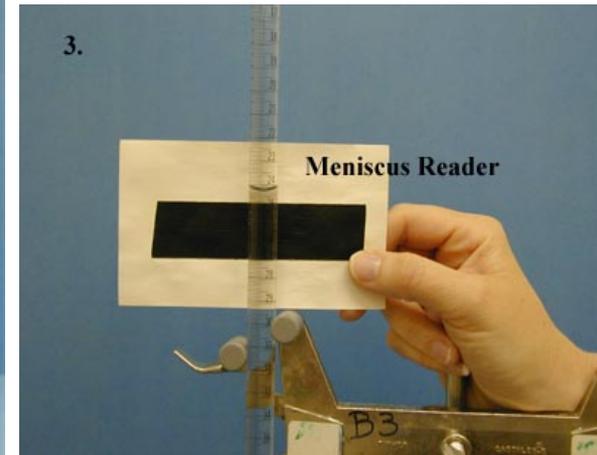
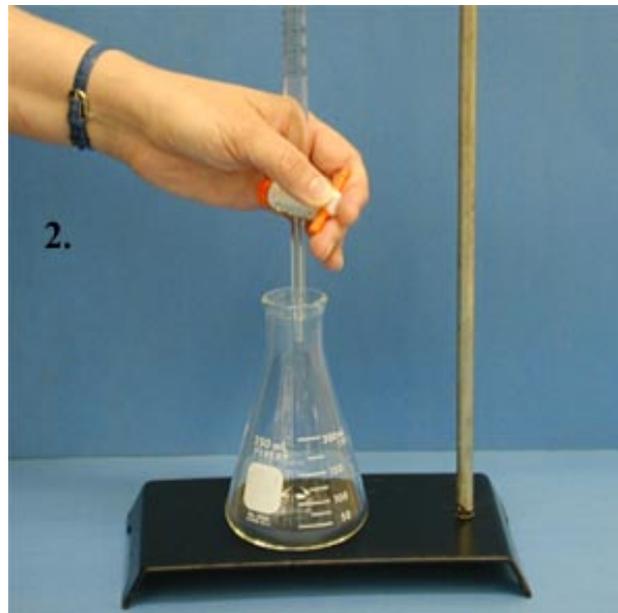
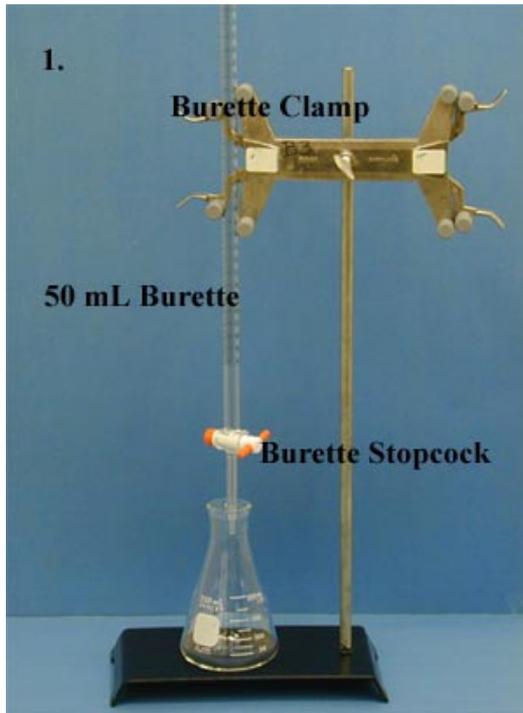


Borato de amônio



Método de Kjeldahl

Titulação



Método de Kjeldahl

1 Eq HCl _____ 1 Eq Nitrogênio

1N (1Eq/1000 mL) _____ 14 g Nitrogênio

1N (1mL) _____ 0,014g Nitrogênio

0,1N (1mL) _____ 0,0014g Nitrogênio

Logo:

1mL (0,1N) _____ 0,0014g Nitrogênio

Vol. de HCl _____ Xg Nitrogênio

Método de Kjeldahl

A maioria das proteínas possui em média 16% de nitrogênio, se levarmos em conta apenas o **N das ligações peptídicas**

Portanto:

16g N _____ 100g proteínas

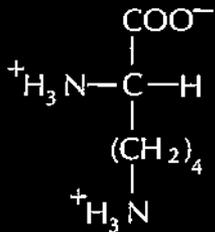
1g N _____ Xg

$$Xg = 100/16 = \mathbf{6,25}$$

O teor de proteína bruta de um alimento é obtido pela multiplicação do teor de N - total pelo fator de conversão (6,25).

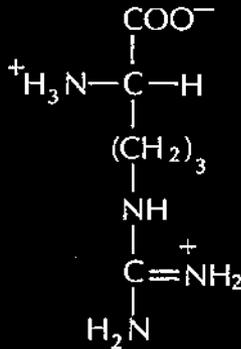
Aminoácidos básicos

Lisina
(Lys, K)



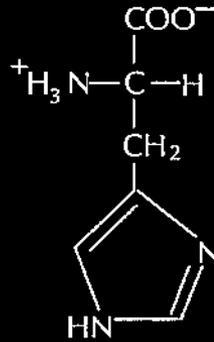
AAA
AAG

Arginina
(Arg, R)



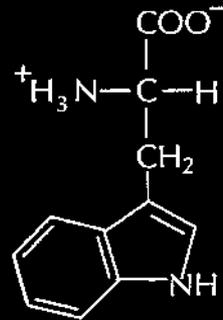
AGA
AGG
CG(N)

Histidina
(His, H)



CAU
CAC

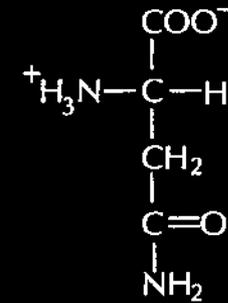
Triptofano
(Trp, W)



UGG

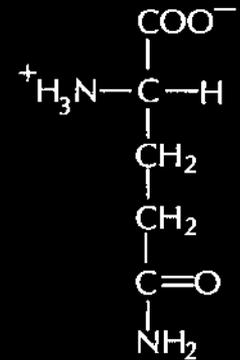
Aminoácidos com grupo amida

Asparagina
(Asn, N)



AAU
AAC

Glutamina
(Gln, Q)



CAA
CAG

Levando em conta o N nas cadeias laterais de aminoácidos como Lys, Arg, His, Trp, Asn e Gln, o teor de N será diferente, logo o fator de correção também!

Método de Kjeldahl

Conhecendo a composição de AAs de um produto, é possível propor fatores mais específicos.

	% de N na proteína	Fator
Ovo ou carne	16,00	6,25
Leite	15,70	6,38
Trigo	17,15	5,83
Milho	17,70	5,65
Aveia	18,66	5,36
Soja	18,12	5,52
Arroz	19,34	5,17



Add the BUCHI Kjeldahl Tablets and the corresponding volume of sulfuric acid

Método de Kjeldahl

Vantagens

- Aplicável a muitos tipos de alimentos
- Relativamente simples
- Não é caro
- Preciso. Trata-se de um método oficial para a determinação de proteínas
- Pode analisar microgramas de proteína em um alimento (micro Kjeldhal)

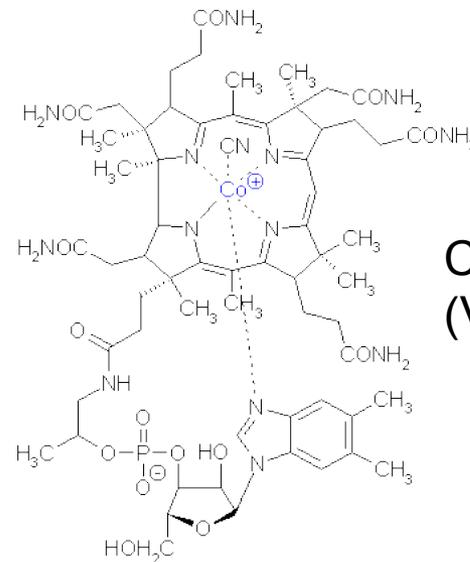
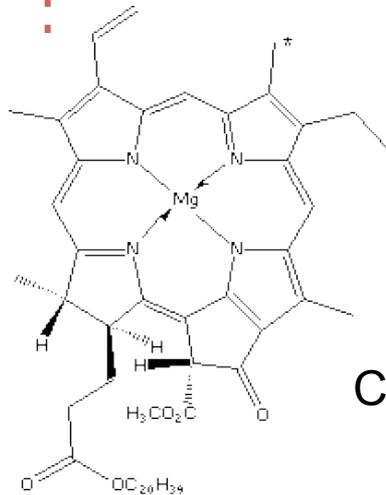
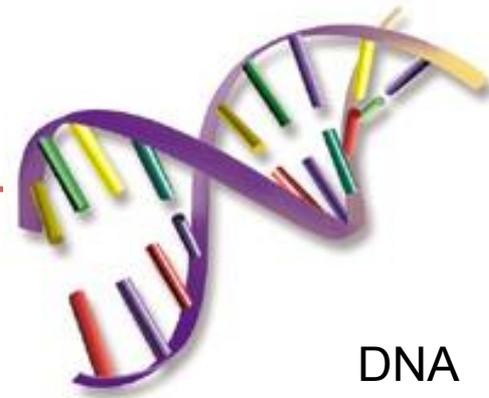
Desvantagens

- Mede Nitrogênio orgânico total, não apenas nitrogênio de proteínas**
- Demorado
- Utiliza reagentes corrosivos.

Método de Kjeldahl

Outras possíveis fontes de N na amostra:

- Amino ácidos livres
- Pequenos peptídeos
- Ácidos nucleicos
- Amino açúcares
- Porfirinas
- Algumas Vitaminas
- Alcaloides
- Ureia
- Íons Amônio



Método de Kjeldahl

- 1. Digestão: H_2SO_4 (conc.) a 350-400°C + catalisador**
- 2. Neutralização e Destilação**
- 3. Titulação**
- 4. Conversão do teor de N total para teor de proteína**

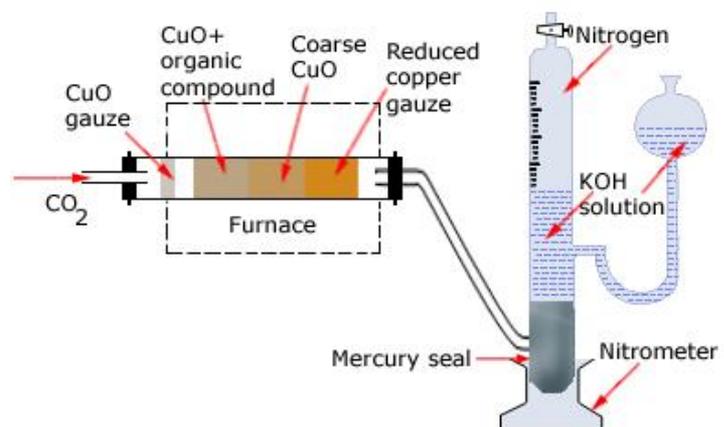
METODO DE DUMAS

O método proposto por Jean-Baptiste Dumas (1831) determina N total, após combustão da amostra a 700 – 900 °C e medida volumétrica do N gasoso (impreciso).

Equipamentos recentes completam a análise em 3 minutos e com boa precisão, pois consegue eliminar a água e CO₂ presentes, analisando em detector de condutividade térmica (TCD) apenas o N elementar.

<https://www.youtube.com/watch?v=Jyo0nnyhoas>

Kjeldahl vs. Dumas Chemistry



Kjeldahl	Dumas
Sample digested in sulfuric acid and a catalyst for 1-2 hours	Sample is introduced into a furnace at high temperature in the presence of oxygen, in a inert gas stream. Digestion time: < 1 min
$(\text{CHNO}) + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_4^+$	Formation of N ₂ and NO _x as well as other products of combustion
Neutralization of sulfuric acid with sodium hydroxide, formation of ammonia gas and distillation of ammonia	Reduction of NO _x to N ₂ , trapping or removal of other gases, detection of N ₂ on a TCD detector
$\text{NaOH} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+$	
Ammonia is typically trapped in a boric acid solution to form ammonium borate and titrated with sulfuric acid.	

ANÁLISE POR GRUPOS FUNCIONAIS

METODO POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA

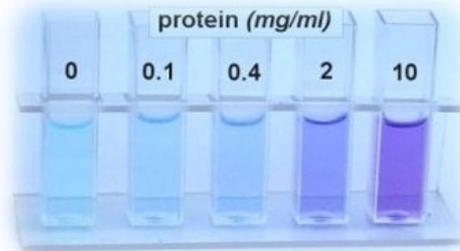
Proteínas absorvem UV em 280 nm.

Aminoácidos aromáticos: tirosina, triptofano



METODO POR BIURETO

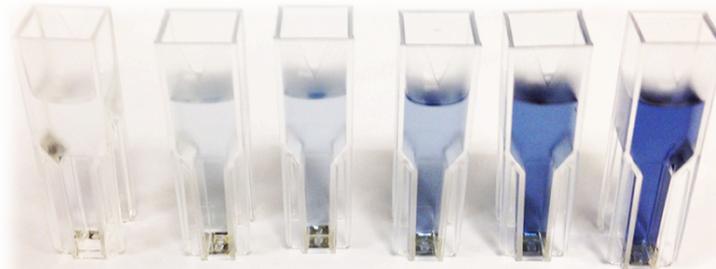
ligações peptídicas formam um complexo de cor roxa com sais de cobre em soluções alcalinas



MÉTODO DE LOWRY (reagente de FOLLIN-CIOCALTEAU)

reagente fenol e cobre em condições alcalinas: aminoácidos aromáticos

10 a 20X mais sensível que UV, 100X mais sensível que o método por biureto



ANÁLISE POR GRUPOS FUNCIONAIS

MÉTODOS TURBIDIMÉTRICOS

A medida é baseada na turbidez causada pela proteína precipitada por algum agente precipitante

PT. Tripatra Andalan Medika

Turbidimetric Assay

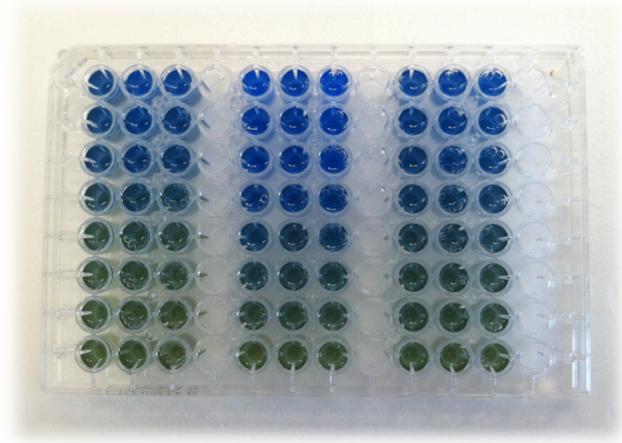
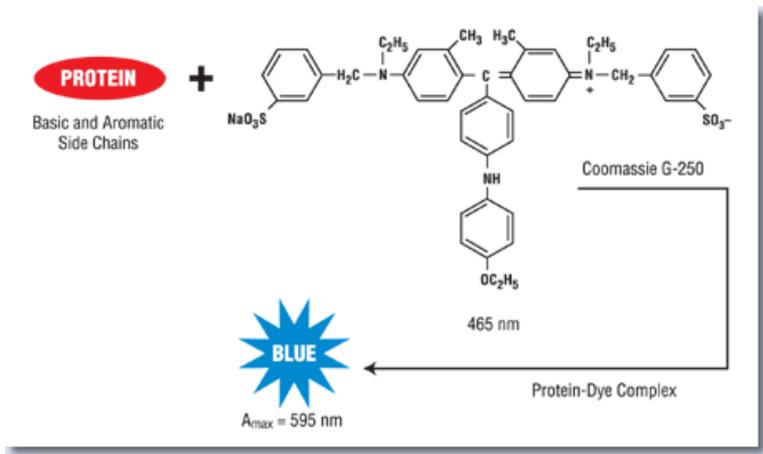
Turbidimetric Assay
Turbidimetric assays measure the intensity of the transmitted light as shown below.

Early turbidimetric assay
Were Not sensitive enough
To Measure low levels of
Serum proteins.
However, significant
improvements in newer
automated analyzer
have made Turbidimetric
assays equivalent to
nephelometric
analysis

Turbidimetry Principle
Based on the principle of
measuring the intensity of
transmitted light.
A. Incoming Light
B. Transmitted Light

MÉTODO DYE-BINDING (ligação de corante)

Corante que forma um complexo colorido com a proteína: “Bradford”



REFERÊNCIAS

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos:** componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1.

FENNEMA, O. R. **Química de alimentos.** 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

DE MAN, J.M. **Principles of Food Chemistry.** 3.ed. Gaithersburg, Maryland, 1999.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry.** 4.ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.