

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós – Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

Determinação de ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa

Mahyara Markievicz Mancio Kus

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho

São Paulo  
2009

Mahyara Markievicz Mancio Kus

Determinação de ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho

São Paulo

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K97d Kus, Mahyara Markievicz Mancio  
Determinação de ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa / Mahyara Markievicz Mancio Kus. -- São Paulo, 2009.  
196p.  
Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.  
Orientador: Mancini Filho, Jorge  
1. Bromatologia 2. Gorduras : Ciências dos alimentos 3. Nutrição : Infância : Ciência dos alimentos I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.  
641 CDD

Mahyara Markievicz Mancio Kus

Determinação de ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa.

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

São Paulo, agosto de 2006.



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Janus

RELATÓRIO DE DEFESA

Aluno: 9131 - 5555989 - 1 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Mahyara Markievicz Mancio Kus no Programa de Ciência dos Alimentos do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 26 dias do mês de agosto de 2009, no(a) Anfiteatro Maria A. Pourcheret realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Mahyara Markievicz Mancio Kus, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Determinação de ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Jorge Mancini Filho	Presidente	FCF - USP	Aprovado
Sabria Aued Pimentel	Titular	IAL - Externo	Aprovado
Neura Bragagnolo	Titular	UNICAMP - Externo	Aprovado

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora \*

Eu, Monica Dealls Perussi \_\_\_\_\_, lavrei o presente relatório, que assino juntamente com os(as) Senhores(as) examinadores. São Paulo, aos 26 dias do mês de agosto de 2009.

Sabria Aued Pimentel

Neura Bragagnolo

Jorge Mancini Filho

Presidente da comissão julgadora

\* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

O título foi homologado pela Comissão de Pós-Graduação em 28/08/2009 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Ciências obtido no Programa Ciência dos Alimentos - Área de concentração: Bromatologia.

\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Mamerto Kus e Lavize Mancio, Kus com todo amor pelo apoio e ensinamentos em todas as fases da vida.*

*À minha irmã Lyhandra Markievicz Mancio Kus pelo companheirismo e amor.*

*Aos meus avôs, em especial à Edward Mancio (in memoriam) pelo sempre incentivo aos estudos.*

## AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, pela orientação e paciência em todas as fases desta pesquisa.

À Dr<sup>a</sup> Sabria Aued Pimentel, pelos anos de convivência, que me ensinou não apenas a gostar de realizar uma pesquisa, mas ter amor pelo que faz; por me ensinar muito, contribuindo para meu crescimento intelectual e científico e pela amizade e carinho sempre a mim dedicados.

À Simone Alves da Silva pela amizade, companheirismo, dedicação, ajuda nas análises e por ser uma amiga muito especial não me deixando desistir nunca.

À Edna Emy Kumagai, Miriam Solange Fernandes Caruso, Célia Mria Gaudêncio, amigas do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade, carinho e auxílio durante toda essa caminhada.

Aos amigos Felipe Gomes Pinheiro, Paula da Costa Garcia, Milessa da Silva Afonso, Claudimar de Jesus Oliveira, Lucillia Rabelo de Oliveira, Ana Mara de Oliveira e Silva, Fernanda Archilla Jardim, Eliane Bonifácio Silva, Rosângela Pavan e demais colegas do laboratório de Lipídes, pela amizade e ensinamentos científicos.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial aos da secretaria da Ciência dos Alimentos, pela ajuda na parte documental.

As secretárias da Diretoria da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rose e Suzi, por sempre conseguirem um horário para conversar com o Prof. Jorge.

Aos funcionários do Instituto Adolfo Lutz que direta ou indiretamente propiciaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais, Mamerto Kus e Lavize Mancio Kus, por toda dedicação, amor e carinho em toda essa trajetória.

À Lyhandra Markievicz Mancio Kus, minha irmã, pela compreensão e incentivo nos momentos difíceis e pela alegria em todas as conquistas.

À Vanessa Aparecida Soares, em nome de todos meus colegas de faculdade, pela amizade, compreensão, companheirismo, incentivo e dedicação em todos os momentos: nos alegres e tristes.

Aos meus avôs, pelos ensinamentos que muito me ajudaram durante a vida, pelos exemplos de amor e amizade.

Aos meus primos e tios, por sempre acreditarem na minha capacidade e sempre estarem torcendo por mim, obrigada pelo ombro amigo e pelas comemorações de cada etapa vencida.

À Eduardo Yamashita de Siqueira, pelo amor, incentivo, dedicação, compreensão nos momentos de dificuldade e por sempre estar ao meu lado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Instituto Adolfo Lutz pela disponibilização do Laboratório de Cromatografia para a realização das análises experimentais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.



*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

***Martin Luther King***

*"O segredo é não correr atrás das borboletas...  
É cuidar do jardim para que elas venham até  
você."*

***Mario Quintana***

## RESUMO

KUS, M. M. M. **Determinação de ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa.** 2009. 196f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os ácidos graxos polinsaturados atuam no organismo humano em diversos processos fisiológicos e metabólicos, além de serem importantes na nutrição infantil. A quantificação dos ácidos graxos polinsaturados, devido à presença de vários sítios reativos na molécula, deve envolver processos de extração da gordura em condições amenas. Este trabalho teve como objetivos a comparação dos métodos analíticos para determinação de lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados (ácido linoléico, ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico) em fórmula infantil, a quantificação dos ácidos graxos polinsaturados nas fórmulas infantis comerciais e o acompanhamento da estabilidade destes ácidos graxos neste alimento. Foram analisadas 15 amostras, sendo uma amostra da Nacional Institute of Standards and Technology (NIST 1849) e 14 fórmulas infantis comercializadas no Estado de São Paulo. Os métodos analíticos comparados para extração de lipídios foram: gravimétricos (Bligh Dyer, Roese Gottlieb e hidrólise ácida AOAC 963.15) e por cálculo (AOAC 996.06 e método direto adaptado de Golay et al. (2006)). Para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos utilizaram-se metodologias descritas pela IUPAC, Hartman e Lago e método direto adaptado de Golay et al. (2006). Compararam-se diferentes padrões interno,

sendo estes dos ésteres metílicos de ácidos graxos 13:0, 21:0 e 23:0 e fatores de resposta para quantificação dos ácidos graxos polinsaturados em relação aos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 23:0. O estudo de estabilidade durou 8 meses, e as análises foram realizadas nos meses de março, abril, julho e outubro de 2008. Os melhores resultados, para gordura total e para ácidos graxos polinsaturados, foram obtidos pelo método oficial (Roese Gottlieb). Quanto ao cálculo dos ácidos graxos polinsaturados, o uso do padrão interno 23:0 e o fator de resposta de correção teórico em relação ao 23:0 revelam resultados mais satisfatórios. Das fórmulas infantis comerciais analisadas, 85,7% apresentaram pelo menos um analito em desacordo com a informação nutricional e 100% com relação à legislação brasileira e o *Codex Alimentarius*. Em relação à estabilidade dos ácidos graxos polinsaturados, apenas três fórmulas infantis não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) nos teores de ácido graxos no período de 8 meses.

**Palavras chaves:** Ácidos graxos polinsaturados. Fórmula infantil. Metodologia analítica. Cromatografia gasosa. Informação nutricional.

## ABSTRACT

KUS, M. M. M. **Determination of polyunsaturated fatty acid in infant formulas: comparison of quantization methods by gas chromatography.**

2009. 196f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Long chain polyunsaturated fatty acids are involved in several physiological and metabolic process of human organism. The quantification of polyunsaturated fatty acid, must involve the fat extraction in mild conditions, due the reactive sites in the molecule. This work had as objective the comparison of the analytical methods for determination of polyunsaturated fatty acid (linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, arachidonic acid and docosahexaenoic acid) and lipids in infant formula, quantification of polyunsaturated fatty acids in commercial infant formulas and polyunsaturated fatty acids stability evaluation in these foods. A 15 samples of infant formulas were analyzed, these one from NIST and 14 commercial infant formulas. The analytical methods to lipids extraction were: Bligh and Dyer, Roese Gottlieb, acid hydrolyze AOAC 963.15, acid hydrolyze AOAC 996.06 and direct method adapted from Golay et al. (2006). To prepared esters metilics fatty acids utilized the methods: IUPAC, Hartman and Lago and direct method. The quantization of polyunsaturated fatty acid was realized with different standards internal, like fatty acid methyl ester 13:0, 21:0 and 23:0, and flame ionization detector response factors of correction in relation fatty acids 16:0, 18:0 and 23:0. The stability study during 8 months and analysis were analyzed in the months March, April, July and October. The best results, for lipids and polyunsaturated fatty acid, were obtained by the official method,

Roesse Gottlieb and methylation followed Hartman and Lago. In accordance with the present study the internal standard 23:0, and the theoretical correction factors with relation 23:0 showed satisfactory trueness and precision for calculation of polyunsaturated fatty acid. Among of commercial infant formula analyzed, 85.7% had at least one analyte in disagreement with the nutritional label facts and 100% with respect to Brazilian Legislation and the *Codex Alimentarius*. Regarding polyunsaturated fatty acids stability, three infant formulas showed no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) in levels of these fatty acids during the period of analysis (8 months).

**Key words:** Polyunsaturated fatty acid. Infant formula. Analytical methodology. Gas chromatography. Nutritional labeling.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1. Isomeria de posição .....	31
Figura 1-2. Metabolismo dos ácidos graxos de cadeia longa.....	34
Figura 3-2. Cromatograma dos principais ésteres metílicos de ácidos graxos obtido da análise da amostra NIST 1849/2006 por cromatografia em fase gasosa. PI: padrão interno. ....	110
Figura 4-1. Razão de LA/ALA analisada nas fórmulas infantis comerciais comparados com limites do <i>Codex Alimentarius</i> stan-72 (2007). $\diamond$ : LA/ALA; limites preconizados pelo <i>Codex Alimentarius</i> . ....	132
Figura 6-1. Estabilidade do ácido linoléico (LA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante 8 meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13 fórmulas infantis recomendadas de 0 a 6 meses; FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14 fórmulas infantis de seguimento recomendadas de 6 a 12 meses; FI 9 e FI 10 fórmulas infantis recomendadas para prematuro. ....	170
Figura 6-2. Estabilidade do ácido $\alpha$ -linolênico (ALA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante 8 meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13 fórmulas infantis recomendadas de 0 a 6 meses; FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14 fórmulas infantis de seguimento recomendadas de 6 a 12 meses; FI 9 e FI 10 fórmulas infantis recomendadas para prematuro. ....	172
Figura 6-3. Estabilidade do ácido araquidônico (ARA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante 8 meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13, FI 14: fórmulas infantis suplementadas	

com ácidos graxos de cadeia longa (ácido araquidônico e/ou ácido docosahexaenóico). ..... 173

Figura 6-4. Estabilidade do ácido docosahexaenóico (DHA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante 8 meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13, FI 14: fórmulas infantis suplementadas com ácidos graxos de cadeia longa (ácido araquidônico e/ou ácido docosahexaenóico)..... 174

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1. Estudos realizados por diversos autores, sobre os efeitos da suplementação de AGPI-CL em fórmulas infantis.....	40
Tabela 1-2. Valores de lipídios e ácidos graxos em fórmula infantil para lactentes, segundo as legislações e recomendações. ....	54
Tabela 1-3. Características dos principais métodos para quantificação de ácidos graxos polinsaturados em alimentos.....	63
Tabela 2-1. Valores de lipídios para amostra da NIST 1849/2006 pelos diferentes métodos de extração de lipídios.....	84
Tabela 2-2. Comparação dos teores de AG obtidos por diferentes métodos de preparação para ésteres metílicos de ácidos graxos na amostra de referência de fórmula infantil da NIST.....	86
Tabela 2-3. Valores de ácidos graxos de acordo com os diferentes métodos de extração de lipídios, metilação dos ácidos graxos por Hartman e Lago modificado, e diferentes padrões internos utilizados na quantificação de ácidos linoléico, $\alpha$ -linolênico, araquidônico e docosahexaenóico na amostra de referência da NIST 1849. ....	88
Tabela 2-4. Comparação dos teores dos ácidos graxos calculados com diferentes fatores teóricos de correção de resposta do detector de ionização em chama para amostra NIST 1849/2006. ....	90
Tabela 3-1. Teor dos lipídios obtido por cálculo a partir da composição de ácidos graxos pela metodologia direta com os padrões interno de triacilglicerídio (TAG) 13:0 e ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) 21:0 e 23:0. ....	109



Tabela 3-2. Valores para ácido linoléico (LA), ácido $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) para fórmula infantil da NIST 1849/2006 pelos dois métodos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos .....	111
Tabela 4-1. Valores de lipídios e ácidos graxos em fórmula infantil para lactentes, segundo as legislações e recomendações. ....	124
Tabela 4-2. Valores de lipídios, ácido linoléico (LA), ácido $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) para as amostras de fórmulas infantis comerciais. ....	129
Tabela 4-3. Quantidade de fórmulas infantis em acordo e desacordo com a Portaria nº 997 e o <i>Codex Alimentarius</i> stan-72 (2007), segundo os teores de lipídios, ácido linoléico (LA), ácido $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA), ácido docosahexaenóico (DHA) e a razão ácido linoléico/ácido $\alpha$ -linolênico (LA/ALA). ....	134
Tabela 5-1. Características das fórmulas infantis comerciais analisadas. ....	145
Tabela 5-2. Teores de Lipídios, ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos <i>trans</i> (AGT) nas fórmulas infantis comerciais quanto à informação nutricional e análise. ....	149
Tabela 5-3. Teores de ácido linoléico (LA), ácido $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) nas fórmulas infantis comerciais quanto à informação nutricional e análise. Mayara arrumar os algarismos significativos. ....	153
Tabela 6-1. Estabilidade do ácido linoléico (LA), ácido $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) na amostra da NIST 1849/2006 em dois momentos: maio de 2006 e janeiro de 2008. ....	168

Tabela 7-1. Fatores de conversão de metil éster de ácido graxo em ácido graxo ( $f_{AGi}$ ) e de conversão de metil éster de ácido graxo em triacilglicerol ( $f_{TGi}$ ). .... 194

Tabela 7-2. Fatores teóricos de correção de resposta do detector de ionização em chama em relação aos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 23:0 ..... 196

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Acuity Card Procedure
AG	Ácidos graxos
AGE	Ácido graxo essencial
AGI	Ácido graxo insaturado
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo polinsaturados
AGPI-CL	Ácido graxo polinsaturados de cadeia longa
AGS	Ácidos graxos saturados
ALA	Ácido $\alpha$ -linolênico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemistry
AOCS	American Oil Chemist's Society
ARA	Ácido araquidônico
CG	Cromatografia gasosa
CG/DIC	Cromatografia gasosa acoplada com detector de ionização em chama
CLA	Ácido linoléico conjugado
CV	Coefficiente de variação
DHA	Ácido docosahexaenóico
DIC	Detector de ionização em chama
DP	Desvio padrão
EMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
EPA	Ácido eicosapentaenóico

ESPGHAN	The European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatopogy and Nutrition
FDA	Food and Drug Administration
FI	Fórmula infantil
FPL	Forced-choice Preferencial Looking Procedure
HA	Hidrólise ácida
HB	Hidrólise básica
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IUPAC	Internaciol Union of Pure and Applied Chemistry
LA	Ácido linoléico
MDI	Bayley Mental Developmental Index
NIST	Nacional Institute of Standards and Tecnhology
PDI	Psychomotor Developmental Index
PI	Padrão interno
TAG	Triacilglicerol
VEP	Visual Evoked Potencial

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	25
Capítulo 1. Revisão Bibliográfica.....	28
1.1. Lipídios e ácidos graxos na alimentação.....	28
1.1.1. Lipídios.....	28
1.1.2. Ácidos Graxos .....	30
1.2. A importância dos ácidos graxos polinsaturados na alimentação infantil..	32
1.2.1. Essencialidade de ácidos graxos .....	32
1.3. Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa e alimentação infantil.....	35
1.3.1. Amamentação materna e suplementação de fórmulas infantis com AGPI- CL.....	38
1.4. Estabilidade Oxidativa dos Ácidos Graxos Polinsaturados .....	51
1.5. Definição, legislação e recomendação para as fórmulas infantis.....	52
1.6. Metodologia analítica para determinação de ácidos graxos polinsaturados em alimentos .....	55
1.6.1. Determinação de lipídios em alimentos.....	55
1.6.2. Determinação de ácidos graxos em alimentos.....	58
1.7. Referências Bibliográficas .....	64
Capítulo 2. Comparação de metodologias analíticas para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil.....	73
2.1. Resumo.....	73
2.2. Abstract .....	74
2.3. Introdução .....	75

2.4. Material e Métodos .....	78
2.4.1. Material.....	78
2.4.2. Métodos.....	79
2.5. Resultados e Discussão .....	83
Determinação dos lipídios ou gordura total .....	83
2.5.1. Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa.....	85
2.5.2. Determinação dos ácidos graxos polinsaturados .....	87
2.6. Conclusões.....	90
2.7. Agradecimento .....	91
2.8. Referências .....	91
Capítulo 3. Quantificação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil: Comparação entre os métodos direto e convencional .....	96
3.1. Resumo .....	96
3.2. Abstract .....	97
3.3. Introdução .....	98
3.4. Material e Métodos .....	101
3.4.1. Material.....	101
3.4.2. Métodos.....	102
3.5. Resultados e Discussões .....	107
3.5.1. Extração de Lipídios .....	107
3.5.2. Métodos de preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos .....	111
3.5.3. Quantificação dos ácidos graxos polinsaturados da amostra da NIST 1849/2006 .....	112
3.6. Conclusões.....	113
3.7. Referências Bibliográficas .....	114

Capítulo 4. Comparação dos teores de lipídios e ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis comerciais com os valores preconizados pela legislação brasileira e o Codex Alimentarius.....	118
4.1. Resumo.....	118
4.2. Abstract.....	119
4.3. Introdução.....	119
4.4. Material e Métodos.....	125
4.4.1. Material.....	125
4.4.2. Métodos.....	127
4.5. Resultados e Discussão.....	128
4.6. Conclusões.....	134
4.7. Referências Bibliográficas.....	135
Capítulo 5. Informação nutricional das fórmulas infantis: avaliação dos teores de lipídios e ácidos graxos.....	139
5.1. Resumo.....	139
5.2. Abstract.....	139
5.3. Introdução.....	140
5.4. Material e Métodos.....	143
5.4.1. Material.....	143
5.4.2. Métodos.....	146
5.5. Resultados e Discussão.....	147
5.6. Conclusões.....	155
5.7. Referências Bibliográficas.....	155
Capítulo 6. Estabilidade oxidativa dos ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil comercializadas no estado de São Paulo, Brasil.....	159

6.1. Resumo .....	159
6.2. Abstract .....	160
6.3. Introdução .....	161
6.4. Material e Métodos .....	164
6.4.1. Material.....	164
6.4.2. Métodos.....	166
6.5. Resultados e Discussão .....	167
6.5.1. Estabilidade dos ácidos graxos na amostra NIST 1849/2006 .....	167
6.5.2. Estabilidade dos ácidos graxos nas fórmulas infantis comerciais .....	169
6.6. Conclusões.....	176
6.7. Referências Bibliográficas .....	177
Capítulo 7. Anexos .....	180



## INTRODUÇÃO

---

Historicamente, a preocupação com a saúde da criança se tornou evidente a partir do final do século XVIII, tornando-se um dos grandes objetivos da família. O fortalecimento da medicina foi dos fatores que causou mudanças na alimentação infantil, introduzindo o uso do leite em pó. Tanto nos centros de saúde quanto nas maternidades, a prescrição de fórmula infantil passou a ocorrer de forma indiscriminada. Além disso, durante o século XX, a mulher passou por transformações importantes, deixando de ser mera reprodutora e cuidadora para assumir um papel na produção de renda familiar (MONTEIRO, 2006).

Em 2003 estimou-se que nos Estados Unidos mais de 35% dos lactentes até os seis meses consumiam fórmula infantil e mais de 70% entre seis a doze meses. Pesquisa realizada em capitais brasileiras em 1999 indicou que mais da metade dos lactentes, até os seis meses, estava sendo alimentada com fórmula infantil ou outro tipo de leite (KOO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004).

De acordo com o *Codex Alimentarius* stan 72-1981 e a Portaria nº 977, fórmula infantil para lactentes é o produto em forma líquida ou em pó, destinado a alimentação de lactentes, sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite humano, para satisfazer as necessidades nutricionais deste grupo etário. Lactente é a criança de zero a doze meses de idade incompletos. As fórmulas infantis são compostas essencialmente à base de leite de vaca e

outros animais e/ou de outros componentes comestíveis de origem animal e vegetal que se considerem adequados para a alimentação humana (BRASIL, 1998; CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

A gordura é um componente essencial para a dieta humana, desempenhando diferentes papéis no organismo, como reserva de energia, de fosfolípidios e esteróis; fornece ácidos graxos essenciais, auxilia no transporte e absorção das vitaminas lipossolúveis A,D,E e K (PADOVESE; MANCINI-FILHO,2002).

A importância dos ácidos graxos essenciais se justifica por serem componentes da membrana celular (especialmente de plaquetas, eritrócitos, neutrófilos, monócitos e hepatócitos) e por lhe conferirem fluidez e viscosidade específica permitindo a difusão de várias substâncias importantes para o metabolismo celular e imunológico. Já os ácidos graxos polinsaturados atuam em diversos processos fisiológicos e metabólitos, além de serem importantes na nutrição infantil pelo seu rápido aumento no cérebro durante o primeiro ano de vida. Sintomas clássicos de deficiência de ácidos graxos essenciais são dermatites, retardo no crescimento e infertilidade (AUESTAD et al., 2003; MCCANN; AMES, 2005).

A determinação da composição de ácidos graxos dos alimentos envolve diversas etapas: extração dos lipídios, determinação do teor de gordura ou lipídios totais, preparação dos lipídios extraídos para análise por cromatografia em fase gasosa e determinação da composição de ácidos graxos por análise cromatográfica. Em cada uma das etapas dependendo do procedimento adotado poderemos gerar resultados discrepantes para o teor de gordura e composição de ácidos graxos. A diversidade de matrizes alimentares tende a

crescer, tornando-se cada vez mais difícil definir o melhor método de extração dos lipídios o que conseqüentemente afeta tanto os valores reais da gordura total como dos ácidos graxos nos alimentos (KIRK; SAWER; EGAN, 1996; ANTONIASSI; LAGO, 2000).

## Capítulo 1. Revisão Bibliográfica

---

### 1.1.Lipídios e ácidos graxos na alimentação

#### 1.1.1. Lipídios

A palavra lipídio é derivada do grego lipos que significa gordura; nesse grupo podem ser encontradas substâncias como óleos, gorduras, ceras, esteróides, terpenos, sabões, detergentes e sais biliares. O uso de gorduras como alimento foi intuitiva e data desde a pré-história (SILVA, 1992).

Quimicamente, a definição de lipídios se relaciona com a solubilidade em meio apolar. A definição clássica de lipídios totais refere-se à soma de mono-, di- e triacilglicerídios, ácidos graxos livres, fosfolipídios, glicolipídios, terpenos, esteróis, ceras e outros componentes solúveis em éter (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

A ingestão diária de lipídios na dieta, de populações ocidentais, corresponde a cerca de 15 a 30% do valor calórico total da dieta. O principal componente lipídico dessa dieta são os triacilglicerídios, aproximadamente 95%, que são formados pela esterificação do glicerol com três moléculas de ácidos graxos (AG), sendo que o ácido graxo contribui com mais de 90% da massa molecular e os seus efeitos dependem do tamanho da cadeia carbônica; quantidade, estrutura e posição das duplas ligações e também da posição do AG na molécula do triacilglicerídio (TAG); os demais 5% consistem de mono- e diacilglicerídio, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e outros (BOSCKISCH, 1998; WHO, 2002).

Lipídios na forma de TAG são estocados no tecido adiposo como reserva de energia, enquanto os demais componentes lipídicos são componentes estruturais de membranas biológicas e modulam importantes funções como sua fluidez, permeabilidade e limitante da atividade de proteínas e receptores, além de ser responsável pela excitação elétrica. Ácidos graxos têm um papel direto na regulação gênica (EUROPEAN COMMISSION, 2003).

#### *1.1.1.1. Definição de lipídios para fins de rotulagem nutricional*

Gordura é uma subclasse dos lipídios, mas normalmente essa denominação é utilizada para designar “lipídios”. A Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos em seu compêndio sobre informação nutricional definiu gorduras e óleos como: “moléculas orgânicas complexas formadas pela combinação de três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol”. O foco do conceito nutricional está sendo o TAG, pois é o maior constituinte da gordura. Para fins de rotulagem, gordura pode ser definida como TAG, substâncias extraídas com éter ou lipídios totais. Por outro lado o Instituto Americano de Nutrição e a Sociedade Americana de Nutrição Clínica definem gordura como “triacilglicerídios e lipídios polares”. Essa definição inclui fosfo- e glicolipídios, por serem fontes de ácidos graxos, mas apenas fornecem um ou dois grupos de AG. Portanto a declaração de “gordura” como sendo a soma de AG expressos em TAG engloba todas as fontes de AG nos alimentos. A legislação brasileira de rotulagem nutricional (RDC nº 360) define gorduras ou lipídios, como: “são substâncias de origem vegetal ou animal, insolúveis em água, formadas de TAGs e pequenas quantidades de não glicerídios, principalmente fosfolipídios”. (CARPENTER; NGEH-NGWAINBI; LEE, 1993; BRASIL, 2003).

### 1.1.2. Ácidos Graxos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos, geralmente mono carboxílicos, que podem ser representados pela forma de  $\text{RCO}_2\text{H}$ . Na maioria das vezes, o grupamento R é uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono, podendo ser saturada ou conter uma ou mais insaturações. Se houver insaturação poder ter configuração *cis* ou *trans*. O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia R, a região apolar da molécula. Todos os ácidos graxos presentes nos alimentos são da família dos alcanos e alcenos. Sua estrutura e nomenclatura seguem as regras da química. Entretanto, os ácidos graxos são comumente designados pelos seus nomes triviais (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

#### 1.1.2.1. Ácidos graxos saturados (AGS)

A cadeia hidrocarbonada de um AG saturado está sob forma estendida, uma vez que sua conformação linear, flexível, é o estado de menor energia. Essa conformação permite um melhor empacotamento dos AG, fazendo com que as moléculas fiquem mais próxima umas das outras, aumentando a interação entre elas (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

#### 1.1.2.2. Ácidos graxos insaturados (AGI)

Esses AG são muito especiais, pois são importantes para os mamíferos, incluindo o homem. Os AG insaturados possuem uma (monoinsaturados) ou mais de uma (polinsaturados) insaturações na molécula, essa dupla ligação não permite um empacotamento tão eficiente das moléculas, fazendo com que as interações entre elas sejam menores. Dessa maneira, os AGS têm um ponto maior de fusão que os AGI (GUNSTONE, 2004).

A presença de insaturações restringe a rotação da cadeia hidrocarbonada, fazendo com que ocorra isomeria em torno da dupla ligação, que é denominada configuração *cis* ou *trans* (figura 1-1). Outra forma de isomeria que pode ocorrer nos AGI refere-se à posição da dupla ligação na cadeia hidrocarbonada (BOCKISH, 1998).

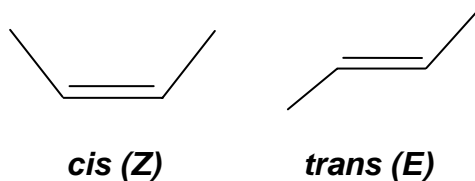


Figura 1-1. Isomeria de posição

Os ácidos graxos polinsaturados (AGPI) podem ser classificados de acordo com a posição da dupla ligação e divididos em famílias; as mais importantes são dos AG  $\omega$ -9,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3. A nomenclatura ômega ( $\omega$ ) é definida segundo a numeração do carbono associada à primeira dupla ligação a partir do radical metila. Assim se a nomenclatura IUPAC (Internacional union of pure and applied chemistry) tem como referência o radical carboxila a nomenclatura ômega se baseia na extremidade oposta (GUNSTONE, 2004; HIRAYAMA; SPERIDIÃO; FAGUNDES-NETO, 2006).

Os principais representantes dessas classes são o ácido oléico ( $\omega$ -9), o ácido linoléico (LA,  $\omega$ -6) e o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA,  $\omega$ -3). As fontes predominantes de AG  $\omega$ -3 são óleos de vegetais e de peixes; o ácido graxo mais importante da série  $\omega$ -6, o LA é encontrado em óleos vegetais, como milho, soja e girassol (BENATTI et al., 2004).

## **1.2. A importância dos ácidos graxos polinsaturados na alimentação infantil**

### **1.2.1. Essencialidade de ácidos graxos**

Os ácidos graxos essenciais (AGE) compõem uma classe de moléculas que não podem ser geradas pelo organismo, devido à carência de enzimas desaturases, que são capazes de inserir ligação dupla entre os carbonos 3-4 e 6-7, assim como de enzimas hidrogenases capazes de remover tais insaturações; mas que são necessárias ao seu funcionamento. A ausência de tais nutrientes na dieta está associada a síndromes que podem levar à morte. Esses AGs, ou seja, o ácido linoléico (LA,  $\omega$ -6) e ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA,  $\omega$ -3), são sintetizados exclusivamente, pelo reino vegetal (POMPÉIA, 2002; VAZ et al., 2006.).

Há duas subclasses de AGE – os ômega 3 e os ômega 6. A essencialidade dos últimos é conhecida desde a década de 1930, sua deficiência está associada a problemas dérmicos. Quanto aos AG  $\omega$ -3, apenas após a década de 1980 descobriu-se sua necessidade na dieta, para evitar, principalmente distúrbios neurológicos e visuais (POMPÉIA, 2002).

Os AGE podem ser modificados pelos mamíferos, com alongamento da cadeia, inserção de insaturações e descarboxilação de pares da cadeia. Dessa forma, os AG das famílias  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9 competem entre si, especialmente na etapa de dessaturação pela enzima  $\Delta$ -6 desaturase. Em geral, as enzimas desaturases apresentam maior afinidade para os substratos de maior insaturação. Outra competição dos AGPI é pelas enzimas elongases e acil transferases, envolvidas na formação dos fosfolipídios. A existência de tais



competições interfere no metabolismo dos AGE. O excesso do LA pode reduzir a síntese de metabólitos do ALA, como o ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5  $\omega$ -3). Os produtos do metabolismo (elongação e desaturação) dos AGE serão sempre da mesma família desses substratos. Portanto o EPA e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6  $\omega$ -3) são produtos do metabolismo do ALA, assim como o ácido araquidônico (ARA, 20:4  $\omega$ -6) é o produto do metabolismo do LA, demonstrado na figura 1-2 (VERLENGUIA; LIMA, 2002; HIRAYAMA; SPERIDIÃO; FAGUNDES-NETO, 2006).

O ARA, EPA e DHA são precursores da síntese de eicosanóides. Os eicosanóides são produzidos nos tecidos, sendo responsáveis pela formação específica das prostaglandinas que regula a contração muscular, resposta imune e tem ação na inflamação; das prostaclinas, a qual inibe a agregação plaquetária; dos tromboxanos que favorecem a agregação plaquetária e dos leucotrienos que está relacionado com a constrição e dilatação bronquial e vascular. Os eicosanóides produzidos pelos AG  $\omega$ -6 são mediadores bioquímicos potentes envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária, por outro lados os da série  $\omega$ -3 atuariam no processo antiinflamatório e não inibiriam o sistema imune (HIRAYAMA; SPERIDIÃO; FAGUNDES-NETO, 2006; LUNN e THEOBALD, 2006).

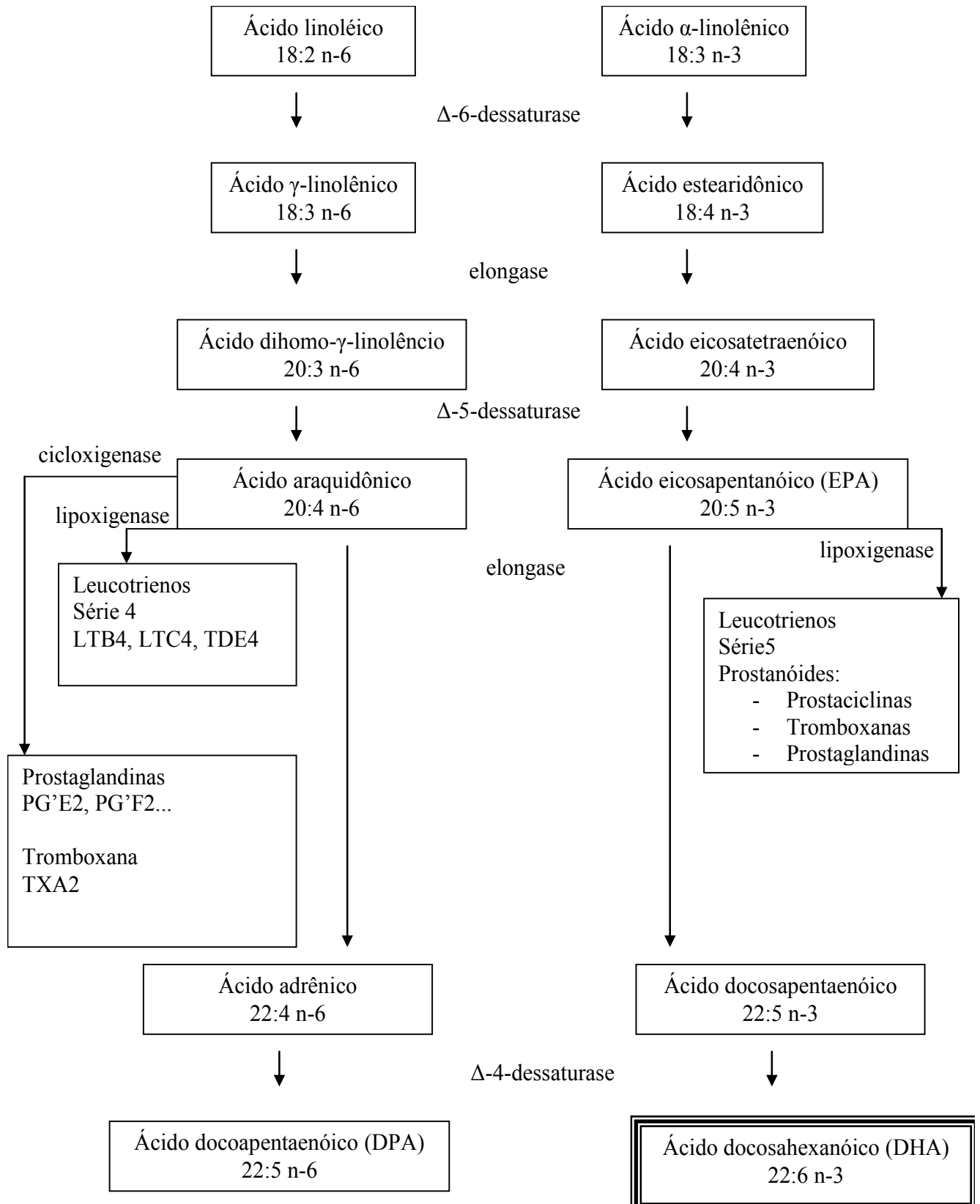


Figura 1-2. Metabolismo dos ácidos graxos de cadeia longa.

### **1.3.Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa e alimentação infantil**

Os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL), ou seja, aqueles ácidos graxos polinsaturados de 20-22 carbonos, possuem diversos papéis metabólicos e fisiológicos. São componentes estruturais de membranas, podendo modificar sua fluidez e influenciar na transdução de sinal pelo balanço da síntese de eicosanóides e afetar a transcrição gênica (CARVER, 2003).

O lactente não tem a capacidade de sintetizar AGPI-CL através de seus precursores, devido à imaturidade hepática, tendo sua necessidade suprima pelo leite materno. O leite materno apresenta três vezes mais ARA e DHA que o leite de vaca, sendo que o segundo é insuficiente para atender suas necessidades. Os AGPI-CL são essenciais em prematuros com pouca reserva lipídica; pela limitada reserva calórica, os mesmos deverão mobilizar parte desses ácidos graxos para atender suas necessidades quando o aporte exógeno for inadequado. Além disso, os prematuros têm um prejuízo nutricional, pois não recebem o suplemento intra-uterino de ARA nem de DHA da última fase gestacional. Isso poderá ocasionar transtornos, como crescimento inadequado, dermatites, aumento de susceptibilidade de infecções, entre outras (KOLETZKO et al., 2003; SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007).

ARA e DHA são os principais componentes da membrana fosfolipídica das células do sistema nervoso central. AGPI-CL são rapidamente absorvidos no cérebro durante o seu período de desenvolvimento, que compreende o último trimestre de gravidez até aproximadamente 2 anos de idade; esses AGs

atuam sobre crescimento, funcionalidade e integridade do cérebro, portanto uma inadequada suplementação de micronutrientes essenciais nesse período pode comprometer a função cerebral durante a toda vida (CARVER, 2003; AUESTAD et al., 2006; SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007) .

O cérebro é um tecido principalmente lipídico, com cerca de 60% de seu peso seco, dos quais 40% são de AGPI e desses cerca de 10 são de ARA e 15% de DHA (LEVANT; RADEL; CARLSON, 2006).

Os AGPI-CL desempenham um papel fundamental nas propriedades físicas das membranas neurais, tais como temperatura de transição, área por molécula e domínios laterais. Interações específicas de determinados lipídios com proteínas de membrana podem, por sua vez, afetar as funções de receptores, bem como as atividades enzimáticas, transdução de sinais e excitabilidade das membranas neurais (FREITAS e KIETZER, 2002).

O DHA é fundamental para o desenvolvimento cerebral e visual do recém nascido, esta especificidade na sua utilização pelas membranas neurais pode estar relacionada com sua estrutura tridimensional, pois essa molécula tem uma conformação mais empacotada e espiralizada, o que pode ser relevante em sua esterificação aos fosfolipídios e nas interações entre lipídios e proteínas nas membranas neurais. Conferindo, dessa maneira a membrana uma grande fluidez, particularmente importante para esse tecido (FREITAS e KIETZER, 2002; SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007).

A deficiência de DHA pode alterar a composição das membranas sinápticas, afetando as funções dos receptores da membrana neural, canais iônicos e enzimáticos. As maiores modificações nas concentrações de DHA no

cérebro são obtidas com dietas deficientes em  $\omega$ -3 durante a gestação e nos primeiros estágios do desenvolvimento pós-natal.

Na retina encontram-se elevadas concentrações de DHA, cerca de 22-33% do total de AG, adquiridos, principalmente, no último trimestre da gravidez. ARA por sua vez está em maior quantidade no fosfatidilinositol e sua concentração diminui com o amadurecimento da retina. O DHA atua nas membranas dos cones e bastonetes, conferindo a fluidez necessária para que ocorra o processo de transdução do sinal luminoso (fotoexcitação da rodopsina) e sua conversão em sinal elétrico, que é posteriormente processado pelo cérebro. Portanto sugere-se que o DHA forneça condições mecânicas na conformação da rodopsina durante sua fotoativação (FREITAS e KIETZER, 2002; SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007).

O ARA é convertido em eicosanóides, importantes em uma série de sistemas fisiológicos, como renal, gastrointestinal, reprodutor e cardiovascular, além de serem mediadores das respostas imune e inflamatória (POMPÉIA, 2002).

A razão das séries  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 para o período paleolítico foi estimada em, 0,79 e nos anos 2000 alcançou 12, cujo aumento deve-se ao alto consumo de  $\omega$ -6, proveniente principalmente dos óleos vegetais. O balanço dessas séries é importante para a manutenção da saúde e desenvolvimento normal. Com o aumento do consumo de  $\omega$ -6 nas dietas dos ocidentais, o produto do metabolismo do ARA, ou seja, os eicosanóides são formados em maiores quantidades que aqueles provenientes da série  $\omega$ -3, particularmente do EPA. Os eicosanóides do ARA são biologicamente ativados em pequenas quantidades; se eles forem formados em grandes proporções, contribuem para

a formação de trombos e ateromas, desordens inflamatórias e alérgicas e proliferação celular. A proporção de  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 deve ser mantida em 5:1, para propiciar o equilíbrio dos eicosanóides e a formação de neurotransmissores e prostaglandinas, fatores vitais para manter a função cerebral normal. No caso de lactentes a razão deve ser entre 5:1 a 15:1 (SIMOPOULOS; 2002; 2006)

### **1.3.1. Amamentação materna e suplementação de fórmulas infantis com AGPI-CL**

Embora o maior acúmulo de AGPI-CL ocorra no período pré-natal, durante o pós-natal o acúmulo também é acentuado, que se dá principalmente através da amamentação. A quantidade de DHA presente no leite materno varia entre 0,1 a 1,4% do total de AG. Isso depende da dieta de AG da mãe, sendo maior em regiões com alto consumo de pescados. Apesar da proporção de ARA e DHA no leite materno ser pequena, a quantidade total desses AG recebidos pela criança através do leite materno é grande, uma vez que o leite humano possui uma boa biodisponibilidade desses AGs quando comparados as fórmulas infantis (FI) (SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007).

Inúmeras pesquisas publicadas nos últimos cinco anos mostraram que a composição do leite de mulheres ocidentais geralmente tem 10 – 17% de  $\omega$ -6; 0,8 – 1,4% de  $\omega$ -3; 0,3 – 0,7% de ARA e 0,1 – 0,5% de DHA. No Japão as concentrações encontradas são em torno de 1,1% de DHA e 1,0% de ARA, enquanto na China 2,8% de DHA. Este fato pode ser explicado pela alta ingestão de peixe e frutos do mar dessas populações. Na Austrália e no Canadá foi observado um declínio no conteúdo de DHA no leite humano, provavelmente pelo baixo consumo de alimentos fontes de DHA e ARA.

Brenna et al. (2007) demonstraram em uma revisão de 65 estudos, realizados em diversos países que a média e a amplitude de DHA e ARA no leite materno foi de 0,32% (0,06 – 1,40%) e 0,47% (0,24 – 1,0%), respectivamente. A quantidade de AG no leite materno vai depender além da dieta, da variação biológica individual, idade gestacional e quadro patológico (AUESTAD et al., 2003; AGOSTINI; BRUNETTI; DI MARCO, 2005; HIRAYAMA; SPERIDIÃO; FAGUNDES-NETO, 2007).

Crianças alimentadas com leite materno possuem mais DHA e menos ARA do que aquelas que recebem alimentação baseada em leite de vaca. A quantidade de AGPI na FI é menor do que as concentrações encontradas no leite materno (FREITAS e KIETZER, 2002).

A melhor forma de assegurar a oferta de AGPI-CL para o lactente é através do leite materno, porém quando a prática da amamentação é impossibilitada, o uso de FI aparece como uma alternativa para a alimentação do bebê. Apesar do avanço no processo tecnológico, as FI ainda apresentam grandes diferenças na composição quando comparadas ao leite materno, com o intuito de estreitar essa diferença a partir de 2002, nos Estados Unidos, as FI estão sendo suplementadas com AGPI-CL. No Brasil, as FI começaram a ser comercializadas com AGPI-CL no início de 2008 (CARVER, 2003; SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007; BRASIL ALIMENTOS ON LINE, 2007).

Vários estudos, em humanos, começaram a ser realizados para verificar a eficiência dessa suplementação, principalmente quanto ao desenvolvimento cerebral e visual, alguns estudos com suas conclusões e autores constam na tabela 1-1.

Tabela 1-1. Estudos realizados por diversos autores, sobre os efeitos da suplementação de AGPI-CL em fórmulas infantis.

Autores (ano)	Experimento	Resultados
SanGiovanni et al. (2000)	Meta-análise; Estudo de revisão com 5 artigos originais e 4 revisões; FI suplementada com DHA Testes de acuidade visual (ACP, FPL, VEP).	A suplementação das FI com DHA é significativa entre 2 e 4 meses; Após 6 meses os comportamentos são similares.
Fewtrell et al. (2002)	Três grupos (Referência – amamentação materna; Controle – FI sem AGPI-CL; Suplementado – FI com AGPI-CL) ARA: 0,31% em AG e DHA: 0,17% em AG; Duração 18 meses; Desenvolvimento psicomotor e mental (MDI, PDI).	Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e suplementado; Após nove meses: testes MDI e PDI com valores maiores para o grupo Suplementado comparado ao Controle, mas sem diferença significativa; Grupo Controle com os maiores valores; Após dezoito meses: valores dos testes MDI e PDI próximos para os três grupos.

ACP: Acuity Card Procedure; FPL: Forced-choice Preferential Looking Procedure; VEP: Visual Evoked Potencial; MDI: Bayley Mental Developmental Index; PDI: Psychomotor Developmental Index AGPI-CL: ácido graxo polinsaturado de cadeia longa; DHA: ácido docosahexaenóico, ARA:ácido araquidônico; FI: fórmula infantil; AG: ácido graxo.



cont...

cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
Forsyth et al. (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 147 participantes</li> <li>✓ Dois grupos: um controle (sem suplementação de AGPI-CL na FI) e um suplementado (com ARA e DHA na FI)</li> <li>✓ ARA: 0,3 – 0,4% em AG e DHA: 0,15 a 0,25% em AG</li> <li>✓ Duração de 4 meses;</li> <li>✓ Pressão sanguínea.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Houve diferença significativa na pressão sanguínea dos grupos controle e suplementado;</li> <li>✓ No grupo suplementado houve uma diminuição na pressão sanguínea.</li> </ul>
Uauy et al. (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Estudo de revisão com 14 artigos;</li> <li>✓ Artigos publicados entre os anos de 1995 a 2001;</li> <li>✓ Desenvolvimento mental e visual (diversos testes);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Desenvolvimento mental:</li> <li>✓ Houve melhora em 54,5% (6 de 11) das observações realizadas para grupo com suplementação de AGPI-CL nas FI comparadas com grupo sem suplementação de AGPI-CL na FI;</li> <li>✓ Acuidade visual:</li> <li>✓ Houve melhora para 37,5% (3 de 8) dos estudos realizados para o grupo com suplementação de AGPI-CL em FI em relação ao grupo sem suplementação de AGPI-CL na FI.</li> </ul>

AGPI-CL: ácido graxo polinsaturado de cadeia longa; DHA: ácido docosahexaenóico, ARA: ácido araquidônico; FI: fórmula infantil; AG: ácido graxo.

cont..

cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
Koletzko et al. (2003)	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Três grupos (Referência – amamentação materna; Controle – FI sem AGPI-CL; Suplementado – FI com AGPI-CL);</li><li>✓ ARA: 0,1% em AG e DHA:0,57% em AG;</li><li>✓ Duração: 28 dias;</li><li>✓ Perfil de ácidos graxos, status de antioxidante e crescimento.</li></ul>	<p>Crescimento:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Similar para os grupos Referência, Controle e Suplementado;</li></ul> <p>Ácidos graxos no sangue:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Houve diferença estatisticamente significativa entres os grupos Referência, Controle e Suplementado para: ARA, ALA, DHA, <math>\omega</math>-3 total e <math>\omega</math>-6/<math>\omega</math>-3;</li><li>✓ O grupo Suplementado obteve valores maiores para estes ácidos graxos que o grupo Controle e menores que o grupo Referência;</li></ul> <p><math>\alpha</math>-tocoferol no plasma:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Não houve diferença estatisticamente significativa entres os grupos Referência, Controle e Suplementado;</li></ul> <p>Aldeído malônico na urina:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Houve diferença estatisticamente significativa entres os grupos Referência, Controle e Suplementado, sendo o grupo Referência igual ao Controle e o Referência igual ao Suplementado.</li></ul> <p>Conclusão:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ FI suplementada com AGPI-CL revela ter efeito na concentração de AG do plasma;</li><li>✓ FI com AGPI-CL não induziu efeitos adversos.</li></ul>

AGPI-CL: ácido graxo polinsaturado de cadeia longa; DHA: ácido docosahexaenóico, ARA: ácido araquidônico; FI: fórmula infantil; ALA: ácido  $\alpha$ -linolênico; AG: ácido graxo

cont..

cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
Auestad et al. (2003)	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Quatro grupos – 276 lactentes (Referência – amamentação materna; Controle – FI sem AGPI-CL; Suplementado I – FI com DHA; Suplementado II – FI com DHA e ARA);</li><li>✓ FI com DHA: 0,23% em AG;</li><li>✓ FI com DHA: 0,12% em AG e ARA: 0,43% em AG</li><li>✓ Duração 39 meses;</li><li>✓ Testes:</li><li>✓ QI (Stanford-Binet);</li><li>✓ Receptive vocabulary (PPVT-R);</li><li>✓ Expressive vocabulary (MLU);</li><li>✓ Visual-Motor Index Score;</li><li>✓ Visual Acuity (Teller Acuity Cards)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Não houve diferença estatisticamente significativa para os testes aplicados nos grupos Controle, Suplementado I, Suplementado II e Referência, após 39 meses;</li><li>✓ Portanto no estudo realizado sobre a avaliação do crescimento, desenvolvimento visual e neuromotor, após 39 meses não foram encontrados efeitos benéficos ou maléficos para a suplementação de FI com DHA ou DHA e ARA;</li><li>✓ Caso houvesse realizado um experimento intermediário, por exemplo, 14 meses, pode ser que os efeitos sejam mais pronunciados.</li></ul>

AGPI – CL: ácido graxo polinsaturados de cadeia longa; DHA: ácido docosahexaenóico. ARA: ácido araquidônico; FI: fórmula infantil.

cont...

cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
Koo; MBBS; FACN (2003)	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Estudo de revisão com 7 artigos</li><li>✓ Artigos publicados entre os anos de 1997 a 2002;</li><li>✓ Desenvolvimento visual e cerebral (diversos testes).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Quatro artigos não obtiveram diferença estatisticamente significativa para os grupos suplementados ou não com AGPI-CL nas FI quanto aos testes aplicados para desenvolvimento visual e cerebral;</li><li>✓ Dois estudos obtiveram melhora apenas para o desenvolvimento cerebral no grupo com FI suplementada com AGPI-CL, comparado com o grupo sem suplementação;</li><li>✓ Em um artigo somente houve melhora na acuidade visual para o grupo alimentado com FI suplementada de AGPI-CL, comparado ao grupo não suplementado;</li><li>✓ Em um estudo houve melhora para o grupo suplementado de FI com AGPI-CL comparado ao grupo sem suplementação, quanto ao desenvolvimento visual e cerebral.</li></ul> <p>Conclusão:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Lactentes nascidos com baixo peso obtêm maiores benefícios com a suplementação de AGPI-CL nas FI.</li></ul>

---

AGPI-CL: ácido graxo polinsaturado de cadeia longa; FI: fórmula infantil.

cont...

cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
Birch et al. (2005)	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ 103 lactentes</li><li>✓ 2 grupos (Controle – FI sem AGPI-CL; Suplementado – FI com AGPI-CL);</li><li>✓ ARA: 0,72% em AG e DHA: 0,36%;</li><li>✓ Valores de LA e ALA iguais para as FI;</li><li>✓ Duração 52 semanas (16 meses);</li><li>✓ Acuidade visual (teste VEP).</li></ul>	<p>Ácidos graxos no sangue:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Após 6 semanas: diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e Suplementado para DHA; LA e ARA;</li><li>✓ Após 17 semanas: diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e Suplementado para EPA; DHA; LA; ARA; <math>\omega</math>-3 total e <math>\omega</math>-6/<math>\omega</math>-3;</li><li>✓ Após 39 semanas: diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Suplementado para EPA; DHA; LA; ARA; <math>\omega</math>-3 total e <math>\omega</math>-6/<math>\omega</math>-3.</li></ul> <p>Acuidade visual (teste VEP):</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Interação significativa da acuidade visual com a dieta; e interação significativa entre dieta e idade;</li><li>✓ Nas idades 17, 39 e 52 semanas houve diferença estatisticamente significativa para os grupos Controle e Suplementado, sendo os valores maiores para o grupo Suplementado.</li></ul>

cont...

AGPI-CL: ácido graxo polinsaturado de cadeia longa; DHA: ácido docosahexaenóico, FI: fórmula infantil; LA: ácido linoléico; ALA: ácido  $\alpha$ -linolênico; EPA: ácido eicosapentaenóico; ARA: ácido arquidônico; VEP: Visual Evoked Potencial.

cont...

cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
Birch et al. (2005)		<p>cont..</p> <p>Estereocuidade:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Grupo Suplementado revelou resultados significativamente melhores que do grupo Controle em 17 semanas, mas não nas idades 39 e 52 semanas;</li></ul> <p>Conclusão:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Há correlação indicando que a melhora na acuidade visual está relacionada com a ingestão de FI com concentração de DHA e ARA.</li></ul>

DHA: ácido docosahexaenóico; ARA: ácido araquidônico; FI: fórmula infantil.

cont...

cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
McCann e Ames (2005)	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Revisão;</li><li>✓ 34 artigos;</li><li>✓ Artigos publicados entre os anos de 1999 a 2004;</li><li>✓ Testes comportamentais e cognitivos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Em 186 estudos em humanos houve melhora no desenvolvimento neuromotor de crianças alimentadas com FI suplementada de DHA;</li><li>✓ Estudos controlados e randomizados demonstram que não há melhora no desempenho cognitivo e neuromotor, entre grupos com e sem suplementação de AGPI-CL na FI;</li><li>✓ Ao analisar estudos isolados a melhora do desenvolvimento mental e visual é perceptível em lactentes alimentados com FI suplementada de AGPI-CL em relação ao alimentados com FI sem suplemento de AGPI-CL;</li><li>✓ Essas diferenças entre os estudos estão relacionadas com variáveis de confundimento, como quantidade suplementadas, idade e testes realizados.</li></ul>

AGPI – CL: ácido graxo polinsaturado de cadeia longa; FI: fórmula infantil; DHA: ácido docosahexaenóico.

... cont

cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
Birch et al. (2007)	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Grupos:</li><li>✓ Controle: FI sem adição de AGPI-CL;</li><li>✓ Suplementado I: FI com 0,35% dos AGs de DHA;</li><li>✓ Suplementado II: FI com 0,36% dos AGs de DHA e 0,72% de ARA;</li><li>✓ Referência: amamentação materna</li><li>✓ Duração de 17 semanas de tratamento, dados analisados após 4 anos ;</li><li>✓ Testes:</li><li>✓ Acuidade visual: VEP;</li><li>✓ Desenvolvimento cerebral: WPPSI – IQ verbal e IQ de desempenho;</li><li>✓ Teste total de IQ: soma do IQ verbal e de desempenho.</li></ul>	<p>VEP:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Referência e Controle, o Controle obteve resultados piores para o olho direito, para o olho esquerdo não se verificou diferença estatística;</li></ul> <p>IQ de desempenho:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Não houve diferença estatística entre os grupos</li></ul> <p>IQ verbal</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Suplementado I, ambos apresentaram resultados menores que do grupo Referência;</li><li>✓ Não houve diferença estatisticamente significativa para os grupos Controle e Suplementado II, mas este grupo obteve resultados de 4 a 6 pontos maiores que do Controle.</li></ul>

cont..

VEP: Visual Evoked Potencial; IQ: intelligence quotient; AG: ácido graxo; AGPI-CL: ácido graxo polinsaturado de cadeia longa; DHA: ácido docosahexaenóico; ARA: ácido araquidônico; WPPSI- Wechsler preschool and primary scale of intelligence.

cont...



cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
Birch et al. (2007)		<p>cont...</p> <p>IQ total</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ Grupo Suplementado II obteve valores de 4 a 6 pontos maiores que o grupo Controle, mas não houve diferença estatisticamente significativo;</li></ul> <p>Conclusão:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>✓ FI sem suplementação de DHA e ARA (Controle) consumida durante 17 semanas mostrou resultados menores significativamente estatísticos para acuidade visual e IQ verbal após 4 anos, comparado ao grupo Referência;</li><li>✓ FI com ARA e DHA (Suplementado II) consumida por 17 semanas e o grupo Referência não revelam diferença estatisticamente significativa nos resultados dos testes aplicados após 4 anos;</li><li>✓ A suplementação com ARA e DHA é importante para o desenvolvimento cerebral.</li></ul>

IQ: intelligence quotient; DHA: ácido docosahexaenóico; ARA: ácido araquidônico.

cont..

cont...

Autores (ano)	Experimento	Resultados
Smithers et al. (2008)	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Revisão;</li><li>✓ Estudo controlado e randomizado;</li><li>✓ Trabalhos publicados de 1992-2005</li><li>✓ Grupos: Controle (FI sem AGPI-CL) e Suplementado (FI com AGPI-CL);</li><li>✓ Desenvolvimento mental (MDI, BSID-I, BSID-II);</li><li>✓ Desenvolvimento psicomotor (PDI);</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Nos modelos randomizados não houve diferença estatística entre os grupos Controle e Suplementado nos testes BSID-I e MDI, mas o grupo Suplementado obteve 3 pontos a mais nos testes;</li><li>✓ Houve diferença significativa estatisticamente entre os grupos Controle e Suplementado no desenvolvimento mental, para o teste BSID-II. O grupo Suplementado demonstrou melhores resultados;</li><li>✓ A diferença ente os tratamento depende dos testes aplicados.</li></ul>

FI: fórmula infantil; AGPI-CL: ácido graxo polinsaturado de cadeia longa; MDI: Bayley Mental Developmental Index; PDI: Psychomotor Developmental Index; BSID: Bayley Scales of Infant Development.

#### **1.4. Estabilidade Oxidativa dos Ácidos Graxos Polinsaturados**

A oxidação lipídica recebe uma atenção especial, por suas implicações indesejadas na saúde humana e sua contribuição para o decréscimo do valor nutricional dos alimentos. A peroxidação lipídica é responsável por mudanças no paladar e odor dos produtos alimentícios, sendo a principal responsável pela deterioração durante o processamento e estocagem de alimentos ricos em lipídios (VELASCO et al., 2008).

A oxidação lipídica inclui a oxidação de AG não saturados, particularmente os AGPI e geram componentes que afetam a qualidade do produto. Produtos derivados da peroxidação do LA são tóxicos para as células humanas, podendo causar sérios problemas de saúde. Portanto é fácil compreender a importância da estabilidade oxidativa. Os AGPI-CL são altamente susceptíveis a oxidação. Em fórmulas infantis o alto conteúdo relativo de AGPI e os minerais pró-oxidantes contribuem para o aumento da oxidação lipídica (MANGLANO et al., 2005; ROMEU-NADAL et al., 2007).

Durante o processamento das FI ácido ascórbico, tocoferóis e sais de ferro, entre outros, são adicionados para agregar valor nutricional ou agir como antioxidante. No entanto, os minerais e as vitaminas adicionadas podem agir como anti- ou pró-oxidantes. O enriquecimento simultâneo da FI com quantidades relativamente altas de ácido ascórbico e ferro – combinação com efeitos pró-oxidantes – pode aumentar a susceptibilidade da FI a oxidação lipídica. Entretanto depende do tipo de sal de ferro adicionado, por exemplo, sais de sulfatos ionizam mais rapidamente que sais de lactatos, com liberação

de ferro e aumento do risco da formação de radicais livres advindos da reação de Fenton (MANGLANO et al., 2005; ROMEU-NADAL et al., 2007).

O *Codex Alimentarius* stan 72 (2007) permite a incorporação de uma mistura concentrada de tocoferol e/ou palmitato de ascorbila como antioxidantes as FIs, com limite de 1mg do composto isolado ou da combinação deles.

### **1.5. Definição, legislação e recomendação para as fórmulas infantis**

As fórmulas infantis são substitutas do leite materno. Em países europeus e nos Estados Unidos são comercializadas em três formas: em pó, líquida ou pronta para o consumo, no Brasil somente as duas primeiras opções são regulamentadas. De acordo com a legislação vigente no país (BRASIL, 1998):

*Considera-se Fórmula Infantil para Lactentes o produto em forma líquida ou em pó, destinado a alimentação de lactentes, sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite humano, para satisfação das necessidades nutricionais deste grupo etário. Excetuam-se as fórmulas destinadas a satisfazer necessidades dietoterápicas específicas.*

*Considera-se Fórmula Infantil de Seguimento o produto em forma líquida ou em pó utilizada como substituto do leite materno a partir do sexto mês, quando indicado, e para crianças de primeira infância.*

Essas definições também são apresentadas na norma *Codex Alimentarius* stan 72-1981 (2007). De acordo com essas legislações o padrão de identidade para a fórmula infantil foi estabelecido. Além disso, vários grupos ligados a nutrição infantil reavaliam essas quantidades presentes nas legislações e estabeleceram outras, baseada em estudos de pesquisadores de vários países. A legislação brasileira era muito parecida com o *Codex Alimentarius* stan 72-1981, porém em 2007, esta norma *Codex* passou por uma revisão alterando alguns valores. As propostas de mudanças foram muito discutidas por um grupo internacional de especialistas da The European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). As recomendações do grupo foram publicadas (Koletzko et al. (2005)) e incorporadas pelo *Codex Alimentarius* em 2007. Na tabela 1-2 constam as quantidades de lipídios e ácidos graxos polinsaturados que devem estar presentes nas fórmulas infantis para lactentes, de acordo com a Legislação Brasileira Portaria nº 977 (1998) e com o *Codex Alimentarius* stan 72-1981, revisado em 2007.

Tabela 1-2. Valores de lipídios e ácidos graxos em fórmula infantil para lactentes, segundo as legislações e recomendações.

	Organização	Valor mínimo	Valor máximo
Gordura Total (g/100 kcal)	Legislação brasileira (1998)	3,3	6,0
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	4,4	6,0
Ácido linoléico (mg/100 kcal)	Legislação brasileira (1998)	300	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	300	-
Ácido $\alpha$ -linolênico (mg/100 kcal)	Legislação brasileira (1998)	-	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	50	-
Razão (linoléico/ $\alpha$ -linolênico)	Legislação brasileira (1998)	-	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	5:1	15:1
Ácido docosahexaenóico (DHA)	Legislação brasileira (1998)	-	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	-	0,5 % do total de ácidos graxos.

O *Codex Alimentarius* (2007) e a ESPHGAN (2005) também possui valores para a soma de ácido láurico e mirístico, que não deve ultrapassar 20% do total de gordura. A soma de ácidos graxos *trans* deve ser inferior a 3% da gordura total e de ácido erúico menor que 1% do total de gordura. Em caso, da utilização de suplementação como a adição de ácido docosahexaenóico (DHA), ácido araquidônico (ARA) e ácido eicosapentaenóico (EPA), os dois últimos devem ter quantidades inferiores que de DHA.

A regulamentação para a FI de seguimento, no Brasil, segue os mesmos valores que as FI para lactentes, com exceção no valor mínimo de gordura total de 3 g/100 kcal (BRASIL, 1998). Nas outras legislações não se encontra essa diferenciação, pois lactente é a criança de zero a doze meses de idade e a criança de primeira infância possui uma alimentação ampla, não tendo a necessidade de ser alimentada apenas com leite (BRASIL, 1998; CODEX ALIMENTARIUS, 2007)

A composição das fórmulas infantis para lactentes é a base de leite de vaca ou de outros animais e/ou de outros componentes comestíveis de origem animal e vegetal que se consideram adequados para a alimentação do lactente (BRASIL, 1998; CODEX ALIMENTARIUS, 2007). Gordura e óleos hidrogenados comercialmente não podem ser utilizados nas FI (CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

## **1.6. Metodologia analítica para determinação de ácidos graxos polinsaturados em alimentos**

A determinação de ácidos graxos em alimentos engloba diversas etapas: extração de lipídios, quantificação de lipídios ou gorduras totais, derivatização desses lipídios para poderem ser analisados por cromatografia em fase gasosa (CG), análise em CG, identificação dos componentes do cromatograma e cálculos matemáticos (IAL, 2005).

### **1.6.1. Determinação de lipídios em alimentos**

O método para extração dos lipídios totais mais comumente usado baseia-se nas diferenças de solubilidade dos lipídios nos solventes. Um grande número de métodos gravimétricos é utilizado para determinação de lipídios.

Fatores específicos que podem influenciar a extração são: polaridade do solvente de extração, pré-tratamento da amostra, procedimentos de re-extração ou lavagem. A escolha do solvente mais apropriado para a extração de lipídios é um dos passos mais críticos na determinação de lipídio em matrizes alimentares. A extração completa pode requerer longos tempos de extração e diversos solventes ou combinação de solventes em série para poder solubilizar a gordura da matriz. Normalmente os solventes utilizados são: éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio-metanol, tetracloroetileno. Todos esses solventes extraem triacilglicerol, extratos etílicos são compostos de glicerídios simples, como mono-, di- e triacilglicerol, esteróis e ácidos graxos livres. Solventes mais polares, como clorofórmio e metanol, extraem lipídios polares, incluindo fosfolipídios, esteróis, terpenos, ceras, hidrocarbonetos e outros materiais não lipídicos (AUED-PIMENTEL, 2007).

Matrizes alimentares são normalmente tratadas antes da extração para haver uma maior ação do solvente. Esses tratamentos incluem adição de álcali para solubilizar a proteína ou adição de ácido para quebrar a emulsão ou hidrolizar lipídios e matrizes complexas. Procedimentos utilizando clorofórmio/metanol e enzimas para hidrolisar proteínas e polissacarídios são usados para facilitar a extração (ADRIAN et al., 2000; AOAC, 2005).

Há um consenso que a mistura clorofórmio/metanol é utilizada para a caracterização da fração lipídica, pois esteróis e colesterol não são destruídas durante a extração e também para produtos lácteos, pois tem eficácia para os ácidos graxos de baixo peso molecular. Este método é aprovado pela AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) para análise de lipídios em alimentos que não tem método específico. Apesar de clorofórmio/metanol ser



um excelente solvente para lipídios, existem os inconvenientes, como a razão clorofórmio:metanol:água é crítica, a umidade presente no alimentos, a quantidade de solvente utilizada. Os métodos mais comumente usados com esses solventes são Folch et al. (1959) e Bligh e Dyer (1959), além do AOAC 983.23 para alimentos sem método específico (CARPENTER; NGEH-NGWAINBI; LEE, 1993; AOAC, 2005).

A digestão com ácido libera os ácidos graxos do glicerol, glicofosfolipídios e ésteres de estero. O ácido também auxilia a extração de gordura pela hidrólise de proteínas e polissacarídios e rompimento das paredes celulares. No entanto, esse procedimento extrai componentes não lipídicos como glicerol, carboidratos de baixo peso molecular e seus produtos de polimerização, aminoácidos e sais e uréia. Resultados obtidos usando este método podem aumentar o valor real de lipídios, dessa maneira o extrato obtido por este método pode não ser apropriado para análise de ácidos graxos (KIRK; SAWER; EGAN, 1996).

Para a maioria dos produtos lácteos, incluindo queijo, é usado um pré-tratamento alcalino, normalmente com hidróxido de amônio, o qual quebra a emulsão lipídica, neutraliza algum ácido e solubiliza a proteína para posterior extração com éter. Estes métodos são o de Roesse Gottlieb (AOAC 905.02) e Monjonier (AOAC 989.05), ambos utilizam uma mistura de éter etílico e de petróleo para extrair uma solução que foi tratada previamente com hidróxido de amônia em etanol. Mono-, di- e triacilglicerol e traços de outros lipídios são extraídos com eficiência de produtos lácteos, incluindo leite, produtos a base de leite, queijo e fórmula infantil à base de leite. Valores de lipídios deste são reais e adequados com a quantidade normalmente encontrada nesses

produtos. Estes métodos de extração de lipídios são os recomendados quando há avaliação de novas metodologias para determinação de ácidos graxos (AOAC, 2005).

Novas tecnologias estão sendo utilizadas para determinação de lipídios, entre elas o uso de microondas e fluidos supercríticos, visando além da diminuição do tempo o menor uso de solventes tóxicos (CARRAPISO e GÁRCIA, 2000).

Para atender a definição para fim de rotulagem nutricional de lipídios estabelecidos na legislação dos Estados Unidos e Canadá, foram desenvolvidos métodos hidrolíticos de extração de lipídios e ácidos graxos. Os lipídios totais são obtidos a partir da determinação dos AG obtidos por cromatografia em fase gasosa acoplado com detector de ionização em chama (CG/DIC), e através de cálculos matemáticos esses AGs são condensados na molécula de glicerol, expressando assim os lipídios em triacilglicerol. Este método foi utilizado em diversos trabalhos e novas modificações têm sido realizadas (RADER et al., 1995; ALI et al., 1997; SATCHITHANANDAM; FRITSCHÉ; RADER, 2001, AUED-PIMENTEL, 2007; ROZEMA et al., 2008).

Para fórmula infantil, o método preconizado pela AOAC para determinação de lipídios é o desenvolvido por Roesse Gottlieb; entretanto existem laboratórios que utilizam hidrólise ácida (IAL, 2005; AOAC, 2005).

## **1.6.2. Determinação de ácidos graxos em alimentos**

### *1.6.2.1. Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos*

A análise por cromatografia em fase gasosa dos ácidos graxos requer sua prévia transformação em derivados mais voláteis e, normalmente, são

preparados ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG). São descritos muitos procedimentos e cada método possui vantagens e limitações, dependendo das características da gordura a ser analisada (CHRISTIE, 1993; AUED-PIMENTEL, 2007).

O procedimento clássico para obtenção de EMAG são reações de saponificação, normalmente catalisadas por ácidos ou bases e envolvem dois processos: hidrólise e esterificação ou transesterificação (MANCINI-FILHO; TAKEMOTO, AUED-PIMENTEL, 2007).

As reações de esterificação são reversíveis, então é realizada em excesso de álcool, deslocando o equilíbrio da reação; a presença de água, nessa reação, não favorece a formação dos produtos, pois é um doador de elétrons mais potente que o álcool, dessa maneira essa reação deve ser realizado em ambiente não aquoso (CHRISTIE, 1993; BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Para diminuir o tempo de reação, pode ser feita uma transesterificação direta (alcoólise ou metanólise) dos lipídios. A reação ocorre, apenas, para ácidos graxos ligados aos lipídios por ligação éster, isto é, triacilgliceróis e fosfolipídios. A transesterificação ocorre com refluxo e na presença de catalisadores ácidos (HCl,  $H_2SO_4$ ,  $BF_3$ ) ou básicos (NaOH, KOH, metóxido de sódio). A água provoca hidrólise e dissociação do produto formado (CHRISTIE, 1993; AUED-PIMENTEL, 2007).

A transesterificação em meio básico ocorre em condições de temperatura mais amenas e tempo reduzido; portanto esse tipo de catálise é recomendada para gordura de leite, óleo de coco, que apresentam ácidos graxos volateis. Entretanto, os ácidos graxos livres não são suscetíveis ao

ataque nucleofílico de álcoois ou bases e, portanto não ocorre a esterificação em condições de catálise básica. O emprego de KOH metanólico não é recomendado devido a ocorrência de hidrólise e formação de ácido graxo livre. Este hidróxido é substituído, com vantagem, por alcoolatos, como o metóxido de sódio. (CHRISTIE, 1993; CARRAPISO; GARCIA, 2000; AUED-PIMENTEL, 2007).

Os métodos mais eficientes empregam os dois tratamentos, ácido e básico. Em meio ácido pode ocorrer isomerização de ácidos graxos insaturados, principalmente os conjugados, quebra de grupamentos reativos como os grupos ciclopropenídicos, além dos processos em meio ácido necessitarem de aquecimento, o que pode comprometer os ácidos graxos de baixo peso molecular. Por outro lado, a transesterificação em meio básico pode levar à saponificação deses AGs (AUED-PIMENTEL,2007).

Procedimentos de transesterificação direta (“in situ”) sem extração prévia de gordura estão sendo utilizados. Estes consistem da mistura da amostra com os reagentes de esterificação, como, cloreto metanólico de hidrogênio; cloreto metanólico de acetila; metóxido de sódio metanólico; hidróxido de sódio metanólico e solução de  $\text{BF}_3$ . Há uma evidente economia de tempo de análise e solventes, uma vez que as etapas de extração de lipídios e derivatização destes ocorrem simultaneamente. Entretanto o teor de água dos alimentos, a tomada de amostra, a escolha dos reagentes (catalisador) e as condições da análise são fatores decisivos na eficiência das reações diretas (ULBERTH; HENNINGER, 1992; CARRAPISO; GARCIA, 2000; GOLAY et al., 2006; AUED-PIMENTEL,2007).

Vários estudos estão sendo realizados para comparar o método tradicional, ou seja, extração de lipídios e posterior derivatização dos AGs em EMAGs com o método *in situ*. O' Fallon et al. (2006) obteve resultados parecidos comparando o método tradicional e “in situ” para amostras de óleo de peixe, produto cárneo e cápsulas de ácido linoléico conjugado (CLA). Abdulkadir e Tsuchiya (2008) também demonstraram similaridade quantos aos métodos para amostras de animais marinhos, fato este também observado por Wang et al. (2000) ao analisarem gemas de ovos e por Golay et al. (2007) em produtos lácteos. Entretanto Mazalli e Bragagnolo (2007) verificaram desempenho inadequado no processo de metilação direta, para a determinação de AGPI em ovos em pó.

#### *1.6.2.2. Análise de ácido graxo polinsaturado por cromatografia gasosa*

As metodologias para determinação de AGPI em alimentos utilizam padrão interno (PI) para a quantificação dos ácidos graxos. As características desses métodos oficiais para AGPI em alimentos encontram-se na tabela 1-3.

Os principais problemas em analisar os AGPI-CL são: a sua instabilidade, a escolha do padrão interno e a utilização de fatores de correção do detector de ionização em chama experimentais ou teóricos. Normalmente se utiliza como padrão interno para quantificação de AGPI-CL o éster metílico do ácido tricosanóico (23:0). Outros padrões internos podem ser utilizados com uma maior exatidão e precisão que o 23:0, como 17:0; 19:0; 21:0. Porém dependendo da programação de temperatura da coluna cromatográfica podem eluir com outros componentes, comprometendo dessa maneira a quantificação (SCHREINER, 2005; MAZALLI; BRAGAGNOLO, 2007).

A determinação de fatores de correção da resposta do DIC pode ser feita experimentalmente a partir da análise de padrões de EMAG. Estes fatores incluem as correções relativas à massa dos componentes e aquelas originadas de desvios de parâmetros químicos e instrumentais. Em 1964, Ackman e Sipos introduziram o conceito da aplicação de fatores teóricos relativos de correção de resposta do DIC, para a análise de EMAG. Estes fatores são determinados pelo cálculo teórico de resposta relativa, considerando a quantidade de carbono nos EMAG, que está ligada a um ou mais hidrogênios, em relação à quantidade ligada a um EMAG específico como o padrão interno.

Tabela 1-3. Características dos principais métodos para quantificação de ácidos graxos polinsaturados em alimentos.

Método	Alimento	Padrão Interno	Fator de Resposta do DIC
Cantellops et al. (1999)	Fórmula Infantil	13:0 – triacilglicerol	Experimental
Satchithanandam et al. (2001)	Fórmula Infantil	13:0 – triacilglicerol	Experimental
AOCS Ce 1b-89 (2004)	Óleos marinhos	23:0 – éster metílico	Teórico
AOCS Ce 1h-05 (2005)	Alimentos contendo óleos vegetais e/ou gordura vegetal parcialmente hidrogenada	21:0 – triacilglicerol	Teórico
AOAC 992.25 (2005)	Fórmula infantil	17:0 – triacilglicerol	Experimental
AOCS Ce 1j-07 (2007)	Produtos lácteos e carnes de ruminantes	13:0 – triacilglicerol	Teórico e experimental
AOCS Ce 1i-07 (2007)	Óleos marinhos	23:0 – triacilglicerol	Teórico e experimental

## 1.7.Referências Bibliográficas

ABDULKADIR, S.; TSUCHIYA, M. One-step method for quantification and qualitative analysis of fatty acids in marine animal samples. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 354, p. 1-8, 2008.

ACKMAN, R.G.; SIPOS, J.C. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detector. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.41, p.377-378, 1964.

ADRIAN, J.; POTUS, J.; POIFFAIT, A.; DAUVILLIER P. Análisis nutricional de los alimentos. Métodos físico químicos generales. Zaragoza: Editorial Acribia, SA; 2000.

AGOSTONI, C.; BRUNETTI, I.; DI MARCO, A. Polyunsaturated fatty acids in human milk and neurological development in breastfed infants. **Current Pediatric Reviews**, v.1, p. 25-30, 2005.

ALI, L.H.; ANGYAL, G.; WEAVER, C. M.; RADER, J. I. Comparison of capillary column gas chromatography and AOAC gravimetric procedures for total fat and distribution of fatty acids in foods. **Food Chemistry**, v. 58, n. 1-2, p. 149-160, 1997.

AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios**. São Paulo, 2007. 230p. Tese de Doutorado – Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

AUESTAD, N.; SCOTT, D.T.; JANOWSKY, J.S.; JACOBSEN, C.; CARROLL, R.B.; et al., Visual, cognitive and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. **Pediatrics**, v.112, n.3, p.177-183, 2003.



BENATTI, A.; PELUSO, G.; NICOLAI, R.; CALVANI, M.. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **Journal of the American College of Nutrition**, v.23, n. 4, p. 281-302, 2004.

BIRCH, E. E.; CASTAÑEDA, Y. S.; WHEATON, D. H.; BIRCH, D. G. et al. Visual maturation of term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented or control formula for 12 mo. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 871-879, 2005.

BIRCH, E. E.; GARFIELD, S.; CASTAÑEDA, Y.; HUGHBANKS-WHEATON, D.; UAUY, R.; HOFFMAN, D. Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. **Early Human Development**, n.83, p. 279-284, 2007.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Lipídios**. In: Introdução à Química de Alimentos. São Paulo: Varela; 2003. p.139 -174.

BOCKISCH. M., **Fats and Oils Handbook**. Illinois: AOCS Press, 1998. 838p.

BRASIL ALIMENTOS ON LINE. **Fórmulas Infantis: Nestlé constrói fabrica de R\$100 milhões em São Paulo**. v. 318, 2007. Disponível em: <http://www.brasilalimentos.com.br/default.asp?numero=318>. Acessado em: 24 nov. 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998. **Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento**, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Rotulagem**

**Nutricional de Alimentos Embalados.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 dez. 2003e. Seção I, nº 251, p 33-4.

BRENNA, J. T.; VARAMINI, B.; JENSEN, R. G.; DIERSEN-SCHADE, D. A. et al. Docosaehaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 1457-1464, 2007.

CANTELLOPS, D.; REID, A.; EITENMILLER, R. R.; LONG, A. R. Determination of lipids in infant formula powder by direct extraction methylation of lipids and fatty acid methyl esters (FAME) analysis by gas chromatography. *Food Composition and Additives*, v. 82, n. 5, p. 1128-1139, 1999.

CARPENTER, D.M.; NGEH-NGWAINBI. J.; LEE, S., **Lipid Analysis**. In: CARPENTER, D.E.; SULLIVAN, D.M;. eds. *Methods of analysis for nutritional labeling*. Arlington: AOAC International; 1993. cap. 5, p 85-104.

CARRAPISO, A.I.; GARCIA, C. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ tranesterification. **Lipids**, n. 35, p. 1167-77, 2000.

CARVER, J.D. Advances in nutritional modifications of infant formulas. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p. 1550S-1554S, 2003.

CHRISTIE, W.W. **Preparation of esters derivatives of fatty acids for chromatographic analysis**. In: *Advances in lipid methodology – two*, p.69-111, 1993. Disponível em: <http://www.lipid.co.uk/infores/topics/methests/index.htm>. Acessado em: 5 out. 2006.

*CODEX ALIMENTARIUS* COMMISSION. JOINT FAO/WHO. **Food standards programme. Codex standard for infant formula – Codex Stan 72 1981**, revisado em 2007.

EUROPEAN COMMISSION: Committee on food on the revision. **Report of the scientific committee on food on the revision of essential requirements of infant formula and follow-on formula**. SCF/CS/NUT/IF/65.FINAL, 2003. Disponível em:

<http://www.fao.org/docrep/meeting/005/X7839E/x7839e0r.htm>. Acessado em: 28 ago. 2006.

FEWTRELL, M.; MORLEY, R.; BCHIR, M.B.; ABBOTT, R. A. et al. Double-Blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in formula fed to preterm infants. **Pediatrics**, v. 110, n. 1, p. 73-82, 2002.

FORSYTH, J.S.; WILLATTS, P.; AGOSTONI, C.; BISSENDEN J. et al. Long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infant formula and blood pressure in later childhood: follow up of a randomized controlled trial. **British Medical Journal**, v.326, 2003.

FOURNIER, V.; DESTAILLATS, F.; HUG, B.; et al. Quantification of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid geometrical isomers formed during fish oil deodorization by gas-liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 353-359, 2007.

FREITAS, J. J. S.; KIETZER, K. S. **Ácidos graxos e Sistema Nervoso**. In CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., eds. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 34, p.467-488.

GOLAY, P. A.; DIONISI, F.; HUG, B.; et al. Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acids content. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1115-1120, 2006.

GRAZIOLA, F.; SOLIS, V.S.; CURI, R., **Estrutura Química e Classificação dos Ácidos Graxos**. In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., eds. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 2, p.5-24.

GUNSTONE, F. D., **The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties and uses**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 288p.

HIRAYAMA, K.B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES-NETO, U., Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. **The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Disease**, v. 10, n.3, p. 1-10, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4.ed., Brasília: ANVISA, 2005.

KIRK, R.S.; SAWER, R.; EGAN, H., **Composición y análisis de alimentos de Pearson**. México, 1996, 777p.

KOLETZKO, B. et al., Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESGHAN Coordinated International Expert Group. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.41, p. 584-599, 2005.

KOLETZKO, B.; SAUERWALD, U.; KEICHER, U.; SAULE, H., et al. Fatty acid profiles, antioxidant status, and growth of preterm infants fed diets without or with long-chain polyunsaturated fatty acids. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 42, p. 243-253, 2003.

KOO, W.W.S; M.B.B.S.; e F.A.C.N. Efficacy and safety of docosahexaenoic acid and arachidonic acid addition to infant formulas: can one buy better vision and intelligence? **Journal of the American College of Nutrition**, v.22, n.2, p. 101-107, 2003.

LEVANT, B.; RADEL, J.D.; CARLSON, S.E. Reduced brain DHA content after a single reproductive cycle in female rats fed a diet deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. **Biological Psychiatry**, v. 60, p. 987-990, 2006.

LUNN, J.; THEOBALD, H.E., The health effects of dietary unsaturated fatty acids. **Nutrition Bulletin**, v.31, n.3, p. 178-224, 2006.

MANCINI-FILHO, J.; TAKEMOTO, E.; AUED-PIMENTEL, S., **Parâmetros de identidade e qualidade de óleos e gorduras**. In ALMEIDA-MURADIAN, L. B. ; PENTEADO, M.V.C.,

eds. Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. Cap 6. p. 81-107

MANGLANO, P.; LAGARDA, M. J.; SILVESTRE, M. D.; et al. Stability of the fraction of Milk-based infant formulas during storage. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 815-823, 2005.

MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. **Lipids**, v. 42, p. 483-490, 2007.

MCCANN, J.C.; AMES, B.N., Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.82, p. 281-295, 2005.

O'FALLON, J.V.; BUSBOOM, J. R.; NELSON, M. L.; GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1511-1521, 2007.

OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AOCS. 5. ed., Champaign: American Oil Chemists' Society, 2004.

OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AOCS. 6. ed., 2009.

Disponível em: <http://www.aocs.org/tech/methods.cfm>. Acessado em: 20 nov. 2008.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC. 18. ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.

POMPÉIA, C., **Essencialidade dos Ácidos Graxos**. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., eds. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 3, p.25-32.

RADER, J. I.; ANGUILA, G.; O'DELL, R. G.; et al. Determination of total fat and saturated fat in foods by packed column gas-liquid chromatography after acid hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 54, p. 419-427, 1995.

ROMEU-NADAL, M.; CHÁVES-SÉRVIN, J.L.; CASTELLOTE, A. I.; et al. Oxidation stability of the lipid fraction in Milk powder formulas. **Food Chemistry**, v. 100, p. 756-763, 2007.

ROZEMA, B.; MITCHELL, B.; WINTERS, D.; KOHN, A.; et al. Proposed modifications to AOAC 996.06, optimizing the determination of *trans* fatty acids: presentation of data. **Journal of AOAC international**, v. 91, n. 1, p. 92-97, 2008.

SANGIOVANNI, J. P.; PARRA-CABRERA, S.; COLDITZ, G.; BERKEY, C. S. et al. Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long-chain polyunsaturated fatty acids as they relate to visual resolution acuity in healthy preterm infants. **Pediatrics**, v. 105, n. 6, p. 1292-1298, 2000.

SATCHITHANANDAM, S.; FRITSCHÉ, J.; RADER, J. Extension of AOAC official method 996.01 to the analysis of standard reference material (SRM) 1846 and infant formulas. **Food Composition and Additives**, v. 84, n. 3, p. 805-813, 2001.

SCHREINER, M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography: Evaluation of factors affecting accuracy. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p. 126-130, 2005.

SILVA, D. R. B.; MIRANDA-JÚNIOR, P. F.; SOARES, E. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.7, n.2, p. 123-133, 2007.

SILVA, S. M. C. S. **Efeito do processamento sobre ácidos graxos polinsaturados da fração lipídica de duas espécies de peixes**. São Paulo, 1992. 136p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of emoga-6/omega-3 essencial fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365-379, 2002.

SIMOPULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 60, p. 502-507, 2006.

SMITHERS, L. G.; GIBSON, R. A.; MCPHEE, A.; MAKRIDES, M. Effect of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of preterm infants on disease risk and neurodevelopment: a systematic review of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, p.912-20, 2008.

UAUY, R.; HOFFMAN, D.; MENA, P.; LLANOS, A. et al. Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. **The Journal of Pediatrics**, v. 143, p. S17-S25, 2003.

ULBERTH F.; HENNINGER, M. One-step extraction/metilation method for determining fatty acid composition of processed foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, p. 174-177, 1992.

VAZ, J.S. et al., Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p. 498-500, 2006.

VELASCO, J.; MARMESAT, S.; HOLGADO, F.; et al. Influence of two lipid extraction procedures on the peroxide value in powdered infant formulas. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1159-1166, 2008.

VERLENGIA, R.; LIMA, T. M., **Síntese de Ácidos Graxos**. In CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., eds. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 11, p.121-134.

WANG, Y.; SUNWOO, H.; CHERIAN, G.; SIM, J. S. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. **Poultry Science**, v. 79, p. 1168-1171, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Comments on the draft report of the joint fao/who expert consultation on "diet, nutrition and the prevention of chronic diseases"**, 2002. Disponível em: [http://www.who.int/dietphysicalactivity/media/en/gsfao\\_cmo\\_077.pdf](http://www.who.int/dietphysicalactivity/media/en/gsfao_cmo_077.pdf). Acessado em: 20 dez. 2008.



## **Capítulo 2. Comparação de metodologias analíticas para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil**

---

**(Artigo publicado na Revista no Instituto Adolfo Lutz)**

### **2.1. Resumo**

Os ácidos graxos polinsaturados de cadeia de longa participam em diversos processos fisiológicos e metabólicos no organismo humano, além de serem importantes na nutrição infantil. Os ácidos graxos são suplementados em fórmulas infantis utilizadas como substituto de leite materno. A quantificação dos ácidos graxos polinsaturados, em virtude da presença de vários sítios reativos na molécula, requer processos de extração da gordura em condições brandas. No presente trabalho foram comparadas as metodologias analíticas para determinação de lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil. Nessa análise foi utilizada uma amostra de fórmula infantil (NIST). Foram comparados métodos analíticos para extração de lipídios: gravimétricos (Bligh Dyer, Roese Gottlieb e hidrólise ácida AOAC 963.15) e por cálculo (AOAC 996.06 e método direto adaptado de Golay et al. (2006)); para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos compararam-se os métodos empregando KOH metanólico 2N, catálise mista por Hartman e Lago e método direto adaptado de Golay et al. (2006). Compararam-se diferentes padrões interno, sendo estes dos ésteres metílicos de ácidos graxos 13:0, 21:0 e 23:0 e fatores de resposta para a quantificação dos ácidos graxos polinsaturados em relação aos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 23:0. Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os resultados de lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados obtidos por meio de diferentes métodos de extração de gordura. As menores taxas de dispersão (%CV) de ácidos graxos polinsaturados foram obtidas pela

metodologia oficial AOAC, que indica a preservação desses componentes, porém com menor recuperação dos lipídios. O uso de padrão interno do éster metílico de ácido graxo 23:0 e de o fator de correção teórico do detector de ionização em chama em relação ao próprio padrão interno mostrou-se como os mais adequados para efetuar o cálculo dos ácidos graxos polinsaturados.

**Palavras chaves:** Ácidos graxos polinsaturados, fórmula infantil, metodologia analítica, cromatografia gasosa, lipídeos.

## **Comparison of analytical methods to determine total lipids and polyunsaturated fatty acids by gas chromatography in infant formula**

### **2.2. Abstract**

Long chain polyunsaturated fatty acids are involved in several physiological and metabolic processes of human organism. Considering the fatty acids as crucial compound in the infantile nutrition, they have been supplemented in infant formula to substitute maternal milk. For quantifying the long chain polyunsaturated fatty acids requires a fat extraction process in mild conditions, due to the occurrence of reactive sites in their molecules. In the present work the analytical methods for determining the polyunsaturated fatty acid and lipids in infantile formula were compared. For these purposes, a sample of infantile formula from the National Institute of Standards and Technology was analyzed. They were compared analytical methods from lipids extraction: gravimetric methods (Bligh and Dyer, Roesse Gottlieb and acid hydrolyzed AOAC 963.15) e by calculate (acid hydrolyzed AOAC 996.06 and direct method adaptive from Golay et al. (2006)), to prepared fatty acid methyl ester compared the methods that using KOH methanolic 2N, mist catalyzed by Hartman and Lago and direct method adaptive from Golay et al. (2006). Comparison distinct internal Standards, that else fatty acid methyl ester 13:0, 21:0 and

23:0 and correction factors for flame ionization detector in relation fatty acids 16:0, 18:0 and 23:0. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found among the total lipids and polyunsaturated fatty acids results, in infantile formula analyzed on different lipid extraction methodologies. The lowest dispersions results (rsd %), of polyunsaturated fatty acid were detected by the AOAC methodology. According to these data, the use of fatty acid methyl ester 23:0 internal standard and of theoretical correction factors of flame ionization detector in relation to the internal standard itself were the most suitable for determining the polyunsaturated fatty acid.

**Key words:** Polyunsaturated fatty acid, infantile formula, analytical methodology, gas chromatography, lipids.

### **2.3.Introdução**

A partir de meados dos anos de 1950 surgiu a idéia de alimentar crianças com o uso de fórmulas infantis desde o nascimento. Nos últimos anos houve uma notável melhoria nas fórmulas infantis. Atualmente há várias opções e estão sendo suplementadas para se tornarem parecidas com a composição de leite materno humano (KOO et al., 2003; CARVER, 2003).

Os lipídios nas fórmulas infantis são compostos por diferentes fontes de gordura, podendo ser de origem animal (gordura láctea), vegetal (óleo de canola, óleo de milho, óleo de coco, óleo de palma) e ácidos graxos polinsaturados micro-encapsulados (CURRTIS; BERRINGAN; DAUPHINEE, 2008). Na gordura láctea há predomínio de ácidos graxos saturados e no leite humano há uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados quando comparado com o leite de vaca. Havendo diferenças nas proporções de ácidos graxos saturados e insaturados nestas fontes de lipídicas, torna-se importante a análise do perfil de ácidos graxos nestes alimentos, pois quanto maior for o tamanho da

cadeia e mais saturada, menor sua absorção no organismo (HIRAYAMA; SPERIDIÃO; FAGUNDES-NETO, 2008).

O ácido linoléico (18:2  $\omega$ -6) e o ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3  $\omega$ -3) são ácidos graxos essenciais, pois não podem ser sintetizados endogenamente pelos seres humanos e alguns animais. Além disso, são precursores das séries  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, originando os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, entre eles o ácido araquidônico (20:4  $\omega$ -6) e o ácido docosahexaenóico (22:6  $\omega$ -3). O recém nascido, entretanto, tem um limite na capacidade de produção de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, em particular quando a dieta é pobre em seus precursores, dessa maneira há a necessidade da suplementação desses ácidos graxos nas fórmulas infantis (SCHAAFMA, 1997; CARVER, 2003).

Ácidos graxos polinsaturados atuam em diversos processos fisiológicos e metabólitos, e são importantes na nutrição infantil pelo seu rápido aumento no cérebro durante o primeiro ano de vida. O ácido araquidônico é importante precursor da “série 2” dos eicosanóides, que são importantes biomediadores. Os ácidos graxos araquidônico e docosahexaenóico são os principais componentes da membrana fosfolipídica das células e são os ácidos graxos polinsaturados predominantes no sistema nervoso central. O ácido docosahexaenóico é o ácido graxo mais abundante na membrana foto receptora da retina (CARVER, 2003; AUESTAD et al., 2003; MCCANN; AMES, 2005).

Estudo realizado por Straarup et al. (2006), na Dinamarca, demonstrou que apenas quatro das 28 fórmulas infantis analisadas encontravam-se com níveis superiores de  $\alpha$ -linolênico preconizado pela legislação daquele país. Em um pequeno número, especialmente aquelas para necessidades especiais, encontrou-se alto conteúdo de ácido linoléico e para a razão de ácido linoléico/ácido  $\alpha$ -linolênico obtiveram-se valores entre 17:1 e 55:1. Recentes estudos indicam que a formação do ácido docosahexaenóico é

inibida pela alta disponibilidade do ácido linoléico. A razão de ácido linoléico e ácido  $\alpha$ -linolênico e a presença de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa em algumas formulas infantis comercializadas na Dinamarca demonstrou que houve uma melhora no perfil dos ácidos graxos, entretanto o conteúdo de  $\alpha$ -linolênico ainda é baixo e o de ácido linoléico é alto comparado com a recomendação e com o leite das dinamarquesas. Somente algumas das fórmulas infantis estudadas continham ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa.

As recomendações de organismos internacionais e de legislações locais para fórmula infantil baseiam-se na composição do leite materno humano (KOLETZKO et al., 2005). A legislação brasileira, Portaria nº 977 (1998), preconiza valores para gordura total e ácido linoléico, entre outros macro e micronutrientes. A Norma *Codex Alimentarius* - stan 72-1981, depois de uma revisão realizada em 2007, aceitou as recomendações de um grupo da The European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), o qual recomenda valores além dos lipídios totais e ácido linoléico, para ácido  $\alpha$ -linolênico, razão de ácido linoléico/ $\alpha$ -linolênico, ácido araquidônico, ácido docosahexaenóico, ácidos graxos *trans*, soma dos ácidos mirístico e palmítico e ácido erúico (BRASIL, 1998; KOTELZKO et al., 2005; CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

A quantificação dos lipídios nos alimentos é realizada, tradicionalmente, por extração com solventes orgânicos (éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio e metanol) e determinação gravimétrica. A habilidade de recuperar os vários componentes dos lipídios varia com o solvente de extração. Solventes mais polares como clorofórmio/metanol extraem lipídios polares, incluindo fosfolipídios, esteróis, terpenos, graxos, hidrocarbonetos e materiais não lipídicos. Matrizes alimentares ainda podem ser previamente tratadas, com hidrólise em meio básico para solubilizar proteínas, adição de ácido para quebrar emulsão ou hidrolizar lipídios de matrizes complexas. No caso das

fórmulas infantis a quantificação dos ácidos graxos polinsaturados, devido à presença de vários sítios reativos na molécula (insaturações), deve envolver processos de extração da gordura em condições amenas, pois, podem ocorrer reações de degradação e/ou isomerização nas insaturações dos ácidos graxos polinsaturados, podendo gerar resultados discrepantes na quantificação destes ácidos graxos (CARPENTER; NGEH-NGWAINBI; LEE, 1993; IVERSON; LANG; COOPER, 2001).

Estudos de comparação de metodologias para ácidos graxos polinsaturados são muito importantes e de difícil execução, pois são realizadas diversas etapas e em cada uma delas há parâmetros que influenciam na quantificação final dos ácidos graxos. Além disso, gera subsídios para padronização de metodologia nos diversos laboratórios, fato este relevante, pois, os alimentos estão sendo suplementados com estes ácidos graxos, e sua correta quantificação torna-se necessária para uma clara informação ao consumidor.

O objetivo desse estudo foi comparar os métodos de extração de lipídios e quantificação (fatores de resposta do detector de ionização de chama e padrões interno) dos ácidos graxos polinsaturados: ácido linoléico, ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico em amostra de referência de fórmula infantil da National Institute of Standard and Technological (NIST 1849/2006).

## **2.4. Material e Métodos**

### **2.4.1. Material**

Para o estudo foi utilizada uma amostra de fórmula infantil da NIST 1849/2006, que tem indicados os teores de ácido linoléico, ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico. A amostra foi armazenada em freezer, de acordo com a recomendação do fabricante. As análises foram realizadas entre os anos de 2006 a 2008.

#### 2.4.1.1. Reagentes e padrões

Os solventes e reagentes utilizados para as etapas de extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram de grau analítico: metanol, clorofórmio, éter de petróleo, éter etílico, etanol a 95%, ácido clorídrico, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de sódio e hidróxido de sódio. Foram também utilizados os seguintes solventes de grau cromatográfico: n-hexano e metanol.

Foram utilizados dois padrões cromatográficos de triacilgliceróis 11:0 e 13:0 e de éster metílico de ácido graxo 13:0, 21:0 e 23:0, marca Sigma com pureza de 99%.

Para identificar os componentes foram utilizados: uma mistura com quantidades certificadas de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4:0 a 24:0, marca Supelco; uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos dos isômeros *cis-trans* do ácido linoléico (18:2) e ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3); e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos individuais, sendo: elaídico (18:1 9t); vacênico (18:1 11c); *trans* vacênico (18:1 11t); (18:1 7c); (18:1 12c); CLA (18:2 9c,11t e 18:2 10t,12c); palmitoelaídico (16:1 9t), palmitico (16:0); linolelaídico (18:2 9t,12t); EPA (20:5 5c,8c,11c,14c,17c); araquidônico (20:4 5c,8c,11c,14c); docosahexaenóico (20:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c), todos da marca Sigma.

### 2.4.2. Métodos

#### 2.4.2.1. Determinação de Lipídios Totais

A determinação de lipídios totais foi realizada de acordo com os métodos gravimétricos descritos por Bligh e Dyer; AOAC 963.15 (hidrólise ácida) e Roese Gottlieb (AOAC 989.05) e método de cálculo pela somatória de ácidos graxos como triacilgliceróis de acordo com a AOAC 996.06 (hidrólise ácida) (BLIGH; DYER, 1958; AOAC, 2005).

#### *2.4.2.2.Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos*

Três metodologias foram comparadas para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos: Hartman e Lago, modificado por Maia e Rodrigues-Amaya (catálise mista, básica e ácida), o qual possui reagentes menos tóxicos que o método oficial do AOAC, que utiliza trifluoreto de boro; IUPAC (meio básico, KOH), sendo que este método utiliza reagentes simples e é de rápida execução; “in situ” (básico, com metóxido de sódio), metodologia amplamente estudada por realizar em uma única etapa a extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (HARTMAN; LAGO, 1973; IUPAC, 1987; MAIA; AMAYA-RODRIGUES, 1993; GOLAY et al., 2006).

#### *2.4.2.3.Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa*

Os ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama, da marca Shimadzu e modelo 17A, com coluna capilar de sílica fundida com fase 100% bis-cianopropil polisiloxana (SP 2560) de 100m, 0,25mm de diâmetro e 0,20µm de espessura de filme. A otimização das condições cromatográficas foi realizada em estudo prévio, descrito por Aued-Pimentel (2007). Foram empregadas as seguintes condições: temperatura do injetor e detector: 250°C; fluxo – 1,90mL/min; rampa de temperatura: 45°C (1 min); 13°C/min até 175°C; 4°C/min até 215°C por 35 min; gás de arraste: hidrogênio; pressão na coluna: 175 kPa; razão de divisão da amostra 1:15.

#### *2.4.2.4.Quantificação dos ácidos graxos*

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada pela adição de padrão interno à gordura extraída das fórmulas infantis. Os padrões utilizados foram os ésteres metílicos de ácidos graxos 13:0, 21:0, 23:0; e os cálculos foram realizados de acordo com a equação 1 e expressos em g/100g de amostra (IAL, 2005):



$$conc_{AG_i} = \frac{M_{PI} \cdot A_{AG_i} \cdot K'_{AG_i} \cdot f_{AG_i} \cdot L}{m \cdot A_{PI}} \quad (1)$$

Onde:

$M_{PI}$  = massa do padrão interno adicionada à amostra;

$A_{AG_i}$  = área do éster metílico de ácido graxo no cromatograma da amostra;

$K'_{AG_i}$  = fator de correção de resposta de cada éster metílico de ácido graxos no detector de ionização em chama com relação ao 16:0, 18:0 ou 23:0 (anexo 5);

$f_{AG_i}$  = fator de conversão de éster metílico de ácido graxos para ácido graxo<sup>15</sup> (anexo 4);

$L$  = teor de lipídios em gramas por cem gramas de amostra;

$m$  = massa da amostra em gramas;

$A_{PI}$  = área do padrão interno do éster metílico de ácido graxo no cromatograma da amostra.

No método de determinação da gordura por cálculo adicionou-se o triacilglicerol 13:0 e ésteres metílicos de ácidos graxos 21:0 e 23:0 no começo da extração, os ácidos graxos foram calculados de acordo com as equações 2 e 3 (AOAC, 2005), e a gordura total a partir da soma dos componentes em forma de triacilglicerol, de acordo com a equação 4 (AOAC, 2005).

$$M_{EMAG_i} = \frac{A_{AG_i} \cdot m_{PI} \cdot 1,0059 \cdot K'_{AG_i}}{A_{AG_{PI}}} \quad (2)$$

Onde:

$M_{EMAG_i}$  = massa de cada componente de éster metílico de ácido graxo;

$A_{AG_i}$  = área do pico de cada componente;

$m_{PI}$  = massa do padrão interno;

1,0059 = fator de conversão do padrão interno de triacilglicerol em éster metílico de ácido graxo correspondente;

$K'_{AGi}$  = fator de resposta experimental do detector de ionização em chama, em relação ao padrão interno (anexo 5);

$A_{AGPI}$  = área do pico do padrão interno.

$$M_{AGi} = M_{EMAGi} \cdot f_{AGi} \quad (3)$$

$$M_{TAGi} = M_{EMAGi} \cdot f_{TAGi} \quad (4)$$

Onde:

$M_{AGi}$  = massa de cada componente expressa como ácido graxo correspondente;

$f_{AGi}$  = fator de conversão de éster metílico de ácido graxo em ácido graxo<sup>16</sup>.

$M_{TAGi}$  = massa de cada componente expressa como triacilglicerol correspondente;

$f_{TAGi}$  = fator de conversão de éster metílico de ácido graxo em triacilglicerol<sup>16</sup>.

Para a quantificação dos ácidos utilizaram-se fatores de resposta do detector de ionização de chama teóricos em relação aos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 23:0, calculados de acordo com as equações 5 e 6 (ACKMAN; SIPOS, 1964; BANNON; GRASKE; HILLKER, 1986; IAL, 2005).

$$K_{AGi} = \frac{M_{AGi}}{(n_{AGi} - 1) \cdot A_c} \quad (5)$$

Onde:

$K_{AGi}$  = fator de correção da resposta para o ácido graxo "i".

$M_{AGi}$  = massa molecular do éster metílico de ácido graxo "i".

$n_{AGi}$  = número de átomos de carbono do éster metílico do ácido graxo "i".

$A_c$  = massa atômica do carbono (12,01).

$$K' = \frac{K_{AGi}}{K_{PI}} \quad (6)$$

Onde:

$K'_{AGi}$  = fator relativo de correção, para o éster metílico de ácido graxo “i”.

$K_{PI}$  = fator de resposta do detector de ionização em chama em relação ao 16:0, 18:0 ou 23:0.

$K_{AGi}$  = fator de resposta do detector de ionização em chama para o ácido graxo “i”.

#### *2.4.2.5. Análise Estatística*

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Para a comparação dos procedimentos foi aplicado teste de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p=0,05$ ). Foram calculados os coeficientes de variação.

## **2.5. Resultados e Discussão**

Os resultados obtidos para a comparação das variáveis para a quantificação dos ácidos graxos foram realizados em etapas distintas e independentes. No caso da extração de lipídios as análises foram feitas quando a amostra chegou ao laboratório, nos anos de 2006 e 2007, e as demais comparações, durante o decorrer do estudo, sendo o último estudo da metodologia “in situ” e conseqüentemente a comparação dos métodos de metilação, nos anos de 2007 e 2008.

### **Determinação dos lipídios ou gordura total**

A tabela 2-1 apresenta os valores de lipídios para a amostra da NIST 1849/2006 pelos diferentes métodos de extração, entretanto esta amostra não apresentava valor para lipídios.

Tabela 2-1. Valores de lipídios para amostra da NIST 1849/2006 pelos diferentes métodos de extração de lipídios.

Métodos	Lipídios (g/100g)	
	Média ± Desvio padrão	CV (%)
HA (AOAC 963.15)	31,53 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,92
HA (AOAC 996.06)	28,20 ± 0,50 <sup>b</sup>	1,78
Roese Gottlieb	26,71 ± 0,36 <sup>b,c</sup>	1,34
Bligh Dyer	25,15 ± 0,24 <sup>c</sup>	0,95

Análise realizada em triplicata; HA: hidrólise ácida, CV(%): coeficiente de variação em porcentagem; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey (p=0,05).

Os métodos de extração de lipídios revelaram diferenças estatísticas entre eles. Pelo método gravimétrico por hidrólise ácida obteve-se o maior teor de lipídios. Os métodos de Bligh e Dyer e o de Roese Gottlieb não apresentaram diferença estatisticamente entre eles, bem como os métodos de Roese Gottlieb e AOAC 996.06. O tratamento ácido prévio pode extrair componentes não lipídicos da amostra, como glicerol, carboidratos de baixo peso molecular, aminoácidos e sais de uréia, superestimando assim os valores (CARPENTER; NGEH-NGWAINBI; LEE, 1993). O método por cálculo, de acordo com a AOAC 996.06, demonstrou resultados comparáveis aos demais métodos. Este método considera como lipídios totais a soma dos ácidos graxos de todas as fontes lipídicas, expressos como triacilgliceróis, portanto a identificação dos EMAG com padrões influencia este cálculo, sendo assim, um maior número de padrões de éster metílico de ácido graxo para identificar os picos cromatográficos gera uma menor discrepância em relação ao resultado final.

O método oficial para determinação de lipídios totais para fórmula infantil segundo a AOAC é o de Roese Gottlieb. Esse método revelou valores próximos ao descrito por Bligh e Dyer, o qual apresentou o menor teor de lipídios. Pelo método de Bligh e Dyer a relação metanol, clorofórmio e água são crítica na etapa de extração. No método de

Roese Gottlieb é feito um tratamento prévio com álcalis para solubilizar a proteína e facilitar a quebra da emulsão, em seguida ocorre a extração utilizando éter etílico e éter de petróleo. O teor de lipídio encontrado pelo método de Roese Gottlieb pode estar relacionado com o tempo de contato da amostra com os solventes, a quantidade de amostra, e a capacidade destes solventes extraírem mono, di e triacilglicerol e apenas alguns lipídios polares (BLIGH; DYER, 1950; CARPENTER; NGEH-NGWAINBI; LEE, 1993).

O método mais apropriado para a determinação de lipídios em fórmula infantil é o método do Roese Gottlieb, pois utiliza reagentes brandos não comprometendo as insaturações dos ácidos graxos polinsaturados, é o método oficial da AOAC para este produto e o recomendado pelo *Codex Alimentarius*. Entretanto, os resultados indicaram uma menor recuperação da gordura.

Novas tecnologias têm sido empregadas, como o micro-encapsulamento dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, para suplementação das fórmulas e são apresentadas propostas de validação de métodos para a determinação de lipídios e ácidos graxos, que utilizam tanto hidrólise ácida como enzimática para digerir as microcápsulas e extrair adequadamente os lipídios e ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa das fórmulas infantis (CURRTIS; BERRIGAN; DAUPHINEE, 2008).

### **2.5.1. Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa**

Os resultados da comparação entre os três métodos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos encontram-se na Tabela 2-2. Para a comparação das metodologias de Hartman e Lago modificada por Maia e Rodrigues-Amaya (1993) e IUPAC (1987), a determinação da gordura foi normalizada, isto é, extraída de acordo com Roese Gottlieb. O padrão interno empregado para o cálculo foi o éster metílico de ácido graxo 23:0. No caso do método “in situ” não há etapa de extração de gordura.

Os três métodos revelaram resultados equivalentes, apenas houve diferenças estatísticas para o ácido  $\alpha$ -linolênico. No método descrito pela IUPAC observaram-se os maiores valores, incluindo os desvios padrão, mais altos que os obtidos pela metodologia de Hartman e Lago (1973) modificada por Maia e Rodrigues-Amaya (1993).

Tabela 2-2. Comparação dos teores de AG obtidos por diferentes métodos de preparação para ésteres metílicos de ácidos graxos na amostra de referência de fórmula infantil da NIST.

	Roese Gottlieb PI EMAG 23:0		Método "in situ"
	Hartman e Lago	IUPAC	Golay et al.
LA (g/100g)	5,98 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	6,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	5,8 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
ALA (g/100g)	0,53 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup>	0,540 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>	0,51 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
ARA (g/100g)	0,096 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,100 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,097 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>
DHA (g/100g)	0,0224 $\pm$ 0,0003 <sup>a</sup>	0,024 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,021 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>

média  $\pm$  desvio padrão (triplicata); LA: ácido linoléico; ALA: ácido  $\alpha$ -linolênico; ARA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenóico; PI: padrão interno; EMAG: éster metílico de ácido graxo; médias seguidas pela mesma letra, em linha, não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p=0,05$ ).

A metodologia da IUPAC que utiliza como catalisador o KOH metanólico é rápida e tem fornecido resultados adequados para alguns produtos alimentícios, apesar de não ser recomendada, devido à ocorrência de hidrólise e formação de ácido graxo livre. No caso da fórmula infantil, estas limitações descritas acima podem ter gerado desvios padrão mais altos do que o observado pelo método de Hartman e Lago modificado (AUED-PIMENTEL et al., 2005).

Quanto ao método "in situ" este apresentou resultados comparáveis com o método de Hartman e Lago modificado por Maia e Rodrigues-Amaya. Entretanto mais estudos devem ser realizados, para otimizar esta metodologia, pois, há a influência de variáveis experimentais como a quantidade de água da amostra, acidez, tomada de amostra, entre outros, no desempenho do método (CHRISTIE, 1993; AUED-PIMENTEL et al., 2005; GOLAY et al., 2006).

### **2.5.2. Determinação dos ácidos graxos polinsaturados**

Na Tabela 2-3 estão presentes os valores de ácidos graxos para os diferentes métodos de extração de lipídios, bem como para os diferentes padrões internos (PI) utilizados. O método AOAC 963.15 foi o que apresentou os teores mais próximos dos valores indicativos, principalmente quando se utilizou os PIs 21:0 e 23:0, fato este explicado pelo maior teor de lipídios. Entretanto, os valores de desvios padrão foram os maiores quando comparado aos outros métodos. Este procedimento utiliza tratamento ácido e a quente, podendo afetar as duplas ligações das moléculas de ácido graxo polinsaturado de cadeia longa e conseqüentemente resultar em maiores dispersões nos resultados (CARPENTER; NGEH-NGWAINBI; LEE, 1993). Entretanto, pode auxiliar na extração dos lipídios e ácidos graxos no caso de produtos microencapsulados (CURRTIS; BERRIGAN; DAUPHINEE, 2008). Os métodos de Bligh e Dyer e Roese Gottlieb são os que mais preservam as ligações características dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, pois utilizam tratamentos brandos. O método por cálculo mostrou resultados satisfatórios quando comparado aos valores indicativos e/ou outros métodos para o ácido linoléico e ácido  $\alpha$ -linolênico, quando o cálculo foi com PI 13:0, porém houve uma perda do ácido araquidônico e do ácido docosahexaenóico. O tempo de aquecimento do método (40 min) pode ter desencadeado reações de degradação e/ou isomerização desses ácidos graxos, diminuindo sua quantificação.

Tabela 2-3. Valores de ácidos graxos de acordo com os diferentes métodos de extração de lipídios, metilação dos ácidos graxos por Hartman e Lago modificado, e diferentes padrões internos utilizados na quantificação de ácidos linoléico,  $\alpha$ -linolênico, araquidônico e docosahexaenóico na amostra de referência da NIST 1849.

		Bligh e Dyer (1959)		Roese Gottlieb (1972)		Hidrólise ácida AOAC 963.15 (2005)		Hidrólise ácida AOAC 996.06 (2005)	
		Média $\pm$ Dp	CV (%)	Média $\pm$ Dp	CV (%)	Média $\pm$ Dp	CV (%)	Média $\pm$ Dp	CV (%)
Ácido linoléico (g/100g)	Referência	5,87							
	13:0	5,39 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>	2,33	5,84 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,42	6,37 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	2,26	6,02 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	2,26
	21:0	4,70 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,12	4,88 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,85	6,00 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	1,05	6,73 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	1,05
	23:0	4,94 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,42	5,09 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,71	6,18 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,92	7,01 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	0,92
Ácido $\alpha$ -linolênico (g/100g)	Referência	0,60							
	13:0	0,53 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	3,12	0,61 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,72	0,67 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,57	0,60 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,57
	21:0	0,48 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,06	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,71	0,60 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,14	0,65 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,14
	23:0	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,94	0,51 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,88	0,61 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,57	0,68 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,57
Ácido araquidônico (g/100g)	Referência	0,21							
	13:0	0,135 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	4,53	0,193 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>	3,93	0,177 $\pm$ 0,006 <sup>b,c</sup>	3,21	0,166 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	3,21
	21:0	0,150 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	1,39	0,158 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	1,65	0,195 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>	3,89	0,173 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>	3,89
	23:0	0,165 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	2,74	0,177 $\pm$ 0,004 <sup>a,b</sup>	1,96	0,216 $\pm$ 0,009 <sup>c</sup>	4,19	0,189 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>	4,19
Ácido docosahexaenóico (g/100g)	Referência	0,07							
	13:0	0,034 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	5,02	0,049 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	1,39	0,056 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	2,45	0,034 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	2,45
	21:0	0,046 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	7,70	0,051 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	1,12	0,064 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	2,51	0,045 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	2,51
	23:0	0,057 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	7,59	0,058 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	1,20	0,070 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>	2,99	0,053 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	2,99

Análise realizada em triplicata; Dp: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; médias seguidas pela mesma letra, em linha, não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p=0,05$ ).



A escolha do padrão interno é de grande importância para a quantificação dos ácidos graxos. O padrão interno deve eluir numa região próxima dos ácidos graxos de interesse, ser estável e não co-eluir com outros ácidos graxos. No presente trabalho verificou-se que o padrão interno do éster metílico de ácido graxo 13:0 eluiu muito antes dos ácidos graxos polinsaturados e também superestimou os valores de LA e ALA; o padrão interno do éster metílico de ácido graxo 21:0, nas condições cromatográficas descritas, pode co-eluir com o ácido linoléico conjugado (CLA), normalmente presente em gorduras lácteas. Portanto, o padrão interno do éster metílico de ácido graxo 23:0 revelou ser o mais apropriado para a quantificação de ácidos graxos polinsaturados, pois possui os requisitos citados, ou seja, elui numa região próxima dos ácidos graxos de interesse, não co-elui com outros ácidos graxos, é estável, além de apresentar resultados adequados quanto à precisão e exatidão para quantificação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa em alimentos (SCHREINER, 2005; MAZALLI; BRAGAGNOLO, 2007).

Os fatores de correção teóricos do detector de ionização em chama foram estudados em relação ao 16:0, 18:0 e 23:0, os resultados encontram-se na Tabela 2-4. Para o estudo da influência desses fatores na quantificação dos ácidos graxos, normalizaram-se o método de extração de gordura utilizando Roesse Gottlieb, metilação por Hartman e Lago modificado e cálculo com padrão interno do éster metílico de ácido graxo 23:0.

Tabela 2-4. Comparação dos teores dos ácidos graxos calculados com diferentes fatores teóricos de correção de resposta do detector de ionização em chama para amostra NIST 1849/2006.

	Referência	16:0	18:0	23:0
LA (g/100)	5,87	5,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,1 <sup>b</sup>
ALA (g/100)	0,60	0,56 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>b</sup>
ARA (g/100)	0,21	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
DHA (g/100)	0,07	0,068 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,070 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,072 ± 0,007 <sup>a</sup>

média ± desvio padrão (triplicata); LA: ácido linoléico; ALA: ácido  $\alpha$ -linolênico; ARA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenóico; médias seguidas pela mesma letra, em linha, não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p=0,05$ ). Lipídios totais por hidrólise ácida AOAC 963.15, extração de lipídios por Roese Gottlieb, metilação por Hartman e Lago e quantificação por padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0.

Houve apenas diferença estatisticamente significativa no uso de diferentes fatores de correção teóricos para o detector de ionização em chama para a quantificação de ácido linoléico e ácido  $\alpha$ -linolênico. Os valores em relação ao 16:0 e 18:0 foram menores que o da referência, sendo o fator de correção teórico do detector de ionização em chama em relação 23:0 o mais próximo dos valores da referência. Shreiner (2005) demonstrou que a utilização de fatores de correção teóricos do detector de ionização em chama são mais apropriados para quantificação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, e que podem ocorrer erros de quantificação do ácido docosahexaenóico de até 22,6% em relação à escolha de fatores experimentais.

## 2.6. Conclusões

O método de extração de lipídios revelou influenciar de maneira significativa na quantificação final dos lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados nas fórmulas infantis. As menores dispersões nos resultados

dos ácidos graxos polinsaturados foram obtidas pela extração de gordura pelo método oficial, ou seja, Roese Gottlieb, entretanto, houve menor recuperação da gordura por este método. Com relação às metodologias de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a de Hartman e Lago e a *in situ* apresentaram desempenho satisfatório. Quanto à quantificação dos ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil recomenda-se o uso de padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0 e fatores de resposta teóricos do detector de ionização em chama em relação a esse padrão interno. Futuros trabalhos devem ser realizados para estabelecer métodos adequados de extração dos lipídios e esterificação direta (*in situ*) para quantificação dos ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis, tendo em vista as tecnologias de suplementação das fórmulas infantis e objetivando a melhoria de desempenho e diminuição do tempo de análise.

## **2.7.Agradecimento**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) e ao Instituto Adolfo Lutz pela colaboração e parceria.

## **2.8.Referências**

ACKMAN, R. G.; SIPOS, J. C. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detector. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 41, p. 377-378, 1964.

AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios**. São

Paulo, 2007. 230p. Tese de Doutorado – Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

AUED-PIMENTEL, S.; CARUSO, M. S. F.; KUMAGAI, E. E.; RUVIERI, V.; ZENEBON, O. Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 167-172, 2005.

AUESTAD, N.; SCOTT, D.T.; JANOWSKY, J.S.; JACOBSEN, C.; CARROLL, R.B.; et al., Visual, cognitive and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. **Pediatrics**, v.112, n.3, p.177-183, 2003.

BANNON, C. D.; GRASKE, J. D.; HILLKER, A. E. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability: Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 63, p. 105-110, 1986.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998. **Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento**, 1998.

CARPENTER, D.M.; NGEH-NGWAINBI. J.; LEE, S., **Lipid Analysis**. In: CARPENTER, D.E.; SULLIVAN, D.M;. eds. Methods of analysis for nutritional labeling. Arlington: AOAC International; 1993. cap. 5, p 85-104.

CARVER, J.D. Advances in nutritional modifications of infant formulas. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p. 1550S-1554S, 2003.

CHRISTIE, W.W. **Preparation of esters derivatives of fatty acids for chromatographic analysis**. In: Advances in lipid methodology – two, p.69-111, 1993. Disponível em: <http://www.lipid.co.uk/infores/topics/methests/index.htm>.

Acessado em: 5 out. 2006.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. JOINT FAO/WHO. **Food standards programme. Codex standard for infant formula – Codex Stan 72 1981**, revisado em 2007.

CURRTIS, J. M.; BERRIGAN, N.; DAUPHINEE, P. The determination of n-3 fatty acid levels in food products containing microencapsulated fish oil using the one-step extraction method. Part 1: measurement in the raw ingredient and dry powdered foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 297-305, 2008.

GOLAY, P. A.; DIONISI, F.; HUG, B.; et al. Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acids content. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1115-1120, 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HIRAYAMA, K.B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES-NETO, U., Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. **The electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Disease**, v. 10, n.3, p. 1-10, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4.ed., Brasília: ANVISA, 2005.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Standard Methods for Analyses of Oils, Fats and Derivatives. **Report of IUPAC Working Group WG 2/87, Method 2.301**. 7.ed. Blackwell Scientific Publications, 1987.

IVERSON, S. J.; LANG, S. L. C.; COOPER, M. H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v. 36, p. 1283-1287, 2001.

KOLETZKO, B.; BAKER, S.; CLEGHORN, G.; FAGUNDES-NETO, U.; GOPALAN, S.; HERNELL, O. et al. Global standard for the composition of infant formula: Recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.41, n. 5, p. 584-599, 2005

KOO, W.W.S; M.B.B.S.; e F.A.C.N. Efficacy and safety of docosahexaenoic acid and arachidonic acid addition to infant formulas: can one buy better vision and intelligence? **Journal of the American College of Nutrition**, v.22, n.2, p. 101-107, 2003.

MAIA, E. L.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. R. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, n. 1/2, p. 27-35, 1993.

MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. **Lipids**, v. 42, p. 483-490, 2007.

MCCANN, J.C.; AMES, B.N., Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.82, p. 281-295, 2005.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC. 18. ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.

SCHAAFMA, G. The Western diet with a special focus on dairy products. **Institut Danome**, v. 4, p. 29-43, 1997.

SCHREINER, M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography: Evaluation of factors affecting accuracy. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p. 126-130, 2005.

STRAARUP, E. M.; LAURITZEN, L.; FAERK, J.; HOY, C. E.; MICHAELSEN, K.F. The stereospecific triacylglycerol structures and fatty acid profiles of human milk and infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 293-299.

## **Capítulo 3. Quantificação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil: Comparação entre os métodos direto e convencional**

---

**(Artigo em preparação para enviar a Revista Química Nova)**

### **3.1. Resumo**

Comumente os lipídios em alimentos são extraídos por solvente e quantificados por gravimetria. Após a extração são transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos. O método direto realiza este procedimento em uma única etapa. Este trabalho comparou o método convencional de extração e quantificação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados (ácido linoléico, ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico) com o método direto em fórmula infantil. Foi utilizada uma amostra de fórmula infantil da *Nacional Institute of Standards and Technology*. O método convencional utilizou extração de lipídios por Roesse Gottlieb, transformação de ésteres metílico de ácidos graxos de acordo com Hartman e Lago, o método direto foi baseado em estudos de Golay et al. (2006) com modificações. A quantificação dos ácidos graxos polinsaturados para ambos foi realizada pela adição de padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0 e fatores de resposta teóricos de correção do detector de ionização em chama em relação ao padrão interno. Os teores de lipídios e ácidos graxos polinsaturados foram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) iguais para os dois métodos, entretanto o método direto demonstrou os valores de desvios padrão maiores. Apesar de o método direto apresentar resultados comparáveis com o convencional novos estudos



deverão ser realizados para otimizar as condições do método, como tomada de amostra, tempo/temperatura de reação

**Palavras chaves:** metodologia analítica, fórmula infantil, lipídios, ácidos graxos polinsaturados

**Quantification of lipids and polyunsaturated fatty acids in infant formula: comparison of the direct and conventional methods**

**3.2. Abstract**

Normally lipids are extracted of foods through solvent and quantification for gravimetric methods. After this extracted are transformed in fatty acid methyl esters. The direct method realized this procedure in one stage. This work compared the conventional methodology of extraction and quantification of lipids and polyunsaturated fatty acid (linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, arachidonic acid and docosahexaenoic acid) with the direct method in infant formula. An infant formula sample of the National Institute of Standards and Technology was used. The conventional method utilized lipids extraction by Roesse Gottlieb and methylation according to Hartman and Lago, the direct method were based in studies from Golay et al. (2006) with modifications. The quantification of polyunsaturated fatty acids to both methods were realized with addition internal standard of fatty acid methyl acid 23:0 and correction factors for flame ionization detector in relation the internal standard; the traditional methodology was of Roesse Gottlieb and the method direct according to Golay et al. (2006) with modifications. The lipids and polyunsaturated fatty acid contents had no statistical difference ( $p < 0.05$ ) between the two methods, however the direct

method demonstrated greater values of standard deviation than conventional methods. In spite of the direct method to have similar values with conventional methods, new studies are necessary, like sample amount, time/temperature of reaction.

**Key words:** analytical methodology, infant formula, lipids, polyunsaturated fatty acids.

### **3.3.Introdução**

A extração dos lipídios dos alimentos é realizada, tradicionalmente, por extração com solventes orgânicos (éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio/metanol) e determinação gravimétrica. Fatores específicos podem influenciar a extração, tais como: polaridade do solvente de extração, pré-tratamento da amostra (ex: hidrólises, lavagens, etc.). A escolha do solvente mais apropriado para a extração de lipídios em matrizes alimentares é um dos passos mais críticos nesta determinação. O processo de extração pode ser demorado, exigindo diversos passos e solventes ou combinação de solventes em série para solubilizar a gordura da matriz (AUED-PIMENTEL, 2007).

As matrizes alimentares são normalmente tratadas antes da extração para haver uma maior ação do solvente. No caso dos produtos lácteos, incluindo as fórmulas infantis, é usado um pré-tratamento alcalino, usualmente hidróxido de amônio, o qual quebra e neutraliza a emulsão lipídica e solubiliza as proteínas para posterior extração com éter. Os métodos de Roese Gottlieb (AOAC 905.02) e Monjonier (AOAC 989.05) utilizam uma mistura de éter etílico e de éter petróleo para extrair a gordura do resíduo tratado com hidróxido de amônia em etanol. Mono-, di- e triacilglicerol e traços de outros

lipídios são extraídos com eficiência de produtos lácteos, incluindo leite, produtos a base de leite, queijo e fórmula infantil à base de leite. Estes métodos de extração de lipídios são recomendados para a determinação de ácidos graxos (ADRIAN et al., 2000; AOAC, 2005).

A análise dos ácidos graxos, por cromatografia em fase gasosa, requer a prévia transformação em derivados mais voláteis e, normalmente, são preparados ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG). São descritos muitos procedimentos e cada método possui vantagens e limitações, dependendo das características da gordura a ser analisada (CHRISTIE, 1993; AUED-PIMENTEL, 2007).

O procedimento clássico para obtenção de EMAG são reações de esterificação, normalmente catalisadas por ácidos ou bases e envolvem dois processos: hidrólise e esterificação ou transesterificação (CARPENTER; NGEH-NGWAINBI; LEE, 1993).

Procedimentos de transesterificação direta (“in situ”) sem extração prévia de gordura têm sido cada vez mais empregados. Consistem da mistura da amostra com os reagentes de esterificação, como, cloreto metanólico de hidrogênio; cloreto metanólico de acetila; metóxido de sódio metanólico; hidróxido de sódio metanólico e solução de  $\text{BF}_3$ . Há uma evidente economia de tempo de análise e solventes, uma vez que as etapas de extração de lipídios e derivatização destes ocorrem simultaneamente. Entretanto o teor de água dos alimentos, a tomada de amostra, a escolha dos reagentes (catalisador) e as condições da análise são fatores decisivos na eficiência das reações diretas (CARRAPISO; GARCIA, 2000; GOLAY et al., 2006).

Vários estudos foram realizados para comparar o método tradicional, ou seja, extração de lipídios e posterior derivatização dos AGs em EMAGs com o método “in situ”. O’ Fallon et al. (2006) obtiveram resultados similares entre os métodos tradicional e “in situ” para amostras de óleo de peixe, produto cárneo e cápsulas de ácido linoléico conjugado (CLA). Outros autores também demonstraram similaridade quanto aos resultados dos métodos; Abdulkadir e Tsuchiya (2008) para amostras de animais marinhos; Wang et al. (2000) ao analisarem gemas de ovos e Golay et al. (2006) em produtos lácteos. Entretanto Mazalli e Bragagnolo (2007) verificaram desempenho inadequado no processo de metilação direta, para a determinação de AGPI em ovos em pó. Em 2007 a AOCS publicou um método de metilação direta dos lipídios empregando hidrólise alcalina com NaOH metanólico, extração com solvente orgânico (n-hexano) e metilação com BF<sub>3</sub>. A gordura total é também determinada diretamente por cálculo, a partir dos ácidos graxos obtidos por CG/DIC segundo método AOCS Ce 1h-05. Este método, entretanto, não é aplicável para gorduras lácteas e óleos marinhos com AGPI-CL ou óleos micro-encapsulados (AOCS, 2007).

O objetivo deste estudo foi comparar o método oficial de extração e quantificação gravimétrica de lipídios (Roese Gottlieb) e o de cálculo da gordura a partir dos AG obtidos por CG/DIC. Também foi comparado o método convencional para preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos poliinsaturados com a metodologia direta, para a amostra NIST 1849/2006 de fórmula infantil.

### 3.4. Material e Métodos

#### 3.4.1. Material

Foi utilizada uma amostra de fórmula infantil da NIST (Nacional Institute of Standards and Technology) 1849/2006, com valores indicativos de ácido linoléico (LA), ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em g/100g de amostra.

##### 3.4.1.1. Reagentes, solventes e padrões

Os solventes e reagentes utilizados para as etapas de extração de gordura e preparação dos EMAG de grau analítico foram: éter de petróleo, éter etílico, etanol a 95 %, ácido clorídrico, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de sódio, hidróxido de sódio, metóxido de sódio, cloreto de amônio e citrato de sódio; e solvente de grau cromatográfico: n-hexano

Para determinação de lipídios e ácidos graxos foram utilizados os seguintes padrões cromatográficos:

- 11:0 e 13:0 em forma de triacilglicerol (TAG), com pureza aproximada de 98% e 99%, respectivamente;
- 11:0, 13:0, 21:0 e 23:0, na forma de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG), com pureza aproximada de 99%.

Para identificar os componentes foram utilizados: uma mistura com quantidades certificadas de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4:0 a 24:0, marca Supelco; uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos dos isômeros *cis-trans* do ácido linoléico (18:2) e ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3); e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos individuais, sendo: elaídico (18:1 9*t*); vacênico (18:1 11*c*); *trans* vacênico (18:1 11*t*); (18:1 7*c*); (18:1 12*c*); CLA

(18:2 9c,11t e 18:2 10t,12c); palmitoelaídico (16:1 9t), palmitico (16:0); linolelaídico (18:2 9t,12t); EPA (20:5 5c,8c,11c,14c,17c); araquidônico (20:4 5c,8c,11c,14c); docosahexaenóico (20:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c), todos da marca Sigma.

### **3.4.2. Métodos**

#### *3.4.2.1. Métodos de extração de lipídios por gravimetria*

Foi utilizado para extração e quantificação de lipídios o método oficial Roesse Gottlieb (AOAC, 2005), onde pesou-se cerca de 2g de amostra, em tubo de centrifuga, adicionou-se 10 mL de água destilada e em seguida a amostra foi homogeneizado, após esta etapa foram adicionados 10 mL de álcool a 95%, 25 mL de éter etílico e 25 mL de éter de petróleo, em seguida o tubo foi agitado em centrifuga por 5 minutos com rotação de 600 rpm. Após esta etapa, ocorreu a separação da fase etérea, a qual é coletada em frasco apropriado para evaporação, a fase aquosa e re-extraída por mais duas vezes com 15 mL de éter etílico e 15 mL de éter de petróleo, e a fase etérea coletada no frasco apropriado. A fase etérea foi evaporada em concentrador de amostra, realizou-se o cálculo de lipídios por gravimetria até peso constante.

#### *3.4.2.2. Método para preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG)*

Para preparação de EMAG utilizou-se o método de catálise mista, de acordo com Hartman e Lago (1973) modificado por Maia e Rodrigues-Amaya (1993). As etapas desta metodologia foram: pesou-se cerca de 100mg da gordura extraída pelo método de Roesse Gottlieb, em tudo de 50 mL com

tampa, adicionou-se 1mL de cada padrão interno com concentração de 2,5mg/mL e 4mL de solução 2N de cloreto de potássio em metanol, após agitação em Vortex, por 1 minuto, esta solução foi mantida por 5 minutos em banho de água, à temperatura de 70°C, em seguida o tubo foi retirado e esfriado em água corrente, até atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 5mL de solução esterificante (preparada com ácido sulfúrico e cloreto de amônio em metanol), agitou-se o tubo por 5 minutos em Vortex e manteve-se o tubo em banho de água em condições iguais a etapas anterior, após resfriamento adicionaram 6mL de solução saturado de cloreto de sódio e 3mL de n-hexano, o tudo foi agitado por 1 minuto em Vortex e deixado em repouso para separação das fases. 1µL da parte superior foi injetada no cromatógrafo gasoso.

#### *3.4.2.3.Método direto para análise de gordura total e ácidos graxos polinsaturados*

A metodologia utilizada foi baseada em estudo de Golay et al. (2006), com modificações realizadas durante o estudo. Os passos analíticos utilizados foram: pesou-se cerca de 100mg de amostra, em frasco de centrifuga de 100mL, adicionou-se 2mL de n-hexano, agitou-se o frasco em Vortex por 30 segundos, em seguida adicionaram-se 300µL de solução de padrão interno com concentração de 2,5 mg/mL e 500 µL de solução de 2N de metóxido de sódio em metanol, agitou-se o frasco em Vortex por 2 minutos e manteve-o em Banho Maria por 20 minutos, à temperatura de 50°C. Após retirar o frasco do Banho Maria, este foi resfriado em água corrente até a temperatura ambiente, e adicionados 2mL de n-hexano e 10mL de solução aquosa de citrato de

sódio/cloreto de sódio (1,5/1,0), o frasco foi agitado por 1 minuto em Vortex e deixado em repouso para separação das fases; 1µL da fase superior foi injetada em cromatógrafo gasoso.

#### *3.4.2.4. Análise dos ácidos graxos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)*

Os ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama (GC/DIC), da marca Shimadzu e modelo 17A, com coluna capilar de sílica fundida com fase 100% bis-cianopropil polisiloxana (SP 2560) de 100m, 0,25mm de diâmetro e 0,20 µm de espessura de filme, de acordo com as condições, descritas por Kramer; Blackadar e Zhou (2002): temperatura do injetor e detector: 250 °C; fluxo – 1,90 mL/min; rampa de temperatura: 45 °C (1 min); 13°C/min até 175°C; 4 °C/min até 215 °C por 35 min; gás de arraste: hidrogênio; pressão na coluna: 175 kPa; razão de divisão da amostra 1:15.

Os componentes separados foram identificados pela co-injeção de padrões e comparações com os tempos de retenção absolutos e relativos ao padrão interno, o qual foi calculado pela divisão do tempo de retenção de cada componente pelo tempo de retenção do pico do padrão interno.

#### *3.4.2.5. Quantificação dos ácidos graxos polinsaturados*

O fator de resposta do DIC teórico foi calculado de acordo com as equações abaixo e foram relativos aos padrões internos (ACKMAN e SIPOS, 1964; BANNON et al., 1986; IAL, 2005).



$$K_{AGi} = \frac{M_{AGi}}{(n_{AGi} - 1) \cdot A_c} \quad (1)$$

Onde:

$K_{AGi}$  = fator de correção da resposta para o ácido graxo "i" (anexo 5).

$M_{AGi}$  = massa molecular do éster metílico de ácido graxo "i".

$n_{AGi}$  = número de átomos de carbono do éster metílico do ácido graxo "i".

$A_c$  = massa atômica do carbono (12,01).

Pesos atômicos utilizados no cálculo:

Carbono =12,01; Hidrogênio = 1,0079; Oxigênio =15,994.

$$K' = \frac{K_{AGi}}{K_{PI}} \quad (2)$$

Onde:

$K'_{AGi}$  = fator relativo de correção, para o EMAG "i".

$K_{PI}$  = fator de resposta do DIC para o PI.

$K_{AGi}$  = fator de resposta do DIC para o ácido graxo "i".

Para a quantificação dos ácidos graxos foram utilizados dois procedimentos, com a adição de padrão interno; quando houve prévia extração de lipídios foram realizados os cálculos, de acordo com a equação 3 (IAL, 2005). O padrão interno utilizado para este calculado foi o éster metílico de ácido graxo 23:0

$$conc_{AGi} = \frac{M_{PI} \cdot A_{AGi} \cdot K'_{AGi} \cdot f_{AGi} \cdot L}{m \cdot A_{PI}} \quad (3)$$

Onde:

$M_{PI}$  = massa do padrão interno adicionada à amostra;

$A_{AGi}$  = área do EMAG no cromatograma da amostra;

$K'_{AGi}$  = fator de correção de resposta de cada EMAG no DIC com relação ao PI.

$f_{AGi}$  = fator de conversão de EMAG para AG (IAL, 2005) (anexo 4);

L = teor de lipídios em gramas por cem gramas de amostra;

m = massa da amostra em g;

$A_{PI}$  = área do padrão interno EMAG no cromatograma da amostra.

No método direto, utilizou-se o método por cálculo para determinação da gordura total, adicionou-se o triacilglicerol 13:0 e ésteres metílicos de ácidos graxos 21:0 e 23:0 no começo da extração, os ácidos graxos foram calculados de acordo com as equações 2 e 3, e os lipídios a partir da soma dos componentes em forma de triacilglicerol, de acordo com a equação 4 (AOAC 966.06, 2005).

$$M_{EMAGi} = \frac{A_{AGi} \cdot m_{PI} \cdot 1,0059 \cdot K'_{AGi}}{A_{AGPI}} \quad (4)$$

Onde:

$M_{EMAGi}$  = massa de cada componente de EMAG;

$A_{AGi}$  = área do pico de cada componente;

$m_{PI}$  = massa do padrão interno;

1,0059 = fator de conversão do padrão interno de TAG em EMAG correspondente;

$K'_{AGi}$  = fator de resposta experimental do DIC, em relação ao padrão interno;

$A_{AGPI}$  = área do pico do padrão interno.

$$M_{AGi} = M_{EMAGi} \cdot f_{AGi} \quad (5)$$

$$M_{TAGi} = M_{EMAGi} \cdot f_{TAGi} \quad (6)$$

Onde:

$M_{AGi}$  = massa de cada componente expressa como AG correspondente;

$f_{AGi}$  = fator de conversão de EMAG em AG (AOAC, 2005) (anexo 4);

$M_{TAGi}$  = massa de cada componente expressa como TAG correspondente ;

$f_{TAGi}$  = fator de conversão de EMAG em TAG (AOAC, 2005) (anexo 4).

#### *3.4.2.6. Análise Estatística*

Em todos os procedimentos as análises foram realizadas em triplicata e os valores foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A comparação dos procedimentos foi realizada pelo teste de Student, no caso de dois procedimentos, e análise de variância (ANOVA) e posterior teste de Tukey, para três ou mais procedimentos, todos os testes foram obtidos com nível de significância de 95 %. Calculou-se o coeficiente de variação em porcentagem (% CV).

### **3.5. Resultados e Discussões**

#### **3.5.1. Extração de Lipídios**

A amostra da NIST 1849/2006 não possuía valor indicativo para os lipídios. O método oficial para determinação de lipídios em fórmula infantil é o de Roese Gottlieb (1972) (AOAC, 2005). Este método utiliza condições

amenas, sem aquecimento e hidrólise básica, preservando assim, os sítios reativos dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, o que é fundamental para uma análise posterior confiável destes AGs (CARPENTER; NGEH-NGWAINBI; LEE, 1993).

A metodologia original descrita por Golay et al. (2006), método direto, não prevê a determinação de lipídios por cálculo; entretanto, neste estudo foi acrescentada esta modificação para possibilitar essa quantificação. Esta quantificação foi realizada por cálculo de acordo com a metodologia descrita pelo método AOAC 996.06, ou seja, a partir da composição dos AGs. O teor de lipídios para o método convencional foi de  $26,16 \pm 1,31$  g/100g e para o direto  $29,07 \pm 1,66$  g/100g. Estes resultados demonstram que os dois métodos de extração de lipídios foram equivalentes, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ( $p < 0,05$ , teste de Student). O método direto forneceu teor de lipídios maior que o convencional, revelando, uma possível, maior eficiência na extração dos tipos de lipídios encontrados nesta matriz. As fórmulas infantis são normalmente compostas por diferentes fontes lipídicas, como gordura láctea, óleos vegetais e ácidos graxos encapsulados, dificultando assim a extração total de todos os lipídios; em estudo prévio realizado por Kus, Aued-Pimentel e Mancini-Filho (2009), nesta mesma amostra, a extração utilizando hidrólise ácida revelou os maiores teores, pois o ácido, possivelmente, auxiliou na quebra das micro-cápsulas, liberando os ácidos graxos para extração (HIRAYAMA; SPERIDIÃO; FAGUNDES-NETO, 2006; CURRTIS; BERRIGAN; DAUPHINEE, 2008).

Nos métodos de quantificação de lipídios por cálculo a escolha do padrão interno é de grande importância. Os lipídios são calculados como a

soma dos ácidos graxos e condensados no triacilglicerol (AOAC, 2005, AOCS Ce 1h-05). No trabalho experimental empregou-se para os cálculos os padrões internos de éster metílico dos ácidos graxos 21:0 e 23:0, além do PI de TAG 13:0 . Os valores obtidos com cada um dos PIs encontram-se na Tabela 3-1.

Tabela 3-1. Teor dos lipídios obtido por cálculo a partir da composição de ácidos graxos pela metodologia direta com os padrões interno de triacilglicerídio (TAG) 13:0 e ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) 21:0 e 23:0.

Método direto	Média ± Desvio Padrão	CV (%)
TAG 13:0	29,07 ± 1,66 <sup>a</sup>	5,70
EMAG 21:0	29,40 ± 1,10 <sup>a</sup>	3,74
EMAG 23:0	31,41 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,43

Análises em triplicata; método direto: metodologia adaptada de Golay et al. (2006); médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, no grupo, de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). CV: coeficiente de variação. TAG: triacilglicerol; EMAG: ésteres metílicos de ácidos graxos.

De acordo com os valores descritos na Tabela 3-1, não houve diferença estatística entre os PIs para o cálculo dos lipídios. Considerando a ordem de eluição dos EMAG num cromatograma, quanto mais afastado o AG calculado do PI, maior a discrepância em sua concentração (SCHREINER, 2005). Os valores maiores obtidos com os PI 21:0 e 23:0 refletem a contribuição dos ácidos graxos de cadeia curta, que estão presentes em produtos lácteos em quantidades apreciáveis, pois o fator de resposta teórico do detector de ionização em chama (DIC), calculado em relação a estes PI são maiores. Para o caso do PI TAG 13:0, são os AGPI-CL que influenciam no cálculo, pois os valores dos fatores de resposta do DIC são menores, quando calculado em relação a este PI. Portanto, o ideal seria a quantificação com dois PI, uma para determinada região do cromatograma, ou seja, do início até a região de eluição

do ácido esteárico (18:0), por exemplo, TAG 13:0, e o EMAG 23:0 para os ácidos graxos conseqüentes aos 18:0 até o último eluído, isto é o 22:6. Considerando a recuperação dos PI, os EMAG 21:0 e 23:0 tiveram recuperações entre 97-99%, próximas, ao do TAG 13:0 (98-99 %), mostrando assim que podem ser utilizados na quantificação dos lipídios conjuntamente. A Figura 3-2 apresenta um cromatograma para a amostra NIST 1849/2006, onde se pode verificar a ordem de eluição dos ésteres metílicos de ácidos graxos.

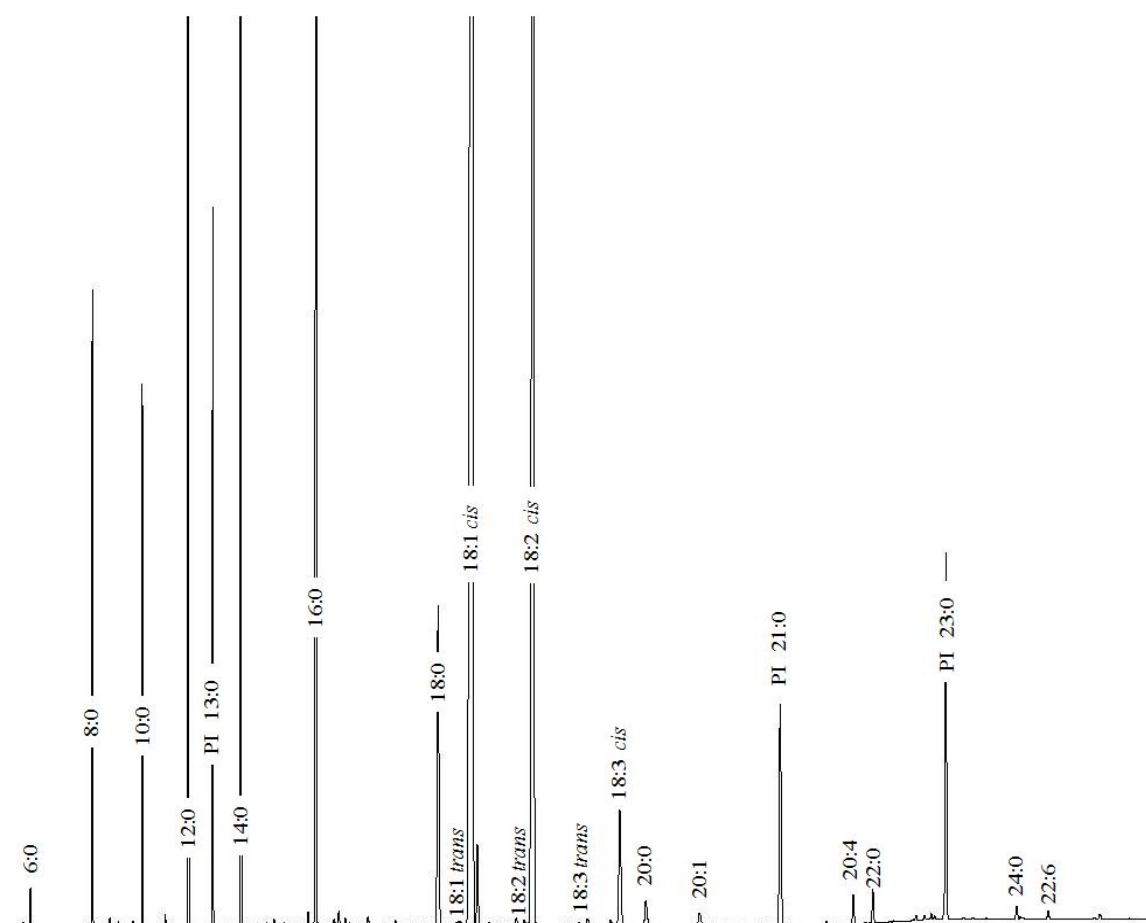


Figura 3-1. Cromatograma dos principais ésteres metílicos de ácidos graxos obtido da análise da amostra NIST 1849/2006 por cromatografia em fase gasosa. PI: padrão interno.

### 3.5.2. Métodos de preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Na Tabela 3-2 estão presentes os valores para os ácidos graxos da amostra da NIST 1849/2006 por método convencional e direto de derivação dos ácidos graxos, são eles Hartman e Lago (1973) modificado por Maia e Amaya-Rodrigues (1993) e a metodologia direta adaptada de Golay et al. (2006). Cabe ressaltar, que o estudo da metodologia direta foi realizado em 2008, e a amostra chegou ao laboratório no 2º semestre de 2006. No final do ano de 2007 foram iniciados os estudos para a metodologia direta, entretanto, os valores obtidos de AGPI-CL eram inferiores aos verificados em 2006. Dessa maneira, realizaram-se novamente as quantificações dos ácidos graxos pelo método oficial e verificou-se que os valores estavam parecidos com o do método direto. Concluiu-se que houve a degradação destes ácidos e por este motivo os valores dos ácidos graxos são bem menores que os indicativos da amostra NIST.

Tabela 3-2. Valores para ácido linoléico (LA), ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) para fórmula infantil da NIST 1849/2006 pelos dois métodos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos

Referência		Hartman e Lago		Método direto	
		Média $\pm$ desvio padrão	CV (%)	Média $\pm$ desvio padrão	CV (%)
LA	5,87	6,07 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,50	5,81 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	2,58
ALA	0,60	0,54 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,45	0,51 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	2,15
ARA	0,21	0,100 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,73	0,097 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	3,10
DHA	0,07	0,024 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	1,34	0,021 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	7,29

Análise em triplicata; médias seguidas pela mesma letra, em linha, não diferem entre si, no grupo, de acordo com teste de Student ( $p < 0,05$ ); CV: coeficiente de variação. Extração e quantificação dos ácidos graxos pelo método oficial, Roese Gottlieb.

De acordo com os valores expostos na Tabela 3-2, pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa para todos os ácidos graxos, mostrando que os métodos foram equivalentes. O método descrito por Hartman e Lago (1973) e modificado por Maia e Amaya-Rodrigues (1993) foi que demonstrou os menores coeficientes de variação, e os maiores teores de ácidos graxos. Neste método emprega-se catálise mista, em condições amenas de temperatura, o que garante a esterificação dos ácidos graxos ligados ao glicerol (mono, di triacilgliceróis e fosfolipídios), além dos ácidos graxos livres. Adicionalmente este método pode contribuir para a liberação dos ácidos graxos micro encapsulados. Por outro lado, no método direto que emprega catálise básica pode não ocorrer a quebra das micro-cápsulas e os ácidos graxos livres não são suscetíveis ao ataque nucleofílico de álcoois ou bases (BOBBIO; BOBBIO, 2003; CURRTIS; BERRIGAN; DAUPHINEE, 2008). O método direto revelou os menores resultados e coeficientes de variação maiores que o método de Hartman e Lago. Uma atenção maior deve ser dada a este método com o intuito de otimizar as condições analíticas, uma vez que tal método é rápido e econômico.

### **3.5.3. Quantificação dos ácidos graxos polinsaturados da amostra da NIST 1849/2006**

Na Tabela 3-2 estão presentes os valores dos ácidos graxos LA, ALA, ARA e DHA da amostra da NIST 1849/2006 obtidos pelos dois métodos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos. Os cálculos foram realizados utilizando o padrão interno de EMAG 23:0 e fator teórico de resposta de correção do DIC em relação ao próprio padrão interno. No caso da



metodologia convencional foi utilizada a equação 3 e para o método direto a equação 4, como descrito por Kus, Aued-Pimentel e Mancini-Filho (2009). A metodologia direta adaptada de Golay et al. (2006) (metilação *in situ*) e cálculo dos lipídios a partir da quantificação dos AG por CG/DIC revelou resultados comparáveis ao método convencional empregado no laboratório, entretanto, os valores de desvio padrão ainda são mais altos que do método convencional (determinação gravimétrica por Roesse Gottlieb e metilação por Hartman e Lago).

Métodos em condições mais brandas, como Roesse Gottlieb (1972) não afetaram a composição dos ácidos graxos polinsaturados. Apesar de diminuir o tempo de análise a metodologia direta ainda requer um aprofundamento do conhecimento e controle das variáveis experimentais para poder ser utilizada com segurança nas análises de rotina das fórmulas infantis.

### **3.6.Conclusões**

O método direto (metilação *in situ* e cálculo dos lipídios a partir da quantificação dos AG por CG/DIC), para quantificação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil revelou resultados comparáveis com o método convencional (extração gravimétrica por Roesse Gottlieb e metilação da gordura extraída) empregado para este alimento. O método direto é promissor para as análises de rotina, pois diminui o tempo de análise sendo que em uma etapa pode-se obter o valor de lipídios totais e de ácidos graxos. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para a otimização de algumas variáveis, como tipo de reagente, quantidade de amostra, tempo/temperatura

de reação, quantidade e concentração dos reagentes para melhorar o desempenho do método na matriz estudada.

### **3.7.Referências Bibliográficas**

ABDULKADIR, S.; TSUCHIYA, M. One-step method for quantification and qualitative analysis of fatty acids in marine animal samples. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 354, p. 1-8, 2008.

ACKMAN, R.G.; SIPOS, J.C. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detector. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.41, p.377-378, 1964.

ADRIAN, J.; POTUS, J.; POIFFAIT, A.; DAUVILLIER P. Análisis nutricional de los alimentos. Métodos físico químicos generales. Zaragoza: Editorial Acribia, SA; 2000.

AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios**. São Paulo, 2007. 230p. Tese de Doutorado – Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

BANNON, C.D.; GRASKE, J.D.; HILLKER, A.E. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability: Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 63, p. 105-110, 1986.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Lipídios. In: Introdução à Química de Alimentos. São Paulo:Varela; 2003. p. 139 -174.

CARPENTER, D.M.; NGEH-NGWAINBI. J.; LEE, S., Lipid Analysis. In: CARPENTER, D.E.; SULLIVAN, D.M.; eds. Methods of analysis for nutritional labeling. Arlington: AOAC International; 1993. cap. 5, p 85-104.

CARRAPISO, A.I.; GARCIA, C. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ tranesterification. **Lipids**, n. 35, p. 1167-77, 2000.

CHRISTIE, W.W. Preparation of esters derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: Advances in lipid methodology – two, p.69-111, 1993. Disponível em: <http://www.lipid.co.uk/infores/topics/methests/index.htm>. Acessado em: 5 out. 2006.

CURRTIS, J. M.; BERRIGAN, N.; DAUPHINEE, P. The determination of n-3 fatty acid levels in food products containing microencapsulated fish oil using the one-step extraction method. Part 1: measurement in the raw ingredient and dry powdered foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 297-305, 2008.

GOLAY, P. A.; DIONISI, F.; HUG, B.; et al. Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acids content. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1115-1120, 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 8, p. 475-97, 1973.

HIRAYAMA, K.B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES-NETO, U., Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. **The electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Disease**, v. 10, n.3, p. 1-10, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4.ed., Brasília: ANVISA, 2005.

KRAMER, J. K. G.; BLACKADAR, C. B.; ZHOU, J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. **Lipids**, v.37, n.8, p.823-835, 2002.

KUS, M. M. M.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Comparação de metodologias analíticas na determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n.1, 2009 (On line).

MAIA, E.L.; RODRIGUES-AMAYA, D.B.R. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, n.1/2, p. 27-35, 1993.

MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. **Lipids**, v. 42, p. 483-490, 2007.

O'FALLON, J.V.; BUSBOOM, J. R.; NELSON, M. L.; GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1511-1521, 2007.

OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AOCS. 5. ed., Champaign: American Oil Chemists' Society, 2004.

OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AOCS. 6. ed., 2009. Disponível em: <http://www.aocs.org/tech/methods.cfm>. Acessado em: 20 nov. 2008.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC. 18. ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.

SCHREINER, M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography: Evaluation of factors affecting accuracy. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p. 126-130, 2005.

WANG, Y.; SUNWOO, H.; CHERIAN, G.; SIM, J. S. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. **Poultry Science**, v. 79, p. 1168-1171, 2000.

## Capítulo 4. Comparação dos teores de lipídios e ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis comerciais com os valores preconizados pela legislação brasileira e o Codex Alimentarius

---

(Artigo enviado para International Dairy Journal)

### 4.1. Resumo

A portaria brasileira nº 977 (1998) e o *Codex Alimentarius* stan-72 (2007) preconizam valores de lipídios e ácidos graxos para fórmula infantil. O trabalho quantificou os teores lipídios e ácidos graxos polinsaturados nestes alimentos e comparou-os com as recomendações. Foram utilizadas 14 fórmulas infantis. A extração e quantificação dos lipídios foram feitas por Roese Gottlieb, metilação por Hartman e Lago, análise dos ácidos graxos por cromatografia gasosa e quantificação com padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0. Todas as fórmulas infantis estavam em desacordo com a Portaria nº 977 (1998) e/ou *Codex Alimentarius* stan-72 (2007), em pelo menos um dos parâmetros analisados.

**Palavras chaves:** legislação, lipídios, ácidos graxos polinsaturados, fórmula infantil.

## **Comparison of the lipids and polyunsaturated fatty acids contents in commercial infant formulas with the values praised for the Brazilian legislation and the Codex Alimentarius**

### **4.2. Abstract**

Brazilian's legislation nº977 (1998) and Codex Alimentarius stan-72 (2007) would values of fatty acids and lipids for infant formula. This work had the quantification of lipids and polyunsaturated fatty acids in this food, and compared with the recommendations. Fourteen samples of infant formula had been analyzed. The extraction and quantification of the lipids had been made by Roese Gottlieb, methylation for Hartman and Lago, analysis of fatty acids for gas chromatography and the quantification with internal standard 23:0. Of 14 samples analyzed, in at least a parameter they were in disagreement with Brazilian's legislation nº 997 (1998) and/or *Codex Alimentarius* stan-72 (2007).

**Keys words:** legislation, lipids, polyunsaturated fatty acid, infant formula

### **4.3. Introdução**

Os ácidos graxos essenciais (AGE) compõem uma classe de moléculas que não podem ser geradas pelo organismo, mas que são necessárias ao seu funcionamento. Esta deficiência ocorre devido à carência de enzimas as quais são capazes de inserir ligação dupla entre os carbonos 3-4 e 6-7 (dessaturases) dos ácidos graxos ou removê-las (hidrogenases). Os AGE linoléico (LA, 18:2  $\omega$ -6) e o  $\alpha$ -linolênico (ALA, 18:3  $\omega$ -3) são sintetizados, exclusivamente, pelo reino vegetal. A ausência de tais nutrientes na dieta está associada a síndromes que podem levar à morte. (POMPÉIA, 2002; VAZ et al., 2006).

Os AGE podem ser modificados pelos mamíferos, com alongamento da cadeia, inserção de insaturações e descarboxilação de pares da cadeia, originando os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL). Entretanto há uma competição das famílias  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9 por estas enzimas. A existência de tais competições interfere no metabolismo dos AGE. O excesso do LA pode reduzir a síntese de metabólitos do ALA, como o ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5  $\omega$ -3). Os produtos do metabolismo (elongação e desaturação) dos AGE serão sempre da mesma família desses substratos. Portanto o EPA e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6  $\omega$ -3) são produtos do metabolismo do ALA, assim como o ácido araquidônico (ARA, 20:4  $\omega$ -6) é o produto do metabolismo do LA (VERLENGUIA; LIMA, 2002; HIRAYAMA; SPERIDIÃO; FAGUNDES-NETO, 2006).

Os AGPI-CL possuem diversos papéis metabólicos e fisiológicos. São componentes estruturais de membranas, podendo modificar sua fluidez e influenciar na transdução de sinal pelo balanço da síntese de eicosanóides e afetar a transcrição gênica (CARVER, 2003).

O lactente não tem a capacidade de sintetizar AGPI-CL através de seus precursores, devido à imaturidade hepática, tendo sua necessidade suprida pelo leite materno. O leite materno apresenta três vezes mais ARA e DHA que o leite de vaca, sendo que o segundo não atende as necessidades do lactente. Porém quando a prática da amamentação é impossibilitada, o uso de fórmula infantil (FI) aparece como uma alternativa para a alimentação do bebê. Apesar do avanço no processo tecnológico, as FIs ainda apresentam grandes diferenças na composição quando comparadas ao leite materno. Com o intuito de estreitar essa diferença a partir de 2002, nos Estados Unidos, as FI estão



sendo suplementadas com AGPI-CL. No Brasil, as FI começaram a ser comercializadas com AGPI-CL no início de 2008. (CARVER, 2003; BRASIL ALIMENTOS ON LINE, 2007)

Os AGPI-CL são essenciais em prematuros com pouca reserva lipídica. Devido à limitada reserva calórica, os prematuros deverão mobilizar parte desses ácidos graxos para atender suas necessidades quando o aporte exógeno for inadequado. Além disso, os prematuros têm um prejuízo nutricional, pois não recebem o suplemento intra-uterino de ARA nem de DHA da última fase gestacional. Isso poderá ocasionar transtornos, como crescimento inadequado, dermatites, aumento de susceptibilidade de infecções, entre outras (KOLETZKO et al., 2003; SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007).

ARA e DHA são os principais componentes da membrana fosfolipídica das células do sistema nervoso central. AGPI-CL são rapidamente absorvidos no cérebro durante o seu período de desenvolvimento, que compreende o último trimestre de gravidez até aproximadamente 2 anos de idade; esses AGs atuam sobre crescimento, funcionalidade e integridade do cérebro, portanto uma inadequada suplementação de micronutrientes essenciais nesse período pode comprometer a função cerebral durante a toda vida (CARVER, 2003; AUESTAD et al., 2006; HIRAYAMA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007) .

Na retina encontram-se elevadas concentrações de DHA, cerca de 22-33% do total de ácidos graxos, adquiridos, principalmente, no último trimestre da gravidez. ARA por sua vez está em maior quantidade no fosfatidilinositol e sua concentração diminui com o amadurecimento da retina. O DHA atua nas membranas dos cones e bastonetes, conferindo a fluidez necessária para que

ocorra o processo de transdução do sinal luminoso (fotoexcitação da rodopsina) e sua conversão em sinal elétrico, que é posteriormente processado pelo cérebro. (FREITAS e KIETZER, 2002; SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007).

O balanço das séries  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 é importante para a manutenção da saúde e desenvolvimento normal. Com o aumento do consumo de  $\omega$ -6 nas dietas ocidentais, o produto do metabolismo do ARA, ou seja, os eicosanóides, são formados em maior quantidade que aqueles provenientes da série  $\omega$ -3, particularmente do EPA. Os eicosanóides do ARA são biologicamente ativados em pequenas quantidades, se eles forem formados em grandes proporções, contribuem para a formação de trombos e ateromas, desordens inflamatórias e alérgicas e proliferação celular. A proporção de  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 deve ser mantida em 5:1, para propiciar o equilíbrio dos eicosanóides e a formação de neurotransmissores e prostaglandinas correspondentes, fatores vitais para manter a função cerebral normal. No caso de lactentes a razão deve ser entre 5:1 a 15:1 (SIMOPOULOS; 2002; 2006)

A Portaria brasileira n° 977 (1998) do Ministério da Saúde e a Norma Codex Stan - 72 (2007) apresentam o padrão de identidade para fórmula infantil. Segundo as duas legislações:

*Considera-se Fórmula Infantil para Lactentes o produto em forma líquida ou em pó, destinado a alimentação de lactentes, sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite humano, para satisfação das necessidades nutricionais deste grupo etário. Excetuam-se as fórmulas destinadas a satisfazer necessidades dietoterápicas específicas.*

*Considera-se Fórmula Infantil de Seguimento o produto em forma líquida ou em pó utilizada como substituto do leite materno a partir do sexto mês, quando indicado, e para crianças de primeira infância.*

Vários grupos ligados à nutrição infantil têm reavaliado as recomendações. A legislação brasileira, até 2007, era muito parecida com o *Codex Alimentarius* stan 72-1981, porém em 2007 esta norma passou por uma revisão alterando e acrescentando valores de parâmetros. As propostas foram muito discutidas por um grupo internacional de especialistas da *The European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN). Koletzko et al. (2005) publicaram essas recomendações, as quais foram incorporadas pelo *Codex Alimentarius* em 2007. Na tabela 4-1 constam os valores de lipídios e ácidos graxos para fórmula infantil para lactentes, de acordo com a legislação brasileira - Portaria nº 977 (1998) e com o *Codex Alimentarius* stan 72, revisado em 2007 (2007).

Tabela 4-1. Valores de lipídios e ácidos graxos em fórmula infantil para lactentes, segundo as legislações e recomendações.

	Organização	Valor mínimo	Valor máximo
Gordura Total (g/100 kcal)	Legislação brasileira (1998)	3,3	6,0
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	4,4	6,0
Ácido linoléico (mg/100 kcal)	Legislação brasileira (1998)	300	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	300	-
Ácido $\alpha$ -linolênico (mg/100 kcal)	Legislação brasileira (1998)	-	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	50	-
Razão (linoléico/ $\alpha$ - linolênico)	Legislação brasileira (1998)	-	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	5:1	15:1
Ácido docosahexaenóico (DHA)	Legislação brasileira (1998)	-	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (2007)	-	0,5 % do total de ácidos graxos.

O *Codex Alimentarius* (2007) e a ESPHGAN (2005), também fixaram valores para a soma de ácido láurico e mirístico que não deve ultrapassar 20% do total de gordura, por estes ácidos graxos terem um possível efeito aterogênico, aumentando o acúmulo de gordura nas paredes das artérias. A soma de ácidos graxos *trans* deve ser inferior a 3% da gordura total e de ácido erúxico menor que 1% do total de gordura. No caso, da utilização de suplementação como a adição de ácido docosahexaenóico (DHA), ácido

araquidônico (ARA) e ácido eicosapentaenóico (EPA), os dois últimos devem ter quantidades inferiores que a de DHA (KOLETZKO et al., 2005).

A regulamentação para a fórmula infantil (FI) de seguimento, no Brasil, segue os mesmos valores que as FI para lactentes, com exceção no valor mínimo de gordura total de 3 g/100 kcal (BRASIL, 1998). Nas outras legislações não se encontra essa diferenciação, pois *lactente* é a criança de zero a doze meses de idade e a criança de primeira infância possui uma alimentação ampla, não tendo a necessidade de ser alimentada apenas com leite (BRASIL, 1998; CODEX ALIMENTARIUS, 2007)

Este trabalho teve como objetivo quantificar os teores de gordura total e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil comercializadas no estado de São Paulo e avaliá-los quanto aos valores preconizada pela Legislação Brasileira Portaria nº 977 (1998) e pela norma do *Codex Alimentarius* stan 72-1981 (2007).

#### **4.4. Material e Métodos**

##### **4.4.1. Material**

###### *4.4.1.1. Amostras*

Foram analisadas 14 amostras de fórmulas infantis (FI), sendo 7 de fórmulas infantis comerciais recomendadas para lactentes de 0 a 6 meses (*FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13*), 5 de fórmulas infantis de seguimento recomendadas para lactentes de 6 a 12 meses (*FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14*) e 2 de fórmulas infantis para lactentes prematuros (*FI 9 e FI 10*). Todas as fórmulas infantis analisadas eram à base de leite de vaca. De acordo com o

fabricante, as amostras *FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13* continham ARA e DHA e a amostra *FI 14* continha apenas DHA. As fórmulas infantis estudadas foram obtidas do comércio do Estado de São Paulo e fabricadas no Brasil, México, Holanda e Argentina. As FIs apresentavam diversas fontes de lipídios, sendo, principalmente: leite desnatado, oleína de palma, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de coco, óleo de canola, óleo de milho, óleo de peixe, entre outros.

#### *4.4.1.2. Reagentes e padrões.*

Os solventes e reagentes utilizados para as etapas de extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram de grau analítico: éter de petróleo, éter etílico, etanol a 95%, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de sódio e hidróxido de sódio. Foram também utilizados os seguintes solventes de grau cromatográfico: n-hexano e metanol.

Foram utilizados dois padrões cromatográficos de éster metílico de ácido graxo 13:0 e 23:0, marca Sigma com grau de pureza de 99%.

Para identificar os componentes foram utilizados: uma mistura com quantidades certificadas de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4:0 a 24:0, marca Supelco; uma de ésteres metílicos de ácidos graxos dos isômeros *cis-trans* do ácido linoléico (18:2) e ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3); e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos individuais, sendo: elaídico (18:1 9t); vacênico (18:1 11c); *trans* vacênico (18:1 11t); (18:1 7c); (18:1 12c); CLA (18:2 9c,11t e 18:2 10t,12c); palmitoelaídico (16:1 9t), palmitico (16:0); linolelaídico (18:2 9t,12t); EPA (20:5 5c,8c,11c,14c,17c); araquidônico (20:4 5c,8c,11c,14c); docosaheptaenóico (20:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c), todos da marca Sigma.

#### **4.4.2. Métodos**

##### *4.4.2.1. Determinação dos lipídios e ácidos graxos polinsaturados*

A extração e quantificação dos lipídios das amostras de fórmula infantil foram realizadas de acordo com Roese Gottlieb (1972), método oficial para este tipo de alimento segundo o compêndio de métodos da Association of Official Analytical Chemistry - AOAC (2005). A derivatização dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada segundo Hartman e Lago (1973) modificado por Maia e Amaya-Rodrigues (1993). Os ésteres metílicos foram separados em coluna de sílica fundida (SP 2560) de 100m, instalada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama (CG/DIC) da marca Shimadzu e modelo 17A; em condições de temperatura e pressão descritas por Kramer; Blackadar e Zhou (2002): temperatura do injetor e detector: 250°C; fluxo – 1,90mL/min; rampa de temperatura: 45°C (1 min); 13°C/min até 175°C; 4°C/min até 215°C por 35 min; gás de arraste: hidrogênio; pressão na coluna: 175 kPa; razão de divisão da amostra 1:15. Os componentes separados foram identificados pela co-injeção de padrões e comparações com os tempos de retenção absolutos e relativos ao padrão interno. A quantificação dos ácidos graxos polinsaturados foi feita com a adição de padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0 e fatores de correção de resposta teóricos do detector de ionização em chama em relação ao próprio padrão interno, de acordo com metodologia proposta por Kus, Aued-Pimentel, Mancini-Filho, (2009).

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e apresentadas como média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.5.Resultados e Discussão**

Na tabela 4-2 estão presentes os teores para lipídios, ácido linoléico (LA), ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) para as amostras de fórmulas infantis comerciais.



Tabela 4-2. Valores de lipídios, ácido linoléico (LA), ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) para as amostras de fórmulas infantis comerciais.

Amostras	Lipídios (g /100 kcal)	LA (mg /100 kcal)	ALA (mg /100 kcal)	ARA (% em AG)	DHA (% em AG)
<i>FI 1</i>	3,02 $\pm$ 0,09	530 $\pm$ 22	53 $\pm$ 1	0,545 $\pm$ 0,005	0,270 $\pm$ 0,004
<i>FI 2</i>	2,27 $\pm$ 0,09	440 $\pm$ 36	42 $\pm$ 4	0,665 $\pm$ 0,039	0,320 $\pm$ 0,009
<i>FI 3</i>	2,18 $\pm$ 0,13	366 $\pm$ 26	43 $\pm$ 3	-	-
<i>FI 4</i>	2,23 $\pm$ 0,04	578 $\pm$ 11	36 $\pm$ 1	-	-
<i>FI 5</i>	1,86 $\pm$ 0,03	576 $\pm$ 22	31 $\pm$ 2	-	-
<i>FI 6</i>	2,71 $\pm$ 0,05	403 $\pm$ 37	40 $\pm$ 1	-	-
<i>FI 7</i>	2,23 $\pm$ 0,10	315 $\pm$ 10	33 $\pm$ 1	-	-
<i>FI 8</i>	2,15 $\pm$ 0,11	334 $\pm$ 22	38 $\pm$ 2	-	-
<i>FI 9</i>	2,26 $\pm$ 0,09	427 $\pm$ 3	34 $\pm$ 1	0,122 $\pm$ 0,005	0,307 $\pm$ 0,077
<i>FI 10</i>	2,74 $\pm$ 0,08	319 $\pm$ 6	34 $\pm$ 2	0,382 $\pm$ 0,008	0,287 $\pm$ 0,002
<i>FI 11</i>	2,49 $\pm$ 0,07	424 $\pm$ 34	45 $\pm$ 2	-	-
<i>FI 12</i>	1,86 $\pm$ 0,03	280 $\pm$ 32	8 $\pm$ 1	-	-
<i>FI 13</i>	2,74 $\pm$ 0,09	408 $\pm$ 37	41 $\pm$ 4	0,180 $\pm$ 0,002	0,179 $\pm$ 0,002
<i>FI 14</i>	2,14 $\pm$ 0,11	317 $\pm$ 4	37 $\pm$ 1	-	0,153 $\pm$ 0,004

Média  $\pm$  desvio padrão (triplicata);AG: ácidos graxos *FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13* fórmulas infantis recomendadas de 0 a 6 meses; *FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14* fórmulas infantis de seguimento recomendadas de 6 a 12 meses; *FI 9 e FI 10* fórmulas infantis recomendadas para *prematuro*. Mahyara arrumar o número de algarismos significativos.

As recomendações de valores de micro- e macro-nutrientes para as FIs são baseadas na composição do leite humano materno (EUROPEAN COMMISSION, 2003; KOLETZKO et al., 2005).

Dentre as FIs analisadas, tanto de 0 a 6 meses, como as de seguimento de 6 a 12 meses, apenas duas (*FI 1* e *FI 13*) apresentaram valores de lipídios próximos com o preconizado pela legislação brasileira, ou seja, no mínimo de 3,3 g de lipídios/100 kcal ou de 3,0 g lipídios /100 kcal para as fórmulas de 0 a 6 meses e de seguimento (6 a 12 meses), respectivamente, e no máximo de 6,0 g/100 kcal para ambas. Quanto aos valores recomendados pelo *Codex Alimentarius* (2007), mínimo de 4,4 g/100 kcal e máximo igual à legislação brasileira, nenhuma FI apresentou lipídios totais dentro da faixa ou próximo. Os lipídios são a principal fonte de energia para os lactentes, e o conteúdo recomendado equivale a aproximadamente 40-54% do total da energia para as FI de 0 a 6 meses e 30-59% para as FI de seguimento. Estes valores de lipídios são necessários para um adequado aporte energético e para manter o equilíbrio osmótico e metabólico do organismo infantil (EUROPEAN COMMISSION, 2003; KOLETZKO et al., 2005).

Quanto ao valor de LA, todas as FIs revelaram valores dentro dos recomendados tanto pela Portaria nº 977 (1998) e norma *Codex* (2007), ou seja valores superiores a 300 mg/100 kcal (300 mg de LA por 100 kcal de amostra). Seis apenas apresentaram valores no limite inferior estabelecido. O *Codex Alimentarius* estabeleceu limite máximo (1200 mg LA/100 kcal), pois a alta ingestão de LA pode induzir efeitos metabólicos indesejáveis no metabolismo de lipoproteínas, função imune, balanço dos eicosanóides e estresse oxidativo (KOLETZKO et al., 2005). Riva et al. (2007) em estudo com

16 FIs verificaram que os valores de LA estavam de acordo com o recomendado pela União Européia, valores estes iguais ao do *Codex Alimentarius*.

A legislação brasileira, Portaria nº 977 (1998), contempla apenas valores recomendados de lipídios e LA para fórmula infantil. Desta forma, os demais parâmetros avaliados no presente trabalho, quanto aos AGPI, foram de acordo com a norma *Codex stan-72* (2007).

Das 14 FIs analisadas, apenas uma teve valor de ALA, acima do recomendado de 50 mg/100 kcal (50 mg de ALA por 100 kcal de amostra), as demais revelaram valores até 75% menores que o preconizado. O ALA é um ácido graxo indispensável, pois é precursor da síntese de DHA e seu valor mínimo é importante para o desenvolvimento infantil (KOLETZKO et al., 2005). Estudo realizado por Straarup et al. (2006), na Dinamarca, demonstrou que apenas quatro das 28 FIs analisadas encontravam-se com níveis superiores de ALA ao mínimo preconizado pela legislação daquele país. O valor máximo de ALA é regulado pela razão de LA/ALA; estes dados para as FIs comerciais estão presente na Figura 4-1.

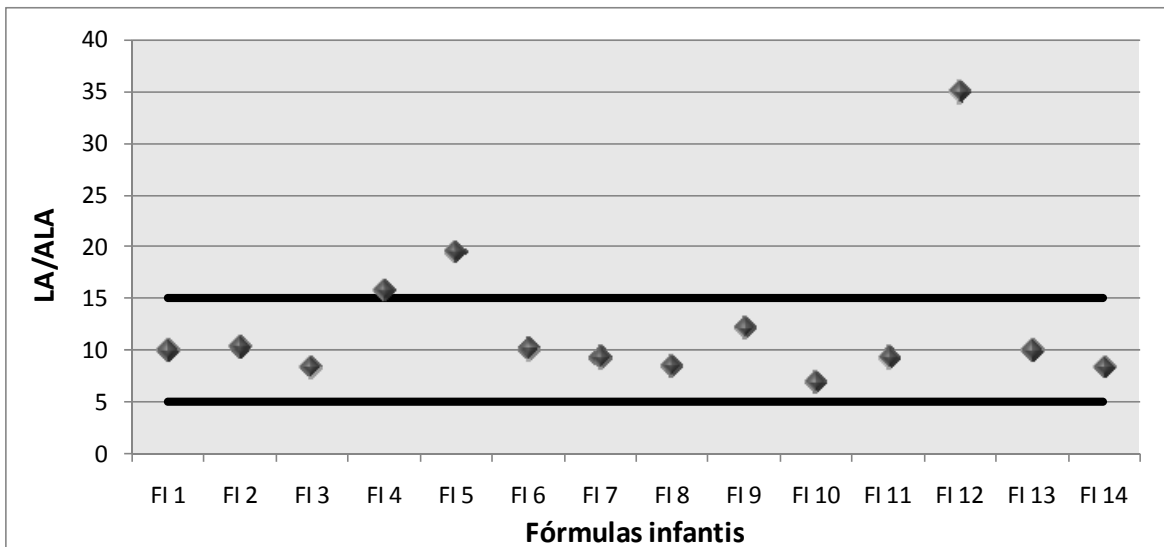


Figura 4-1. Razão de LA/ALA analisada nas fórmulas infantis comerciais comparados com limites do *Codex Alimentarius* stan-72 (2007).  $\diamond$ : LA/ALA; — limites preconizados pelo *Codex Alimentarius*.

Valores para a razão dos ácidos LA/ALA têm sido recomendados, tendo em vista um balanço harmônico entre os ácidos graxos das séries  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, os quais resultam nos eicosanóides. A implementação dessa razão também teve o objetivo de limitar o valor de ALA nas FIs, uma vez que altos teores de ALA podem aumentar o risco de peroxidação lipídica, levar a formação de produtos de rancificação e a efeitos adversos na estabilidade do produto (EUROPEAN COMMISSION, 2003; KOLETZKO et al., 2005).

Nas FIs analisadas, uma de 0 a 6 meses (FI 4) demonstrou valor acima da razão de LA/ALA recomendado, e duas (FI 5 e FI 12) para as FIs de seguimento. Straarup et al. (2006), verificaram comportamento similar, duas FI apresentaram razão de 17:1 e 55:1 de LA/ALA. Entretanto, Riva et al. (2007) não obtiveram valores fora do recomendado, uma vez que apenas realizaram a análise da informação nutricional. Estudos recentes alertam que a alta

concentração de LA inibe a síntese de DHA a partir do ALA (STRAARUP et al., 2006).

Quanto aos AGPI-CL, os predominantes no leite materno são ARA e DHA, sendo que estes ácidos graxos são metabólitos com efeitos diferenciados. Exercem, muitas vezes, funções contraditórias no metabolismo de eicosanóides, na função imune e na fisiologia das membranas. O ácido eicosapentênico (EPA) é encontrado em menor proporção no leite materno e em tecidos infantis, porém é um metabólito competidor direto do ARA (EUROPEAN COMMISSION, 2003; KOLETZKO et al., 2005). De acordo com o *Codex Alimentarius* stan-72 (2007), quando a FI for suplementada com AGPI-CL, deve conter no máximo 0,5% em ácido graxo de DHA e valor semelhante para ARA. Caso ocorra suplementação de EPA não deve ultrapassar o valor de DHA.

Dentre as 14 amostras comerciais apenas 5 (*FI 1, FI 2, FI 9, FI 10 e FI 13*) eram suplementadas, destas, três (60%) – *FI 1, FI 2 e FI 10* – apresentaram valor de ARA maior que de DHA; uma (*FI 9*) valores de ARA menor que DHA e apenas uma (*FI 13*) valores bem parecidos para os dois AGPI-CL, o que é o recomendado. A amostra *FI 14* foi suplementada apenas com DHA, e o teor aproximado de 0,15 % de DHA em ácidos graxos está de acordo com a recomendação do *Codex Alimentarius*.

Portanto das 14 FIs analisadas quanto ao teor de lipídios, LA, ALA, LA/ALA, ARA e DHA segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1998) e a norma do *Codex Alimentarius* stan-72 (2007), todas apresentaram pelo menos um analito fora das recomendações. A tabela 4-3 demonstra a quantidade de FIs

em acordo e desacordo com a Portaria nº977 (1998) e o *Codex Alimentarius* stan-72 (2007) para os parâmetros analisados.

Tabela 4-3. Quantidade de fórmulas infantis em acordo e desacordo com a Portaria nº 997 e o *Codex Alimentarius* stan-72 (2007), segundo os teores de lipídios, ácido linoléico (LA), ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA), ácido docosahexaenóico (DHA) e a razão ácido linoléico/ácido  $\alpha$ -linolênico (LA/ALA).

Parâmetro	Total	Acordo	Desacordo
Lipídios	14	<b>0</b>	<b>14</b>
Ácido linoléico	14	<b>14</b>	<b>0</b>
Ácido $\alpha$ -linolênico	14	<b>1</b>	<b>13</b>
Ácido araquidônico	5	<b>2</b>	<b>3</b>
Ácido docosahexaenóico	6	<b>6</b>	<b>0</b>
Razão (LA/ALA)	14	<b>9</b>	<b>3</b>

Apesar de o leite materno ser o melhor alimento para o recém-nascido, o uso de fórmula infantil é uma realidade em nosso país, e a fiscalização quanto aos teores nutricionais, não apenas dos componentes lipídicos, deste alimento deve ser intensificada, uma vez que o desenvolvimento infantil depende, nesse período da vida, predominantemente da alimentação por meio dos alimentos citados.

#### **4.6. Conclusões**

A legislação brasileira de identidade das fórmulas infantis em vigor deve ser submetida a uma revisão, pois apenas contempla valores para lipídios e ácido linoléico. Outros componentes lipídicos também são importantes para o desenvolvimento infantil e devem ter valores preconizados (conforme norma

Codex stan -72), uma vez que 100% das fórmulas infantis comercializadas no estado de São Paulo e analisadas no presente estudo estão em desacordo quanto aos teores dos lipídios e ácidos graxos polinsaturados. As fórmulas infantis comerciais devem ser monitoradas continuamente quanto ao teor de lipídios e ácidos graxos preconizados na legislação, além de outros componentes, uma vez que o uso destes produtos é freqüente e sua qualidade nutricional pode influenciar o desenvolvimento infantil.

#### **4.7.Referências Bibliográficas**

AUESTAD, N.; SCOTT, D.T.; JANOWSKY, J.S.; JACOBSEN, C.; CARROLL, R.B.; et al., Visual, cognitive and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. **Pediatrics**, v.112, n.3, p.177-183, 2003.

BRASIL ALIMENTOS ON LINE. **Fórmulas Infantis: Nestlé constrói fabrica de R\$100 milhões em São Paulo.** v. 318, 2007. Disponível em: <http://www.brasilalimentos.com.br/default.asp?numero=318>. Acessado em: 24 nov. 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998.** Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento, 1998.

CARVER, J.D. Advances in nutritional modifications of infant formulas. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p. 1550S-1554S, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. JOINT FAO/WHO **Food standards programme. Codex standard for infant formula – Codex Stan 72 1981,** revisado em 2007.

EUROPEAN COMMISSION: Committee on food on the revision. **Report of the scientific committee on food on the revision of essential requirements of infant formula and follow-on formula.** SCF/CS/NUT/IF/65.FINAL, 2003.

Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/X7839E/x7839e0r.htm>.

Acessado em: 28 ago. 2006.

FREITAS, J. J. S.; KIETZER, K. S. **Ácidos graxos e Sistema Nervoso.** In CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., eds. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 34, p.467-488.

HARTMAN, L.; LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 8, p. 475-97, 1973.

HIRAYAMA, K.B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES-NETO, U., Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. **The electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Disease**, v. 10, n.3, p. 1-10, 2006.

KOLETZKO, B. et al., Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESGHAN Coordinated International Expert Group. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.41, p. 584-599, 2005.

KOLETZKO, B.; SAUERWALD, U.; KEICHER, U.; SAULE, H., et al. Fatty acid profiles, antioxidant status, and growth of preterm infants fed diets without or with long-chain polyunsaturated fatty acids. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 42, p. 243-253, 2003.

KRAMER, J. K. G.; BLACKADAR, C. B.; ZHOU, J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. **Lipids**, v.37, n.8, p.823-835, 2002.



KUS, M. M. M.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Comparação de metodologias analíticas na determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n.1, 2009 (Em prelo).

MAIA, E.L.; RODRIGUES-AMAYA, D.B.R. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, n.1/2, p. 27-35, 1993.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC. 18. ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.

POMPÉIA, C., **Essencialidade dos Ácidos Graxos**. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., eds. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 3, p.25-32.

RIVA, E.; VERDUCI, E.; AGOSTINI, C.; GIOVANNINI, M. Comparison of the nutritional values of follow-on formulae available in Italy. **The Journal of International Medical Research**, v.35, p.20-37, 2007.

SILVA, D. R. B.; MIRANDA-JÚNIOR, P. F.; SOARES, E. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.7, n.2, p. 123-133, 2007.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365-379, 2002.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 60, p. 502-507, 2006.

STRAARUP, E. M.; LAURITZEN, L.; FAERK, J.; et al. The stereospecific triacylglycerol structures and fatty acid profiles of human milk and infant formulas. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 42, p. 293-299, 2006.

VAZ, J.S. et al., Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p. 498-500, 2006.

VERLENGIA, R.; LIMA, T. M., **Síntese de Ácidos Graxos**. In CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., eds. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 11, p.121-134.

## **Capítulo 5. Informação nutricional das fórmulas infantis: avaliação dos teores de lipídios e ácidos graxos**

---

**(Artigo enviado para Revista de Nutrição da PUCAMP)**

### **5.1. Resumo**

A informação nutricional dos nutrientes é uma das estratégias que possibilita ao consumidor a escolha de produtos saudáveis e de acordo com a sua necessidade. No Brasil, a resolução RDC nº360, regulamenta sobre os dizeres de rotulagem e informação nutricional dos alimentos embalados. Fórmulas infantis são substitutas do leite materno, e tem suas recomendações baseada neste tipo de leite. Este trabalho teve como objetivo a avaliação da informação nutricional das fórmulas infantis quanto aos teores de lipídios e ácidos graxos. Foram avaliadas 14 amostras de fórmulas infantis comercializadas no estado de São Paulo. Destas, apenas uma fórmula infantil apresentou todos os valores de acordo com a informação nutricional apresentada pelo fabricante, considerando a variação da legislação de 20%.

**Palavras chave:** informação nutricional, lipídeos, ácidos graxos, fórmula infantil.

**Labeling nutritional in the infant formula:: evaluation in the lipids  
and fatty acids content**

### **5.2. Abstract**

The nutritional labeling of the nutrients is the strategies for the choice of healthful and appropriated products to the consumer. In Brazil, resolution RDC

nº 360, regulates on nutritional labeling to them packed foods. Infant formulas are substitute of maternal milk, and have its recommendations based in this milk. This work had as objective the evaluation lipids and fatty acids content of the nutritional labeling in infant formula. Fourteen different infant formula samples had been analyzed. These foods analyzed, only one infant formula presented all the values in agreement with nutritional labeling presented by the manufacturer, considering the variation of the legislation of  $\pm 20\%$ .

**Key words:** labeling nutritional, fatty acids, lipids, infant formula

### 5.3.Introdução

Os ácidos graxos essenciais (AGE) compõem uma classe de moléculas que não podem ser geradas pelo organismo, devido à carência de enzimas dessaturases e hidrogenases. A ausência de tais nutrientes na dieta está associada a síndromes que podem levar à morte. Os ácidos essenciais linoléico (LA, 18:2  $\omega$ -6) e  $\alpha$ -linolênico (ALA,  $\omega$ -3), são sintetizados exclusivamente, pelo reino vegetal (POMPÉIA, 2002; VAZ et al., 2006). Estes AGE podem ser modificados pelos mamíferos, com alongamento da cadeia, inserção de insaturações e descarboxilação de pares da cadeia, originando os ácidos graxos de cadeia longa (AGPI-CL). Sendo o ácido eicosapentanóico (EPA – 20:5,  $\omega$ -3) e ácido docosahexaenóico (DHA - 22:6,  $\omega$ -3) produtos do metabolismo do ALA e o ácido araquidônico (ARA – 20:4,  $\omega$ -6) do metabolismo do LA (HIRAYAMA; SPERIDIÃO; FAGUNDES-NETO, 2006).

O ARA, EPA e DHA são precursores da síntese de eicosanóides. Os produzidos pelos ácidos graxos (AG)  $\omega$ -6 são mediadores bioquímicos

potentes envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária. Por outro lado, eicosanóides produzidos a partir da série  $\omega$ -3 atuam no processo antiinflamatório e não inibiriam o sistema imune (HIRAYAMA; SPERIDIÃO; FAGUNDES-NETO, 2006; LUNN e THEOBALD, 2006).

O lactente não tem a capacidade de sintetizar os AGPI-CL através de seus precursores, devido à imaturidade hepática, tendo sua necessidade suprida pelo leite materno (KOLETZKO et al., 2003; SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007).

ARA e DHA são os principais componentes da membrana fosfolipídica das células do sistema nervoso central. Os AGPI-CL são rapidamente absorvidos no cérebro durante o seu período de desenvolvimento, que compreende o último trimestre de gravidez até aproximadamente 2 anos de idade. Embora o maior acúmulo de AGPI-CL ocorra no período pré-natal, durante o pós-natal o acúmulo também é acentuado, que se dá principalmente através da amamentação. Estes AGs atuam sobre crescimento, funcionalidade e integridade do cérebro. Portanto uma inadequada suplementação de micronutrientes essenciais nesse período pode comprometer a função cerebral durante toda a vida (CARVER, 2003; AUESTAD et al., 2006; HIRAYAMA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007).

A melhor forma de assegurar a oferta dos AGPI-CL para o lactente é através do leite materno, porém quando a prática da amamentação é impossibilitada, o uso de fórmula infantil (FI) aparece como uma alternativa para a alimentação do bebê. Apesar do avanço no processo tecnológico, as FI ainda apresentam grandes diferenças na composição quando comparadas ao

leite materno. Com o intuito de estreitar essa diferença, a partir de 2002, nos Estados Unidos, as FI passaram a ser suplementadas com AGPI-CL. No Brasil, as FI começaram a ser comercializadas com AGPI-CL no início de 2008 (CARVER, 2003; SILVA; MIRANDA-JÚNIOR; SOARES, 2007; BRASIL ALIMENTOS ON LINE, 2007).

As fórmulas infantis em países europeus e nos Estados Unidos são comercializadas em três formas: pó, líquida ou pronta para o consumo. No Brasil somente as duas primeiras opções são regulamentadas. A legislação vigente no país diferencia as fórmulas infantis em duas categorias: fórmula infantil para lactentes - o produto destinado a alimentação de lactentes, em substituição total ou parcial do leite humano, para satisfazer as suas necessidades nutricionais e fórmula infantil de seguimento - produto utilizado como substituto do leite materno a partir do sexto mês e na primeira infância (BRASIL, 1998; CAVER, 2003).

No Brasil, a Portaria nº 977, 05 de dezembro de 1998, publicada pela Secretaria de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde, regulamenta a identidade e qualidade das fórmulas infantis, resolvendo sobre as quantidades de cada nutriente. Por ser um alimento embalado na ausência do cliente, a RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), deve ser obedecida e, portanto, na rotulagem das fórmulas infantis deve haver a declaração na informação nutricional de gordura total, gordura saturada e *trans*, entre outros nutrientes. No caso das fórmulas infantis, de acordo com o Informe Técnico nº 36, de 27 de junho de 2008, da ANVISA, a informação nutricional deve ser declarada por 100 g/100 mL do alimento quando exposto à venda. Adicionalmente, pode-se declarar a

informação nutricional por 100 mL e/ou por 100 kcal do alimento pronto para o consumo. Portanto, não há a necessidade de indicação da porção e do valor diário recomendado (% VD) (BRASIL, 1998; 2003; 2008).

A norma *Codex stan 72* (2007) exige a declaração na informação nutricional das fórmulas infantis, além da gordura total, dos ácidos graxos saturados e *trans*, dos teores do ácido linoléico e ácido  $\alpha$ -linolênico, entre outros nutrientes. Quando houver a adição de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, seu valor também deve ser declarado. Esta declaração, de acordo com o *Codex Alimentarius* deve ser feita por 100 g/100 mL do alimento quando vendido ou preparado, seguindo as recomendações do fabricante. Na legislação brasileira não há a obrigatoriedade na declaração na informação nutricional para estes ácidos graxos, exceto quando no rótulo houver a alegação de propriedade nutricional de algum nutriente (BRASIL, 2003; CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

Este trabalho teve como objetivo comparar os teores de gordura total e ácidos graxos das fórmulas infantis, comercializadas no Estado de São Paulo, com os valores constantes na informação nutricional das mesmas.

## **5.4. Material e Métodos**

### **5.4.1. Material**

#### *5.4.1.1. Amostras*

Foram analisadas 14 amostras de fórmulas infantis (FIs), sendo 7 de fórmulas infantis comerciais recomendadas para lactentes de 0 a 6 meses (*FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13*), 5 de fórmulas infantis de seguimento

recomendadas para lactentes de 6 a 12 meses (*FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14*) e 2 de fórmulas infantis para lactentes prematuros (*FI 9 e FI 10*). Todas as fórmulas infantis analisadas eram à base de leite de vaca e as análises foram realizadas em 2008. As características destas fórmulas infantis estão presentes na tabela 5-1.



Tabela 5-1. Características das fórmulas infantis comerciais analisadas.

Amostra	Fonte de lipídios	Suplementação	País fabricante
FI 1	leite desnatado, oleína de palma, óleo e coco, óleo de soja, óleo de girassol com alto teor de oléico, mistura de ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico.	ARA e DHA	México
FI 2	leite desnatado, oleína de palma, óleo e coco, óleo de girassol com alto teor de oléico, mistura de ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico.	ARA e DHA	México
FI 3	leite de vaca desnatado, oleína de palma, óleo de canola, óleo de palmiste, óleo de milho.	-	Brasil
FI 4	leite integral, óleos de milho, canola e girassol.	-	Argentina
FI 5	leite integral, óleo de milho, leite desnatado, óleos de canola e palma.	-	Argentina
FI 6	leite de vaca desnatado, oleína de palma, óleo de palmiste, óleo de canola, óleo de milho.	-	Brasil
FI 7	leite de vaca desnatado, oleína de palma, óleo de palmiste, óleo de canola, óleo de milho.	-	Brasil
FI 8	leite desnatado, oleína de palma, óleo de canola, óleo de semente de palma, óleo de milho.	-	Brasil
FI 9	leite desnatado, oleína de palma, óleo de canola, triglicerídeos de cadeia média, óleo de semente de cassis, óleo de peixe, ácido graxo araquidônico.	AGPI-CL	Holanda
FI 10	óleos e gorduras vegetais e animais	-	Holanda
FI 11	leite desnatado, óleos de palma, coco e canola, óleo de milho.	-	Argentina
FI 12	leite integral, óleo de milho.	-	Argentina
FI 13	oleína de palma, leite desnatado, óleo de palmiste, óleo de canola, óleo de milho, óleo de peixe, ácido graxo araquidônico.	ARA e DHA	Brasil
FI 14	leite desnatado, oleína de palma, óleo de canola, óleo de palmiste, óleo de milho, óleo de peixe.	DHA	Brasil

#### 5.4.1.2. Reagentes e padrões.

Os solventes e reagentes utilizados para as etapas de extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram de grau analítico: éter de petróleo, éter etílico, etanol a 95%, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de sódio e hidróxido de sódio. Foram também utilizados os seguintes solventes de grau cromatográfico: n-hexano e metanol.

Foram utilizados dois padrões cromatográficos de éster metílico de ácido graxo 13:0 e 23:0, marca Sigma com elevado grau de pureza.

Para identificar os componentes foram utilizados: uma mistura com quantidades certificadas de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4:0 a 24:0, marca Supelco; uma de ésteres metílicos de ácidos graxos dos isômeros *cis-trans* do ácido linoléico (18:2) e ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3), marca Sigma; e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos individuais, marca Sigma, sendo: elaídico (18:1 9*t*); vacênico (18:1 11*c*); *trans* vacênico (18:1 11*t*); (18:1 7*c*); (18:1 12*c*); CLA (18:2 9*c*,11*t* e 18:2 10*t*,12*c*); palmitoelaídico (16:1 9*t*), palmitico (16:0); linolelaídico (18:2 9*t*,12*t*); EPA (20:5 5*c*,8*c*,11*c*,14*c*,17*c*); araquidônico (20:4 5*c*,8*c*,11*c*,14*c*); docosahexaenóico (22:6 4*c*,7*c*,10*c*,13*c*,16*c*,19*c*).

### 5.4.2. Métodos

#### 5.4.2.1. Determinação dos lipídios e ácidos graxos

A extração e quantificação dos lipídios das amostras de fórmula infantil foram realizadas de acordo com Roese Gottlieb (1972), método oficial para

este tipo de alimento segundo o compêndio de métodos da Association of Official Analytical Chemistry - AOAC (2005). A derivatização dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada segundo Hartman e Lago (1973) modificado por Maya e Amaya-Rodrigues (1993). Os ésteres metílicos foram separados em coluna de sílica fundida (SP 2560) de 100m, instalada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama (CG/DIC) da marca Shimadzu e modelo 17A; em condições de temperatura e pressão descritas por Kramer; Blackadar e Zhou (2002): temperatura do injetor e detector: 250 °C; fluxo – 1,90 mL/min; rampa de temperatura: 45°C (1 min); 13 °C/min até 175 °C; 4 °C/min até 215 °C por 35 min; gás de arraste: hidrogênio; pressão na coluna: 175 kPa; razão de divisão da amostra 1:15. Os componentes separados foram identificados pela co-injeção de padrões e comparações com os tempos de retenção absolutos e relativos ao padrão interno. A quantificação dos ácidos graxos foi feita com a adição de padrões interno de éster metílico de ácido graxo 23:0 e 13:0 e fatores de correção de resposta teóricos do detector de ionização em chama em relação ao próprio padrão interno, de acordo com metodologia proposta por Kus, Aued-Pimentel e Mancini-Filho (2009).

Todas as amostras foram realizadas em triplicata e apresentadas como média  $\pm$  desvio padrão.

## **5.5.Resultados e Discussão**

Na Tabela 5-2 encontram-se os valores de lipídios, ácidos graxos saturados e *trans* para as fórmulas infantis comerciais descritos na informação nutricional e analisados. Para estes analitos a informação nutricional das FIs segue a Resolução RDC nº 360 (2003). De acordo com a norma Codex stan

72-1981 (revisado em 2007), e o Informe Técnico nº 36 (2008) a declaração dos nutrientes deve ser expressa por 100 g/100 mL do produto ou, adicionalmente, de acordo com o preparo de cada produto por 100 mL, de acordo com o fabricante.

Tabela 5-2. Teores de Lipídios, ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos *trans* (AGT) nas fórmulas infantis comerciais quanto à informação nutricional e análise.

Amostras	Informação Nutricional			Resultados da análise		
	Lipídios (g)	AGS (g)	AGT (mg)	Lipídios (g)	AGS (g)	AGT (g)
<i>FI 1</i>	29	9,5	0	27,2 ± 0,8	13,1 ± 1,2	0,262 ± 0,009
<i>FI 2</i>	22	9,5	0	20,4 ± 0,8	10,0 ± 2,6	0,21 ± 0,02
<i>FI 3</i>	23	9,2	0	19,7 ± 1,3	7,9 ± 0,3	0,115 ± 0,003
<i>FI 4</i>	21,48	6,67	0	20,1 ± 0,4	6,3 ± 0,3	0,266 ± 0,005
<i>FI 5</i>	19,31	6,21	0	16,8 ± 0,1	5,1 ± 0,4	0,29 ± 0,02
<i>FI 6</i>	26	10	não contém	24,4 ± 0,5	10,1 ± 1,3	0,086 ± 0,007
<i>FI 7</i>	22	8,7	não contém	20,1 ± 0,9	8,9 ± 0,6	0,078 ± 0,005
<i>FI 8</i>	22	8,5	não contém	19,0 ± 0,8	7,8 ± 0,4	0,061 ± 0,004
<i>FI 9</i>	26	11	0	24,1 ± 0,8	13,0 ± 1,8	0,23 ± 0,02
<i>FI 10</i>	28,2	12,18	0	24,7 ± 0,8	10,2 ± 0,6	0,160 ± 0,003
<i>FI 11</i>	23,91	9,42	0	22,4 ± 0,7	10,9 ± 2,1	0,16 ± 0,01
<i>FI 12</i>	18,99	9,49	0	16,3 ± 0,3	7,9 ± 0,3	0,41 ± 0,04
<i>FI 13</i>	28	11	não contém	26,5 ± 0,8	11,3 ± 0,4	0,087 ± 0,002
<i>FI 14</i>	21	8,6	não contém	19,0 ± 0,9	8,2 ± 0,5	0,082 ± 0,002

Média ± desvio padrão (triplicata); valores expressos por 100g de amostra; *FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13 fórmulas infantis recomendadas de 0 a 6 meses; FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14 fórmulas infantis de seguimento recomendadas de 6 a 12 meses; FI 9 e FI 10 fórmulas infantis recomendadas para prematuro.*

Quanto à informação nutricional, das catorze fórmulas infantis analisadas todas apresentaram valores para lipídios, ácidos graxos saturados (AGS) e ácidos graxos *trans* (AGT) na informação nutricional. Entretanto estes nutrientes devem ser declarados por 100 g/100 mL do produto (Informe Técnico nº36 (2008)), e as *FI 4*, *FI 5*, *FI 10*, *FI 11* e *FI 12*, apresentaram estes valores por 100 mL do produto preparado, sendo esta forma de declaração a opcional e não a obrigatória. O tamanho da porção também é variado, uma vez que não há uma padronização, cada fabricante deve fornecer o preparo do seu produto. Em relação aos teores de lipídios todas as fórmulas infantis analisadas estavam de acordo com a informação nutricional fornecida pelo fabricante e dentro da tolerância de 20% da Resolução RDC nº 360 da ANVISA. Para os AGS apenas a *FI 1*, apresentou o valor analisado em 38% maior que o informado no rótulo. No caso dos AGT todas as fórmulas infantis tinham declarado este valor como zero na informação nutricional. Segundo a Resolução RDC nº 360, para valores menores ou iguais a 0,2 g de AGT na porção do produto, pode-se declarar os AGT como zero. No caso, das fórmulas infantis a porção seria de 100 g/100 ml, uma vez que a declaração dos nutrientes deve ser realizada nesta quantidade. As fórmulas infantis: *FI 1*, *FI 2*, *FI 4*, *FI 5*, *FI 6* e *FI 12* apresentaram valores para AGT entre 0,21 a 0,41 g/100 g, valores estes que deveriam ser declarados na informação nutricional. Entre os AGT analisados as *FI 1* e *FI 2* apresentaram os maiores valores para os isômeros do ácido graxo 18:2 e a *FI 9* para os isômeros do 18:3. Estes isômeros foram, provavelmente, provenientes dos óleos vegetais adicionados as FIs. A desodorização dos óleos vegetais pode gerar ácidos graxos *trans*. Aued-Pimentel et al. (2009) observaram que 22 das 49 amostras de óleos

vegetais refinados analisados continham valores maiores que 0,2 g de AGT por porção do produto, sendo estes principalmente dos isômeros dos ácidos graxos 18:2 e 18:3. Como nas fórmulas infantis são adicionados óleos vegetais, estes ácidos graxos podem ser transferidos para este alimento infantil. Para as amostras: *FI 4*, *FI 5* e *FI 12* os maiores teores foram para os isômeros do ácido graxo 18:1, principalmente o isômero 18:1 *t*11, isto é, o ácido *trans* vacênico, o qual é característico de produto lácteo como é o caso das fórmulas infantis analisadas, à base de leite. Outro ácido graxo *trans* característico de produto lácteo, é o ácido linoléico conjugado (CLA). Para estes isômeros os teores observados nas fórmulas infantis foram mínimos, e apenas nas amostras: *FI 3*, *FI 4*, *FI 5*, *FI 7*, *FI 8* e *FI 13* foi identificado o CLA 9c,11t (ácido rumênico), e seus teores variaram de 1,9 a 6,5 mg/100 g de amostra (COLLOMB, 2006; KRAMER et al., 2008).

Na tabela 5-3 apresentam-se os valores dos ácidos graxos polinsaturados: ácido linoléico (LA), ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) das fórmulas infantis comerciais analisadas e os valores da informação nutricional. O *Codex Alimentarius* preconiza a declaração na informação nutricional de LA e ALA, e de ARA e DHA quando estes forem suplementados; na legislação brasileira não há nenhuma citação quanto à declaração destes ácidos graxos. Porém, a maioria dos fabricantes declarou os valores de ácido linoléico e ácido  $\alpha$ -linolênico na informação nutricional e apenas na amostra *FI 5* isto não foi verificado. Nas amostras: *FI 9*, *FI 13* e *FI 14* observaram-se a presença de alegações de propriedade nutricional nos rótulos quanto à suplementação com ARA e/ou DHA, mas não foi constatada a declaração dos teores na informação

nutricional. O que configurou o produto em desacordo com as legislações de rotulagem nutricional (RDC nº 360, 2003) e de informação nutricional complementar (Portaria nº 27, 1998) (BRASIL, 2003; 1998).



Tabela 5-3. Teores de ácido linoléico (LA), ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) nas fórmulas infantis comerciais quanto à informação nutricional e análise. Mayara arrumar os algarismos significativos.

Amostras	Informação Nutricional				Resultados da análise			
	LA (g)	ALA (mg)	ARA (mg)	DHA (mg)	LA (g)	ALA (mg)	ARA (mg)	DHA (mg)
<i>FI 1</i>	4,7	490	177	89	4,79 ± 0,14	479,83 ± 11,87	147,90 ± 1,32	73,35 ± 1,39
<i>FI 2</i>	3,4	360	165	83	3,58 ± 0,33	345,83 ± 31,01	135,45 ± 7,86	65,26 ± 1,78
<i>FI 3</i>	3,6	451	-	-	2,79 ± 0,07	331,17 ± 8,59	-	-
<i>FI 4</i>	6,15	444	-	-	5,21 ± 0,02	327,39 ± 0,35	-	-
<i>FI 5</i>	-	-	-	-	4,68 ± 0,27	238,11 ± 14,25	-	-
<i>FI 6</i>	4,1	533	-	-	3,62 ± 0,34	356,39 ± 33,17	-	-
<i>FI 7</i>	3,3	429	-	-	2,83 ± 0,08	298,39 ± 7,73	-	-
<i>FI 8</i>	3,4	430	-	-	2,67 ± 0,01	310,54 ± 2,29	-	-
<i>FI 9</i>	4,1	435	-	-	3,63 ± 0,24	296,69 ± 21,00	29,39 ± 1,25	63,33 ± 1,12
<i>FI 10</i>	4,01	644	578	96	2,74 ± 0,04	383,51 ± 6,24	94,19 ± 1,87	70,67 ± 0,55
<i>FI 11</i>	4,50	507	-	-	3,80 ± 0,17	403,12 ± 16,90	-	-
<i>FI 12</i>	3,67	127	-	-	2,45 ± 0,10	69,90 ± 2,47	-	-
<i>FI 13</i>	4,1	520	-	-	3,60 ± 0,06	360,78 ± 6,14	47,69 ± 0,59	47,56 ± 0,53
<i>FI 14</i>	3,2	402	-	-	2,84 ± 0,06	333,47 ± 6,93	2,96 ± 0,73	29,45 ± 0,75

Média ± desvio padrão (triplicata); valores expressos por 100g de amostra; *FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13 fórmulas infantis recomendadas de 0 a 6 meses; FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14 fórmulas infantis de seguimento recomendadas de 6 a 12 meses; FI 9 e FI 10 fórmulas infantis recomendadas para prematuro.*

Apenas quatro das catorze amostras apresentaram valores para ácido linoléico fora do limite de tolerância de 20% de variação em relação à rotulagem. As amostras foram: *FI 3*, *FI 8*, *FI 10* e *FI 12*, e os teores analisados foram de 27 a 50 % menores que os declarados na informação nutricional. No caso do ácido  $\alpha$ -linolênico as concentrações analisadas nas fórmulas infantis: *FI 3*, *FI 4*, *FI 6*, *FI 7*, *FI 8*, *FI 9*, *FI 10*, *FI 11*, *FI 12* e *FI 13* foram de 26 a 82 % menores que os declarados nos rótulos dos alimentos, isto é, 71,43 % das fórmulas infantis analisadas estavam em desacordo com a rotulagem nutricional fornecida pelo fabricante, em relação ao ALA. Das fórmulas infantis estudadas, apenas três declararam o valor do ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico, dentre elas as *FI 2* e *FI 10* apresentaram valores de 21 e 513 %, respectivamente, menores que o declarado no rótulo para ARA e as amostras *FI 1*, *FI 2* e *FI 10* teores entre 21 a 36 % abaixo de DHA declarados na informação nutricional.

Em geral, avaliando a informação nutricional das fórmulas infantis, apenas uma apresentou todos os parâmetros declarados na informação nutricional e de acordo com a variação de  $\pm 20\%$  em relação aos valores analisados. Entretanto, esta amostra (*FI 14*) apresentava no painel principal do produto, uma alegação de propriedade relacionada ao ácido graxo DHA, mas não continha na informação nutricional o teor de DHA. As principais finalidades da informação nutricional são: aperfeiçoar as ações de controle sanitário na área de alimentos, visando à proteção da saúde da população; facilitar ao consumidor o conhecimento das propriedades nutricionais dos alimentos, contribuindo para o consumo adequado dos mesmos; e a rotulagem nutricional

pode complementar as estratégias e política de saúde dos países em benefício da saúde do consumidor. Porém, quando a informação nutricional não revela as quantidades corretas, sua finalidade também não será alcançada. Os nutrientes são importantes para o crescimento e desenvolvimento saudável do organismo, principalmente para os recém-nascidos e infantes. Alguns nutrientes como ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans*, podem trazer malefício para o organismo, pois estão relacionados com doenças cardíacas. Portanto um maior monitoramento quanto estes valores tornam-se necessário para garantir o bem estar infantil

### **5.6.Conclusões**

Apenas uma fórmula infantil à base de leite, das catorze analisadas, apresentou valores analisados de acordo com a informação nutricional (dentro da variação de  $\pm 20\%$ ). Portanto as fórmulas infantis comerciais devem ser monitoradas continuamente quanto ao teor de lipídios e ácidos graxos presente na informação nutricional, bem como na avaliação das alegações de propriedade nutricional contidas na rotulagem.

### **5.7.Referências Bibliográficas**

AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios**. São Paulo, 2007. 230p. Tese de Doutorado – Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

AUED-PIMENTEL, S.; KUS, M. M. M.; CARUSO, M. S. F.; KUMAGAI, E.; ZENEBON, O. Ácidos graxos *trans* em óleos vegetais refinados polinsaturados

comercializados no estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** (No prelo).

AUESTAD, N.; SCOTT, D.T.; JANOWSKY, J.S.; JACOBSEN, C.; CARROLL, R.B.; et al., Visual, cognitive and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. **Pediatrics**, v.112, n.3, p.177-183, 2003.

BRASIL ALIMENTOS ON LINE. **Fórmulas Infantis: Nestlé constrói fábrica de R\$100 milhões em São Paulo.** v. 318, 2007. Disponível em: <http://www.brasilalimentos.com.br/default.asp?numero=318>. Acessado em: 24 nov. 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº36, 27 de junho de 2008.** Orientações sobre a declaração da informação nutricional em alimentos para fins especiais e outras categorias específicas, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 360, de 12 de dezembro de 2003.** Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998.** Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998.** Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta Portaria, 1998.

CARVER, J.D. Advances in nutritional modifications of infant formulas. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p. 1550S-1554S, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. JOINT FAO/WHO Food standards programme. **Codex standard for infant formula – Codex Stan 72 1981, revisado em 2007.**

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WEEHSLER, D.; RYHÄANEN, E. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. **Internacional Dairy Journal**, v.16, p. 1347-1361, 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 8, p. 475-97, 1973.

HIRAYAMA, K.B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES-NETO, U., Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. **The electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Disease**, v. 10, n.3, p. 1-10, 2006.

KOLETZKO, B.; SAUERWALD, U.; KEICHER, U.; SAULE, H., et al. Fatty acid profiles, antioxidant status, and growth of preterm infants fed diets without or with long-chain polyunsaturated fatty acids. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 42, p. 243-253, 2003.

KRAMER, J. K. G.; BLACKADAR, C. B.; ZHOU, J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. **Lipids**, v.37, n.8, p.823-835, 2002.

KRAMER, J. K.G.; HERNANDEZ, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAFT, J.; DUGAN, M. E.R. Combining results of two GC separation partly achieves determination of all *cis* and *trans* 16:1, 18:1, 18:2 and 18:3 except CLA isomers

of milk fat as demonstrated using Ag-iron SPE fractionation. **Lipids**, v.43, p. 259-273, 2008.

KUS, M. M. M.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Comparação de metodologias analíticas na determinação de lipídios e ácidos graxos poliinsaturados em fórmula infantil por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n.1, 2009 (No prelo).

LUNN, J.; THEOBALD, H.E., The health effects of dietary unsaturated fatty acids. **Nutrition Bulletin**, v.31, n.3, p. 178-224, 2006.

MAIA, E.L.; RODRIGUES-AMAYA, D.B.R. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, n.1/2, p. 27-35, 1993.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC. 18. ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.

POMPÉIA, C., Essencialidade dos Ácidos Graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., eds. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manoli, 2002. cap. 3, p.25-32.

SILVA, D. R. B.; MIRANDA-JÚNIOR, P. F.; SOARES, E. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.7, n.2, p. 123-133, 2007.

VAZ, J.S. et al., Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p. 498-500, 2006.

## **Capítulo 6. Estabilidade oxidativa dos ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil comercializadas no estado de São Paulo, Brasil**

---

(Artigo enviado para Brazilian Journal of Food Technology (ITAL))

### **6.1. Resumo**

A oxidação lipídica recebe uma atenção especial, por suas implicações indesejadas na saúde humana e sua contribuição para o decréscimo do valor nutricional dos alimentos. O aumento do conteúdo de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, a fortificação mineral, os tratamentos tecnológicos e o período de estocagem, podem acelerar este processo, gerando perda dos ácidos graxos essenciais, formação de ácidos graxos *trans*, liberação de compostos voláteis e formação de compostos não voláteis. O objetivo deste estudo foi analisar e avaliar os ácidos graxos polinsaturados em 14 fórmulas infantis comerciais durante o período de oito meses. As amostras foram analisadas nos meses de março, abril, julho e outubro de 2008. A extração e quantificação dos lipídios foram feitas segundo Roesse Gottlieb, a análise dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa e quantificação pela adição de padrão interno de éster metílico 23:0. A maioria das amostras não apresentou degradação dos ácidos graxos polinsaturados no período de um mês, mas ao final do estudo 11 das 14 amostras apresentaram diminuição do valor dos ácidos graxos analisados.

**Palavras-chave:** ácidos graxos polinsaturados, oxidação lipídica, estabilidade, fórmula infantil.

**Oxidation stability of polyunsaturated fatty acids in infant formula commercialized in the são paulo state, brazil**

**6.2. Abstract**

The lipid oxidation receives a special attention, for its have serious problems to human health and its contribution for the decrease of the nutritional value of foods. The increase of the long-chain polyunsaturated fatty acids, the mineral supplementation, the technological treatments and the period of storage, can speed up this process, generating loss of essential fatty acids, formation of *trans* fatty acids, release of volatile composite and formation of no volatile composite. The objective of this study was to analyze polyunsaturated fatty acids in 14 commercialized infant formulas for 8 months. The extraction and quantification of the lipids had been made according to Roese Gottlieb, the analysis of fatty acids was carried through by gas chromatography and quantification for the addition of standard internal 23:0. The majority of the samples did not present degradation of polyunsaturated fatty acid in the period of one month, but to the end of study (8 months) 11 of the 14 samples they had presented reduction value of the fatty acids analyzed.

**Key-words:** polyunsaturated fatty acid, lipids oxidation, stability, infant formula.



### **6.3.Introdução**

A oxidação lipídica recebe uma atenção especial, por suas implicações indesejadas na saúde humana e sua contribuição para o decréscimo do valor nutricional dos alimentos. Esta oxidação inclui a oxidação de ácidos graxos não saturados, particularmente dos ácidos graxos polinsaturados, gerando componentes que afetam a qualidade do produto (ROMEU-NADAL et al., 2007). A peroxidação lipídica é responsável por mudanças no paladar e odor dos produtos alimentícios, sendo a principal responsável pela deterioração durante o processamento e estocagem de alimentos ricos em lipídios (VELASCO et al., 2008).

Os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa são altamente susceptíveis a oxidação. Em fórmulas infantis o alto conteúdo relativo de ácidos graxos polinsaturados e minerais pró-oxidantes contribuem para o aumento da oxidação lipídica (ROMEU-NADAL et al., 2007).

Na peroxidação dos ácidos graxos insaturados, hidroperóxidos lipídicos são formados durante a fase de propagação. Estes compostos primários são instáveis e rapidamente decompostos na presença de elementos traços, formando um grande número de compostos, incluindo radicais alcoxilas e alquilas, aldeídos, cetonas e uma série de compostos carboxilados que formam uma complexa mistura de produtos da oxidação secundária dos lipídios, os quais danificam as fórmulas infantis (MADUKO; PARK; AKOH, 2008). Produtos derivados da peroxidação do ácido linoléico (LA) são tóxicos para as células humanas, podendo causar sérios problemas de saúde (MANGLANO et al., 2005).

Durante a preparação comercial da maioria das fórmulas infantis, uma parte da gordura láctea é substituída por uma mistura de óleos vegetais, adicionados para propiciar uma composição de ácidos graxos, principalmente polinsaturados, próximo ao do leite materno. A formulação da matéria-prima é misturada, pasteurizada, homogeneizada, concentrada e seca ou esterilizada e muitos recursos são utilizados pelos fabricantes para assegurar que estes produtos têm boa qualidade e longa vida de prateleira (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007; CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2009).

Muitas fórmulas infantis baseadas em leite são suplementadas com ácidos graxos polinsaturados, tais como o ácido araquidônico (20:4,  $\omega$ -6) (ARA) e o ácido docosahexaenóico (22:6,  $\omega$ -3) (DHA). Teores adequados destes ácidos graxos são obtidos pela adição de fontes de lipídios insaturados, como os óleos de peixe e óleos obtidos de algas e fungos. Entretanto os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa são mais suscetíveis a oxidação que o ácido linoléico (18:2,  $\omega$ -6) (LA). Porém, LA é o principal ácido graxo insaturado nas fórmulas infantis (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007; CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2009).

Quando estocadas, as fórmulas infantis são usualmente protegidas da luz e mantidas em temperatura ambiente. Entretanto, por causa do longo tempo de vida de prateleira, normalmente 2 anos, os ácidos graxos polinsaturados podem ser oxidados, ocasionando a perda do valor nutricional e gerando compostos voláteis. Luz ultravioleta induz a oxidação lipídica, portanto produtos lácteos, como as fórmulas infantis, após abertas, são altamente susceptíveis à oxidação lipídica em temperatura ambiente e a luz acelera este processo. De acordo com as informações dos fabricantes, após aberta, as

fórmulas infantis devem ser consumidas em até um mês. Geralmente, elas são consumidas antes deste período. No entanto, quando elas são usadas como alimentação complementar, o produto é armazenado por um período maior (CHÁVEZ-SERVÍN; CASTELLOTE; LÓPEZ-SABATER, 2008).

Durante o processamento das fórmulas infantil ácido ascórbico, tocoferóis e sais de ferro, entre outros, são adicionados para agregar valor nutricional ou agir como antioxidante. As fórmulas infantis incluem em sua composição, minerais e vitaminas com efeitos anti e pró-oxidantes. O enriquecimento simultâneo da fórmula infantil com quantidades relativamente altas de ácido ascórbico e ferro – combinação com efeitos pró-oxidantes – pode aumentar a susceptibilidade da fórmula infantil à oxidação lipídica. Entretanto, o efeito depende do tipo de sal de ferro adicionado, sais de sulfatos ionizam mais rapidamente que sais de lactatos, liberando o ferro mais rapidamente, aumentando o risco da formação de radicais livres advindos da reação de Fenton (MANGLANO et al., 2005; ROMEU-NADAL et al., 2007).

Portanto o aumento do conteúdo de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa e a fortificação mineral paralela, bem como os tratamentos tecnológicos e o período de estocagem, podem conduzir à modificação oxidativa com subsequente perda dos ácidos graxos essenciais, formação de ácidos graxos *trans*, liberação de compostos voláteis responsáveis pela rancificação e formação de compostos não voláteis que são prejudiciais à saúde (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007).

Antioxidantes naturais ou adicionados aos alimentos, normalmente tocoferóis, carotenóides e compostos fenólicos, aumentam a estabilidade oxidativa. Estes compostos estendem o período de indução da oxidação ou

diminuem a taxa de oxidação. Antioxidantes seqüestram, os radicais livres, como os radicais alquila e peroxila, controlam a transição dos metais, quelam o oxigênio singlet evitando assim a formação de produtos secundários e a continuação da oxidação lipídica (CHOE e MIN, 2006). No caso das fórmulas infantis o *Codex Alimentarius* stan 72 (2007) permite a incorporação de uma mistura concentrada de tocoferol e/ou palmitato de ascorbila como antioxidantes, com o limite de 1 mg por 100 mL do produto pronto para o consumo, do composto isolado ou da combinação deles.

O objetivo deste trabalho foi verificar a estabilidade oxidativa do ácido linoléico, ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido araquidônico, ácido docosahexaenóico nas fórmulas infantis, armazenadas por um período de 8 meses, nos meses de março, abril, julho e outubro. Adicionalmente, foi analisada uma amostra de referência da NIST 1849/2006 em dois momentos: maio de 2006 e janeiro de 2008.

## **6.4. Material e Métodos**

### **6.4.1. Material**

#### *6.4.1.1. Amostras*

Foram analisadas 15 amostras, uma da NIST (Nacional Institute of Standard e Techonology) e 14 amostras de fórmulas infantis comerciais divididas da seguinte maneira: 7 amostras de fórmulas infantis comerciais recomendadas para lactentes de 0 a 6 meses (*FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13*), 5 amostras de fórmulas infantis de seguimento recomendadas para lactentes de 6 a 12 meses (*FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14*) e 2 amostras de

fórmulas infantis para lactentes prematuros (*FI 9 e FI 10*). Todas as fórmulas infantis analisadas eram à base de leite de vaca. As amostras *FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13* continham ARA e DHA e a amostra *FI 14* continham apenas DHA. As fórmulas infantis foram obtidas do comércio do Estado de São Paulo e fabricadas no Brasil, México, Holanda e Argentina. As fontes de lipídios destas fórmulas infantis eram diversas, sendo principalmente: leite desnatado, oleína de palma, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de coco, óleo de canola, óleo de milho, óleo de peixe, entre outros.

#### *6.4.1.2. Reagentes e padrões.*

Os solventes e reagentes utilizados para as etapas de extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram de grau analítico: éter de petróleo, éter etílico, etanol a 95%, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de sódio e hidróxido de sódio. Foram também utilizados os seguintes solventes de grau cromatográfico: n-hexano e metanol.

Foram utilizados dois padrões cromatográficos de éster metílico de ácido graxo 13:0 e 23:0, marca Sigma com pureza de 99%.

Para identificar os componentes foram utilizados: uma mistura com quantidades certificadas de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4:0 a 24:0, marca Supelco; uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos dos isômeros *cis-trans* do ácido linoléico (18:2) e ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3), Sigma; e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos individuais, sendo: elaídico (18:1 9*t*); vacênico (18:1 11*c*); *trans* vacênico (18:1 11*t*); (18:1 7*c*); (18:1 12*c*); CLA (18:2 9*c*,11*t* e 18:2 10*t*,12*c*); palmitoelaídico (16:1 9*t*), palmitico (16:0); linolelaídico (18:2 9*t*,12*t*); EPA (20:5 5*c*,8*c*,11*c*,14*c*,17*c*); araquidônico

(20:4 5c,8c,11c,14c); docosahexaenóico (22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c), todos da marca Sigma.

#### **6.4.2. Métodos**

##### *6.4.2.1. Ensaio de estabilidade*

Foi realizado pela análise dos ácidos graxos por cromatografia gasosa, na abertura do produto (mês de março), depois de 1 mês (abril), e em seguida de três em três meses (meses de julho e de outubro) completando assim 8 meses. As amostras foram analisadas no ano de 2008, o período de análise foi limitado pela validade as mesmas. As fórmulas infantis continuaram acondicionadas em sua embalagem original, entretanto foram separadas em porções e armazenadas em sacos plásticos, em atmosfera inerte (nitrogênio) e a cada nova rodada uma embalagem era utilizada.

##### *6.4.2.2. Determinação dos lipídios e ácidos graxos*

A extração e quantificação dos lipídios das amostras de fórmula infantil foram realizadas de acordo com Roese Gottlieb (1972), método oficial para este tipo de alimento segundo o compêndio de métodos da Association of Official Analytical Chemistry - AOAC (2005). A derivatização dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada segundo Hartman e Lago (1973) modificado por Maya e Amaya-Rodrigues (1993). Os ésteres metílicos foram separados em coluna de sílica fundida (SP 2560) de 100m, instalada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama (CG/DIC) da marca Shimadzu e modelo 17A; em condições de temperatura e pressão descritas por Kramer; Blackadar e Zhou (2002): temperatura do injetor e detector: 250°C;

fluxo – 1,90mL/min; rampa de temperatura: 45°C (1 min); 13°C/min até 175°C; 4°C/min até 215°C por 35 min; gás de arraste: hidrogênio; pressão na coluna: 175 kPa; razão de divisão da amostra 1:15. Os componentes separados foram identificados pela co-injeção de padrões e comparações com os tempos de retenção absolutos e relativos ao padrão interno. A quantificação dos ácidos graxos foi feita com a adição de padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0 e fatores de correção de resposta teóricos do detector de ionização em chama em relação ao próprio padrão interno, de acordo com metodologia proposta por Kus; Aued-Pimentel e Mancini-Filho (2009).

#### *6.4.2.3. Análise estatística*

Todas as amostras foram realizadas em triplicata e o resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão. Utilizou-se o teste de Student ( $p=0,05$ ) para comparação da amostra da NIST 1849/2003 e a análise de variância (ANOVA) e posterior teste de Tukey, ambos com nível de significância de 95%, para comparação dos teores de ácidos graxos nas fórmulas infantis comerciais, durante o período de estudo.

## **6.5. Resultados e Discussão**

### **6.5.1. Estabilidade dos ácidos graxos na amostra NIST 1849/2006**

A amostra da NIST 1849/2006 foi analisada em dois momentos neste estudo, isto é em maio de 2006 e janeiro de 2008. Os valores de ácido linoléico (LA), ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) para esta amostra estão presentes na tabela 6-1.

Tabela 6-1. Estabilidade do ácido linoléico (LA), ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido araquidônico (ARA) e ácido docosahexaenóico (DHA) na amostra da NIST 1849/2006 em dois momentos: maio de 2006 e janeiro de 2008.

	LA (g/100g)	ALA (g/100g)	ARA (g/100g)	DHA (g/100g)
Maio/2006	6,38 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,64 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,222 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,072 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>
Janeiro/2008	5,98 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,53 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,096 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,022 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>

Média  $\pm$  desvio padrão (triplicata); médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si de acordo com teste de Student ( $p < 0,05$ ). Método utilizado: lipídios totais por hidrólise ácida AOAC 963.15, extração de lipídios por Roesse Gottlieb, metilação por Hartman e Lago e quantificação por padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0).

A amostra da NIST 1849/2006, não era considerada uma amostra certificada durante o período das análises (entre os anos de 2006 e 2008). Para que os valores dos analitos sejam certificados, estudos de estabilidade e avaliação das incertezas das medições devem ser implementados, conforme preconizado pela NIST. Portanto os valores apresentados na Tabela 6.1 eram apenas indicativos. Um dos requisitos para um material ser considerado um padrão de referência, é ser estável durante o tempo de armazenamento, ou seja, durante a média da vida de prateleira deste produto, neste caso de 18 a 24 meses e também ser armazenado de acordo com as instruções da instituição e/ou fabricante (SHARPLESS et al., 2001; 2007; SANDER et al., 2009).

Na tabela 6-1 verifica-se que houve uma degradação e/ou oxidação dos ácidos graxos da amostra da NIST 1849/2006 durante o tempo de armazenamento. Houve diferença significativa entre os dois momentos da análise para ALA, ARA e DHA, revelando assim que os ácidos graxos polinsaturados são altamente susceptíveis à degradação e/ou oxidação,



diminuindo dessa maneira o teor dos ácidos graxos essenciais e alterando o valor nutricional do produto.

Observou-se que o teor de LA, ALA, ARA e DHA, diminuíram em 6,33%, (1,97%)16,66%(13,11%), 57,05% (56,07%) e 68,98% (68,57%), (em vermelho as porcentagens para os valores corrigidos na Tabela 6-1)respectivamente, mostrando dessa maneira que os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, o ARA e DHA foram que sofreram uma maior degradação, fato este explicado pelo maior número de insaturações, as quais são sítios ativos para o início da oxidação lipídica (CHOE e MIN, 2006).

A NIST em julho de 2009 disponibilizou o certificado da amostra NIST 1849. Consta neste, que os valores certificados para a amostra são garantidos apenas se a amostra for mantida a -80 °C e para as embalagens fechadas. No caso deste estudo, não tínhamos a informação deste procedimento e as amostras foram armazenadas em - 10 °C, este fato pode explicar a degradação da amostra durante o período de armazenamento.

#### **6.5.2. Estabilidade dos ácidos graxos nas fórmulas infantis comerciais**

Normalmente o prazo de validade de uma fórmula infantil (FI) varia de 18 a 24 meses, e na embalagem há a recomendação de serem consumidas em até 1 mês após o produto ser aberto.

As FIs comerciais começaram a ser analisadas em março de 2008, em abril houve a segunda análise, e as outras duas foram realizadas após três e seis meses da segunda análise, ou seja, em julho e outubro, respectivamente.

Os teores dos ácidos graxos polinsaturados analisadas nas fórmulas infantis comerciais estão nas Figuras de 6-1 a 6-4.

Realizou-se análise estatística dos dados, quanto à estabilidade do LA, ALA, ARA e DHA nas FI comerciais, utilizando a análise de variância (ANOVA) e posterior teste de Tukey ( $p=0,05$ ).

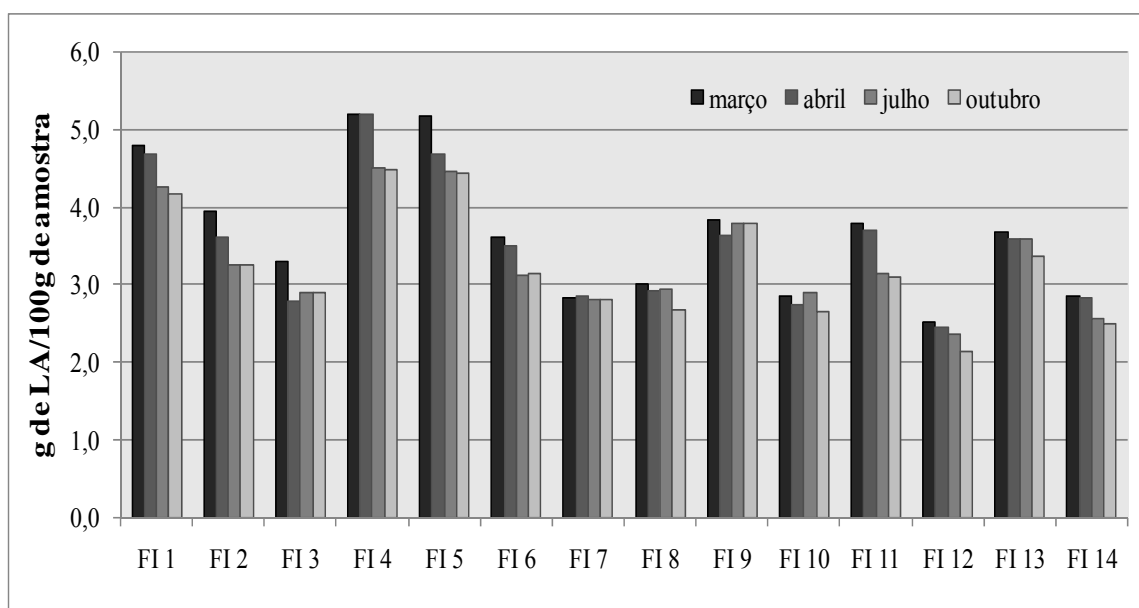


Figura 6-1. Estabilidade do ácido linoléico (LA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante 8 meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13 fórmulas infantis recomendadas de 0 a 6 meses; FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14 fórmulas infantis de seguimento recomendadas de 6 a 12 meses; FI 9 e FI 10 fórmulas infantis recomendadas para prematuro.

Para o ácido linoléico (LA) verificou-se que em 13 amostras (FI 1, FI 2, FI 4, FI 5, FI 6, FI 7, FI 8, FI 9, FI 10, FI 11, FI 12, FI 13, FI 14) não houve diferença estatisticamente significativa entre os meses de março e abril; em 5 amostras (FI 1, FI 2, FI 3, FI 11, FI 14) houve a diminuição do teor de LA ( $p < 0,05$ ) a partir do mês de julho comparado aos meses de março e abril; no mês de outubro houve uma ligeira queda do teor de LA nessas FIs comparada com a análise do mês de julho, porém não foi estatisticamente significativo para

nenhuma amostra; 1 amostra (*FI 8*) a diferença no teor de LA ocorreu no mês de outubro; 5 amostras (*FI 7, FI 9, FI 10, FI 12, FI 13*) não revelam diferença estatisticamente significativa do teor de LA analisado nos quatro meses. Houve diminuição de 1,09% a 18,50% dos teores de LA analisados em março para aqueles de outubro.

Estudo realizado por Chavéz-Servín et al. (2009) em duas amostras de fórmula infantil suplementada com ácido graxo polinsaturado de cadeia longa (AGPI-CL), armazenadas por 12 e 18 meses, revelou diferença estatisticamente significativa para o ácido linoléico somente após 18 meses, o qual teve redução de 16,29% para 15,43%. Rodríguez-Alcalá et al. (2007) notaram em duas fórmulas infantis estudadas, a diminuição estatisticamente significativa no teor de LA, após 4 anos de armazenamento. Em estudo similar ao deste trabalho Chavéz-Servín; Castellote; López-Sabater (2008) analisaram 20 amostras de fórmulas infantis comerciais, as análises foram realizadas na abertura do produto e após 15, 30, 50 e 70 dias; em nove amostras houve a perda estatisticamente significativa de LA após 70 dias, em média esse decréscimo foi 0,18%.

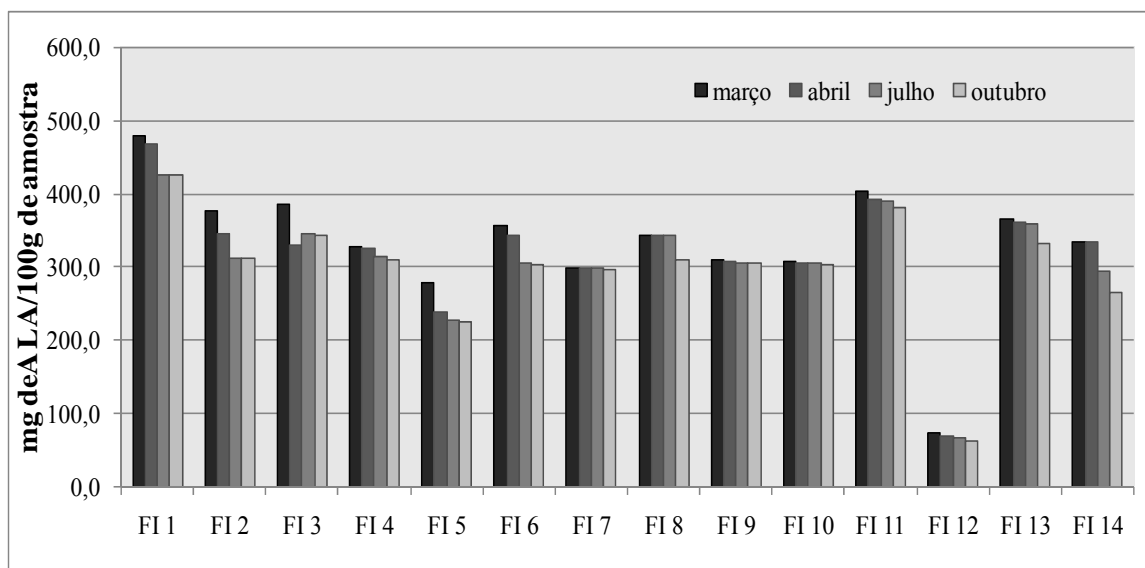


Figura 6-2. Estabilidade do ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante 8 meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13 fórmulas infantis recomendadas de 0 a 6 meses; FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14 fórmulas infantis de seguimento recomendadas de 6 a 12 meses; FI 9 e FI 10 fórmulas infantis recomendadas para prematuro.

Quanto ao ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), em 11 amostras (FI 2, FI 3, FI 4, FI 7, FI 8, FI 9, FI 10, FI 11, FI 12, FI 13, FI 14) os teores de ALA nos meses de março e abril foram iguais estatisticamente; em 7 amostras (FI 1, FI 2, FI 3, FI 4, FI 5, FI 6, FI 8) houve a diminuição de ALA no mês de julho, o qual foi estatisticamente igual ao mês de outubro; em 7 (FI 7, FI 9, FI 10, FI 11, FI 12, FI 13, FI 14) amostras não houve diferença estatisticamente significativa no teor de LA nos meses analisados. Durante os meses de março e outubro observou-se uma diminuição de 0,63% a 21,02% da concentração de ALA nas fórmulas infantis analisadas. Rodríguez-Alcalá et al. (2007) verificaram uma diferença estatisticamente significativa para o ALA após dois anos de armazenamento. Já Chavéz-Servín; Castellote; López-Sabater (2008) observaram perda na concentração de ALA após 70 dias de estocagem, em 3 das 20 amostras analisadas, com valores médios de 0,12%.

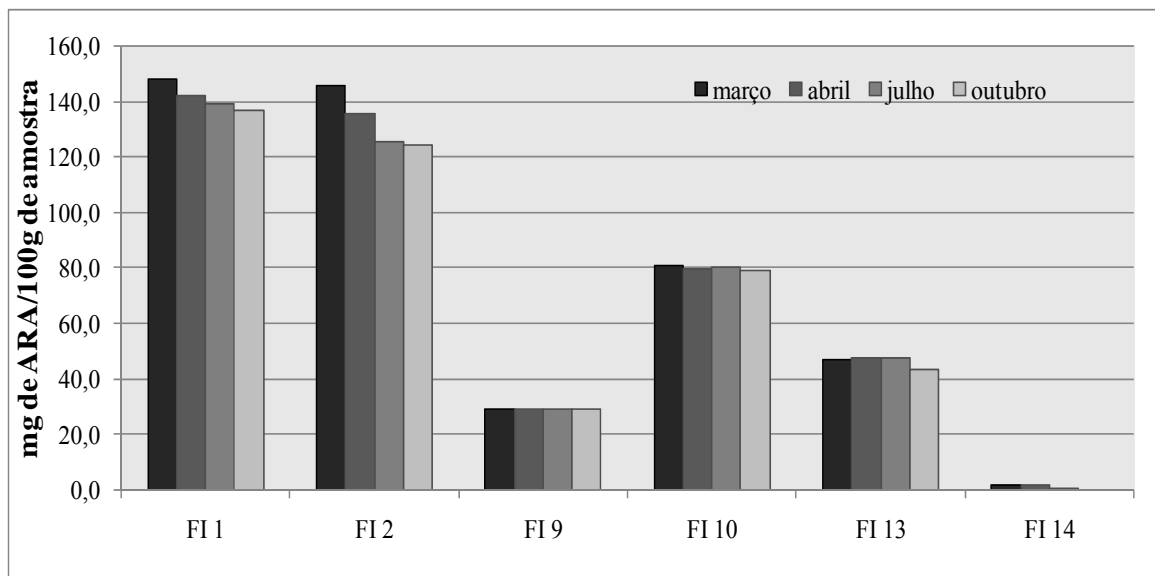


Figura 6-3. Estabilidade do ácido araquidônico (ARA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante 8 meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13, FI 14: fórmulas infantis suplementadas com ácidos graxos de cadeia longa (ácido araquidônico e/ou ácido docosahexaenólico).

Para o ácido araquidônico (ARA), apenas 1 amostra (*FI 1*) demonstrou diferença estatisticamente significativa no seu teor para todos os meses; 5 amostras (*FI 2*, *FI 9*, *FI 10*, *FI 13*, *FI 14*) revelaram teor de ARA estatisticamente igual para os meses de abril e março; em 3 amostras (*FI 1*, *FI 2*, *FI 14*) houve a diminuição do teor de ARA no mês de julho, o qual foi estatisticamente igual ao mês de outubro; uma amostra (*FI 13*) apresentou diferença estatisticamente significativa no teor de ARA no mês de outubro; em 2 amostras (*FI 9*, *FI 10*) não houve diferença estatisticamente significativa no teor de ARA nos meses analisados. Em diversos estudos realizados com fórmulas infantis suplementadas com AGPI-CL, em períodos de armazenamento de 15 dias a 4 anos, não foi verificado a degradação estatisticamente significativa para o ácido araquidônico (ROMEU-NATAL et al., 2007; RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007; CHAVÉZ-SERVÍN;

CASTELLOTE; LÓPES-SABATER, 2008; CHAVÉZ-SERVÍN et al., 2009). Neste estudo, a maioria das amostras analisadas (4 amostras) houve a degradação de 7,67% a 14,71% do ARA no quarto mês (julho).

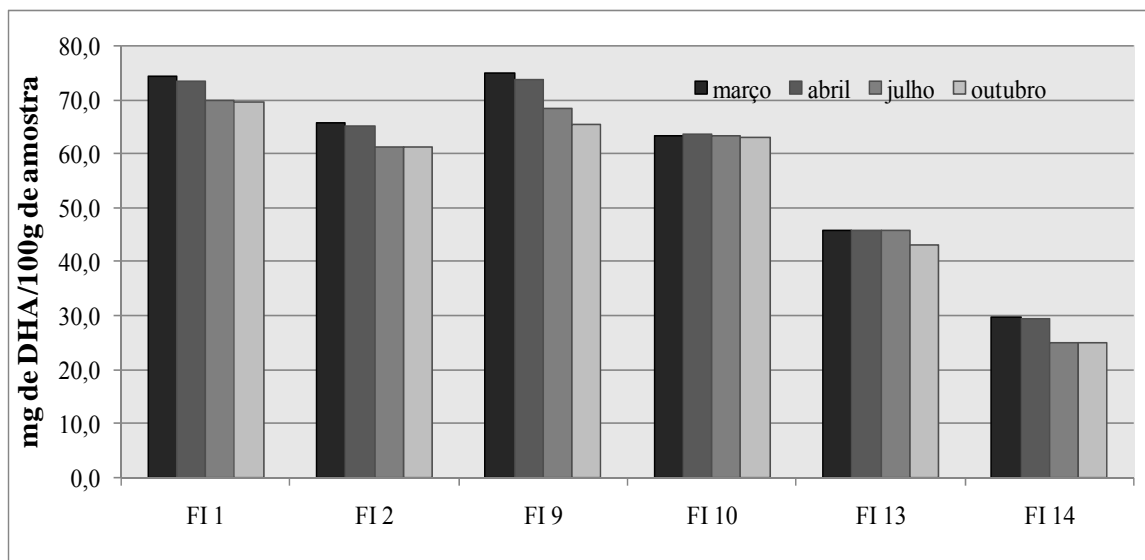


Figura 6-4. Estabilidade do ácido docosahexaenóico (DHA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante 8 meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13, FI 14: fórmulas infantis suplementadas com ácidos graxos de cadeia longa (ácido araquidônico e/ou ácido docosahexaenóico).

Quanto ao ácido docosahexaenóico (DHA), todas as amostras (FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13, FI 14) revelaram teor de DHA estatisticamente igual para os meses de abril e março; em 3 amostras (FI 1, FI 9, FI 14) houve a diminuição do teor de DHA no mês de julho, o qual foi estatisticamente igual ao mês de outubro; em 3 amostras (FI 2, FI 10, FI 13) não houve diferença estatisticamente significativa no teor de DHA nos meses analisados. Romeu-Nadal et al. (2007) demonstraram em 15 meses de acompanhamento da estabilidade de uma FI suplementada com AGPI-CL, que o teor de DHA permaneceu sem alterações estatisticamente significativas. Fato este também demonstrado em nosso estudo, em um menor tempo de acompanhamento, em três amostras (50%). Este fato também foi verificado em trabalhos de Chavéz-

Servín et al. (2009), Rodríguez-Alcalá et al. (2007) e Chavéz-Servín, Catellote e López-Sabater (2008).

Portanto, no geral os ácidos graxos analisados nas fórmulas infantis comerciais tiveram comportamentos semelhantes quanto a sua estabilidade, entretanto em apenas 2 amostras (*FI 7* e *FI 12*) não suplementadas com ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, não foi verificada a degradação de LA e ALA durante os meses da análise e em uma amostra (*FI 10*) suplementada não ocorreu a diminuição dos teores de LA, ALA, ARA e DHA. Nas demais amostras pelo menos um ácido graxo sofreu degradação durante o período de estudo. A degradação e/ou oxidação do ácido linoléico e ácido  $\alpha$ -linolênico foi causada pela peroxidação lipídica durante o armazenamento das fórmulas infantis. Em particular, era esperado que o ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico, sofressem mais ataques de radicais livres em suas duplas ligações, uma vez que a susceptibilidade a oxidação é proporcional ao grau de insaturação do ácido graxo e ARA e DHA são os ácidos graxos mais insaturados presentes nas fórmulas infantis (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007; CHÁVEZ-SERVÍN; CASTELLOTE; LÓPEZ-SABATER, 2008). Entretanto este fato que não foi observado, uma vez que a concentração destes ácidos graxos nas fórmulas infantis é pequenas, cerca de 100mg/100g de amostra, enquanto os teores de LA e ALA são de 4g/100g e 400mg/100g, respectivamente, ou seja, estes dois últimos estão mais disponíveis para o ataque de radicais livres ou para o início da oxidação (CHOE e MIN, 2006).

As fórmulas infantis, nas quais não houve diminuição dos teores de ácidos graxos polinsaturados são aquelas que se obtiveram valores menores que os declarados na rotulagem e estão mais próximas do período de validade,

podendo revelar que mesmo estando em embalagens fechadas e dentro do prazo de validade, os ácidos graxos sofrem uma degradação, gerando a perda de seu valor nutricional. Também deve ter uma atenção quanto ao período de armazenamento após o produto aberto. Em muitos casos os lactentes já estão ingerindo alimentos sólidos e a fórmula infantil é utilizada como um suplementado a essa alimentação, sendo utilizada por um tempo superior ao indicado pelos fabricantes (SARNI, 2007; SCHUTZMAN et al., 2008).

Apenas as amostras *FI 1* e *FI 2* declararam na lista de ingredientes o uso de antioxidantes: o palmitato de ascorbila e a mistura de tocoferóis, entretanto, houve a degradação dos ácidos graxos durante o período de estudo. As fórmulas infantis possuem uma porcentagem elevada de lipídios (de 30 a 55%). A suplementação com minerais (pró-oxidantes) pode ser um fator para acelerar a oxidação dos AGPI, por outro lado há a suplementação com nutrientes antioxidantes, os quais são protetores destes ácidos graxos. Esse balanço de nutrientes suplementados é fundamental para a prevenção da oxidação lipídica, bem como a utilização de antioxidantes permitidos, para assim, assegurar o valor nutricional das fórmulas infantis.

## **6.6. Conclusões**

A maioria das fórmulas infantis não apresentaram degradação e/ou oxidação dos ácidos graxos polinsaturados durante o período recomendado de consumo (1 mês), entretanto estes teores tiveram variação estatisticamente significativa para o período do estudo (8 meses). Portanto deve-se ter uma atenção ao utilizar este alimento próximo ao período de validade e após a abertura da embalagem e, especialmente, com relação ao



seu armazenamento, por tempo prolongado, pois os ácidos graxos são degradados e seu valor nutricional será modificado.

### **6.7.Referências Bibliográficas**

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, C. Volatile compounds and fatty acid profiles in commercial milk-based infant formulae by static headspace gas chromatography: Evolution after opening the packet.

**Food Chemistry**, v. 107, p. 558-569, 2008.

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTRLLOTE, A. I.; MARTÍN, M.; CHIFRÉ, R.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Stability during storage of LC-PUFA-supplemented infant formula containing single cell oil or egg yolk. **Food Chemistry**, v. 113, p. 484-492, 2009.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews en Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 169-186, 2006.

*CODEX ALIMENTARIUS* COMMISSION. JOINT FAO/WHO Food standards programme. **Codex standard for infant formula – Codex Stan 72 1981, revisado em 2007.**

HARTMAN, L.; LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 8, p. 475-97, 1973.

KRAMER, J. K. G.; BLACKADAR, C. B.; ZHOU, J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. **Lipids**, v.37, n.8, p.823-835, 2002.

KUS, M. M. M.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Comparação de metodologias analíticas na determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n.1, 2009 (No prelo).

MADUKO, C. O.; PARK, Y. W.; AKOH, C. C. Characterization and oxidative stability of structured lipids: infant milk fat analog. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 197-204, 2008.

MAIA, E.L.; RODRIGUES-AMAYA, D.B.R. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, n.1/2, p. 27-35, 1993.

MANGLANO, P.; LAGARDA, M. J.; SILVESTRE, M. D.; et al. Stability of the fraction of Milk-based infant formulas during storage. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 815-823, 2005.

OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AOCS. 5. ed., Champaign: American Oil Chemists' Society, 2004.

RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, M. C.; CACHÓN, F.; MARMESAT, S.; ALONSO, L.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; FONTECHA, J. Changes in the lipid composition powdered infant formulas during long-term storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6533-6538, 2007.

ROMEU-NADAL, M.; CHÁVES-SÉRVIN, J.L.; CASTELLOTE, A. I.; et al. Oxidation stability of the lipid fraction in Milk powder formulas. **Food Chemistry**, v. 100, p. 756-763, 2007.

SANDER, L.; SCHANTZ, M.; SHARPLESS, K.; WISE, S. **Standard Reference Materials to support measurement of fatty acids**, v. 21, n. 1, p. 7-12, 2009.

SARNI, R. O. S. Alimentação no primeiro ano de vida. **Pediatria moderna**, v. 43, n. 3, p. 121-129, 2007.

SCHUTZMAN, D. L.; PORAT, R.; SALVADOR, A.; JANECKO, M. Neonatal nutrition: a brief review. **World Journal of Pediatrics**, v. 4, n. 4, p. 248-253, 2008.

SHARPLESS, K. E.; COLBERT, J. C.; GREENBERG, R. R.; SCHANTZ, M. M.; WELCH, M. J. Recent developments in food-matrix Reference Materials at NIST. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, n. 2-3, p. 275-278, 2001.

SHARPLESS, K.; THOMAS, J.; CHRISTOPHER, S.; GREENBERG, R.; SANDER, L. ; SCHANTZ, M.; WELCH, M.; WISE, S. Standard reference materials for foods and dietary supplements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 171-178, 2007.

VELASCO, J.; MARMESAT, S.; HOLGADO, F.; et al. Influence of two lipid extraction procedures on the peroxide value in powdered infant formulas. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1159-1166, 2008.

## Capítulo 7. Anexos

---

### **Anexo 1: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
  - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
  - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
  - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: [pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco  
Presidente da CPG/FCF/USP

## Anexo 2: Currículo Lattes

Mahyara Markievicz Mancio Kus

possui graduação em Engenharia Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena (2004). Atualmente é bolista de mestrado do CNPq. Realiza o mestrado em Ciências dos Alimentos na Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Saúde Coletiva, com ênfase em Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: ácidos graxos em alimentos, comparação de metodologias para extração de gordura.

### Última atualização em 15/04/2009

Endereço para acessar este CV:  
<http://lattes.cnpq.br/0918830853294079>

#### *Dados Pessoais*

Nome	Mahyara Markievicz Mancio Kus
Filiação	Mamerto Kus e Lavize Mancio Kus
Nascimento	17/09/1981 - Curitiba/PR - Brasil
Carteira de Identidade	282136563 SSP - SP - 09/12/1989
CPF	29092349836
Endereço residencial	Rua Boa Vista, 128 Centro - Moji das Cruzes 08717-140, SP - Brasil Telefone: 11 47994827
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Av. Professor Lineu Prestes, 580 - Bloco 14 - Laboratório de Lipides Butantã - Sao Paulo 05508-900, SP - Brasil
Endereço eletrônico	e-mail para contato : mahyarakus@yahoo.com.br e-mail alternativo : mahyara@usp.br

#### *Formação Acadêmica/Titulação*

2007	Mestrado em Ciências dos Alimentos. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Título: Determinação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por
------	--

- cromatografia em fase gasosa.  
Orientador: Jorge Mancini Filho  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2000 - 2004      Graduação em Engenharia Química.  
Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL, Lorena, Brasil
- 2008 - 2008      Graduação em Licenciatura para Bacharéis e Tecnólogos.  
Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Sao Paulo, Brasil

*Atuação profissional*

1. Universidade de São Paulo - USP

**Vínculo  
institucional**

- 2007 - Atual      Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista, Regime:  
Dedicação Exclusiva

**Atividades**

- 03/2007 - Atual      Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
*Participação em projetos:*  
*Determinação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (EPA, DHA) em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa.*

2. Instituto Adolfo Lutz - IAL

**Vínculo  
institucional**

- 2005 - 2007      Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Bolista de  
Treinamento Técnico - FAPESP , Carga horária: 40, Regime:  
Dedicação Exclusiva
- 2005 - 2005      Enquadramento funcional: Bolsista FUNDAP - Alimentos , Carga  
horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva

**Atividades**

- 11/2005 -  
04/2007      Projetos de pesquisa, Divisão de Bromatologia e Química

*Participação em projetos:  
Determinação de ácidos graxos saturados e trans em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia em fase gasosa*

### 3. Faculdade de Engenharia Química de Lorena - FAENQUIL

#### **Vínculo institucional**

2003 - 2004      Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica - FAPESP, Carga horária: 20, Regime: Dedicção Exclusiva

#### **Atividades**

09/2003 - 07/2004      Estágio, Diretoria Geral, Departamento de Engenharia Química

*Estágio:  
no Laboratório de Absorção Atômica, projeto sobre determinação de metais pesados e oligoelementos em leite materno*

#### *Projetos*

2007 - 2009      Determinação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (EPA, DHA) em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa  
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);  
Integrantes: Mahyara Markievicz Mancio KusJorge Mancini Filho (Responsável)  
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2005 - 2007      Determinação de ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia em fase gasosa

Situação: Em Andamento Natureza: Desenvolvimento  
Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1);  
Integrantes: Mahyara Markievicz Mancio KusSabria Aued Pimentel; Odair Zenebon (Responsável)  
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

#### *Áreas de atuação*

1. Alimentos
2. Química

### 3. Cromatografia

#### *Idiomas*

Alemão	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Pouco
Inglês	Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Bem, Lê Bem
Espanhol	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente

#### *Prêmios e títulos*

2007 Premio Adolfo Lutz, Instituto Adolfo Lutz

#### *Produção em C, T&A*

##### Produção bibliográfica

##### Artigos aceitos para publicação

- AUED-PIMENTEL, Sabria, SILVA, S. A., KUS, M. M. M., CARUSO, M. S. F., ZENEBON, O.
1. Avaliação dos teores de gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em alimentos embalados com alegação "livre de gorduras *trans*". Brazilian Journal of Food Technology (ITAL). , 2009.  
KUS, M. M. M., AUED-PIMENTEL, Sabria, MANCINI FILHO, J.
  2. Comparação de metodologias analíticas para a determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil. Revista do Instituto Adolfo Lutz. , 2009.  
SOARES, V. A., KUS, M. M. M., PEIXOTO, A. L. C., CARROCCI, J. S., SALAZAR, R. F. S., Izário Filho, H.J
  3. Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraiba region (Brazil). Food Control. , 2009.

##### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- AUED-PIMENTEL, Sabria, SILVA, S. A., KUS, M. M. M., CARUSO, M. S. F.
1. Ácido linoléico conjugado (CLA): avaliação de suplementos comerciais submetidos à vigilância sanitária In: XII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2008, São Paulo. **Anais do XII Congresso Brasileiro de Nutrologia.** , 2008.  
AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., SILVA, S. A., KUMAGAI, E.E., ZENEBON, O.
  2. Avaliação do método AOAC 996.06 modificado na determinação de gordura total e ácidos graxos para a rotulagem nutricional In: VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), 2008, Lorena. **Book of Abstracts do BMCFB.** , 2008. v.7. p.206 - 206
  3. AUED-PIMENTEL, Sabria, SILVA, S. A., KUS, M. M. M., CARUSO, M. S. F.,



- ZENECON, O.  
Avaliação dos teores de ácidos graxos saturados e *trans* em alimentos embalados com alegação no rótulo: "livre de gordura *trans*" In: XII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2008, São Paulo.  
**Anais do XII Congresso Brasileiro de Nutrologia.** , 2008.
- AUED-PIMENTEL, Sabria, SILVA, S. A., CARUSO, M. S. F., ZENECON, O., KUS, M. M. M.
4. Avaliação dos teores de ácidos graxos saturados e *trans* em alimentos embalados com alegação no rótulo: "livre de gordura *trans*" In: VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), 2008, Lorena.  
**Books of Abstracts do VII BMCFB.** , 2008. v.7. p.204 - 204  
KUS, M. M. M., AUED-PIMENTEL, Sabria, MANCINI FILHO, J.  
Comparação de metodologias na determinação de ácidos graxos polinsaturados (LA, ALA, ARA e DHA) em fórmula infantil por análise em cromatografia em fase gasosa In: VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), 2008, Lorena.  
**Book of Abstracts do BMCFB.** , 2008. v.7. p.207 - 207  
KUS, M. M. M., AUED-PIMENTEL, Sabria, MANCINI FILHO, J.  
Comparação de metodologias na determinação de ácidos graxos polinsaturados (LA, ALA, ARA e DHA) em fórmula infantil por análise em cromatografia em fase gasosa. In: XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, 2008, São Paulo.
  6. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008. v.44. p.76 - 76  
SILVA, S. A., CARUSO, M. S. F., AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M.  
Comparação de procedimentos para preparação de ésteres metílicos do ácido linoléico conjugado (CLA) em suplemento comercial In: VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), 2008, Lorena.  
**Book of Abstracts.** , 2008. v.7. p.205 - 205  
AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., KUMAGAI, E.E., CARUSO, M. S. F., TAVARES, M., ZENECON, O.
  8. Ácidos graxos *trans* em óleos vegetais polinsaturados refinados comercializados no estado de São Paulo In: VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2007, São Paulo.  
**Anais do VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz.** , 2007.  
KUS, M. M. M., AUED-PIMENTEL, Sabria, ZENECON, O., MANCINI FILHO, J.
  9. Determinação de ácido linoléico em fórmula infantil: comparação de métodos na extração de lipídios In: VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2007, São Paulo.  
**Anais do VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz.** , 2007.  
KUS, M. M. M., AUED-PIMENTEL, Sabria, ZENECON, O., MANCINI FILHO, J.
  10. Determinação de ácido linoléico em fórmula infantil: comparação de métodos na extração de lipídios In: XI Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2007, São Paulo.  
**Anais do XI Congresso Brasileiro de Nutrologia.** , 2007.  
AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., KUMAGAI, E.E., RUVIERI, V.,
  11. ZENECON, O.  
Gordura Total, ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios:

- comparação de procedimentos analíticos In: VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2007, São Paulo.  
**Anais do VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz.** , 2007.  
 AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., KUMAGAI, E.E., RUVIERI, V., ZENEBO, O.
12. Gordura total e ácidos graxos em produtos alimentícios: comparação de procedimentos analíticos In: XI Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2007, São Paulo.  
**Anais do XI Congresso Brasileiro de Nutrologia.** , 2007.  
 TAVARES, M., KUMAGAI, E.E., KUS, M. M. M., CARUSO, M. S. F., AUED-PIMENTEL, Sabria  
 Ácidos graxos *trans* em óleos vegetais refinados comercializados no estado de São Paulo In: III SIMBRAVISA - Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária, 2006, Florianópolis.  
**Anais do III SIMBRAVISA - Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária.** , 2006.  
 AUED-PIMENTEL, Sabria, KUMAGAI, E.E., KUS, M. M. M., CARUSO, M. S. F., TAVARES, M.
14. Ácidos graxos *trans* em óleos vegetais refinados comercializados no estado de São Paulo, Brasil In: X Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2006, São Paulo.  
**Anais do X Congresso Brasileiro de Nutrologia.** , 2006. p.72 - 72  
 AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., KUMAGAI, E.E., RUVIERI, V., ZENEBO, O.  
 Gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios:
15. comparação de procedimentos analíticos In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.  
**Anais do XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** , 2006. p.114 - 114  
 AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., KUMAGAI, E.E., RUVIERI, V., ZENEBO, O.
16. Gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios: comparação de procedimentos analíticos In: X Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2006, São Paulo.  
**Anais do X Congresso Brasileiro de Nutrologia.** , 2006. p.71 - 71  
 AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., KUMAGAI, E.E., RUVIERI, V., ZENEBO, O.
17. Gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios: comparação de procedimentos analíticos In: II Simpósio de Cromatografia, 2006, São Pedro.  
**Livro de Resumos SIMCRO 2006.** , 2006. p.49/247 - 49/247  
 AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., KUMAGAI, E.E., RUVIERI, V., ZENEBO, O.
18. Gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios: comparação de procedimentos analíticos In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.  
**Anais do XX Congresso de Ciência de Tecnologia de Alimentos.** , 2006.
19. SOARES, V. A., KUS, M. M. M., BALTAZAR, E. O., Izário Filho, H.J,

- BACCAN, N., CAPRI, M. R., NASCIMENTO, L. F. C.  
 Determination of essential oligo-elements in commercial milk In: 8th Rio  
 Symposium on atomic spectrometry, 2004, Paraty.  
**Book of abstracts.** , 2004. p.79 - 79
- KUS, M. M. M., SOARES, V. A., BALTAZAR, E. O., BACCAN, N., CAPRI, M.  
 R., NASCIMENTO, L. F. C., Izário Filho, H.J
20. Determination of essential oligo-elements in maternal milk (colostrum) In: 8th Rio  
 Symposium on atomic spectrometry, 2004, Paraty.  
**Book of Abstracts.** , 2004. p.80 - 80
- NASCIMENTO, L. F. C., KUS, M. M. M., SOARES, V. A., Izário Filho, H.J  
 Quantificação de Minerais em colostro e leite maduro humanos In: IV Congresso de  
 21. Pesquisa em Saúde da Criança e o Adolescente, 2004, São Paulo.  
**Revista Paulista de Pediatria.** São Paulo: Sociedade de Pediatria de São Paulo,  
 2004. v.22. p.35 - 35
- Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)
- AUED-PIMENTEL, Sabria, SILVA, S. A., KUS, M. M. M., CARUSO, M. S. F.,  
 ZENEON, O.  
 Avaliação dos teores de ácidos graxos saturados e *trans* em alimentos embalados com  
 1. alegação no rótulo: "livre de gordura *trans*" In: XXI Congresso Brasileiro de Ciência  
 e Tecnologia de Alimentos, 2008, Belo Horizonte.  
**Anais do XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** ,  
 2008.
- KUS, M. M. M., AUED-PIMENTEL, Sabria, MANCINI FILHO, J.  
 Comparação de metodologias na determinação de ácidos graxos polinsaturados (LA,  
 2. ALA, ARA e DHA) em fórmula infantil por análise em cromatografia em fase  
 gasosa. In: XII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2008, São Paulo.  
**Anais do XII Congresso Brasileiro de Nutrologia.** , 2008.
- AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., KUMAGAI, E.E., RUVIERI, V.,  
 ZENEON, O.  
 3. Gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios: comparação  
 de procedimentos analíticos In: XV Enaal - Encontro Nacional dos Analistas em  
 Alimentos, 2007, Fortaleza.  
**Anais do XV Enaal.** , 2007.
- AUED-PIMENTEL, Sabria, KUS, M. M. M., KUMAGAI, E.E., RUVIERI, V.,  
 ZENEON, O.  
 Gordura Total, Ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios: comparação  
 4. de procedimentos analíticos In: 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas,  
 gorduras e biodiesel, 2006, Varginha.  
**Anais do 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e  
 Biodiesel.** , 2006. v.3. p.696 - 700

## Eventos

### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB)**, 2008. (Congresso)

- Comparação de metodologias na determinação de ácidos graxos polinsaturados (LA, ALA, ARA e DHA) em fórmula infantil por análise em cromatografia em fase gasosa.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP**, 2008. (Congresso)
2. Comparação de metodologias na determinação de ácidos graxos polinsaturados (LA, ALA, ARA e DHA) em fórmula infantil por análise em cromatografia em fase gasosa.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) **XII Congresso Brasileiro de Nutrologia**, 2008. (Congresso)
3. Comparação de metodologias na determinação de ácidos graxos polinsaturados (LA, ALA, ARA e DHA) em fórmula infantil por análise em cromatografia em fase gasosa..
4. **IV Simpósio sobre ácidos graxos e saúde**, 2008. (Simpósio)
- Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz**, 2007. (Encontro)
5. Determinação de ácido linoléico em fórmula infantil: comparação de métodos na extração de lipídios.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Enaal - Encontro Nacional dos Analistas em Alimentos**, 2007. (Encontro)
6. Gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios: comparação de procedimentos analíticos.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) **XI Congresso Brasileiro de Nutrologia**, 2007. (Congresso)
7. Gordura total e ácidos graxos em preodutos alimentícios: comparação de procedimentos analíticos.
8. **III Simpósio sobre ácidos graxos e saúde**, 2007. (Simpósio)
- Apresentação de Poster / Painel no(a) **III SIMBRAVISA - Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária**, 2006. (Simpósio)
9. Ácidos graxos *trans* em óleos vegetais refinados comercializados no estado de São Paulo.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) **XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006. (Congresso)
10. Gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios: comparação de procedimentos analíticos.
- Apresentação de Poster / Painel no(a) **X Congresso Brasileiro de Nutrologia**, 2006. (Congresso)
11. Gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em produtos alimentícios: comparação de procedimentos analíticos.
- I Evento de Integração da Qualidade do Instituto Adolfo Lutz**, 2005.
12. (Encontro)
13. **5º Mini Simpósio da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz**, 2005. (Simpósio)

14. **Seminários sobre ética em pesquisa, 2005.** (Seminário)

15. **VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2005.** (Encontro)

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes  
em 03/07/2009 às 14:35:38.

## Anexo 3: Ficha do aluno emitida pelo fenixweb

**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Documento sem validade oficial**

### FICHA DO ALUNO

---

**9131 - 5555989/1 - Mahyara Markievicz Mancio Kus**

**Email:** mahyara@usp.br  
**Data de Nascimento:** 17/09/1981  
**Cédula de Identidade:** RG - 28.213.656-3 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado do Paraná  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Engenharia Química - Faculdade de Engenharia Química de Lorena - São Paulo - Brasil - 2004

---

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Ciência dos Alimentos  
**Área:** Bromatologia  
**Data de Matrícula:** 08/03/2007  
**Início da Contagem de Prazo:** 08/03/2007  
**Data Limite:** 08/09/2009  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Jorge Mancini Filho - 08/03/2007 a 26/08/2009 E.Mail: jmancini@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 08/03/2007  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 05/03/2009  
**Data do Depósito do Trabalho:** 17/07/2009  
**Título do Trabalho:** "Determinação de ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa"  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:** 15/09/2009  
**Data de Aprovação da Banca:** 29/07/2009  
**Data Máxima para Defesa:** 27/10/2009  
**Data da Defesa:** 26/08/2009  
**Resultado da Defesa:** Aprovado  
**Histórico de Ocorrências:** Ingressou no Mestrado em 08/03/2007  
Titulado em 26/08/2009

---

**Situação Atual:** Titulado em 26/08/2009



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 5555989/1 - Mahyara Markievicz Mancio Kus

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5870-5/3	Seminários em Ciência dos Alimentos e Nutrição	03/04/2007	12/06/2007	30	2	100.0	A	N	Concluída
FBA5702-3/2	Compostos Bioativos em Alimentos e sua Relação com a Saúde Humana	09/04/2007	25/04/2007	30	2	83.0	A	N	Concluída
FBA5703-4/1	Tópicos em Tratamento de Dados para Ciência e Tecnologia de Alimentos	11/06/2007	24/06/2007	60	4	95.0	B	N	Concluída
FBT5735-5/4	Modificação Industrial de Óleos e Gorduras	08/08/2007	14/09/2007	75	5	78.0	B	N	Concluída
FBA5748-1/3	Oxidação de Colesterol em Alimentos	03/09/2007	14/10/2007	60	4	90.0	A	N	Concluída
HNT5712-4/1	Nutrição na Infância (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	23/10/2007	30/11/2007	30	2	100.0	A	N	Concluída
FBA5712-5/1	Fisiologia da Nutrição I	02/04/2008	13/05/2008	90	6	91.0	A	N	Concluída
FBA5874-5/1	Química e Análise dos Alimentos Lipídicos	28/10/2008	08/12/2008	60	4	90.0	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de dissertação	
<b>Disciplinas :</b>	25	25	29
<b>Atividades Programadas:</b>			
<b>Seminários :</b>			
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	25	25	29

**Créditos Atribuídos à Dissertação: 71**

<b>Conceito até 31/12/1996:</b>
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 12 horas de atividade programada.
<b>Conceito a partir de 02/01/1997:</b>
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Situação Atual:** Titulado em 26/08/2009





Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
**Documento sem validade oficial**  
FICHA DO ALUNO

---

9131 - 5555989/1 - Mahyara Markievicz Mancio Kus

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
43102	Jorge Mancini Filho	FCF - USP	Presidente
1968648	Sabria Aued Pimentel	IAL - Externo	Membro
5079992	Neura Bragagnolo	UNICAMP - Externo	Membro

---

**Situação Atual:** Titulado em 26/08/2009

**Impresso em:** 11/09/09 10:50:10

#### Anexo 4: Fatores de conversão

Tabela 7-1. Fatores de conversão de metil éster de ácido graxo em ácido graxo ( $f_{AGi}$ ) e de conversão de metil éster de ácido graxo em triacilglicerol ( $f_{TGi}$ ).

Ácido graxo	Fatores de conversão	
	$f_{AGi}$	$f_{TGi}$
4:0	0,8627	0,9868
6:0	0,8923	0,9897
8:0	0,9114	0,9915
10:0	0,9247	0,9928
11:0	0,9300	0,9933
12:0	0,9346	0,9937
13:0	0,9386	0,9945
14:0	0,9421	0,9945
14:1	0,9417	0,9944
15:0	0,9453	0,9948
15:1	0,9449	0,9947
16:0	0,9481	0,9950
16:1	0,9477	0,9953
17:0	0,9507	0,9952
17:1	0,9503	0,9955
18:0	0,9530	0,9955
18:1	0,9527	0,9955
18:2	0,9524	0,9954
18:3	0,9520	0,9954
20:0	0,9570	0,9959
20:1	0,9568	0,9959
20:2	0,9565	0,9958
20:3	0,9562	0,9958
20:4	0,9560	0,9958
20:5	0,9557	0,9958
21:0	0,9588	0,9960
22:0	0,9604	0,9962
22:1	0,9602	0,9962
22:2	0,9600	0,9962
22:6	0,9590	0,9961
23:0	0,9620	0,9963
24:0	0,9633	0,9961
24:1	0,9632	0,9965

## Anexo 5: Fatores teóricos de correção de resposta do detector de ionização em chama

Exemplo de cálculo em relação ao 18:0.

CÁLCULO DO FATOR DE RESPOSTA TEÓRICO							
Fórmula=	$\frac{M_{AG}}{(n_{EMAG} - 1)M_{car}} = K_{AG}$						
M <sub>AG</sub> =	massa molecular do ester metílico de ácido graxo						
n <sub>EMAG</sub> =	número de átomos de carbonos do ester metílico de ácido graxo						
M <sub>car</sub> =	massa atômica do carbono (12,01)						
K <sub>AG</sub> =	fator de resposta para o ácido graxo						
em relação ao ácido graxo de sua escolha							
	$K'_{AG} = \frac{K_{AG}}{K_{escolhido}}$						
K' <sub>AG</sub> =	fator de relativo de correção para o ácido graxo						
K <sub>escolhido</sub> =	fator de resposta do DIC em relação ao ácido graxo escolhido						
AG	nº C do AG	nº C EMAG	nº H EMAG	nº O EMAG	M <sub>AG</sub>	K <sub>AG</sub>	K' <sub>AG</sub>
c4:0	4	5	10	2	102,117	2,1256661	1,539564699
c6:0	6	7	14	2	130,1686	1,8063919	1,308322685
c8:0	8	9	18	2	158,2202	1,6467548	1,192701678
c10:0	10	11	22	2	186,2718	1,5509725	1,123329074
c11:0	11	12	24	2	200,2976	1,5161426	1,098102672
c12:0	12	13	26	2	214,3234	1,4871177	1,077080671
c13:0	13	14	28	2	228,3492	1,4625581	1,059292824
c14:0	14	15	30	2	242,375	1,4415071	1,044046098
c14:1	14	15	28	2	240,3592	1,4295183	1,035362908
c15:0	15	16	32	2	256,4008	1,4232628	1,030832268
c15:1	15	16	30	2	254,385	1,4120733	1,022727958
c16:0	16	17	34	2	270,4266	1,4072991	1,019270168
c16:1	16	17	32	2	268,4108	1,3968089	1,011672377
c17:0	17	18	36	2	284,4524	1,3932135	1,009068314
c17:1	17	18	34	2	282,4366	1,3833404	1,001917452
c18:0	18	19	38	2	298,4782	1,3806929	1
c18:1	18	19	36	2	296,4624	1,3713683	0,993246408

As fórmulas para cálculo foram:

AG	nº C do AG	nº C EMAG	nº H EMAG	nº O EMAG	M <sub>AG</sub>	K <sub>AG</sub>	K' <sub>AG</sub>
c4:0	4	B17+1	2*(B17+1)	2	(C17*12,01)+(D17*1,0079)+(E17*15,994)	F17/((C17-1)*12,01)	G17/G\$32
c6:0	6	B18+1	2*(B18+1)	2	(C18*12,01)+(D18*1,0079)+(E18*15,994)	F18/((C18-1)*12,01)	G18/G\$32
c8:0	8	9	18	2	158,2202	1,646754788	G19/G\$32
c10:0	10	11	22	2	186,2718	1,550972523	G20/G\$32
c11:0	11	12	24	2	200,2976	1,516142608	G21/G\$32
c12:0	12	13	26	2	214,3234	1,48711768	G22/G\$32
c13:0	13	14	28	2	228,3492	1,462558125	G23/G\$32
c14:0	14	15	30	2	242,375	1,441507077	G24/G\$32
c14:1	14	B25+1	2*B25	2	(C25*12,01)+(D25*1,0079)+(E25*15,994)	F25/((C25-1)*12,01)	G25/G\$32
c15:0	15	16	32	2	256,4008	1,423262837	G26/G\$32
c15:1	15	B27+1	2*B27	2	(C27*12,01)+(D27*1,0079)+(E27*15,994)	F27/((C27-1)*12,01)	G27/G\$32
c16:0	16	17	34	2	270,4266	1,407299126	G28/G\$32
c16:1	16	17	32	2	268,4108	1,396808909	G29/G\$32
c17:0	17	18	36	2	284,4524	1,393213499	G30/G\$32
c17:1	17	18	34	2	282,4366	1,383340354	G31/G\$32
c18:0	18	B32+1	2*(B32+1)	2	(C32*12,01)+(D32*1,0079)+(E32*15,994)	F32/((C32-1)*12,01)	G32/G\$32
c18:1	18	19	36	2	296,4624	1,371368304	G33/G\$32

Tabela 7-2. Fatores teóricos de correção de resposta do detector de ionização em chama em relação aos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 23:0

Ácido graxo (AG)	$K_{AG}$	$K'_{16:0}$	$K'_{18:0}$	$K'_{23:0}$
4:0	2,12567	1,51046	1,53956	1,59295
6:0	1,80639	1,28359	1,30832	1,35369
8:0	1,64675	1,17015	1,19270	1,23406
10:0	1,55097	1,10209	1,12333	1,16228
11:0	1,51614	1,07734	1,09810	1,13618
12:0	1,48712	1,05672	1,07708	1,11443
13:0	1,46256	1,03927	1,05929	1,09602
14:0	1,44151	1,02431	1,04405	1,08025
14:1	1,42952	1,01579	1,03536	1,07126
15:0	1,42326	1,01134	1,03083	1,06658
15:1	1,41207	1,00339	1,02273	1,05819
16:0	1,40730	1,00000	1,01927	1,05461
16:1	1,39681	0,99255	1,01167	1,04675
17:0	1,39321	0,98999	1,00907	1,04406
17:1	1,38334	0,98298	1,00192	1,03666
18:0	1,38069	0,98109	1,00000	1,03468
18:1	1,37137	0,97447	0,99325	1,02769
18:2	1,36204	0,96784	0,98649	1,02070
18:3	1,35272	0,96122	0,97974	1,01371
20:0	1,35941	0,96597	0,98458	1,01872
20:1	1,35102	0,96001	0,97851	1,01244
20:2	1,34262	0,95404	0,97243	1,00615
20:3	1,33423	0,94808	0,96635	0,99986
20:4	1,32584	0,94212	0,96027	0,99357
20:5	1,31745	0,93615	0,95419	0,98728
21:0	1,35029	0,95949	0,97798	1,01189
22:0	1,34199	0,95359	0,97197	1,00567
22:1	1,33436	0,94817	0,96644	0,99996
22:2	1,32673	0,94275	0,96092	0,99424
22:6	1,29622	0,92107	0,93882	0,97137
23:0	1,33442	0,94821	0,96649	1,00000
24:0	1,32748	0,94328	0,96146	0,99480
24:1	1,32049	0,93831	0,95639	0,98956