

# Implementação e validação de uma metodologia para análise de fibra alimentar

Ana Rita Mendes

Mestrado em Química Forense  
Departamento de Química  
FCTUC

Julho 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



**Implementação e validação de uma  
metodologia para determinação  
de fibra alimentar**

Ana Rita Mendes

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em  
Química Forense**

Orientador: Prof. Rui Fausto

Co-orientador: Dr.<sup>a</sup> Elsa Cancela

**Julho 2011**

**Universidade de Coimbra**

# Índice

Índice	2
Lista de Abreviaturas	5
Resumo	6
Agradecimentos	8
I-Introdução	9
As Fibras Alimentares	12
1-Definição	12
2- Origem, características e composição da fibra alimentar	15
2.1- Origem: Parede Celular	15
2.2- Características	17
2.2.1- Classificação	18
2.3- Composição Química	21
2.3.1- Celulose	21
2.3.2- Hemicelulose	22
2.3.3- Pectinas	22
2.3.4- $\beta$ -Glicanos	23
2.3.5- Amido Resistente	23
2.3.6- Oligossacarídeos não-digeríveis	24
2.3.7- Outros carboidratos sintéticos	25
2.3.8- Gomas e mucilagens	26
2.3.9- Lignina	26
2.3.10- Outros componentes	27
II- A Química Forense na Segurança Alimentar	27
1- Aditivos Alimentares	27
2-Rotulagem	31

3-Polidextrose e Amido Modificado	33
3.1-Polidextrose	33
3.2-Amido Modificado	33
III- Métodos e Materiais	34
3.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	34
3.1.1. Introdução ao método	34
3.1.2. Princípios Teóricos e Instrumentais	35
3.1.3- Materiais usados em HPLC	41
3.2- Espectroscopia de Infravermelho, FTIR	41
3.2.1- Materiais usados em espectroscopia de infravermelho	43
3.3-Espectroscopia de Raman	43
3.3.1- Introdução ao método	43
3.3.2- Princípios teóricos	44
3.3.3- Instrumentação	46
3.3.4- Materiais usados em espectroscopia de Raman	48
IV- Procedimento Experimental Implementação do método AOAC 2009.01 na linha de análise de alimentos da ControlVet	49
4.1- Objectivo e domínio de aplicação	49
4.2- Referências	49
4.3- Resumo do processo	49
4.4- Reagentes	50
4.5- Aparelhos e Utensílios	51
4.6- Técnica	52
4.6.1 - Extração da matéria gorda para amostras com teor de gordura superior a 10%.	52
4.6.2 - Toma para análise	53
4.6.3 - Digestão enzimática e filtração	53
4.6.4 – Determinação de fibras de baixo peso molecular	54
4.6.4.1- Filtração	54

4.6.4.2- Desionização da amostra	54
4.6.4.2.1- Preparação da coluna de vidro	54
4.6.4.2.2- Desionização da amostra	54
4.7- Cálculos	55
V- Resultados	56
5.1- Resultados obtidos por HPLC	56
5.2- Resultados obtidos por espectroscopia de Infravermelho	70
5.3- Resultados obtidos por espectroscopia de Raman	74
VI- Conclusão	76
VII- Bibliografia	77

# Lista de Abreviaturas

AOAC - Association of Official Analytical Chemists International

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

GC- Cromatografia Gasosa

HPAEC- High-Performance Anion-Exchange Chromatography

HPAEC-PAD- High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection

FAT- Fibra alimentar total

FAI- Fibra alimentar insolúvel

FAZ- Fibra alimentar solúvel

AGCC- Ácidos gordos de cadeia curta

# Resumo

A determinação e a quantificação do teor de aditivos em alimentos é fundamental na segurança alimentar, uma vez que estes podem ser prejudiciais à saúde do consumidor. Sendo assim, todos os produtos alimentares devem vir rotulados com as percentagens de aditivos que incluem, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) um método adequado para esse fim. As fibras alimentares, em particular, são também um elemento de caracterização geral de alimentos, cuja importância forense pode ser relevante.

Neste trabalho, foi efectuada uma caracterização de oito amostras de gelado da marca Pingo Doce por HPLC, de forma a quantificar-se a fibra alimentar sintética (fibra alimentar de baixo peso molecular) e determinar se a percentagem presente estava de acordo com a rotulada.

O método de análise usado (AOAC 2009.01) foi implementado pela primeira vez no laboratório da empresa ControlVet durante este trabalho, expandindo desta forma as capacidades da empresa nesta área, visto que até agora estava, este apenas habilitado a efectuar determinação de fibra de alto peso molecular. O método foi validado obtendo-se o limite de quantificação igual a 0.2g/ ml.

Nas amostras estudadas, observa-se que as percentagens de fibra de baixo peso molecular obtidas pelo método aqui implementado se encontravam dentro dos valores rotulados. Foram ainda realizados estudos por espectroscopia de infravermelho para quatro das amostras, tendo-se concluído que 50% das amostras injectadas no cromatógrafo corresponde a fibra de baixo peso molecular, glucose e maltose. Os restantes 50% correspondem a outro tipo de substâncias, cuja composição detalhada não foi possível efectuar, deixando-se aqui campo aberto para futuros estudos.



Por último, iniciaram-se ensaios por espectroscopia de Raman das amostras e padrões, para futura aplicação na caracterização e eventual quantificação de fibras alimentares.

# Agradecimentos

Desde já queria agradecer ao Professor Doutor Rui Fausto, por todos os conhecimentos e ensinamentos transmitidos, por todas as suas palavras sábias, e por toda a paciência e dedicação demonstrados ao longo deste ano de trabalho que não é possível descrever num pequeno parágrafo. Desde já o meu muito obrigado!

Quero agradecer também a todo o grupo de trabalho do Laboratório de Crioscopia e Bio-espectroscopia Molecular, em especial à Susana. Obrigado!

Agradeço também ao laboratório de química da ControlVet, em particular à Dr.<sup>a</sup> Ana e à Dr.<sup>a</sup> Elsa pelas condições que me facultaram para desenvolver o meu trabalho na empresa. O meu muito obrigado!

Agradeço ainda a todos os meus amigos, em especial à Tânia...pois foram eles que me confortaram em momentos de desalento, foi com eles que me diverti e são eles o meu porto de abrigo. Obrigado!

Como não poderia deixar de ser, quero agradecer à minha mãe, pois sem ela nada disto era possível. Agradeço-te tudo o que fizeste e continuas a fazer por mim. Sem Ti nada disto era possível. Muito obrigado!

Agradeço também à minha família, em especial aos meus sobrinhos, Bernardo, Leonor e Filipa, por todos os sorrisos que me deram em momentos de tristeza, e que me fizeram continuar a lutar, e a todas as pessoas que acreditaram sempre em mim e me deram muita força para que nunca desistisse de lutar pelos meus sonhos!

Agradeço ao meu namorado Ricardo, por todos os momentos fantásticos que me proporcionaste, mas, acima de tudo, pela paciência que tiveste comigo, especialmente este ano que não foi nada fácil, pelo teu carinho, amor e dedicação, mesmo nos momentos mais complicados da minha vida. Sem Ti nada disto era possível. Muito Obrigado!

A ti Coimbra!!!!

# I- Introdução

A Química, em todas as suas modalidades, é instrumento de interesse à área forense, sendo utilizada neste domínio de forma isolada ou associada a outras ciências, já que uma única investigação num laboratório forense pode envolver vários tipos de cientistas. A Química Forense é uma subdivisão da grande área do conhecimento que é a Ciência Forense que se encarrega da análise, classificação e determinação de elementos ou substâncias encontradas nos locais de averiguação ou ocorrência de um delito, ou que podem estar relacionadas a este.

A Química Forense tem vindo largamente a expandir-se, sendo cada vez mais necessária diante da criminalidade que, ao longo dos anos, tem evidenciado uma face sofisticada e procedimentos complexos de actuação. É um meio seguro e eficaz na elucidação de diversos tipos de crimes, que recorre ao uso de técnicas de diferentes leituras destinadas a esse fim.

Uma das áreas abrangidas pela Química Forense é a segurança alimentar, na medida em que o uso indevido de aditivos alimentares ou com rotulação deficiente de composição dos alimentos por exemplo, podem afectar, por vezes gravemente, a saúde do consumidor. Assim, a Segurança Alimentar surge actualmente como uma das principais preocupações da Indústria Alimentar.

Existem hoje em dia regulamentos, leis e directivas múltiplas que estabelecem critérios no uso de aditivos alimentares, bem como especificações de rotulagem.

Neste trabalho, foi desenvolvido e implementado, de acordo com as necessidades do laboratório de química da empresa ControlVet, um método que permite quantificar o teor de fibra alimentar total (fibras de alto e baixo peso molecular) presente nos alimentos. Este método (AOAC 2009.01) assenta na determinação quantitativa das fibras alimentares de alto peso

molecular por técnicas enzimáticas e graviméticas e na quantificação das fibras de baixo peso molecular por cromatografia líquida de alta eficiência

O conceito de fibra alimentar mudou consideravelmente nos últimos anos. Actualmente, sabe-se que fibra alimentar abrange uma gama muito mais ampla de substâncias do que se acreditava anteriormente, e que a fibra tem maior significado fisiológico do que se pensava. Não existe, contudo, uma definição universalmente aceite de fibra alimentar na Europa, ou no resto do mundo. Existe, no entanto, consenso de que há necessidade de uma definição com bases fisiológicas.

A não-digestibilidade no intestino delgado é uma característica fisiológica de fundamental importância das fibras alimentares. Por isso, definições recentes de fibra alimentar englobam, além dos polissacarídeos não-amiláceos, outros carboidratos não-digeríveis, como o amido resistente e oligossacarídeos não-digeríveis. Por outro lado, estudos realizados ao longo das últimas décadas identificaram diversos efeitos fisiológicos da fibra alimentar, sendo os principais a melhoria no funcionamento do intestino grosso, a redução do colesterol sanguíneo e a atenuação dos níveis plasmáticos pós-prandiais de insulina e de glicose. Essas características fisiológicas foram também incorporadas nas recentes definições de fibra alimentar.

De acordo com as definições mais recentes, a fibra alimentar consiste então em polímeros de carboidratos e em polissacarídeos não-amiláceos que são, basicamente, componentes da parede celular das plantas. Estes incluem a celulose, hemiceluloses, hemiglicanos e pectinas, além de outros polissacarídeos de origem vegetal e de algas, como as gomas e mucilagens. Outros componentes que se podem incluir neste tipo de substâncias são os oligossacarídeos não-digeríveis, como a inulina e o amido resistente. As definições recentes consideram também como constituintes das fibras alimentares outros carboidratos que atravessam o intestino delgado sem sofrer qualquer tipo de alteração, tais como maltodextrinas resistentes, frutooligosacarídeos e galactooligosacarídeos, e ainda as celuloses

modificadas e polímeros de carboidratos sintetizados, como a polidextrose. Incluem-se ainda substâncias como a lignina e outras extraídas juntamente com os polissacarídeos e oligossacarídeos quando da aplicação dos métodos analíticos de fibra alimentar (por exemplo, ceras, cutina, polifenóis e fitosteróis). Essas substâncias podem estar naturalmente presentes ou podem ser sintetizadas.

Nesta tese, adopta-se o conceito de fibra alimentar proposto pelo *Codex Alimentarius* [2], e o método para sua determinação proposto pela AOAC 2009.01 (*Association of Official Analytical Chemists International*), que permite determinar a fibra alimentar total de baixo e alto peso molecular presente nos alimentos.

Os métodos anteriormente existentes apenas quantificavam fibra de alto peso molecular, deixando a fibra de baixo peso molecular por quantificar. O método aqui descrito não se encontrava implementado em Portugal, apesar de já ser utilizado noutros países.

Nesta tese, começa-se por fazer uma breve referência às definições de fibra alimentar propostas ao longo dos anos. Seguidamente são apresentadas as origens principais e a composição das fibras alimentares, as suas características e os seus efeitos fisiológicos. É feita depois referência ao papel e relevância da química forense na segurança alimentar, onde são especificados os cuidados a ter no uso de aditivos alimentares, de acordo com a legislação em uso. Descrevem-se também sucintamente os principais cuidados a ter na rotulagem de alimentos para que não se induza o consumidor em erro, evitando assim fraudes.

Finalmente, são apresentados os resultados obtidos neste trabalho, em particular os relativos à implementação do método de quantificação das fibras alimentares, bem como o relatório de validação do mesmo.

# As Fibras Alimentares

## 1- Definição

A compreensão do significado fisiológico de substâncias definidas como fibra alimentar e, portanto, do conceito de fibra alimentar, progrediu consideravelmente ao longo dos últimos dez anos. Tal definição é vital para os fabricantes de alimentos, para que possam fornecer informação válida e precisa na rotulagem dos produtos. É também fundamental para a actividade das entidades reguladoras das alegações de propriedades nutricionais e de saúde. Essa informação é ainda necessária para os consumidores, que utilizam as informações nutricionais declaradas nos rótulos dos alimentos e em materiais associados.

A denominação *fibra alimentar* foi originalmente adoptada, em 1953, por Hipsley, com o objectivo de descrever os componentes alimentares provenientes da parede celular de vegetais [1-6].

Em 1970, Trowell definiu fibra alimentar [1-6] como “*os remanescentes da parede celular vegetal que não são hidrolisados pelas enzimas digestivas do homem, que inclui celulosas, hemicelulosas, lignina, gomas, celulosas modificadas, mucilagens, oligossacarídeos, pectinas e substâncias menores associados, como ceras, cutina e suberina.*”

Em 2006, a Comissão do *Codex Alimentarius* avançou com uma definição para fibra que estabelece que: “*O termo fibra dietética indica polímeros de carboidratos com um grau de polimerização (DP) não menor do que três, os quais não são digeridos nem são absorvidos no intestino delgado. O grau de polimerização não inferior a três pretende excluir os mono e dissacarídeos; não pretende reflectir o grau de polimerização médio de uma mistura. A fibra alimentar consiste em um ou mais:*

*- polímeros de carboidratos comestíveis presentes naturalmente nos alimentos na forma em que estes são consumidos;*

- *polímeros de carboidratos que foram obtidos de material alimentício cru por métodos físicos, enzimáticos ou químicos, ou de polímeros de carboidratos sintéticos*”.

Na maioria dos países, a necessidade de definir precisamente fibra alimentar resulta da necessidade de fornecer informação rigorosa ao consumidor na rotulagem. As definições utilizadas baseiam-se em diversos métodos analíticos adoptados pela *Association of Official Analytical Chemists International*, inicialmente o método AOAC 985.29 (tabela 1). Este método é baseado no conceito de resistência à digestão. O método utiliza a digestão enzimática para eliminar componentes não fibrosos e a quantificação dos resíduos por pesagem (portanto, o termo ‘gravimétrico’). Os procedimentos analíticos e enzimas utilizados seguem critérios rígidos de desempenho e pureza. O seu uso foi defendido em parte por causa da sua suposta reprodutibilidade. No entanto, esta característica não foi confirmada por um estudo de certificação da Comissão Europeia realizado em 1996 [3-6].

Actualmente, para finalidade de rotulagem, é utilizada a definição proposta pelo Codex Alimentarius [7,8]. Este facto fez surgir a necessidade de se criar um novo método de quantificação de fibras alimentares que quantificasse todos os componentes da fibra alimentar, incluindo os oligossacarídeos não-digeríveis, como a inulina e a polidextrose, e ainda o amido resistente.

Assim, em 2009 foi desenvolvido um método enzimático-gravimétrico e de cromatografia líquida de alta eficiência (AOAC 2009.01). A implementação e validação deste método constituíram a componente principal do trabalho apresentado nesta tese.

Tabela 1- Principais métodos de análise de fibra alimentar.

<b>Nome</b>	<b>Tipo</b>	<b>Componentes</b>
<b>Fibra alimentar total</b>	Enzimático-gravimétrico AOAC 985.29 AOAC 991.43	- Polissacarídeos solúveis e insolúveis - Lignina
<b>Método de Englyst</b>	Enzimático-químico ou GC ou HPLC	- Polissacarídeos não amiláceos
<b>Método Upsala AOAC 994.13</b>	Enzimático-químico	-Polissacarídeos solúveis e insolúveis - Lignina
<b>AOAC 995.16 AACC 32-33</b>	Enzimático	- $\beta$ -Glicanos
<b>Método de Englyst para amido resistente</b>	Enzimático	- Amido resistente
<b>AOAC 2002-02 AACC 37.42</b>	Enzimático	- Amido resistente - Fibra de algas
<b>AOAC 999.03</b>	Enzimático e colorimétrico	- Frutanas
<b>AOAC 997.08</b>	Enzimático e cromatografia de troca iônica	- Frutanas
<b>AOAC 2000.11</b>	HPAEC	- Polidextrose
<b>AOAC 2001.02</b>	HPAEC-PAD	- Galactooligossacarídeos
<b>AOAC 2001.03</b>	Enzimático, gravimétrico e HPLC	- Fibra Alimentar total em alimentos contendo maltodextrinas resistentes
<b>AOAC 2009.01</b>	Enzimático, gravimétrico e HPLC	-Fibra alimentar total - Oligossacarídeos não digeríveis -Amido resistente



## 2- Origem, Características e Composição da Fibra Alimentar

A principal fonte de fibra dietética é a parede celular vegetal, que compreende uma série de polissacarídeos frequentemente associados a proteínas e compostos fenólicos, juntamente com polímeros de lignina.

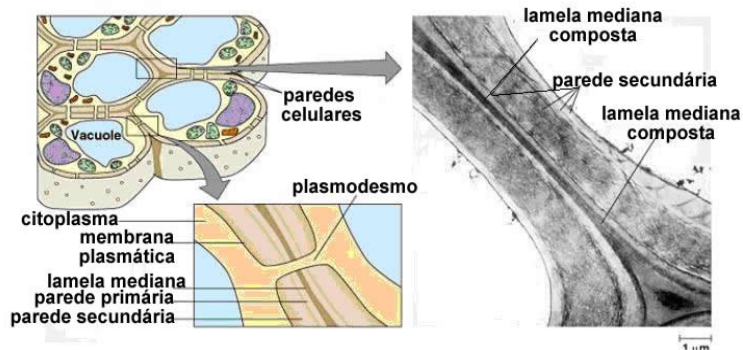


Figura 2.1- Esquema geral de uma parede celular, origem principal da fibra alimentar

### 2.1- Origem: Parede Celular

A parede da célula vegetal apresenta uma série de funções essenciais, tais como conferir rigidez às células vegetais, proteger do ambiente, evitar a desidratação e permitir a comunicação entre as células [9].

A célula viva segrega a sua parede celular, que compreende três partes [10] (Figura 2.2):

- Lamela Mediana: é a camada mais externa. Consiste principalmente de substâncias pécticas e tem uma estrutura coloidal, amorfa e opticamente inactiva.

- Parede Primária: composta principalmente de celulose e algumas hemiceluloses.
- Parede Secundária: Aparece quando as células envelhecem, de modo que, neste ponto, termina o seu crescimento. É constituída por celulose, hemicelulose, substâncias pécticas e lignina.

De acordo com os modelos mais recentes, a parede das células dos vegetais é composta uma rede de celulosos / xiloglucanos (Figura 2.2) e uma rede de pectinas, que interagem entre si e, em alguns casos, com uma terceira rede composta por proteínas estruturais [10]:

- Rede de celulosos / xiloglucanos: a celulose é o principal componente desta rede; as cadeias de celulose formam microfibrilas, que estão embutidas dentro de uma matriz de hemiceluloses, principalmente xiloglucanos e arabinoxilanos.
- Rede de pectinas: as substâncias pécticas constituem uma família de polímeros e ácidos como o ramnogalacturonano e homogalacturonanos; unidos a estes polímeros existem outros que são neutros, como outras arabinanos, galactanos e arabinogalactanos.
- Proteínas estruturais: as proteínas são também parte importante da parede celular.

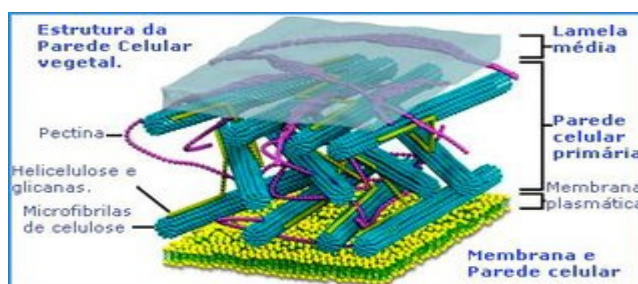


Figura 2.2- Modelo da parede celular das dicotiledóneas

Embora a natureza da celulose varie muito pouco de uma planta para outra, a composição da matriz que incorpora a celulose apresenta uma variação considerável de um tecido para o outro dentro da mesma planta e entre plantas. Portanto, a composição da parede celular depende não só da espécie vegetal, mas também do tipo de tecido e da maturidade da planta na época da colheita [11].

## *2.2- Características*

Os constituintes das fibras alimentares são, na sua maior parte, substâncias de origem vegetal, predominantemente originadas da parede celular e, em menor parte, alguns polissacarídeos extraídos de outras partes das plantas ou sintetizados por microorganismos. Sendo assim, a fibra alimentar está presente na dieta humana através do consumo de alimentos de origem vegetal, nos quais está presente normalmente como constituinte natural, em alimentos em geral onde tenha sido adicionada e na forma de suplementos alimentares ricos em fibra.

As substâncias constituintes da fibra, conforme a definição adoptada nesta Tese, estão listadas na Tabela 2. A composição da fibra presente nos vegetais é bastante variável, dependendo de muitos factores, podendo-se considerar que esta variação provém principalmente de diferenças [12]:

- a) entre diferentes espécies vegetais;
- b) entre variedades, dentro da mesma espécie vegetal;
- c) entre os diferentes órgãos ou tecidos vegetais, inclusive dentro da mesma espécie;
- d) num mesmo órgão ou tecido, na dependência da fase de desenvolvimento e/ou maturação vegetal;
- e) ocasionadas por condições de armazenamento;
- f) ocasionadas por processamentos industriais ou culinários.

Tabela 2- Constituintes das Fibras de acordo com a definição do *Codex Alimentarius*

<b>Grupos</b>	<b>Constituintes</b>
<b>Polissacarídeos não-amiláceos e oligossacarídeos resistentes à digestão</b>	Celulose
	Hemicelulose
	Polifrutoses (inulinas e oligofrutanas)- solúveis
	Galactooligossacarídeos
	Gomas
	Mucilagens
<b>Carboidratos análogos ao primeiro grupo</b>	Pectinas
	Dextrinas indigeríveis
	Carboidratos sintetizáveis (polidextrose e metilcelulose)
<b>Lignina</b>	Amidos resistentes à digestão
	Lignina
<b>Substâncias associadas com polissacarídeos e lignina formadores de fibra nas plantas</b>	Fitatos
	Cutina
	Saponinas
	Taninos

### 2.2.1- Classificação

As fibras podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura, a sua solubilidade em água, e em relação ao seu grau de fermentação [12].

#### - Solubilidade em água

Segundo a grande maioria dos autores, a fibra alimentar total (FAT) é classificada de acordo com a sua solubilidade em água em duas fracções: fibra alimentar solúvel (FAS) e fibra alimentar insolúvel (FAI).

A FAI é a principal fracção (75%) de fibra da grande maioria dos alimentos, sendo que em alguns alimentos é a única ou quase a única.

Consiste principalmente de constituintes da parede celular das células vegetais, que incluem a celulose, hemiceluloses e lignina. Apresenta efeito mecânico no tracto gastrointestinal, é pouco fermentável e acelera o tempo de trânsito intestinal devido à absorção de água. São encontradas principalmente em verduras, farelo de trigo e grãos integrais [12-15].

Os seus principais efeitos metabólicos são:

- Aumentam o peso e a maciez das fezes;
- Aumentam a frequência da evacuação e diminuem o tempo de trânsito no cólon;
- Reduzem a obstipação;
- Retêm água;
- São pouco fermentáveis;
- Aumentam a protecção contra infecção bacteriana.

A FAS consiste de polissacarídeos não-celulósicos, tais como pectinas, gomas, mucilagens, inulina, FOS (frutooligossacarídeos) e polifrutoses, grande parte das quais sofrem degradação/fermentação no intestino grosso. Estas fibras têm a capacidade de se ligar à água e formar géis. No tracto gastrointestinal, retardam o esvaziamento gástrico e o tempo de trânsito intestinal, e diminuem o ritmo de absorção de glicose e colesterol. São substratos para fermentação bacteriana que resultam em gases (hidrogénio, metano e dióxido de carbono) e ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), importantes para o metabolismo intestinal. São encontradas principalmente em frutas e verduras, mas também em cereais (aveia e cevada) e leguminosas (feijão, grão de bico, lentilha e ervilha). Os principais efeitos metabólicos das fibras solúveis são [12-15]:

- Retardam o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal;
- Alteram o metabolismo intestinal através da produção dos AGCC;
- Modulam a mobilidade gastrointestinal
- Reduzem a diarreia (aumento na absorção de água);

- Promovem o desenvolvimento da mucosa intestinal (íleo e cólon);
- Proporcionam energia (devido à fermentação) para a mucosa intestinal;
- Diminuem o pH do cólon;
- Melhoram a protecção contra a infecção (função de barreira, imunidade);
- Aumentam tolerância à glicose;
- Diminuem os níveis de colesterol total.

### - Estrutura

Grande parte das fibras pertence ao grupo dos polissacarídeos, os quais são muito variáveis física e quimicamente. Normalmente, o que difere nas fibras em termos de estrutura é essencialmente [12]:

- A quantidade de monossacarídeos;
- O tipo de monossacarídeos na cadeia polimérica;
- A sequência dos monossacarídeos na cadeia;
- A existência ou não de cadeias secundárias;
- O tipo de ligação, alfa ou beta, entre os monossacarídeos.

Assim, a classificação das fibras de acordo com a sua estrutura subdivide-se em duas categorias: polissacarídeos não amiláceos (definidos como polissacarídeos com grau de polimerização  $\geq 10$ ) e polissacarídeos amiláceos.

### - Fermentação bacteriana

A fermentação das fibras ocorre nos intestinos por acção das bactérias anaeróbicas. O tracto gastrointestinal possui mais de 500 espécies diferentes de bactérias. No cólon, a flora bacteriana consiste quase que totalmente de bactérias anaeróbias estritas, como *Bacteróides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*

e *Lactobacillus*. O grau de fermentação no cólon é função da composição da flora intestinal e das características químicas e físicas, ou seja, o tipo de fibra, a solubilidade, a fonte, e a forma e o tamanho das partículas [13,16].

Os produtos da fermentação bacteriana das fibras são:

- **Ácidos gordos de cadeia curta (AGCC):** os mais importantes obtidos por fermentação das hemiceluloses e pectinas são os ácidos acético, butírico e propiónico; são removidos do lúmen intestinal por difusão iónica e facilitam a absorção do sódio e potássio.
- **Gases:** hidrogénio, metano e dióxido de carbono, que são excretados por via rectal.
- **Energia:** utilizada para crescimento e manutenção das bactérias.

A fermentação das fibras varia de 0% a 90%, e a fibra, só é considerada fermentável se for no mínimo 60% fermentada. Quanto mais solúvel for a fibra, maior o seu grau de fermentação (lignina, 0%; celulose, 15% a 60%; hemiceluloses, 56% a 85%; e pectinas, 90% a 95%) [13].

### 2.3- Composição Química

De acordo com a definição de fibra alimentar adoptada no âmbito desta tese são descritos seguidamente os seus componentes principais.

#### 2.3.1- Celulose

A celulose (Figura 2.3) é um polissacarídeo linear, não-ramificado, consistindo apenas em unidades de glicose, com até 10.000 unidades de glicose por molécula. As moléculas estão intimamente compactadas em forma de fibras longas, muito insolúveis e resistente à digestão pelas enzimas humanas. A celulose é o principal componente da parede celular da maioria dos vegetais estando presente em frutas, hortaliças e cereais. Grande parte da fibra no farelo de cereais é constituída por celulose. A celulose constitui cerca

de um quarto da fibra alimentar nos grãos e frutas e um terço nas hortaliças e castanhas/nozes [17].

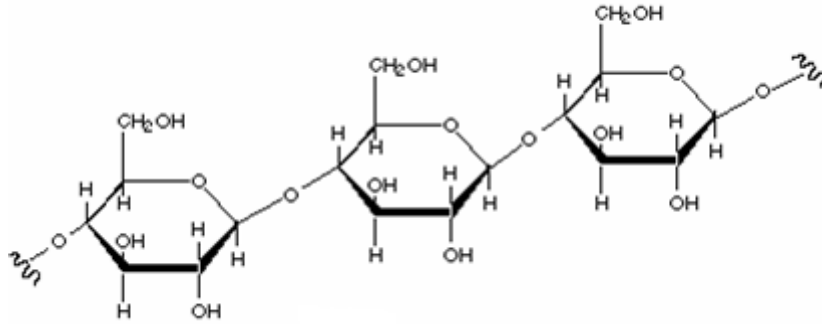


Figura 2.3- Estrutura química da celulose

### 2.3.2- Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos que contêm outros açúcares além da glicose, estando associadas à celulose na parede celular dos vegetais. As hemiceluloses tanto podem ser polímeros lineares como ramificados, menores que a celulose; tipicamente, contêm 50-200 unidades de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, galactose, manose, ramnose, ácidos glucurônico e galacturônico). O nome hemicelulose descreve assim um grupo heterogêneo de substâncias que estão presentes nos alimentos de origem vegetal nas formas solúvel e insolúvel. Aproximadamente um terço da fibra alimentar nas hortaliças, frutas, leguminosas e castanhas/nozes consiste de hemiceluloses [17].

### 2.3.3- Pectinas

As pectinas são polissacarídeos que são solúveis em água quente e formam géis depois de frias. São compostas principalmente de cadeias de ácido galacturônico intercalado com unidades de ramnose, exibindo ramificações com cadeias de unidades de pentose e hexose. Estão presentes



nas paredes celulares e tecidos intracelulares de frutas e hortaliças, sendo utilizados como agentes gelificantes e espessantes em diversos produtos alimentares.

Embora as frutas sejam a principal fonte de pectinas, estas substâncias também representam 15% a 20% da fibra alimentar nas hortaliças, leguminosas e castanhas/nozes [17].

#### 2.3.4- $\beta$ -Glicanos

Os  $\beta$ -glicanos são polímeros da glicose. Ao contrário da celulose, as ligações entre as moléculas de glicose são variáveis. Possuem estrutura ramificada e são menores que a celulose. Estas propriedades influenciam a sua solubilidade, favorecendo a formação de soluções viscosas. Os  $\beta$ -glicanos são importantes componentes do material da parede celular dos grãos de aveia e cevada, mas estão presentes apenas em quantidades reduzidas no trigo. Os  $\beta$ -glicanos têm despertado interesse enquanto fibras solúveis [17].

#### 2.3.5- Amido Resistente

O amido e os seus produtos de degradação que não são absorvidos no intestino delgado dos seres humanos, são conhecidos como *amido resistente*. O amido resistente está presente numa ampla variedade de alimentos, em proporções variáveis. Foram identificadas quatro classes de amido resistente: amido fisicamente inacessível (RS1), grãos de amido nativo (RS2), amido cristalizado (RS3) e amido quimicamente modificado (RS4). As leguminosas constituem uma das principais fontes de RS1, por conterem uma espessa parede celular que torna o amido inacessível às enzimas. Certos tipos de amido, como o existente na batata crua e na banana verde, são muito resistentes à hidrólise enzimática (RS2). Contudo, ao contrário da banana, a batata é consumida depois de cozida e quase todos os processos de cozimento promovem a gelatinização do amido. Portanto, a banana verde é a principal fonte de RS2 na dieta humana. A quantidade de RS2 na banana depende do

seu grau de maturação. Outra categoria de RS2 é constituída pelos amidos ricos em amilose, fontes frequentes de amido resistente industrial. O cozimento, o arrefecimento e o armazenamento de alimentos sem prévia desidratação provocam retrogradação (recristalização) do amido gelatinizado: RS3. O reaquecimento de, por exemplo, batata fria, pode reduzir o conteúdo de RS3. Contudo, ciclos repetidos de aquecimento e arrefecimento aumentam os níveis de RS3 nas batatas [17].

O amido quimicamente modificado (RS4) inclui éteres e ésteres de amido, amidos com ligações cruzadas e amidos pirodextrinados. As modificações químicas são a razão para a redução da digestibilidade do amido no intestino delgado e, portanto, para a formação de RS4. Alguns amidos quimicamente modificados nos quais a digestibilidade do amido não foi modificada são utilizados como ingredientes, por exemplo, em alimentos infantis.

O conteúdo de amido resistente num alimento pode mudar durante o armazenamento, dependendo da temperatura e do conteúdo de água, e durante a preparação do alimento. Conseqüentemente, é impossível uma quantificação exacta da concentração de amido resistente num alimento por ocasião do seu consumo.

### 2.3.6- Oligossacarídeos não-digeríveis

Os oligossacarídeos não-digeríveis com grau de polimerização entre 3-12 ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal, principalmente verduras, cereais e frutas. Estas substâncias também podem ser sintetizadas por processos químicos ou enzimáticos a partir de monossacarídeos e dissacarídeos, ou por hidrólise enzimática de polissacarídeos. Os oligossacarídeos não-digeríveis estão incluídos na definição de fibra alimentar porque, como resultado da sua não-digestibilidade, exibem efeitos fisiológicos similares aos dos polissacarídeos maiores e seus congêneres. Em geral, os oligossacarídeos não-digeríveis são altamente fermentáveis, e alguns possuem

as propriedades prebióticas. Alguns dos prebióticos mais conhecidos são as frutanas, que incluem a inulina, e os frutooligossacarídeos ou oligofrutoses, obtidos pela hidrólise enzimática da inulina de ocorrência natural (com grau de polimerização 3-60), e seus análogos sintéticos obtidos por síntese enzimática a partir da sacarose. A cebola, a chicória e a alcachofra são as principais fontes alimentares de frutanas de ocorrência natural, a partir das quais são obtidos a inulina e os frutooligossacarídeos [17,18].

### 2.3.7- Outros carboidratos sintéticos

Como a própria celulose, os derivados sintéticos da celulose, e.g. a metilcelulose e a hidroxipropilmetilcelulose, não são digeridos no intestino delgado. Ao contrário da sua molécula-mãe, essas substâncias são solúveis, mas dificilmente fermentáveis pela colônia microbiótica.

A polidextrose (Figura 2.4) é um polissacarídeo ou oligossacarídeo resistente e é também uma fibra solúvel resistente. É um polímero de carboidrato não-digerível, com um grau médio de polimerização de 12, sintetizado a partir da glicose e do sorbitol, utilizando como catalisador um ácido orgânico (por exemplo, ácido cítrico). O resultado é uma estrutura complexa e resistente à hidrólise pelas enzimas digestivas humanas. A polidextrose é parcialmente fermentada no colo – cerca de 50% em seres humanos – e tem propriedades prebióticas e de formação de volume [17,18].

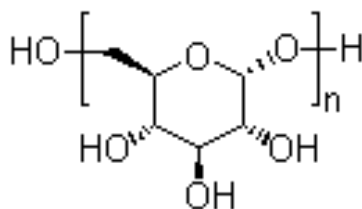


Figura 2.4- Estrutura química da polidextrose

As dextrinas resistentes são produzidas por calor em pH alcalino e por tratamento enzimático de amidos, como o do milho e o da batata, resultando num material com grau de polimerização aproximadamente igual a 15. As dextrinas resistentes são parcialmente digeridas pelas enzimas digestivas humanas e parcialmente fermentadas no cólon. Conseqüentemente, estas substâncias comportam-se fisiologicamente como fibra alimentar. Os efeitos prebióticos das dextrinas não foram ainda confirmados [17,18].

### 2.3.8- Gomas e mucilagens

Os hidrocolóides compreendem uma ampla gama de polissacarídeos viscosos. Estas substâncias são derivadas de exsudatos vegetais (goma arábica), sementes (gomas de guar e *locust*) e de extractos de algas marinhas (agar, carragena e alginatos). As mucilagens estão presentes em células das camadas externas de sementes da família “plantain”, por exemplo, *isphagula* (*Psyllium*). Estes hidrocolóides são utilizados em certos alimentos, em pequenas quantidades, como agentes gelificantes, espessantes, estabilizantes e emulsificantes [17,18].

### 2.3.9- Lignina

A lignina não é um polissacarídeo, mas está quimicamente ligada à hemicelulose na parede celular dos vegetais e, portanto, mantém uma íntima associação com polissacarídeos da parede celular dos vegetais. A lignina também influencia a fisiologia gastrointestinal. Está presente em alimentos possuidores de componente “lenhoso”, como o aipo, e nas camadas externas dos grãos de cereais [17-19].

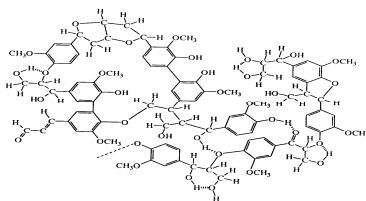


Figura 2.5- Estrutura química da lignina

### 2.3.10- Outros componentes

O ácido fítico (hexafosfato de inositol) está associado à fibra em alguns alimentos, sobretudo nos grãos de cereais. Os seus grupos fosfatos ligam-se muito fortemente com iões positivamente carregados como o ferro, o zinco, o cálcio e o magnésio, podendo interferir na absorção dos minerais. Outros constituintes dos vegetais associados à fibra alimentar são, por exemplo, polifenóis (taninos), cutinas e fitosteróis [17-19].

## *II- A Química Forense na Segurança Alimentar*

No contexto desta Tese seguiu-se o Regulamento (CE) n° 1333/2008, de 16.12.08 referente ao uso de aditivos alimentares e, em questões de rotulagem, a Directiva 2000/12/CE de 20 de Março de 2000, uma vez que uma das fibras quantificadas neste trabalho (polidextrose) é considerada um aditivo alimentar.

### 1- Aditivos Alimentares

De acordo com o regulamento atrás referido, são considerados aditivos alimentares as substâncias que não são consumidas habitualmente como géneros alimentícios em si mesmas, mas que são intencionalmente adicionadas aos géneros alimentícios para atingir determinado objectivo tecnológico, como, por exemplo, a conservação dos géneros alimentícios. Todos os aditivos alimentares deverão ser abrangidos pelo regulamento citado acima e, por conseguinte, a lista das classes funcionais deverá ser actualizada à luz do progresso científico e dos avanços tecnológicos. Contudo, não deverão ser consideradas aditivos alimentares as substâncias cuja utilização

tenha por objectivo conferir determinado aroma e/ou sabor ou tenha fins nutricionais, tais como os sucedâneos do sal, as vitaminas e os minerais. Além disso, as substâncias consideradas géneros alimentícios que podem ser utilizadas com um objectivo tecnológico, tais como o cloreto de sódio ou o açafraão — utilizado para conferir cor — assim como as enzimas alimentares, também não deverão ser abrangidas pelo âmbito do presente regulamento. No entanto, deverão ser consideradas aditivos, as preparações obtidas a partir de géneros alimentícios ou de outros materiais de base naturais e que se destinem a ter um efeito tecnológico a nível do produto final e sejam obtidas por extracção selectiva de componentes (por exemplo, pigmentos) em relação aos componentes nutritivos ou aromáticos.

Os aditivos alimentares só podem ser autorizados e utilizados se preencherem os critérios definidos no regulamento. A utilização dos aditivos alimentares deve ser segura, deve decorrer de uma necessidade tecnológica, não deve induzir o consumidor em erro e deve ser vantajosa para o consumidor. Induzir o consumidor em erro inclui, por exemplo, as alegações relacionadas com a qualidade dos ingredientes utilizados, com o carácter natural de um produto ou do modo de produção, com o valor nutricional do produto, incluindo o seu teor de frutos e legumes. A aprovação de aditivos alimentares requer igualmente a consideração de outros factores pertinentes para a matéria em apreço, incluindo os factores sociais, económicos, tradicionais, éticos e ambientais, o princípio da precaução e a viabilidade dos controlos. O uso e os níveis máximos de um aditivo alimentar têm de ter em conta a dose do aditivo alimentar proveniente de outras fontes e a exposição ao mesmo a que estão sujeitos grupos especiais de consumidores (por exemplo, consumidores alérgicos).

Os aditivos alimentares estão classificados da seguinte forma:

1. **Edulcorantes:** substâncias utilizadas para conferir um sabor doce aos géneros alimentícios ou utilizadas nos edulcorantes de mesa.

2. **Corantes:** substâncias que conferem ou restituem cor a um género alimentício; incluem componentes naturais de géneros alimentícios e

substâncias naturais que normalmente não são consumidos como géneros alimentícios em si mesmos nem utilizados como ingredientes característicos dos géneros alimentícios. São consideradas corantes as preparações obtidas a partir de géneros alimentícios ou de outros materiais de base naturais comestíveis obtidas por extracção física e/ou química de modo a provocar a extracção selectiva dos pigmentos em relação aos componentes nutritivos ou aromáticos.

3. **Conservantes:** substâncias que prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos e/ou contra o desenvolvimento de microrganismos patogénicos.

4. **Antioxidantes:** substâncias que prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação, tal como a rancidez das gorduras e as alterações de cor.

5. **Agentes de transporte:** substâncias utilizadas para dissolver, diluir, dispersar ou de outro modo modificar fisicamente um aditivo alimentar, um aroma alimentar, uma enzima alimentar, um nutriente e/ou outra substância adicionada a um género alimentício para efeitos nutricionais ou fisiológicos sem alterar a sua função (e sem que elas próprias exerçam quaisquer efeitos tecnológicos), a fim de facilitar o respectivo manuseamento, aplicação ou utilização.

6. **Acidificantes:** substâncias que aumentam a acidez dos géneros alimentícios e/ou lhes conferem um sabor acre.

7. **Reguladores de acidez:** substâncias que alteram ou controlam a acidez ou a alcalinidade dos géneros alimentícios.

8. **Antiaglomerantes:** substâncias que reduzem a tendência das partículas isoladas dos géneros alimentícios para aderirem umas às outras.

9. **Antiespumas:** substâncias que impedem ou reduzem a formação de espuma.

10. **Agentes de volume:** substâncias que contribuem para dar volume aos géneros alimentícios sem contribuírem significativamente para o seu valor energético disponível.

11. **Emulsionantes:** substâncias que tornam possível a formação ou a manutenção de uma mistura homogénea de duas ou mais fases imiscíveis, como óleo e água, nos géneros alimentícios.

12. **Sais de fusão:** substâncias que convertem as proteínas contidas no queijo numa forma dispersa, daí resultando uma distribuição homogénea das gorduras e outros componentes.

13. **Agentes de endurecimento:** substâncias que tornam ou mantêm firmes ou estaladiços os tecidos dos frutos ou dos produtos hortícolas, ou actuam em conjunto com gelificantes para produzir ou reforçar um gel.

14. **Intensificadores de sabor:** substâncias que intensificam o sabor e/ou o cheiro dos géneros alimentícios.

15. **Espumantes:** substâncias que tornam possível a dispersão homogénea de uma fase gasosa nos géneros alimentícios líquidos ou sólidos.

16. **Gelificantes:** substâncias que dão textura aos géneros alimentícios através da formação de um gel.

17. **Agentes de revestimento** (incluindo lubrificantes): substâncias que, quando aplicadas na superfície externa dos géneros alimentícios, lhes conferem uma aparência brilhante ou um revestimento protector.

18. **Humidificantes:** substâncias que impedem os géneros alimentícios de secar por contrabalançarem o efeito de uma atmosfera com baixo grau de humidade, ou promovem a dissolução de um pó num meio aquoso.

19. **Amidos modificados:** substâncias obtidas através de um ou mais tratamentos químicos de amidos comestíveis, que podem ter sofrido um tratamento físico ou enzimático e podem ser fluidificadas por via ácida ou alcalina ou branqueadas.



20. **Gases de embalagem:** gases, com excepção do ar, introduzidos em recipientes antes, durante ou após a colocação dos géneros alimentícios nesses recipientes.

21. **Propulsores:** gases, com excepção do ar, que expellem os géneros alimentícios dos recipientes.

22. **Levedantes químicos:** substâncias ou combinações de substâncias que libertam gás, aumentando assim o volume das massas ou polmes de farinha.

23. **Sequestrantes:** substâncias que formam complexos químicos com iões metálicos.

24. **Estabilizadores:** substâncias que tornam possível a manutenção do estado físico-químico dos géneros alimentícios. Os estabilizadores incluem as substâncias que permitem a manutenção de uma dispersão homogénea de duas ou mais substâncias imiscíveis nos géneros alimentícios, as substâncias que estabilizam, retêm ou intensificam a cor natural dos géneros alimentícios e as substâncias que aumentam a capacidade de aglomeração do género alimentício, incluindo a formação de ligações cruzadas entre proteínas que permitem a aglomeração dos elementos alimentares para a formação de um género alimentício reconstituído.

25. **Espessantes:** substâncias que aumentam a viscosidade dos géneros alimentícios.

26. **Agentes de tratamento da farinha:** substâncias, com excepção dos emulsionantes, adicionadas à farinha ou à massa para melhorar a qualidade da cozedura.

## 2- Rotulagem

De acordo com a directiva mencionada anteriormente entende-se por rotulagem as menções, indicações, marcas de fabrico ou de comércio, imagens ou símbolos referentes a um género alimentício e que figurem em

qualquer embalagem, documento, aviso, rótulo, anel ou gargantilha que acompanhe ou seja referente a este género alimentício.

Entenda-se por género alimentício a unidade de venda destinada a ser apresentada como tal ao consumidor final e às colectividades, constituída por um género alimentício e pela embalagem em que foi acondicionado, antes de ser apresentado para venda, quer a embalagem o cubra na totalidade ou parcialmente, mas de tal modo que o conteúdo não possa ser alterado sem que a embalagem seja aberta ou alterada.

Segundo esta directiva todos os ingredientes presentes no alimento devem vir especificados no rótulo nas proporções presentes no alimento. Esta regra aplica-se tanto aos componentes naturais dos alimentos como aos aditivos. Assim, e com uma legislação mais rígida, uma vez que os aditivos alimentares quando consumidos em demasia são prejudiciais para a saúde humana, estes têm regras de rotulagem, sendo a mais relevante a de nele ter de vir indicado o nome. Por outro lado, os aditivos têm de ser fabricados em conformidade com as boas práticas e as suas dosagens indicadas nos rótulos para que o consumidor não seja induzido em erro.



Figura 3.1- Rotulagem de alimentos

## 3- Polidextrose e Amido Modificado

### 3.1- Polidextrose

A polidextrose, a que já me referi anteriormente, além de ser uma fibra sintética de baixo peso molecular, é classificada nos termos referidos como sendo um aditivo alimentar, uma vez que pode ser usada como agente de volume e de textura, humidificante, estabilizador e espessante. Assim, tem de obedecer tanto aos critérios de rotulagem bem como aos dos aditivos alimentares. Logo, o seu nome tem de vir especificado no rótulo bem como a sua quantidade.

### 3.2- Amido Modificado

O mesmo acontece com o amido modificado, uma vez que este também é obtido por tratamentos químicos de amidos comestíveis, que podem ter sofrido um tratamento físico ou enzimático e podem ser fluidificados por via ácida ou alcalina ou branqueados. Pode mesmo não ser de origem vegetal e conter glúten, acabando por poder ser prejudicial à saúde do consumidor afectado por alergia a esta última substância.

# *III-Materiais e Métodos*

## 3.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

### 3.1.1. Introdução ao método

A cromatografia, em todas as suas variantes, é um método de separação de componentes de uma mistura em que a separação depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. Os métodos cromatográficos classificam-se de acordo com a natureza das fases estacionária e móvel, os seus estados físicos e os mecanismos de separação [20].

Em cromatografia líquida, a fase móvel é um líquido que escoar ao longo da fase estacionária numa direcção definida. Os compostos que são fracamente retidos pelo sorbente da fase estacionária escoam mais rapidamente ao longo do enchimento, enquanto os que estabelecem interacções mais fortes com a fase estacionária saem mais lentamente, até à separação completa dos componentes da mistura.

O processo de escoamento dos compostos, que são arrastados pela fase móvel ao longo da coluna até à saída, designa-se eluição [21]. O detector regista o resultado na forma de um cromatograma, tal como o mostrado na Figura 3.1.

Assim, um cromatograma é a resposta do detector na forma de gráfico, representando a concentração de analito em função do tempo ou do volume de eluição.

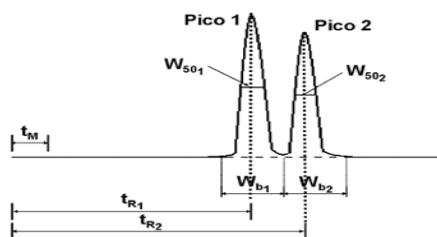


Figura 3.1- Esquema geral de um cromatograma, mostrando dois picos. Vêr texto para significado dos símbolos apresentados na figura.

De um cromatograma podem obter-se vários parâmetros que caracterizam a separação (ver Figura 3.1):

- $t_M$  (tempo morto da coluna): também conhecido como tempo extra da coluna, é o tempo que demora o soluto que não foi retido na coluna para ser eluído, isto é, um composto que é insolúvel ou não adsorvido na fase estacionária.
- $t_R$  (tempo de retenção): é o tempo que demora um soluto a ser totalmente eluído da coluna. Na Figura 3.1 estão representadas por  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  as respostas para dois solutos diferentes.
- $w_{50}$ : largura a meia altura do pico de eluição
- $w_b$  (largura do pico): resultante da intersecção das duas tangentes aos pontos de inflexão do pico

### 3.1.2. Princípios Teóricos e Instrumentais

A cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC, High Performance Liquid Chromatography*) foi inventada na década de 60 do século XX. É uma extensão da cromatografia líquida clássica e é caracterizada pelo uso de colunas em aço inox muito mais estreitas, com diâmetro interno de 2-5 mm, empacotadas com partículas de tamanho muito pequeno, 3-10  $\mu\text{m}$ , que constituem a fase estacionária. A fase móvel circula sob alta pressão ao longo

da coluna, com um fluxo controlado. A alta pressão permite análises rápidas, e o uso de fases estacionárias constituídas por micro-partículas permite uma elevada eficiência na separação [20].

A técnica de HPLC revelou-se um dos mais eficientes métodos cromatográficos, também em virtude do desenvolvimento de instrumentação automatizada. Permitiu a injeção de volumes de amostra cada vez mais pequenos e reprodutíveis, e a detecção de quantidades de analito cada vez menores, em sistemas de detecção em fluxo, que indicam quando os componentes sofrem eluição da coluna.

Esta técnica veio complementar a cromatografia de gases (GC) no tipo de compostos separados. Apresenta também a vantagem de conduzir a tempos de retenção mais curtos e permitir assim, um maior número de análises por unidade de tempo. A introdução de colunas capilares, ofereceu um maior número de pratos teóricos e uma melhor resolução do que as colunas padrão. Outra vantagem que esta técnica apresenta é a menor quantidade de fase móvel, o que permite utilizar solventes tóxicos, raros, ou caros, bem como o uso de fases estacionárias dispendiosas [20].

Um sistema de HPLC consiste em quatro componentes principais: uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna de separação e um detector, todos conectados numa instalação resistente a altas pressões (Figura 3.2), que podem ir até 300 atm.

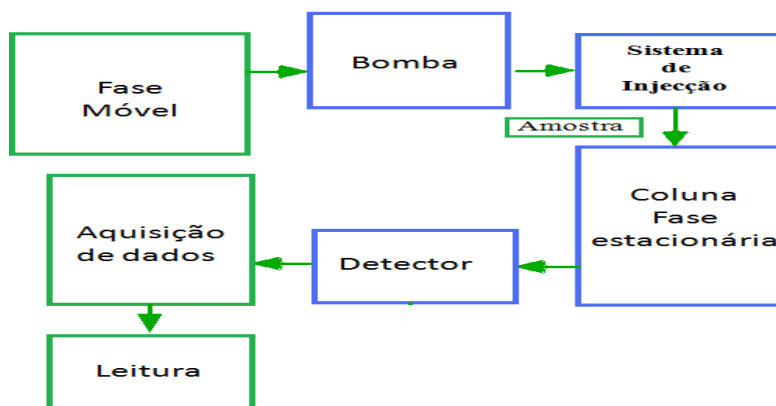


Figura 3.2- Esquema representativo de Cromatografia líquida

Em geral, a técnica de HPLC é um processo dinâmico onde as moléculas dos analitos se movem através de um enchimento poroso, por acção da fase móvel bombeada continuamente, e interagem com diferentes afinidades com o material da fase estacionária.

Consoante as características específicas do sistema experimental, a cromatografia líquida de alta eficiência pode ser classificada como cromatografia de fase normal (HPLC-NP) ou cromatografia de fase reversa (HPLC-RP).

Na cromatografia em fase normal, é usada uma fase estacionária polar (normalmente sílica) para a retenção de analitos polares. As separações em fase reversa baseiam-se em forças atractivas entre solutos não polares e grupos funcionais não polares ligados a um suporte de sílica.

A maioria das separações são levadas a cabo por HPLC de fase reversa, pois, ao contrário de HPLC de fase normal, existem muitos poucos compostos que sejam retidos permanentemente na coluna. As colunas tendem também a ser mais robustas [22].

Para um soluto ser retido por um sistema cromatográfico, deve ser transferido da fase móvel para a fase estacionária. A associação do soluto com a fase estacionária pode envolver partição, adsorção ou a combinação de ambas.

Num processo por partição, o soluto está praticamente todo embebido na fase estacionária, enquanto num processo por adsorção o soluto apenas está em contacto superficial com a fase estacionária e não totalmente embebido nela. Esses dois processos foram usados para desenvolver as duas teorias principais que descrevem o mecanismo de retenção molecular em HPLC-RP [23].

Na fase reversa existe uma relação exponencial entre o factor de retenção  $k$  e a fracção do volume do solvente orgânico na fase móvel. Um erro de 1% na quantidade de solvente orgânico pode variar o tempo de retenção ( $t_R$ ) entre 5% e 15% [24].

Quando a composição da fase móvel é alterada gradualmente ao longo da eluição cromatográfica, por aumento e posterior diminuição de percentagem de solvente orgânico, fala-se de uma eluição em gradiente. Nos casos em que a composição da fase móvel se mantém constante durante toda a análise, o tipo de eluição é conhecido como isocrático.

Pode dizer-se que, nas cromatografias de fase reversa, os compostos apolares ou fracamente polares são mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel. A retenção de um composto na fase estacionária é tanto maior quanto menor é a sua solubilidade na fase móvel.

Um detector de HPLC deve seguir os seguintes requisitos [25]:

- Suficiente sensibilidade
- Limite de detecção suficientemente baixo
- Amplo intervalo dinâmico linear
- Suficiente estabilidade e reprodutibilidade do sinal
- Resposta do sensor rápida
- Ligação entre a coluna e o detector curta e directa
- Detector com volume tão pequeno quanto possível

Existem outras características que afectam a aplicabilidade do detector, por exemplo, se é necessário que o detector mostre a mesma sensibilidade para todos os solutos detectados, e que o sinal seja o menos possível influenciado pela temperatura, a velocidade do fluxo e a composição da fase móvel.

O detector refractivo é um dos menos sensíveis em HPLC. É muito sensível às mudanças de temperatura, às mudanças de pressão, às alterações na taxa de fluxo e não pode ser usado para a eluição de gradiente. Apesar destas desvantagens, este detector é extremamente útil para detectar compostos que são não iónicos, que não absorvem no UV, e que não fluorescem. Existem muitos sistemas ópticos utilizados em detectores refractivos, mas um dos mais comuns é o detector de índice de refração diferencial, representado esquematicamente na Figura 3.3.



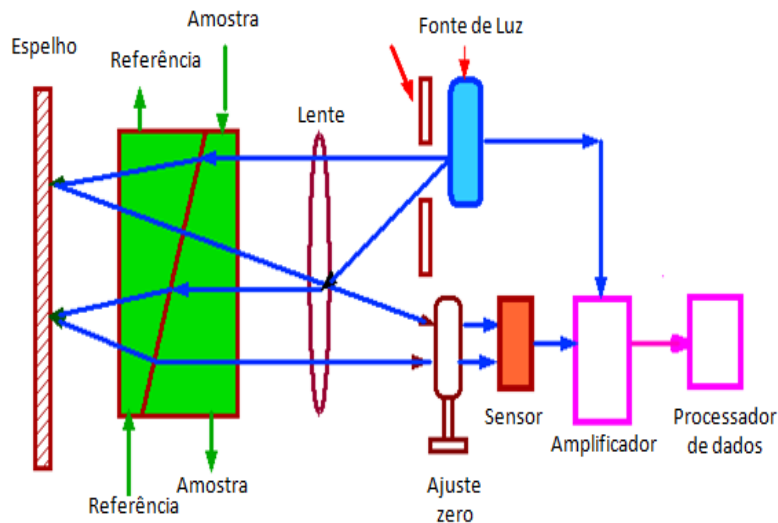


Figura 3.3- Esquema representativo do detector de índice de refração diferencial

O refractómetro apresentado na Figura 3.3 mostra a deflexão de um feixe de luz causada pela diferença do índice de refração entre o conteúdo da célula da amostra e da célula de referência. Um feixe de luz (obtido geralmente a partir de uma lâmpada incandescente) passa através de uma máscara óptica que limita a iluminação à região da célula. Uma lente colima o feixe de luz que passa através de ambas as células (da amostra e referência) e o fazem incidir num espelho plano. O espelho reflecte o feixe de volta através das células da amostra e referência, após o que o feixe é focado por uma lente numa célula fotoelétrica. A localização do feixe, ao invés da sua intensidade, é determinada pelo desvio angular do feixe resultante da diferença do índice de refração entre o conteúdo das duas células. O sinal é então electronicamente modificado para fornecer um sinal proporcional à concentração de solutos na célula da amostra [25].

O detector de índice de refração é quase sempre uma "escolha de último recurso" e está marcado para as aplicações onde, por uma razão ou outra, todos os outros detectores são inadequados ou impraticáveis. No entanto, o detector possui uma área de aplicação específica onde é utilizado correntemente: a separação e análise de polímeros. Para os polímeros que

contêm mais de dez unidades de monómero, o índice de refração é directamente proporcional à concentração do polímero e é praticamente independente da massa molecular. Uma análise quantitativa de uma mistura de polímero pode, portanto, ser obtida pela normalização simples das áreas dos picos no cromatograma. Algumas especificações típicas para o detector de índice de refração são as seguintes:

<b>Sensibilidade</b>	<b><math>1 \times 10^{-6}</math> g/ml</b>
<b>Intervalo dinâmico linear</b>	<b><math>1 \times 10^{-6}</math> a <math>1 \times 10^{-4}</math> g/ml</b>
<b>Factor resposta</b>	<b>0.97 – 1.03</b>

Uma aplicação típica do detector de índice de refração é a análise de carboidratos. Os carboidratos não absorvem no UV, não se ionizam e, apesar de poderem ser produzidos derivados fluorescentes, o procedimento é complexo e demorado. Um exemplo de aplicação deste tipo de sistema de detecção está representado na Figura 3.4, onde se apresenta a separação dos produtos da hidrólise da  $\beta$ -ciclodextrina.

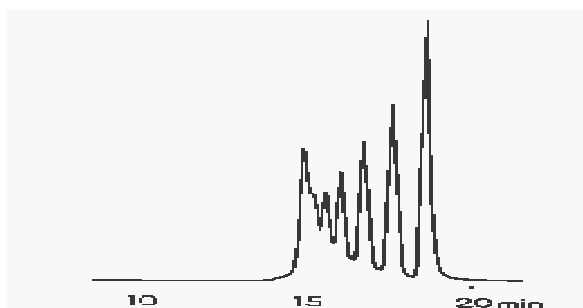


Figura 3.4- Cromatograma de separação dos produtos de hidrólise da  $\beta$ -ciclodextrina utilizando um detector de índice de refração [25]

### 3.1.3- Materiais usados em HPLC

Para a realização deste trabalho, foi usado um equipamento de HPLC da marca Shimadzu, acoplado a um detector refractivo da mesma marca, com as seguintes características: temperatura de 60 °C, fluxo 0.5 mL/min, coluna da marca Macherey- Nagel Nucleogel Sugar 810 CA Va 300/7.8 e fase móvel constituída por uma solução de água destilada com Na<sub>2</sub>CaEDTA (50 mg/L). Foi ainda usada, numa fase inicial de experimentação, uma coluna da marca Waters Carbohydrate Analyses de 3.9x300 mm destinada à análise de açúcares.

Foram obtidos os cromatogramas de oito amostras de gelados da marca Pingo Doce de três sabores, morango, baunilha e chocolate.

### 3.2- Espectroscopia de Infravermelho, FTIR

A espectroscopia estuda a interacção da radiação electromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objectivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas.

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho permite a identificação de uma substância orgânica pelos grupos funcionais presentes no material em análise. Baseia-se na medida da energia absorvida para excitação vibracional dos diferentes modos vibracionais de uma molécula. A amostra é submetida a uma radiação de comprimento de onda na região do infravermelho e a faixa de radiação utilizada situa-se, em geral, entre os 4000 os 400 cm<sup>-1</sup>.

Uma técnica importante no estudo de sistemas moleculares complexos é a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. Esta técnica baseia-se no método interferométrico de Michelson. (Figura 3.5) A energia da fonte de radiação é dirigida para o divisor do feixe, que gera dois percursos ópticos ortogonais, em que um colide num espelho fixo e outro num espelho

móvel. Tanto o espelho móvel como o espelho fixo reflectem novamente a respectiva radiação para o divisor do feixe onde se recombina.

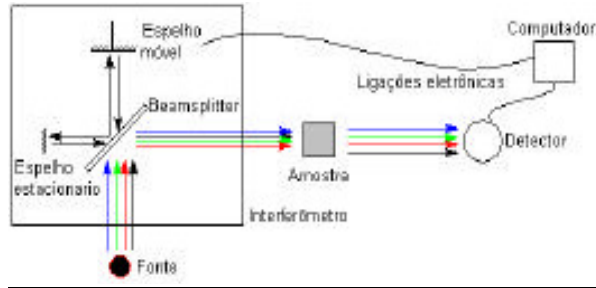


Figura.3.5. Instrumentação típica para espectroscopia IR usando transformada de Fourier.

Este feixe de luz recombinado gera uma interferência que, consoante o valor do deslocamento do espelho móvel, se manifesta de forma opticamente construtiva ou destrutiva, seguindo depois em direcção do detector.

Quando o espelho móvel do interferómetro se desloca num certo espaço de tempo faz surgir diferente padrão e interferência que são observadas no detector como bandas ou espaços negros. É, assim, registado um interferograma, que, matematicamente, é uma soma de funções cosseno que descrevem a intensidade da radiação em função do tempo ou do espaço percorrido,

$$I(\delta) = \int I(\nu) [1 + \cos(2\pi\nu\delta)] \delta\nu \quad (3.2.1)$$

onde  $I(\delta)$  é a intensidade do sinal no detector;  $I(\nu)$  é a intensidade da radiação como função do tempo da frequência (número de onda,  $\nu$ ) e  $\delta$  é o valor da retardação óptica. Para determinar a partir do interferograma a função intensidade da radiação vs o número de onda, calcula-se a Transformada de Fourier do interferograma, a partir da qual se pode obter o espectro;

$$I(\nu)=4\int [I(\delta)-1/2I(\delta=0)](\cos(2\pi\nu\delta)d\delta \quad (3.2.1)$$

Quando o composto não está presente, o espectro obtido é o característico do material óptico do espectrómetro e das condições ambientais. Quando o composto está presente, por subtração do espectro anterior, obtêm-se o espectro de infravermelho característico do composto [26].

### 3.2.1- Materiais usados em espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de Infravermelho foram obtidos num espectrofotômetro da marca Bomem (MB104), com resolução de  $2 \text{ cm}^{-1}$  e óptica de ZnSe.

Obtiveram-se os espectros de quatro amostras de gelado de diferentes sabores, bem como o de glucose, maltose e de uma mistura padrão de oligossacarídeos (LCRT), usando o método da pastilha em brometo de potássio, tendo-se registado as bandas características dos referidos compostos, à temperatura ambiente, entre  $4000$  e  $550 \text{ cm}^{-1}$ .

## 3.3-Espectroscopia de Raman

### 3.3.1 Introdução ao método

Quando um feixe de luz monocromática é difundido pelas moléculas de um composto, verifica-se que uma pequena parte da luz difundida tem uma frequência que difere da radiação incidente. Tal fenómeno é chamado *efeito Raman*.

Desde a sua descoberta, em 1928, o efeito Raman tornou-se a base de um método importante de elucidação de estruturas moleculares, de localização de diversos grupos funcionais ou ligações químicas na molécula, e de análise quantitativa de misturas complexas, em particular no que respeita aos seus componentes maiores. Embora os espectros de Raman estejam relacionados

com os espectros de absorção no infravermelho, o seu mecanismo de produção é totalmente diferente, o que permite obter informação complementar. As vibrações activas em Raman podem ser inactivas no infravermelho, e vice-versa. Um aspecto importante da difusão Raman é o facto de cada sinal espectroscópico ter uma polarização característica. Esta particularidade constitui um elemento adicional de análise, também relacionado com a estrutura molecular do composto, em particular com a simetria das vibrações e com a simetria global da molécula.

### 3.3.2- Princípios teóricos

Observa-se o efeito Raman quando um feixe intenso de radiação monocromática, proveniente, por exemplo, de um laser, incide numa amostra que contém moléculas susceptíveis de sofrerem uma alteração na sua polarizabilidade molecular à medida que vibram.

A maior parte das colisões dos fótons incidentes com as moléculas da amostra são elásticas (difusão de Rayleigh). Porém, cerca de uma em cada milhão de colisões é inelástica, e envolve uma troca quantificada de energia entre a molécula e o fóton incidente, o que dá origem a sinais espectroscópicos distintos da banda correspondente à radiação excitadora. As frequências destes sinais estão relacionadas com as frequências de vibração específicas do material. De acordo com a interpretação do fenómeno Raman à luz da Mecânica Quântica, o fóton incidente eleva a molécula difusora até a um estado vibracional virtual, com um valor acima do nível inicial igual à energia da radiação excitadora, Figura 3.5. No regresso a um nível de menor energia, um quantum de energia vibracional pode permanecer associado à molécula, de onde resulta um decréscimo da frequência da radiação re-emitada. Se a molécula se encontra já num nível vibracional excitado, pode ceder um quantum de energia vibracional, transitando, como resultado do processo global, para um nível de energia inferior, enquanto aumenta a frequência de radiação difundida. Em qualquer dos casos, o desvio da

frequência da radiação difundida de Raman varia proporcionalmente à energia vibracional que intervêm na transição. Assim, o espectro de Raman ocorre sob a forma de uma serie de bandas, situadas simetricamente acima e abaixo da frequência da radiação incidente, segundo um modelo característico da molécula. O desvio é independente da frequência da luz incidente, mas a intensidade da radiação difractada varia inversamente à quarta potência dessa frequência.

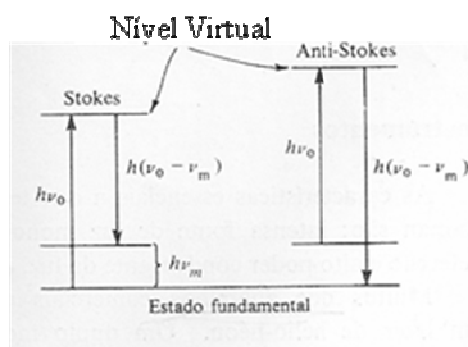


Figura 3.6- Transições vibracionais em Espectroscopia de Raman

As bandas habitualmente estudadas são as que se situam na zona de menores frequências, as chamadas *bandas de Stokes*, as quais são mais intensas do que as de frequências superiores à da radiação excitadora (bandas de anti-Stokes). Por convenção, a posição das bandas de Raman são expressas em números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Observam-se certos inconvenientes na técnica de Raman. Assim, a frequência da radiação excitadora tem de ser inferior às que correspondem às transições electrónicas da molécula, para que não ocorra qualquer absorção da luz incidente por alteração o estado electrónico. Por vezes, a amostra emite fluorescência a uma destas frequências de excitação, podendo essa fluorescência ser intrínseca à substância em estudo ou devida à presença na amostra de uma impureza, ainda que em pequenas quantidades. A fluorescência, com uma intensidade em geral muito maior à do efeito Raman, pode obscurecer completamente o espectro de Raman. A frequência da

radiação excitadora é então escolhida de forma que se situe abaixo da maior parte das transições electrónicas  $S \rightarrow S^*$ , e acima da maior parte das frequências vibracionais fundamentais [27].

### 3.3.3- Instrumentação

Os espectrómetros de Raman combinam, em geral, uma fonte de radiação, um dispositivo de amostragem, um sistema de dispersão ou selecção de radiação e um detector de radiação interfaciado com equipamento para registo e processamento do sinal.

Num espectrómetro dispersivo com rede de difracção, a radiação é monocromatizada com base numa rede de difracção, Figura 3.6. Uma rede de difracção é um dispositivo óptico que contém um grande número de estrias paralelas, produzidas mecânica ou fotograficamente no material suporte, e que dispersa a radiação por interferência.

Para além do elemento dispersivo, têm-se ainda outros elementos necessários para gerar, transportar e detectar radiação: fonte de radiação adequada, espelhos, colimadores e fibras ópticas, detectores de radiação e conversores de radiação em sinais eléctricos, e ainda conversores analógico-digitais e sistemas informáticos.

Os espectrómetros de Raman exigem fontes de radiação muito intensa e monocromática. Sendo assim, utilizam-se lasers (de plasma, de estado sólido ou de corantes - consoante a frequência de excitação desejada). O laser de plasma mais vulgarmente utilizado é o de árgon, cujas frequências dominantes de emissão correspondem ao comprimentos de onda  $\lambda = 488$  e  $\lambda = 515$  nm.

Quanto aos detectores, estes são dispositivos que têm como finalidade essencial converter uma propriedade associada a uma radiação numa carga, corrente ou potencial eléctrico. Uma vez o sinal gerado, este pode ser utilizado directamente para traçar um espectro, ou digitalizado para armazenamento e posterior processamento analítico em sistemas informáticos.



Em espectroscopia de Raman, porque os sinais originais são intrinsicamente muito pouco intensos, a detecção convencional exige a utilização de fotomultiplicadores (em geral arrefecidos termoelectricamente), dispositivos que amplificam o número de fotões incidentes, através de uma reacção em cadeia em que o elemento iniciador são os próprios fotões, de forma a produzir um fluxo electrónico suficientemente intenso para gerar um sinal eléctrico significativo. Uma alternativa ao uso de fotomultiplicadores consiste na utilização de múltiplos detectores miniatura (rede de fotodíodos), dispostos numa matriz. Este arranjo permite que o registo de um espectro se possa fazer de uma só vez, após separação espacial das diferentes frequências que o compõem, enquanto na detecção convencional se torna necessário recolher os dados individualmente para cada valor de frequência analisada. O registo sequencial de um grande número de espectros assim obtidos para a mesma amostra, seguido da sua adição, traduz-se num aumento da relação sinal-ruído, sem acarretar um aumento do tempo total de obtenção do espectro [28].

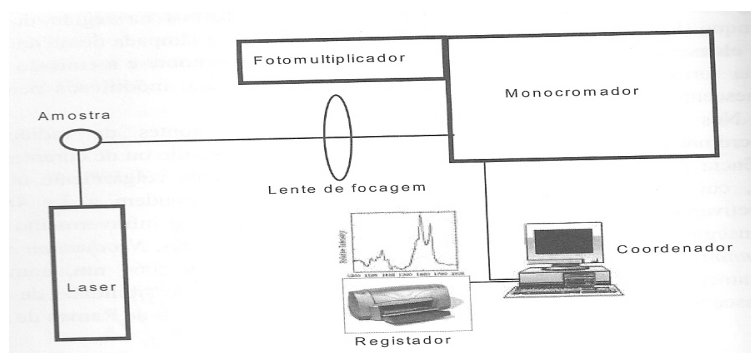


Figura 3.7- Esquema geral simplificado de um Espectrómetro de Raman dispersivo

### 3.3.4- Materiais usados em espectroscopia de Raman

Para a realização deste trabalho, foi usado um espectrômetro de Raman com as seguintes características: comprimento de onda do laser 780 nm, potência do laser (máx 14 mW) 10.0 mW, abertura da fenda 50  $\mu\text{m}$ , com uma resolução estimada 10.1 – 18.6  $\text{cm}^{-1}$ .

Foram obtidos os espectros de glucose, de uma mistura padrão de oligossacarídeos (LCRT) e de uma amostra de gelado da marca Pingo Doce de sabor a morango.

## *IV- Procedimento Experimental*

### *Implementação do método AOAC 2009.01 [2]*

#### *na linha de análise de alimentos da ControlVet*

#### 4.1- Objectivo e domínio de aplicação

O método quantifica fibras alimentares totais incluindo amido resistente (RS) e oligossacarídeos não digeríveis com  $DP \geq 3$ .

#### 4.2-Referências

Este método resulta da combinação de vários métodos da AOAC, nomeadamente os 985.29, 991.43, 2001.03 e 2002.02.

#### 4.3-Resumo do processo

As amostras são incubadas durante 16 h, em frascos de 100 mL, com  $\alpha$ -amilase pancreática e amiloglucosidase, a 37 °C, em banho vibratório. Durante este passo, o amido não resistente é solubilizado e hidrolisado a glucose e maltose, por combinação da acção das duas enzimas.

A reacção termina com o ajuste do pH a 8.2 e aquecimento. A proteína na amostra é digerida pela protease. Para a quantificação de fibras de alto peso molecular, é adicionado etanol, e as fibras alimentares solúveis e insolúveis são capturadas, lavadas com etanol e acetona, aquecidas e pesadas. Um dos duplicados é analisado para proteína e o outro para cinza. As fibras que não precipitaram encontram-se no filtrado (solução etanólica) e são posteriormente concentradas por evaporador rotativo, dessalinizadas em coluna de resinas, novamente concentradas, e quantificadas por HPLC.

#### 4.4- Reagentes

- **Solução tampão maleato de sódio 50 mM, pH = 6.0**

Dissolver 11.6 g de ácido maleico em 1600 mL de água destilada e ajustar o pH com solução tampão de hidróxido de sódio, 4 M.

- **Solução tampão de hidróxido de sódio, 4 M**

Dissolver 160 g/L de hidróxido de sódio em água destilada. Perfazer o volume até 1 L. De seguida, adicionar 0.6 g de  $\text{CaCl}_2$  (cloreto de sódio) e 0.4 g de azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ )- Não adicionar  $\text{NaN}_3$  até o pH ser ajustado a pH 6.0. Usar máscara. A solução é estável durante um ano, em refrigeração.

- **Solução de “trizma base” 0.75 M**

Dissolver 90.8 g de trizma base em aproximadamente 800 mL de água destilada. Perfazer o volume até 1 L.

- **Solução de ácido acético, 2 M**

Num balão de 1 L com aproximadamente 500 mL de água destilada, adicionar 115 mL de ácido glacial acético e perfazer o volume.

- **D-sorbitol (padrão interno para coluna SugarPaK), 100 mg/L, grau de pureza  $\geq 99.5\%$**

Pesar 10 g de D-sorbitol para um balão de 100 mL. Dissolver em 80 mL de azida de sódio a 0.02%. Perfazer até aos 100 mL.

- **Solução de  $\text{NaN}_3$ , 0.02% (m/v)**

Dissolver 0.2 g de azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) num balão de 1 L, com água destilada. (Usar máscara)

- **Solução para determinação do tempo de retenção padrão (LCRT)**

Dissolver 2.5 g da porção de mistura padrão de oligossacarídeos em água destilada, e transferir para um balão de 100 mL. Pipetar 10 mL de D-sorbitol. Perfazer o volume com a solução de azida de sódio a 0.02%. Transferir as soluções para um frasco Duran de 100 mL.

- **D-Glucose padrão para cromatografia líquida, 2, 5, 10, 15, 20 mg/L, com um grau de pureza  $\geq 99.5\%$**

Pesar 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 g de D-glucose (Sigma) e adicionar em separado as porções em balões de 100 mL. Pipetar 10 mL da solução de D-sorbitol para cada balão. Perfazer o volume com solução de azida de sódio a 0.02%. Transferir as soluções para frascos Duran.

- **Kit enzimático MEGAZYME**

Contém enzimas  $\alpha$ -amilase pancreática (3300 U/mL), protease (50 mg/mL) e amiloglucosidase (3.4 U/mL).

- **Álcool etílico 78 %**

Num balão de 1 L, diluir 800 mL de álcool etílico e perfazer o volume com água destilada.

- **Álcool etílico 96 %**

- **Amberlite FPA53**

- **Ambersep 200**

- **Acetona**

- **Areia do mar lavada**

#### 4.5-Aparelhos e Utensílios

- **Balança sensível à quarta casa decimal**

- **Cadinhos de vidro de placa filtrante de porosidade 2 (40 a 100  $\mu$ m).**

Colocam-se na mufla a 525 °C, com uma colher de areia do mar, durante duas horas. Arrefecem-se no excicador e regista-se a massa.

- **Banho de água com temperatura regulável até 100 °C**

- **Banho de água vibratório com temperatura regulável: T= 37  $\pm$  -1 °C e 60 $\pm$ 1°C**

- **Banho de areia**

- **Mufla de temperatura regulável até 525  $\pm$  5 °C**

- **Bomba de vácuo**

- **Coluna de vidro**

- **Potenciómetro**

- **Estufa com temperatura regulável**
- **HPLC (características referidas anteriormente na secção dos materiais)**

- T= 60 °C
- fase móvel: solução de água destilada com Na<sub>2</sub>CaEDTA (50 mg/L)
- velocidade do fluxo: 0.5 mL/min
- coluna: Nucleogel Sugar 810 CA Va 300/7.8
- Detector refractivo

#### 4.6- Técnica

De uma forma genérica, o processo para determinar o teor de fibra alimentar de acordo com o método AOAC 2009.01 segue o seguinte procedimento:

4.6.1 - Extração da matéria gorda para amostras com teor de gordura superior a 10%.

##### *Produtos sólidos secos*

A toma de amostra é feita para um cadinho de placa filtrante, onde é posteriormente lavada com acetona. O cadinho é seco na estufa o tempo necessário para evaporar o solvente ou deixar o cadinho submerso em acetona durante a noite; no dia seguinte, filtrar e lavar com acetona. Depois de seca, a amostra é transferida cuidadosamente para o copo onde decorre a digestão, de modo a evitar perdas.

##### *Produtos sólidos pastosos*

A toma da amostra é feita para um cadinho de placa filtrante, tendo o cuidado de esta não agarrar à placa do cadinho e, para isso, tentar fixá-la na parte lateral do cadinho. O cadinho é seco na estufa até a amostra solidificar,

de modo a que possa ser desengordurada. O procedimento posterior é o mesmo que se descreveu para produtos sólidos.

#### 4.6.2 - Toma para análise

A toma de amostra varia consoante o teor de humidade e de matéria gorda presente na amostra a analisar, tendo como massa de referência 1.0 g.

#### 4.6.3 - Digestão enzimática e filtração

a) A amostra é pesada em duplicado para a determinação de cinza e proteína, não devendo a massa exceder 0.02 g uma da outra. A toma da amostra é feita para garrafas de vidro de 100 mL.

b) Adicionar 40 mL da solução tampão de maleato de sódio (pH=6) contendo a mistura de  $\alpha$ -amilase pancreática e AMG, e verificar o pH. Ajustar se não for igual a  $6.0 \pm 0.1$ .

c) Incubar em banho vibratório (159 r/min), à temperatura de 37 °C, durante 16 h (17h00-9h00).

d) Adicionar 3.0 mL de trizma base (pH 7.9-8.4) e ajustar o pH a 8.2

e) Incubar em banho de água (95-100 °C), durante 20 minutos.

f) Remover os frascos do banho de água, com luvas apropriadas, e deixar arrefecer o banho até 60 °C

g) Adicionar 0.1 mL de protease (solução viscosa).

h) Incubar a 60 °C em banho de água durante 30 minutos. Deixar arrefecer à temperatura ambiente.

i) Adicionar 4.0 mL de ácido acético (2 M) a cada frasco e ajustar o pH a 4.3.

j) Adicionar 1 mL da solução D-sorbitol a cada frasco e, posteriormente, à temperatura ambiente, adicionar 180 mL, de etanol a 95%, pré aquecido a 60 °C. A precipitação de fibra ocorre em 1 hora.

k) Usando um sistema de vácuo, filtrar a amostra digerida para o cadinho já pesado e lavar o resíduo com 2x15 mL de etanol a 78%, 2x15 mL de etanol a 95% e 2x15 mL de acetona. Reter os filtrados e as lavagens para a determinação de fibra de baixo peso molecular.

l) Secar o resíduo na estufa a 105 °C durante a noite.

m) Arrefecer em excicador, aproximadamente durante uma hora, e registrar o peso do cadinho com o resíduo

n) Num dos duplicados é determinado o teor de proteína a partir da análise de nitrogénio e, no outro, o teor de cinza (5 horas a 525 °C)

o) A massa do resíduo de cinza obtém-se por diferença do cadinho + resíduo e do cadinho vazio, e a massa resíduo de proteína obtém-se por diferença do cadinho + resíduo e do cadinho vazio x 6.25 (factor resultante da conversão do teor de nitrogénio em proteína assumindo que em média a percentagem de nitrogénio numa proteína é 16%).

#### 4.6.4 – Determinação de fibras de baixo peso molecular

##### 4.6.4.1- Filtração

Transferir o filtrado para um balão e concentrar a amostra em banho de areia.

##### 4.6.4.2- Desionização da amostra

###### 4.6.4.2.1- Preparação da coluna de vidro

Misturar 4 g de Amberlite e 4 g de Ambersep, e empacotar na coluna para a análise de cada amostra teste.

###### 4.6.4.2.2- Desionização da amostra

Dissolver a amostra em 5 mL de água desionizada, e transferir 2 mL desta para a coluna.



Colectar o eluato (0.5 para 2 mL/min) para um balão de 100 mL. Continuar a extracção na coluna com 20 mL de água desionizada. Posteriormente, levar à secura em banho de areia. Redissolver em 2 mL de água desionizada. Filtrar e injectar.

#### 4.7- Cálculos

O teor de fibra, em percentagem, é obtido pela seguinte fórmula de cálculo:

$$(((Mrp+Mrc/2)-P-C)/ (Mc+Mp/2)) + (((Mg*PAA)/(Mc*PAG)*100)*2.5)$$

Onde:

Mrp – massa do resíduo da proteína (g);

Mrc – massa do resíduo de cinza (g);

P – Massa de proteína da amostra (g);

C- Massa de cinza (g);

Mc – massa de amostra para cinza (g)

Mp – massa da amostra para proteína (g);

Mg – massa do padrão glucose (g)

PAA – área do pico da amostra;

PAG – área do pico da glucose

## V- Resultados

### 5.1- Resultados obtidos por HPLC

Numa fase inicial de implementação do método da AOAC 2009.01 e enquanto se aguardava a chegada da coluna destinada à análise de fibra de baixo peso molecular, foram realizados ensaios com uma coluna da marca Waters destinada à análise de açúcares. Sendo assim, e como primeiro passo, foram realizados testes para a obtenção dos padrões, com diferentes proporções de fase móvel. Os resultados encontram-se nas tabelas 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1- Resultados para os padrões de glucose a diferentes concentrações e mistura padrão de oligossacarídeos (LCRT) com fase móvel nas seguintes proporções 80 acetonitrilo (ACN):20 água (H<sub>2</sub>O) e fluxo a 2 mL/min

	Tempo de retenção (min)	Área do pico
Glucose 0.5%	4.947	456704
Glucose 1 %	5.067	896565
Glucose 2 %	5.009	1496549
LCRT	5.455	2027845

Tabela 5.2- Resultado para o padrão de glucose com a fase móvel na proporção 75 ACN:25 H<sub>2</sub>O

	Tempo de retenção (min)	Área do pico
Glucose 1%	2.107	1945334

Como a glucose saiu com um tempo de retenção de 2.107 com a fase móvel a 75 ACN: 25 H<sub>2</sub>O, ou seja muito cedo, optou-se por usar a fase móvel na proporção de 80 ACN:20 H<sub>2</sub>O.

Seguidamente, foi realizado um ensaio com três amostras do qual se concluiu que o sorbitol (usado como padrão interno) adicionado durante o processo não deveria ser utilizado, uma vez que o seu tempo de retenção era o mesmo da glucose para esta coluna. Com isto, retirou-se o sorbitol do ensaio e

passou-se a realizá-lo pelo método de referência externo (sem uso do padrão interno, apenas com o padrão de glucose).

Posteriormente foi repetido todo o processo, para três amostras tendo-se obtido os seguintes resultados:

	Tempo de retenção (min)	Área do pico
Glucose 0.5%	4.965	456704
Glucose 1%	5.070	896565
Glucose 2%	5.070	1730645
Branco C	-----	-----
Branco P	-----	-----
11594 C	5.699	20047
11595 C	6.070	21365
11596 C	5.664	25000

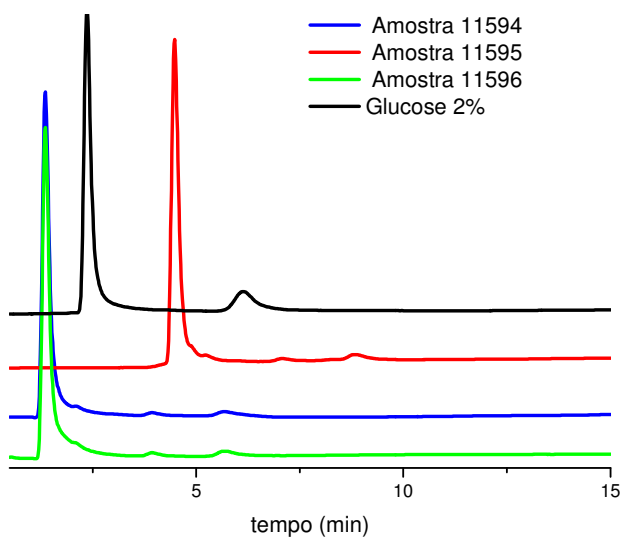


Figura 5.1- Resultados obtidos para amostras e padrões a fluxo 2 mL/min, fase móvel a 80 ACN:20 H<sub>2</sub>O e volume de injeção de 20 µL.

Aquando da análise destes resultados concluiu-se haver necessidade de tarar balões, para que fosse possível saber a massa que é recuperada e

posteriormente diluída em água, e assim se quantificar a percentagem de fibra presente nas amostras. Mais tarde, concluiu-se que a percentagem de fibra seria a mesma tanto no resíduo como na amostra pesada inicialmente. Os resultados para as amostras com balões tarados encontram-se na tabela e cromatograma a seguir:

	Massas(g)	Vinj*( $\mu$ l)	Tr (min)	Área	%Glucose
Glucose1%		20	4.771	863825	
11595C	0.9836	20	3.724	123132	1.45
		20	5.337	401461	4.73
11595P	0.3072	20	3.671	44134	1.66
		20	5.350	167996	6.33
11596P	0.6506	20	3.776	197703	3.52
		20	5.422	410424	7.3
11596C	0.7726	20	3.698	125704	1.88
		20	5.323	641843	9.62
11594 P e C			REPETIU-SE		

\*Vinj = volume de solução injectada

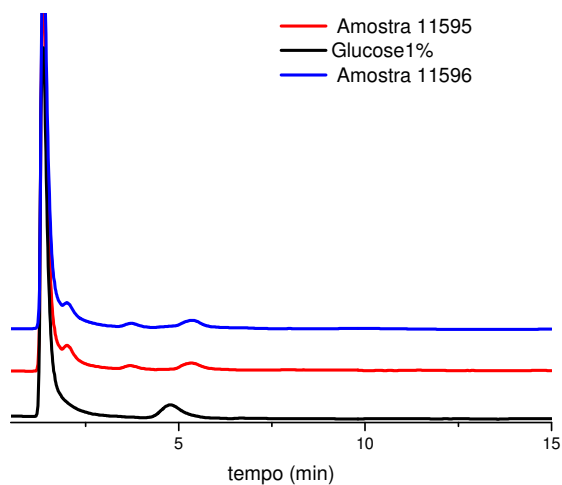


Figura 5.2- Resultados obtidos para amostras e padrões a fluxo 2 mL/min com a fase móvel nas seguintes proporções 80ACN:20H<sub>2</sub>O.

Da análise destes resultados conclui-se que o segundo pico, observado na Figura 5.2, tinha o mesmo tempo de retenção do padrão da glucose. Pensou-se ser este o pico correspondente às porções de fibra de baixo peso molecular, uma vez que aquando da contaminação directa em vial, da amostra este veio evidenciado. No entanto, os valores obtidos para a percentagem de fibra de baixo peso molecular não estavam de acordo com o esperado. Depois da realização de vários ensaios com esta coluna, chegou-se à conclusão que definitivamente esta não podia ser utilizada, uma vez que depois da realização de ensaios de recuperação se pode verificar que os picos que se estavam a quantificar não podiam corresponder à fibra de baixo peso molecular e a interpretação dos picos correctos não ser trivial.

Procederam-se então, seguidamente a ensaios com a coluna de marca Macherey-Nagel destinada para a análise de fibra, usando como fase móvel água com Na<sub>2</sub>CaEDTA (50 mg/L) e um fluxo de 0.5 mL/min, podendo este ser variável. Antes da realização do ensaio, foram testados os padrões, sendo um deles uma mistura de oligossacarídeos (LCRT), que serviu apenas como ponte de referência para as amostras, a maltose e o sorbitol, que servem como marcadores (sendo o sorbitol usado como padrão interno) e, por fim, a glucose, para quantificar as amostras. Seguidamente está reproduzido o cromatograma dos padrões.

	Tr (min)	Área
LCRT 2.5%	8.186	5351794
Maltose 2%	10.463	8398648
Sorbitol 0.1%	30.74	693636
Glucose 1%	12.483	2595306

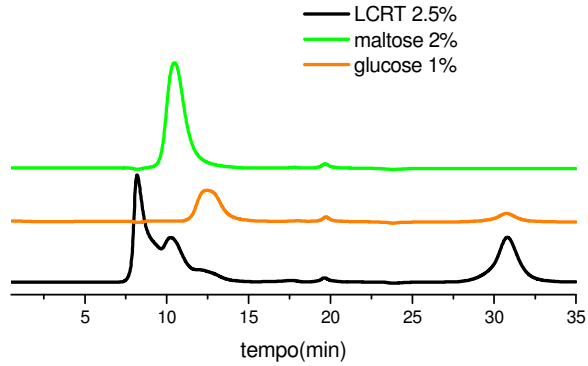


Figura 5.3 - Cromatogramas obtidos para os padrões a fluxo 0.5 mL/min e volume de injeção de 20 µL e na tabela os respectivos tempos de retenção (Tr) e áreas dos picos.

No seguimento da análise dos padrões, foi injectada uma amostra, tendo-se procedido à sua quantificação. Os resultados apresentam-se a seguir.

	Tr (min)	Área
LCRT 2.5%	8.186	5351794
Maltose 2%	10.463	8398648
Sorbitol		
0.1%	30.74	693636
Glucose 1%	12.483	2595306
11595	7.942	9093402

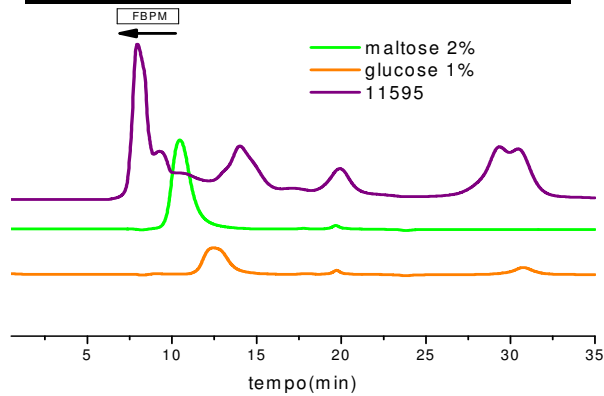


Figura 5.4- Cromatograma de padrões e amostra a fluxo 0.5 mL/min e volume de injeção de 20 µL e tabela com respectivos tempos de retenção e áreas dos picos

Comparando o cromatograma da amostra com o padrão de maltose e o LCRT, conclui-se que a fibra de baixo peso molecular é tudo o que se encontra para trás do padrão de maltose, tendo-se obtido num primeiro ensaio para esta amostra uma percentagem de fibra de baixo peso molecular igual a 3.73%. A percentagem de fibra de alto peso molecular obtida, pela fase gravimétrica, foi de 0.33%, sendo o total de fibra igual a 4.05%. Comparando este valor com o valor rotulado da amostra em estudo (gelado de baunilha) que é de 4.80 %, este resultado encontra-se dentro do critério de aceitação da rotulagem do produto (20%).

Com isto, e depois de se ter obtido este resultado, procedeu-se a realização do ensaio para as oito amostras de gelados da marca Pingo Doce de diferentes sabores (já referenciados anteriormente). Os resultados encontram-se nos cromatogramas na Figura 5.5 e na Tabela 5.3,.

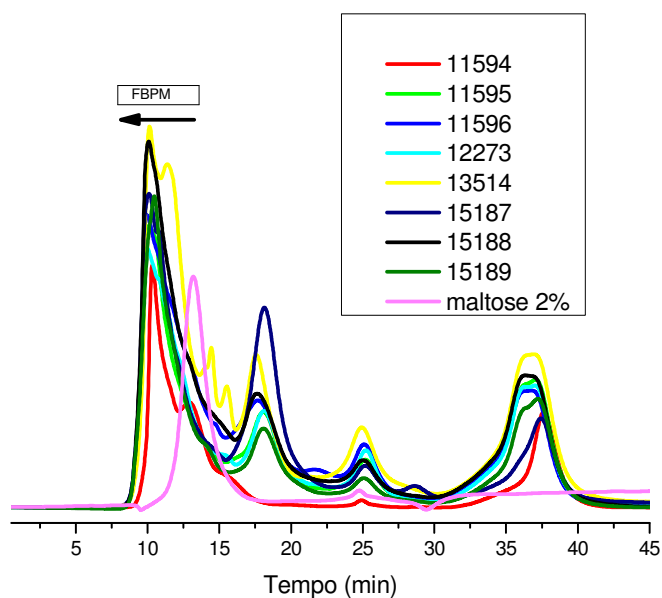


Figura 5.5- Cromatogramas obtidos para diferentes amostras a fluxo 0.4 mL/min e volume de injeção de 20 µL

Tabela 5.3- Resultados obtidos para as oito amostras de gelados a fluxo 0.4 mL/min e volume de injeção de 20 µL tanto para os padrões como para as amostras

QA da Amostra	Massa da amostra (g)	Massa dos resíduos (g)	Fibra de alto peso molecular (g/100g)	Fibra de baixo peso molecular	Total de fibra alimentar (%)	Valores Rotulados dos gelados da marca PD (%)
11594 C	2.5470	0.0117				
11594 P	2.5547	0.0112	0.3127	2.5471	2.86	4.7%
11595 C	2.5543	0.0083				
11595 P	2.7320	0.0061	0.1066	3.7380	3.84	4.8%
11596 C	2.5507	0.0145				
11596 P	2.5190	0.0211	0.4672	4.7600	5.23	5.3%
12273 C	2.5692	0.0033				
12273 P	2.7061	0.0101	0.0410	4.0680	4.11	3.0%
13514 C	2.6493	0.0227				
13514 P	2.5978	0.0042	0.3386	3.8679	4.21	4.3%
15187 C	2.4939	0.0474				
15187 P	2.6006	0.0458	1.0155	3.4688	4.48	4.8%
15188 C	2.5505	0.0861				
15188 P	2.7971	0.0152	0.1041	5.5062	5.61	5.3%
15189 C	2.8374	0.0091				
15189 P	2.5843	0.0056	0.1832	3.6200	3.80	3.7%

Da análise destes resultados, e comparando estes com os valores rotulados, chega-se à conclusão que a percentagem de recuperação de fibra de baixo peso molecular é aceitável. Relativamente às amostras 11594 e 12273, os valores obtidos foram os únicos dissemelhantes relativamente aos valores rotulados, facto que se atribuiu à degradação da amostra, uma vez que esta já evidenciava sinais de presença de bolor. Quanto às restantes amostras, os resultados apresentados são semelhantes aos valores rotulados. A amostra 11595 apresenta como percentagem de fibra total 3.84%, sendo o valor rotulado de 4.8%. A amostra 11596 possui 5.23% de fibra total e o valor rotulado é 5.3%. Quanto à amostra 13514, o valor rotulado é de 4.3%, e o



obtido foi de 4.21%. Na amostra 15187, obteve-se 4.48% e o esperado era de 4.8%. A amostra 15188 teve como resultado 5.61% e o rotulado era 5.3%. Por último, a amostra 15189 tem valor rotulado de 3.7% e obteve-se 3.80%.

Com isto, e visto que resultados serem bastante aceitáveis, procedeu-se à validação do método, sendo que a amostra usada para tal foi a 15189. Seguidamente são apresentados os resultados obtidos, bem como os seus objectivos e critérios de validação.

O processo de validação tem por objectivo evidenciar que o método permite obter resultados cuja qualidade é adequada aos fins com que são usados. Para a validação deste método de ensaio o laboratório utiliza as seguintes avaliações:

**a) Avaliação dos fundamentos teóricos do método e adequabilidade**

**b) Calibração analítica**

**Estudo da linearidade da recta de calibração** Usualmente o estudo da linearidade de uma gama de trabalho em cromatografia é realizado de acordo com o teste RIKILT. Este permite avaliar a linearidade através do estudo dos resíduos. Contudo, para a validação deste método, utilizou-se a norma ISO 8466-01.

Prepararam-se os padrões necessários, de acordo com o definido no método de ensaio, e efectuou-se a sua leitura. Introduziram-se os resultados obtidos no Modelo 789 (modelo baseado em normas ISO) e avaliou-se a linearidade.

Para avaliar a linearidade utilizaram-se, então, os padrões referidos no método da AOAC 2009.01: 0.2 g/mL, 0.5 g/mL, 1.0 g/mL, 1.5 g/mL e 2.0 g/mL.

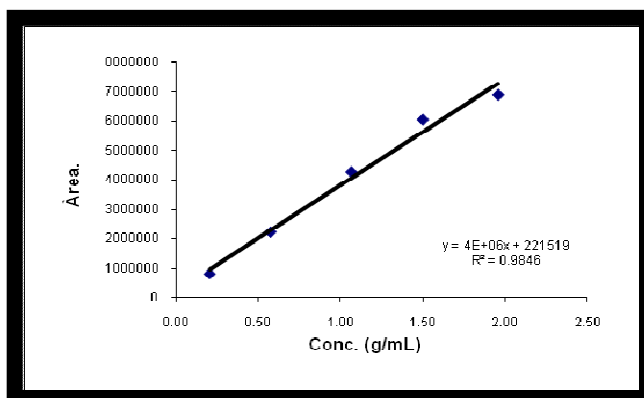


Gráfico 1: Curva de calibração para doseamento das fibras de baixo peso molecular. Utilizou-se a fase móvel referida no método 2009.01, fluxo de 0.4 mL/min, temperatura de 60 °C e detector RID.

A função de calibração é linear, fornecendo a equação da recta  $y = 4 \times 10^6 x + 221519$  e um coeficiente de correlação igual a 0.99227 para concentrações entre 0.2 e 2.0 g/mL de glucose, obedecendo ao critério de aceitação do laboratório ( $r \geq 0.99$ ). Procedendo de acordo com a norma ISO referida anteriormente, a partir de um conjunto de pares ordenados ( $y$ =área;  $x$ =concentração) calculam-se para a função de calibração linear e não linear os respectivos desvios-padrão residuais,  $S_{y/x}$ ,  $S_{y_2}$ . A diferença das variâncias ( $DS^2$ ) é calculada pela equação seguinte:

$$DS^2 = (N - 2)S_{y/x}^2 - (N - 3)S_{y_2}^2$$

em que  $N$  é o número de padrões de calibração.

Calcula-se o valor teste  $F$ , dado por.:

$$F_{Calc.} = \frac{DS^2}{S_{y_2}^2}$$

e compara-se com o  $F$  tabelado. Como o valor de  $F$  obtido (1.99) é menor que o  $F$  tabelado (15.98) a função é linear.

**Estudo do limite de quantificação-** Neste trabalho, o estudo do limite de quantificação foi realizado através do primeiro padrão da curva de calibração (padrão residual). Neste caso, efectuaram-se 10 leituras do primeiro padrão da curva de calibração, em condições de precisão intermédia, e, posteriormente, efectuou-se o cálculo da média, desvio padrão. Se o erro relativo e coeficiente de variação dos valores obtidos foram inferiores a 10% o limite de quantificação é igual ou inferior ao valor testado. Caso contrário, outro limite de quantificação terá que ser estudado. O estudo do limite de quantificação do método foi apurado no Modelo 759.

Tabela 5.4- Concentrações obtidos para o primeiro padrão da recta de calibração

Ensaio	Data	Resultado (g/ml)
1	16-02-2011	0.2020
2	23-02-2011	0.1840
3	25-02-2011	0.2093
4	28-02-2011	0.1970
5	28-02-2011	0.2000
6	28-02-2011	0.2000
7	1-03-2011	0.2001
8	1-03-2011	0.2020
9	1-03-2011	0.2002
10	1-03-2011	0.2004

O coeficiente de variação obtido é igual a 3.13% e o erro relativo é de 0.39% logo o limite de quantificação do método é 0.2 g/mL de glucose e corresponde ao primeiro padrão da curva de calibração.

**Estudo da repetibilidade-** O ensaio de repetibilidade consiste em repetir o mesmo ensaio, sobre a mesma amostra, pelo mesmo analista, mesmo equipamento e mesmos reagentes, em curtos intervalos de tempo. Para se determinar a repetibilidade do método efectuaram-se 10 repetições do ensaio para a amostra 15189 nas condições anteriormente descritas.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo:

$$r = 2,8S_{ri}$$

Sendo que,

$S_{ri}$  é o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados;

(NOTA: Avaliou-se a existência de valores aberrantes, através de teste de “Outliers”-teste de Grubb’s.)

O coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) é expresso em percentagem, e é dado por:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{x} 100$$

onde,

$S_{ri}$  é o desvio padrão de repetibilidade

O erro relativo da repetibilidade (Er) é dado por:

$$Er = \frac{|x_{obtido} - x_{médio}|}{x_{médio}} \times 100$$

Considera-se a repetibilidade aceitável quando  $CV_r \leq 10\%$ .

Tabela 5.5- Concentrações obtidas para a amostra 15189, repetida nas condições descritas no texto ( ver acima )

Ensaio	Resultado
1	1.300
2	1.300
3	1.290
4	1.300
5	1.280
6	1.290
7	1.290
8	1.300
9	1.290
10	1.290

A repetibilidade obtida foi de 1.47% em valor relativo e com CVr igual a 0.52%.

**Estudo da especificidade, selectividade e exactidão do método (Ensaio de recuperação)-** Diz-se que um método é específico quando permite discriminar um analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito. A selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito numa mistura complexa, sem interferência de outros componentes.

Para avaliar as interferências de matriz, efectuou-se um teste de recuperação utilizando uma amostra real representativa do tipo de matriz, com valor quantificável. Esta amostra é contaminada com analito a diferentes níveis de concentração, incluindo os seus valores extremos.

O cálculo da recuperação é efectuado da seguinte forma:

$$\eta = [C_f - C_a] / C_t * 100$$

$\eta$  = recuperação

$C_f$  = concentração final (analito adicionado + amostra)

$C_a$  = concentração da amostra

$C_t$  = concentração esperada de analito

Considera-se a recuperação aceitável sempre que  $\eta = 100 \pm 20\%$  (métodos cromatográficos).

Tabela 5.6- Resultados obtidos a diferentes concentrações para os ensaios de recuperação

Concentração do analito na amostra	Massa Amostra (g)	Massa Analito Adicionada (g)	Concentração Esperada (%)	Concentração Obtida (%)	Recuperação (%)
0.08	1.0338	0.3750	0.20	0.29	103.50
0.16	1.0508	0.7000	0.50	0.57	81.50
0.33	1.0656	0.1000	1.00	1.44	111.90

Conclui-se que o método é exacto, uma vez que cumpre o critério de aceitação.

**Estudo da precisão intermédia-** Estudou-se a precisão intermédia efectuando no mínimo 15 ensaios fazendo variar as condições susceptíveis de variação tais como o tempo (variação de dias).

A precisão intermédia (S) é avaliada através da seguinte expressão:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_i} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}}$$

Considera-se a precisão intermédia (S) aceitável se cumprir o valor de referência  $CV \leq 20\%$ .

Tabela 5.7- Resultados obtidos em g/100 g para a mesma amostra desfasada no tempo

Ensaio	Resultado
1	1.300
2	1.300
3	1.290
4	1.300
5	1.280
6	1.290
7	1.290
8	1.300
9	1.290
10	1.290
11	1.130
12	1.280
13	1.300
14	1.100
15	1.100

Como o  $CV=6.06\%$ , cumpre o critério de aceitação relativamente à precisão intermédia.

**Avaliação da incerteza-** A incerteza do método foi calculada a partir de ensaios de recuperação (exactidão) e da precisão intermédia.

A incerteza foi calculada a partir de ensaios de recuperação, sendo o valor obtido de  $8.88\%$  em valor relativo.

Atendendo aos resultados obtidos durante o processo de validação, conclui-se que este método se encontra validado, podendo ser realizado em trabalho de rotina do laboratório.

## 5.2- Resultados obtidos por espectroscopia de Infravermelho

Com estes estudos, pretendeu-se efectuar uma caracterização espectroscópica das amostras a injectar no cromatógrafo, utilizando depois a informação obtida para tirar ilações de natureza semi-quantitativa.

Numa fase inicial de experimentação, foram registados espectros de infravermelho de glucose, de maltose e da amostra 13514 (gelado de morango da marca Pingo Doce), com a finalidade de se tentar perceber onde se encontravam as bandas características da fibra de baixo peso molecular. Na Figura 5.7 encontram-se representados os mesmos:

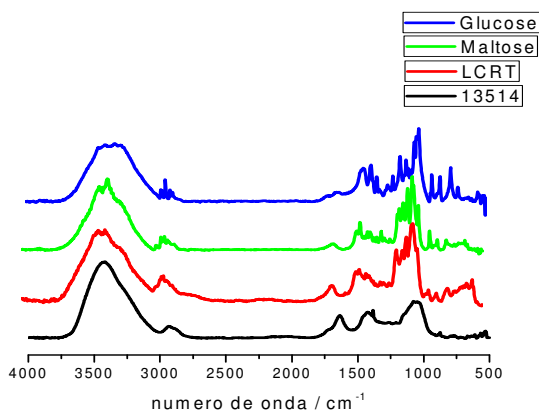


Figura 5.7. Espectros de infravermelho de glucose, maltose, LCRT e da amostra 13514 obtidos à temperatura ambiente

A análise dos espectros obtidos revelou que estes apresentavam grande grau de semelhança entre si, inviabilizando, desta forma, qualquer análise quantitativa relativa ao teor de fibra por simples análise espectral.

Foi, então, desenvolvida uma metodologia de análise dos espectros alternativa, baseada na simulação dos espectros esperados para cada amostra a partir de espectros de referência da glucose, maltose e LCRT. Os teores de



cada amostra nestas substâncias para construção dos espectros simulados foram fornecidos pelos resultados cromatográficos.

Para construção dos espectros de referência, normalizados pela massa da substância, foram obtidos espectros de glucose, maltose e LCRT, em pastilhas de KBr, à temperatura ambiente, na proporção amostra/KBr de 1:200 mg.

Repetiu-se o processo dez vezes para cada amostra. Os espectros padrão da glucose, maltose e LCRT encontram-se representados na Figura 5.8:

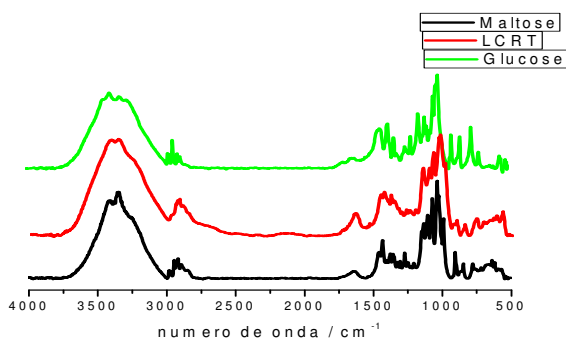


Figura 5.8. Espectros de infravermelhos dos padrões normalizados obtidos à temperatura ambiente

Depois da obtenção destes espectros-padrão, estes foram multiplicados pelas percentagens de fibra de baixo peso molecular, glucose e maltose obtidas por HPLC para cada uma das amostras e, posteriormente, somados, de modo a obter-se o espectro previsto para um conteúdo exclusivo de glucose, maltose e fibra de baixo peso molecular. Estes espectros foram depois normalizados pela intensidade total dos correspondentes espectros das amostras injectadas no cromatógrafo. Na Figura 5.9, encontra-se representado o espectro simulado normalizado pela área, bem como o espectro obtido para

a amostra 13514, e ainda as percentagens de fibra, glucose e maltose obtidas por HPLC.

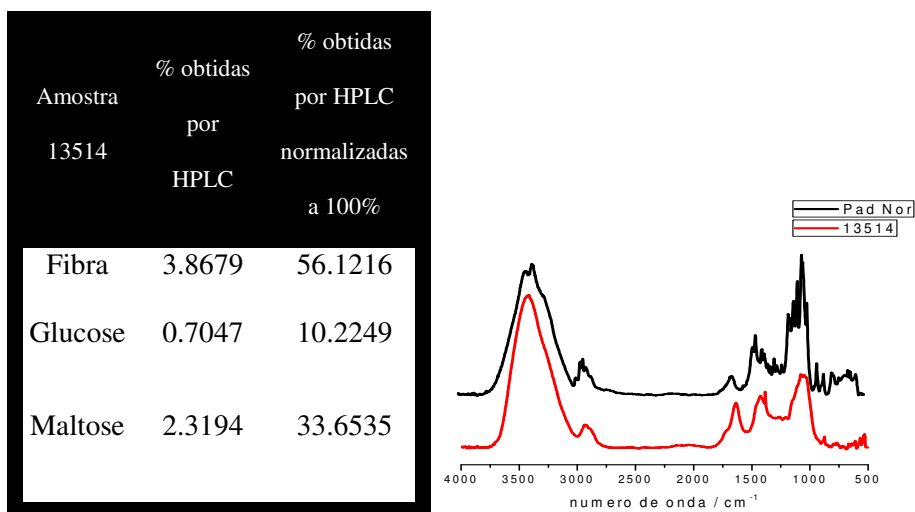


Figura 5.9. Espectros de Infravermelho do padrão normalizado pela área e da amostra 13514 obtidos à temperatura ambiente e tabela de percentagens de fibra, glucose e maltose obtidas por HPLC e as mesmas normalizadas a 100

Após a normalização do espectro simulado pela intensidade total do espectro experimental, subtraíram-se os espectros maximizando o anulamento das bandas características do espectro simulado. Este procedimento permite obter o valor do factor óptimo de multiplicação do espectro simulado na subtração ( $\gamma$ ), que nos diz a percentagem de fibra, maltose e glucose presentes na amostra (nas proporções determinadas por HPLC) e ainda, por diferença para 100%, a percentagem daquilo que não é quantificado por HPLC. Na Figura 5.10, estão representados os espectros resultantes desta subtração, bem como o valor de  $\gamma$  obtido para cada uma das amostras.

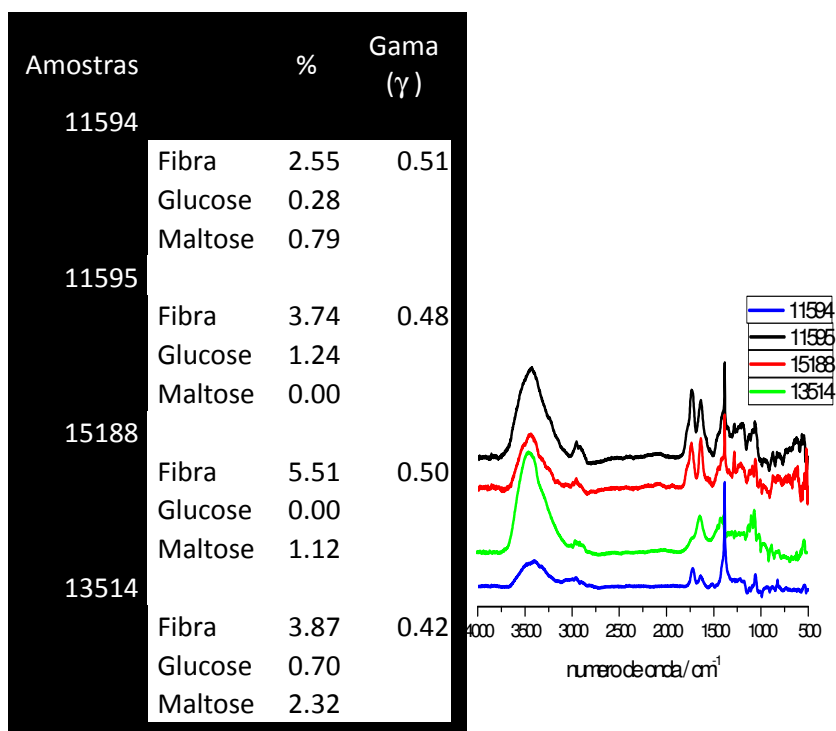


Figura 5.10. Espectros de infravermelho obtidos à temperatura ambiente dos resíduos das amostras e tabela com as percentagens de fibra, glucose e maltose obtida por HPLC e o valor de  $\gamma$  obtido da subtração dos espectros de referência normalizado à área com a amostra

Desta análise, concluiu-se que 50% dos espectros correspondem à fibra, maltose e glucose presentes nas amostras e quantificadas por HPLC, e os restantes 50% a outras substâncias não precipitáveis pela solução etanólica e que estão, por isso, na amostra a injectar no cromatógrafo. Por simples análise dos espectros-resíduo, estas substâncias são de difícil caracterização, exigindo um estudo detalhado, a realizar no futuro. De acordo com a bibliografia consultada [29], um tipo de substância com espectros compatíveis com algumas das bandas mais intensas observadas nos espectros-resíduo são ácidos carboxílicos, uma vez que aos picos mais intensos se podem fazer corresponder elongações C-H e OH (entre 3000 e 2920  $\text{cm}^{-1}$ ) e C=O (1724  $\text{cm}^{-1}$ ).

### 5.3- Resultados obtidos por Espectroscopia de Raman

Foram realizados ensaios preliminares de caracterização do padrão LCRT e ainda da amostra 13514. Na Figura 5.11, encontram-se representados os espectros obtidos para o padrão referido e respectiva amostra.

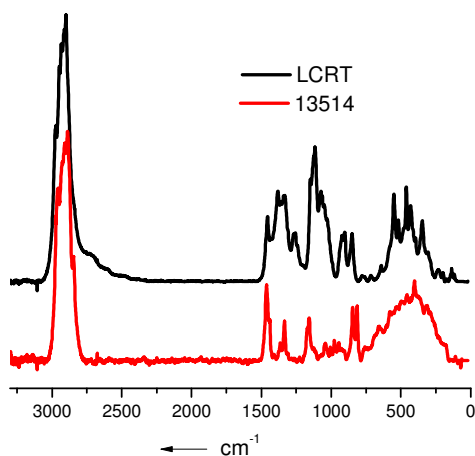


Figura 5.11. Espectros de Raman obtidos para um tempo de exposição de 100 s e 50 espectros

De acordo com a bibliografia consultada, a região entre 3000 e 3100 cm<sup>-1</sup> corresponde às vibrações dos grupos C-H presentes tanto nas moléculas de glucose, como as de maltose e de fibra de baixo peso molecular. Entre 1400 e 1470 cm<sup>-1</sup>, surgem as bandas devidas às as elongações dos grupos CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub> também estes presentes nas moléculas de glucose, maltose e fibra. As restantes zonas espectrais são de difícil caracterização, contudo contribuições das vibrações C-O-C dos anéis de glucose, maltose e fibra, entre outras.

Tal como os espectros de infravermelho discutidos na secção anterior, os espectros de Raman da amostra e do LCRT (bem como os de glucose e maltose constante de literatura [30] são muito semelhantes entre si. Sugere-se então aqui para a análise destes resultados a aplicação de uma metodologia

semelhante à descrita atrás para o tratamento dos resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho. Da conjugação dos resultados obtidos pelas duas técnicas espectroscópicas pode esperar-se uma maior certeza nos resultados obtidos e, eventualmente, a determinação de elementos que permitam a identificação de pelo menos algumas das substâncias-resíduo presentes nas amostras e não identificadas cromatograficamente. Este é um trabalho que fica em aberto para exploração futura.

## VI- Conclusão

Esta dissertação reflecte um trabalho de investigação sobre fibra alimentar (alto e baixo peso molecular), por recurso a três técnicas, sendo que a mais utilizada, durante o desenvolvimento deste trabalho foi a cromatografia líquida de alta eficiência.

Com esta técnica e seguindo os procedimentos do método AOAC 2009.01 foi possível quantificar a percentagem de fibra alimentar de baixo peso molecular (fibra sintética), presente em oito amostras de gelados, tendo-se obtido valores de acordo com os valores rotulados, um requisito muito exigente em segurança alimentar. Este método foi validado tendo-se obtido como limite de quantificação valores de 0.2 g/mL.

O método analítico passou assim a fazer parte dos recursos do laboratório de química da empresa ControlVet. Tratou-se da primeira implementação deste método à escala industrial em Portugal.

As amostras foram ainda submetidas à espectroscopia de infravermelho, da qual se pode concluir que 50% do espectro obtido pertence à percentagem de fibra de baixo peso molecular, maltose e glucose quantificadas por HPLC e os outros 50% a outro tipo de substâncias não precipitáveis pela solução etanólica e que estão, por isso, na amostra a injectar no cromatógrafo. A determinação da natureza precisa, destas substâncias foi deixada em aberto para futura investigação.

A utilização da espectroscopia de Raman conjuntamente com a espectroscopia de infravermelho é aqui proposta para garantir uma maior fidelidade das determinações analíticas semi-quantitativas por espectroscopia.

## VII- Bibliografia

[1] Champ M., Langkilde A.M., Brouns F., Kettlitz B. e Collet Y.L.B., *Nutrition Research Reviews*, **16**, 2003,71-82.

[2] McCleary, B. V., *Cereal Foods World*, **55**, 2010,24-28.

[3] Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the American Association Of Cereal Chemists, *Cereal Foods World*, **46**, 2001,112-126.

[4] McCleary, B.V., *Proceedings of the Nutrition Society*, **62**, 2003, 3–9.

[5] Lunn J. e Buttriss J.L., *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, **32**, 2007, 21-64.

[6] DeVries J.W., Prosky L., Li B., e Cho S., *Cereal Foods World*, **44**,1999, 367-369.

[7] <http://www.fao.org/> (Acedido em: 05-01-2011)

[8] <http://www.who.int/en/> (Acedido em: 19-12-2010)

[9] Johnson, I.T., e Southgate, D.A.T., *Dietary fibre and related substances*. 1.<sup>a</sup>.ed. Chapman & Hall. London, 1994

[10] Wakabayashi, K., Sakurai, N., e Kuraishi, S., *Plant Cell Physiol*, **30**, 1989, 99-105.

[11] Knudsen, K.E, *Animal Feed Sci Technol*, **90**, 2001, 3-20.

[12] Castilho, A.C. *et al.* *A Importância das Fibras Alimentares para o Paciente Diabético*. Support, 2005.

[13] Coppini, L. Z., Waitzberg, D. L., Campos, F.G., Harb.Gama, *As Fibras Alimentares e Ácidos Gordos de Cadeia Curta*, Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica, 3ª ed. Atheneu, São Paulo, 2004, 79 – 94.

[14] Mahan, L.K., Arlin, M.T. *Krause: Alimentos Nutrição e Dietoterapia*. 8ª ed, Roca, São Paulo, 1995, 38 – 40.

[15] Coppini, L.Z. *Introdução à fibra terapêutica: características e funções*. Byk Química.

[16] Fibras em Nutrição Enteral. Tópicos em Nutrição Clínica. Nestlé Nutrition Services, 2000.

[17] Lineback, D.R., *The chemistry of complex carbohydrates*. Complex Carbohydrates in Food . Marcel Dekker, Inc New York,1999.

[18] Gray J.,Dietary fibre. *Definition, Analysis, Physiology and Health*. ILSI Europe Concise Monography Series. Brussels: ILSI

[19] Mataix J., e Gassull, M.A., *Nutrición y alimentación humana*. 1.ºed., Ergon, Madrid, 2002 119-135.

[20] Simpson CF: *Practical High Performance Liquid Chromatography*. Edited by Simpson CF. London: Heyden & Son; 1978

[21] Schwedt G: *The Essential Guide to Analytical Chemistry* edn 2ª. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.; 1997



[22] Prichard E, MacKay GM, Points J: *Trace analysis: a structured approach to obtaining reliable results*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1996

[23] Sentell KB, Dorsey JG: *Retention mechanism in Reverse-Phase Liquid Chromatography. Stationary-Phase bonding density and partitioning*. Anal. Chem. 1989, 61:930-934.

[24] Neue UD: *HPLC Troubleshooting*, Waters Corporation; 1999

[25] <http://www.chromatography-online.org/HPLC/Refractive-Index/rs33.html> (Acedido em: 15-03-11)

[26]- Padilha, D.F.N. – Estudos sobre betaxolol. Polimorfismo e partição entre octanol e água. Coimbra: Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologias, 2006-2007. Relatório de estágio

[27] Willard H.; L. Merritt, Jr; Dean J.: *Análise Instrumental*; 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian

[28] Fausto, R., Burrows, H. D.; Pereira, M.: *Química Síntese e Estrutura*, Escolar Editora

[29] Fausto, R., Pineiro, Marta, Kus, Nihal, *Espectroscopia Vibracional de proteínas, lipídios e hidratos de carbono: Tópicos Seleccionados*, em Aspectos Probióticos Y Tecnológicos de Las Bacterias Lácticas Novel Probio, 2010.

[30]- Mathlouthi M., *Carbohydrate Research*, **284**, 1996, 145-147.