

ROBSON LEANDRO SCHACKER

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO TEOR DOS ÁCIDOS
EICOSAPENTAENÓICO (EPA) E DOCOSAHEXAENÓICO (DHA)
EM ÓLEO DE PEIXE POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

Florianópolis – SC

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO TEOR DOS ÁCIDOS
EICOSAPENTAENÓICO (EPA) E DOCOSAHEXAENÓICO (DHA)
EM ÓLEO DE PEIXE POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

ROBSON LEANDRO SCHACKER

Relatório de conclusão de curso para obtenção do grau de bacharel em
Química

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

FLORIANÓPOLIS – SC

2004

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento do presente trabalho contou com a participação de pessoas especiais, as quais agradeço a seguir:

- Central de Análise
- Departamento de Química
- Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
- João Renato de Mendonça Strelau
- Fabricio Augusto Hansel
- Denyo Silva
- Fábio Roehrs
- Marcelo da Rosa Alexandre
- Luciano Henrique Campestrini
- Gilmar Conte

Agradeço especialmente à família, pelo apoio, carinho e compreensão.

*Aos meus pais Pedro e Janete
pelo amor e carinho.
Aos familiares pelo apoio e
incentivo.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Gorduras.....	12
2.2 Lipídios.....	13
2.3 Ácidos graxos.....	14
2.4 Ácidos graxos saturados.....	15
2.5 Ácidos graxos monoinsaturados.....	15
2.6 Ácidos graxos polinsaturados.....	16
2.6.1 Série ou família ômega-3.....	16
2.7 Análise de ácidos graxos.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Amostras.....	19
3.1.1 Apresentação das amostras.....	19
3.1.2 Aquisição das amostras.....	19
3.2.1 Materiais e equipamentos da extração.....	20
3.2.2 Materiais e equipamentos para análise.....	20
3.2.3 Extração das amostras.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5 CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXOS.....	34
Anexo I.a Fórmulas.....	35
Anexo I.b Fórmulas e estruturas.....	36
Anexo II Figuras 1 e 2.....	37
Anexo III Figuras 3 e 4.....	38

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos lipídios simples.....	13
Tabela 2: Características e ocorrência dos principais ácidos graxos saturados e insaturados presentes em gorduras.....	15
Tabela 3: Características das espécies de peixes tomadas como amostra.....	19
Tabela 4: Reagentes usados no procedimento de extração.....	20
Tabela 5: Padrões usados na análise.....	21
Tabela 6: Concentração das soluções padrão usadas para determinar a resposta do detector.....	24
Tabela 7: Resultados dos cálculos das médias das áreas e fator resposta (Fr) para as soluções padrão do estearato de metila (C18:0) e metil cis-13-docosenoato (C23:1).....	25
Tabela 8: Percentual de C23:1 usando os fatores resposta propostos.....	26
Tabela 9: Percentuais de EPA e DHA em relação ao total de ácidos identificados no cromatograma em anexo (anexo III).....	28

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de um triglicerídeo misto contendo dois ácidos insaturados.....	13
Figura 2: Reação de saponificação de um triglicerídeo.....	14
Figura 3: Caminho simplificado do metabolismo para a série ômega-3.....	16
Figura 4: Reação de derivação de um ácido produzindo éster.....	17
Figura 5: Fluxograma do procedimento de extração das amostras.....	23
Figura 6: Sequência de eluição por tempo de retenção (min) de uma das amostras de sardinha em uma coluna DB-WAX (polar).....	27

RESUMO

O óleo de peixe é rico em ácidos graxos que possuem atividades fisiológicas e biológicas. Atualmente esses ácidos têm sido usado na prevenção de doenças cardiovasculares, doenças da pele, além de ajudar efetivamente na formação de tecidos do cérebro.

Objetivando a identificação e quantificação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) no óleo de peixe; o presente trabalho apresenta uma metodologia de extração e derivatização para o óleo dos peixes galo (*Selene vomer*) e sardinha (*Opisthonema oglinum*), utilizados como amostras. As análises foram realizadas por cromatografia gasosa em coluna capilar DB-1 (apolar). Os resultados obtidos permitiram testar a eficiência dos métodos utilizados e observar uma possível tendência para o peixe-galo em apresentar um percentual maior de EPA em relação ao ácido DHA presente no óleo desse peixe.

INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos têm-se verificado um interesse crescente em determinados alimentos, contendo componentes com atividades fisiológica e biológica para além dos seus nutrientes, chamados alimentos funcionais. O termo alimento funcional apareceu pela primeira vez na década de 80, para designar alimentos processados contendo ingredientes que melhoravam determinadas funções corporais para além do seu papel nutritivo. Alimentos não modificados tais como o peixe e a carne de vaca representam os exemplos mais simples de alimentos funcionais, uma vez que são ricos nos componentes com atividade fisiológica tais como ácidos graxos ômega-3 e ácido linoléico conjugado (Mateus, 2002 e referências).

O peixe tem sido usado há muitas décadas como fonte de vitaminas A e D, encontradas em grande quantidade no óleo do fígado. Mas um grande impulso foi dado ao consumo de peixe após o início do desenvolvimento da ciência nutricional; o peixe tornou-se um alimento funcional, com um grande potencial nutritivo. A carne de peixe passou a ser recomendada como fonte de proteína de alto valor biológico e o peixe inteiro como fonte de cálcio e fósforo. Devido à alta digestibilidade das proteínas, os peixes magros têm sido recomendados pelos médicos para pessoas que consomem grandes quantidades de carboidratos. Mas sem dúvida, o efeito mais marcante do consumo do peixe, reside no fato de conter baixo teor de colesterol e alto teor de ácidos graxos polinsaturados, sendo assim recomendado nas dietas especiais para pessoas com problemas das coronárias (O Lan on line).

Pode-se encontrar na literatura informações sobre a ação de alguns ácidos graxos polinsaturados ômega-3 em certas etapas de desenvolvimento do ser humano. Esses ácidos podem ser provenientes diretamente da alimentação (produtos ricos em ácidos graxos polinsaturados ômega-3), como também ser formados a partir de precursores da mesma série metabólica presente em uma dieta. O consumo ou a ingestão dos precursores de uma série ômega-3 dependerá da etapa de desenvolvimento, do seu estado nutricional, das necessidades fisiológicas destes ácidos graxos e das necessidades por parte de tecidos específicos.

Ácidos graxos das famílias ômega 3 e 6 são considerados essenciais, pois não podem ser sintetizados pelo organismo humano. Existem diversas fontes destes ácidos; no entanto, é em organismos de origem marinha que os ácidos graxos polinsaturados ômega-3 são relativamente abundantes. No que diz respeito aos vegetais marinhos (algas, microalgas e componentes do fitoplâncton), esses ácidos são sintetizados a partir de precursores de menor tamanho molecular, pois tais organismos têm a capacidade de alongar e dessaturar (introduzir duplas ligações) os ácidos graxos com estruturas simples.

Para animais de origem marinha (peixes, crustáceos, bivalves, mamíferos) a presença desses ácidos essenciais deve-se a capacidade que esses organismos têm em sintetiza-los a partir de precursores de menor complexidade, como é o caso do ácido alfa linolênico. Entretanto, ácidos precursores como o alfa linolênico podem ser incorporados aos tecidos destes animais como parte da cadeia alimentar (CUNHA, 2001 e referências).

De acordo com Jorge *et al* (1997, e referências), a possibilidade de que o aumento do consumo de ácidos polinsaturados ômega-3, EPA e DHA possam proteger contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares arterioscleróticas decorreu das observações de Bang *et al* (1976) e Dyerberg *et al* (1975), considerando a baixa prevalência de doenças cardiovasculares arterioscleróticas em esquimós da Groelândia que utilizam altos teores dessas substâncias na sua alimentação. Os mecanismos propostos incluem desde modificações favoráveis nos níveis de lipídios plasmáticos, alterações hepáticas no metabolismo do colesterol, até redução da captação do colesterol pelo fígado. Estudos que avaliaram o efeito do EPA e DHA sobre o perfil lipídico, de um modo geral, demonstraram redução das VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa) e da trigliceridemia. Entretanto, o principal efeito dos ácidos graxos ômega-3 sobre as doenças coronárias estaria na sua ação sobre a agregação plaquetária, redução na produção de TXA₂ (causador de coágulos) e prolongamento do tempo de sangramento. Os ácidos desta família ainda podem colaborar na prevenção de doenças da pele, como eczemas e psoríase, além de evitar artrites e ajudar efetivamente na formação de tecidos do cérebro.

Com o objetivo de reduzir a hipercolesterolemia (uma elevação no nível sanguíneo do colesterol total), muitos trabalhos têm métodos para este fim; tais como alimentação de animais para o consumo humano, com ração contendo óleo de peixe; neste sentido Morelato *et al* (1998, e referências) argumentou que a composição da gordura de suínos

recebendo diferentes concentrações de óleo de peixe na ração sofreu um aumento na concentração dos ácidos graxos poliinsaturados, especialmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), com redução apenas nos ácidos oléico (18:1) e linoléico (18:2), na medida que aumentou a concentração do óleo na dieta dos animais.

No mesmo âmbito, Moschen *et al* (2000, e referências) relatou o uso do crustáceo “artemia”, enriquecido com óleo de peixe, no desenvolvimento de larvas de várias espécies de peixes cultivadas industrialmente. É uma prática comum a utilização do procedimento chamado de enriquecimento, o qual incorpora estes nutrientes ao alimento vivo, antes deles serem fornecidos às larvas. A capacidade que as larvas de peixe têm para converter o ácido linolênico (18:3 ω -3) em EPA e DHA é muito limitada, por isso uma dieta contendo tais ácidos é necessária para um bom desenvolvimento. Emulsões à base de óleos de peixe marinho estão disponíveis no mercado para tal objetivo.

Alimentos enriquecidos com EPA e DHA são empregados com grande sucesso na larvicultura, melhorando a sobrevivência, crescimento e metamorfose de várias espécies de peixes marinhos. Contribui também para uma menor incidência de deformações, melhora na pigmentação e na resistência ao estresse.

De acordo com as referências acima, nota-se claramente que os ácidos graxos ômega-3 desempenham importante papel nos organismos, tanto humano como animal. O potencial destes ácidos está sendo explorado comercialmente por empresas de suplementação alimentar, bem como empresas alimentícias que produzem leite, margarina e produtos carneos enriquecidos com ômega-3.

Tendo em vista estas observações, o presente trabalho teve como objetivo verificar o percentual dos ácidos EPA e DHA (ambos da família ômega-3) em duas espécies de peixes encontradas no mercado, de consumo popular, que são conhecidas como sardinha (*Opisthonema oglinum*) e galo (*Selene vomer*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gorduras

As gorduras constituem um importante papel na dieta humana; como alimento elas fazem com que uma refeição provoque maior plenitude gástrica, ou seja, elas causam uma sensação de saciedade e aumentam o sabor dos alimentos. Por possuírem um alto valor calórico, as gorduras servem de reserva energética para o organismo animal, além de outras funções como atuar no transporte de vitaminas lipossolúveis.

Em termos de classificação, as gorduras e outras substâncias gordurosas encaixam-se na categoria de lipídio, pois são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos tais como clorofórmio e éter.

Uma gordura é constituída principalmente por misturas de triglicerídeos, que contêm ácidos graxos com diferentes números de insaturações e tamanhos de cadeia. Gorduras que possuem ácidos graxos com cadeias menores ou mais insaturados tendem a formar pontos de fusão mais baixo; assim, tais gorduras líquidas à temperatura ambiente são, em geral, chamadas de óleos (Mitchell *et al*, 1978).

Os óleos de organismos marinhos tais como peixes, mamíferos, plâncton e algas, são compostos por lipídios ricos em ácidos graxos polinsaturados de cadeias longas (20-22 átomos de carbono). Mas a composição desses óleos não é invariável, pois de acordo com as estações do ano, tipo de alimentação, geografia e espécie, ocorre uma elevada variação nos percentuais desses ácidos. Para o caso particular do óleo de peixe, a faixa de variação do EPA pode ser entre 4 e 30% e o DHA entre 2 e 25%. Estes dois ácidos graxos representam os polinsaturados de maior importância entre os lipídios oriundos de peixes (Rego, 2003 e referências).

2.2 Lipídios

Os lipídios são classificados como grupos de compostos heterogêneos encontrados em alimentos e organismos possuindo propriedades em comum, que incluem sua insolubilidade em água e sua capacidade de ser usado pelos organismos vivos.

Uma das classes mais importantes de lipídios pode ser observada na Tabela 1. Sendo denominada de lipídios simples, esta classe é de grande importância para a nutrição, uma vez que inclui os triglicerídeos, sendo estes os constituintes de maior proporção nos óleos de origem natural (Mahan, 1998).

Tabela 1- Classificação dos lipídios simples

-
- Ácidos graxos
 - Gorduras neutras: ésteres de ácidos graxos com glicerol monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos
 - Ceras: ésteres de ácidos graxos com álcool de alto peso molecular ésteres esterol (ex: éster colesterol) éster não esterol (ex: ésteres de vitamina A)
-

Os triglicerídeos são compostos derivados de ésteres de ácidos graxos com o glicerol (Figura 1). Na natureza os triglicerídeos encontram-se na forma mista, sendo que os três ácidos ligados ao glicerol são diferentes ou somente dois são iguais.

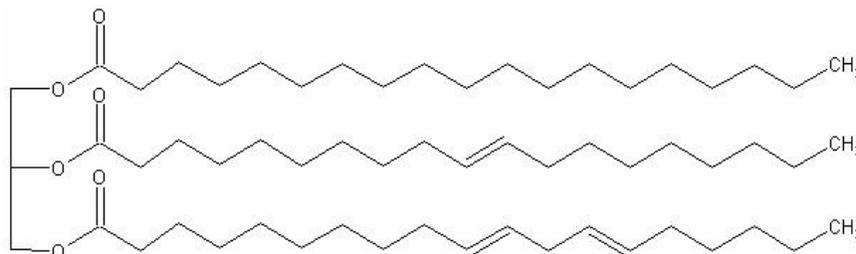


Figura 1- Estrutura de um triglicerídeo misto contendo dois ácidos insaturados.

A função biológica primária dos triglicerídeos nos animais são de armazenamento de energia. Quando metabolizados fornecem mais quilocalorias por grama do que os

carboidratos e proteínas. O armazenamento desses lipídios é função das células especializadas chamadas adipócitos, que compõem o tecido adiposo, mais abundantemente na cavidade abdominal e camada subcutânea.

Os triglicerídeos sofrem uma reação de grande importância biológica na presença de base (ou enzimas) produzindo o glicerol e uma mistura de sais de ácidos carboxílicos de cadeias longas. Esta reação recebe o nome particular de saponificação (Figura 2).

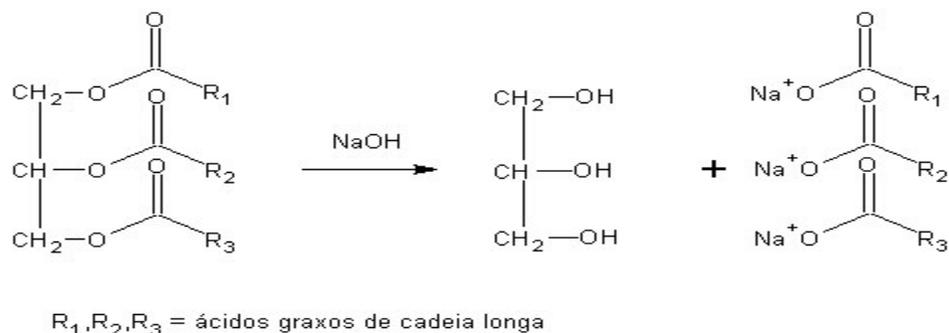


Figura 2- Reação de saponificação de um triglicerídeo com base (NaOH) em meio aquoso.

2.3 Ácidos graxos

As unidades fundamentais da maioria dos lipídios são formadas por compostos carbonílicos de cadeias longas, denominados ácidos graxos. No geral, estes ácidos possuem de 4 a 24 átomos de carbono unidos a um grupo carboxila único. Não ocorrem livremente nas células, mas sim combinados a diferentes classes de lipídios, a partir dos quais podem ser liberados por hidrólise química ou enzimática. Quando encontrados na natureza, quase sempre apresentam cadeias lineares e um número par de átomos de carbono. Eles diferem entre si pela extensão da cadeia e a presença, número e posição das duplas ligações. Os ácidos graxos de cadeia menor são solúveis em água, mas com o aumento do comprimento da cadeia esta propriedade decresce, de maneira que, generalizando se pode afirmar que a maioria dos ácidos de ocorrência natural é insolúvel em água. Os solventes mais comuns de gordura também dissolvem os ácidos graxos de cadeias maiores.

De acordo com a presença e quantidade de duplas ligações na porção hidrocarbônica, os ácidos graxos podem ser classificados como saturados, monoinsaturados e polinsaturados (Lehninger, 1991) (ver estruturas no Anexo I.b).

2.4 Ácidos graxos saturados

Entre os ácidos graxos saturados, de ocorrência em gorduras, destacam-se: o ácido mirístico (com 14 carbonos), palmítico (com 16 carbonos) e o ácido esteárico (com 18 carbonos); suas características e ocorrência podem ser observadas na Tabela 2 (Vianni e Braz-filho, 1996).

Tabela 2- Características e ocorrência dos principais ácidos graxos saturados e insaturados presentes em gorduras

Ácidos	Características e ocorrência
Mirístico	Componente de 15-30% da gordura do coco e 8-12% da gordura do leite.
Palmítico	Ocorre praticamente em toda gordura de origem animal e vegetal. Componente de 30-50% no óleo de dendê e 20-30% na banha e sebo.
Esteárico	Ocorre na maioria dos óleos vegetais. Componente de 35% da manteiga do cacau e 12% do leite.
Oléico	É amplamente distribuído na gordura natural Funciona como precursor dos ácidos: linoléico(18 carbonos, 2 insaturações), eicosadienoico (20 carbonos, duas insaturações), eicosatrienóico (20 carbonos, três insaturações), docosatrienóico (22 carbonos, três insaturações).

2.5 Ácidos graxos monoinsaturados

Em geral podem ser divididos em famílias, que são classificadas de acordo com a posição de sua insaturação em relação ao agrupamento metílico terminal. Os principais ácidos deste grupo são os pertencentes a família ômega-9. Essa designação indica que a última insaturação localiza-se no nono carbono após o grupo metil terminal (Wardlaw, 1995). As características e ocorrência do ácido mais importante deste grupo pode ser observada na Tabela 2.

2.6 Ácidos graxos polinsaturados

São compostos que possuem duas ou mais insaturações ao longo da cadeia hidrocarbônica. Comumente são representados pelo número de carbonos totais, seguidos pelo número de insaturações que compõem a cadeia; desta forma o ácido linolênico pode ser representado por C18:3 e o araquidônico por C20:4.

Juntamente com o ácido linoléico (C18:2), os ácidos araquidônico e linolênico pertencem aos chamados ácidos graxos essenciais. São ditos essenciais os ácidos que não podem ser sintetizados pelo organismo humano, sendo requeridos através da dieta. São indispensáveis à saúde porque fazem parte da membrana celular, além de serem necessários para o transporte do colesterol, produção de energia, funcionamento do cérebro entre outras funções. Depois de ingeridos, estes ácidos são dessaturados e alongados para formar seus metabólitos (Moura, 1998; Carvalho *et al*, 2003 e referências).

2.6.1 Série ou família ômega-3

Os ácidos pertencentes a esta série ou família possuem sua última insaturação no terceiro carbono, contados do grupo metila terminal; são sintetizados de um bioprecursor, também desta série, chamado ácido α -linolênico. Tal ácido fornece como metabólitos os ácidos de maior importância desta série que são: os ácidos eicosapentaenóico(EPA) e o ácido docosahexaenóico(DHA). O fato do óleo de peixe conter grande quantidade de ômega, deriva desta converção por alongamento e dessaturação da cadeia, uma vez que o organismo do peixe possui esta propriedade (Figura 3) (Mahan, 1998).

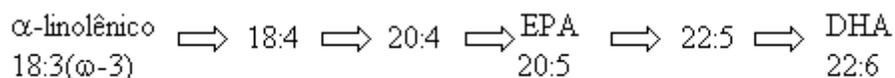


Figura 3- Caminho simplificado do metabolismo para a série ômega-3

Um dos motivos pelos quais os ácidos graxos ômega-3 são fisiologicamente singulares no combate a doenças cardíacas é a produção de tromboxano TXA3, um fraco agente agregador plaquetário, e prostaglandina PGI3, um forte anti-agregador. Estes eicosanóides, como são chamados, derivam da bioconversão do ácido eicosapentaenóico (EPA) e atuam contra a ação de fortes agregadores de plaquetas como o tromboxano TXA2, que é sintetizado a partir do ácido araquidônico (20:4). Podem atuar ainda inibindo a conversão deste ácido para tromboxano TXA2.

Esta série também é responsável pelo controle de triglicerídeos plasmáticos inibindo a formação de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), que são encarregadas do transporte de lipídeos produzidos no fígado para o tecido adiposo. Conseqüentemente evitam doenças relacionadas com o aumento dos triglicerídeos (Mahan, 1998).

2.7 Análise de ácidos graxos

A cromatografia gasosa tem sido usada como um método analítico eficiente na qualificação e quantificação de ácidos graxos provenientes de óleos e gorduras. Para tal, é utilizado um cromatógrafo a gás equipado com coluna capilar e preferencialmente um detector seletivo para compostos orgânicos.

As etapas da análise podem incluir um tratamento prévio da amostra, uma vez que os ácidos graxos de cadeia longa apresentam baixa volatilidade e estabilidade térmica. Uma derivação é preferível para garantir a eficiência do método; o grupo carboxila do ácido é convertido para um grupo mais volátil, como metil-éster (Figura 4) (Vianni e Braz-filho, 1996).

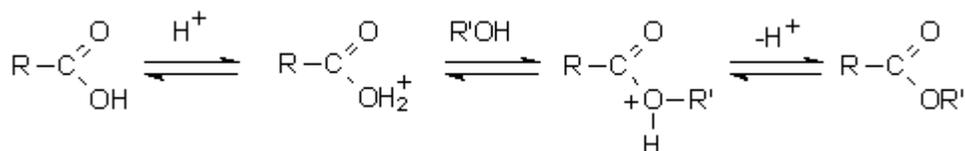


Figura 4- Reação de derivação de um ácido produzindo éster, onde R representa a cadeia carbônica do ácido graxo e R', a cadeia do álcool reagente.

Após a preparação do derivado, a amostra é introduzida no injetor através de uma microseringa. Os compostos são separados de acordo com seus fatores de retenção. No estágio final da análise dos compostos detectados, que eluem da coluna, formam-se picos em forma de gaussiana que correspondem à concentração de cada componente da amostra. Através da comparação com padrões, de ácidos graxos, estes compostos eluidos podem ser identificados e quantificados (Jeffery *et al*, 1992). A praticidade deste método analítico faz com que a análise de ácidos graxos, de óleos e gorduras, se torne uma rotina em laboratórios que dispõem de um cromatógrafo a gás.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

3.1.1 Apresentação das amostras

As amostras consistem em peixes comumente encontrados em mercados, feiras e pesqueiros regionais; são eles: três sardinhas e três peixes-galo (ver Tabela 3).

Tabela 3- Características das espécies de peixes tomadas como amostra

Nome	Características
Galo	<ul style="list-style-type: none"> - Classe Osteichthyes, Família Carangidae - Forma achatada e cabeça alta - Vivem em águas abertas, mas aproximam-se das praias - Cor prateada - Espécie: <i>Selene vomer</i>
Sardinha	<ul style="list-style-type: none"> - Classe Osteichthyes, Família Glupeiidae - Peixe pequeno de cor prateada - Observado na região litorânea em cardumes - Pode-se encontrar também em estuários e lagoas - Espécie: <i>Opisthonema oglinum</i>

3.1.2 Aquisição das amostras

As amostras de peixe foram adquiridas no mercado público localizado no centro da cidade de Florianópolis, em 09 de setembro de 2004. Encontravam-se parcialmente congeladas, com escamas e víceras; mediam aproximadamente 20 cm cada.

3.2.1 Materiais e equipamentos da extração

Os reagentes usados na extração das amostras de gordura estão listados na Tabela 4.

Tabela 4- Reagentes usados no procedimento de extração

Nome	Pureza	Fabricante
Hexano	98% (CG-FID)	Carlo Erba
Tolueno	99,98% (ABSOLV)	Tedia
Metanol	99,9% (HPLC)	Carlo Erba
Diclorometano	99,9% (HPLC)	Burdick & Jackson
Clorofórmio	99,9% (ABSOLV)	Tedia
Ac. clorídrico	37% (P.A)	Quimex
Cloreto de acetila	99%	Fluka
Cloreto de potássio	99,5%	Vetec Q. F. Ltda
Hidróx. de potássio	85% - lentilhas	Vetec Q. F. Ltda
Sulfato de sódio	99% - anidro (P.A)	Vetec Q. F. Ltda

Os equipamentos de laboratório utilizados durante a extração foram : ultrassom (Unique), centrífuga (Fanem), vortex (Phoenix), rotavapor (Fisatom), liofilizador (Heto), multiprocessador (Black & Decker) e vidrarias.

3.2.2 Materiais e equipamentos para análise

a) Padrões

Os padrões utilizados nas análises das gorduras dos peixes estão listados na Tabela 5. Esses padrões foram escolhidos devido à semelhança com os compostos de interesse nesse trabalho.

Tabela 5- Padrões usados na análise

Nome	Pureza	Fabricante
Estearato de metila	99% (CG)	Nacalai Tesque INC
Metil cis-13-docosenoato	97% (CG)	Fluka

b) Equipamentos:

- cromatógrafo gasoso: modelo GC-17A SHIMADZU com programa CLASS-GC10 versão 1.3.
- detector de ionização de chama (DIC).
- injeção manual (volume de 1 μ L).
- coluna: DB-1, J&W; 100%- dimetilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura da fase estacionária).
- Programação de temperatura (n^o1): 50 °C; 10 °C /minuto até 300 °C; isoterma 30 minutos. Split 1:50 com velocidade do gás de arraste (N₂) em 1.4 mL/minuto.
- Coluna: DB-WAX, SHIMADZU; polietilenoglicol (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura da fase estacionária).
- Programação de temperatura (n^o2): 100 °C, 10 °C/minuto até 250 °C; isoterma 30 minutos. Split 1:50 com velocidade do gás de arraste (N₂) em 1.4 mL/minuto.

3.2.3 Extração das amostras

Individualmente as amostras foram limpas em água corrente após retiradas as víceras e escamas. Com o auxílio de um multiprocessador, cada peixe foi triturado inteiro até formar uma pasta uniforme. Esta pasta de peixe foi congelada e depois permaneceu aproximadamente doze horas em um aparelho de liofilização, para retirada da água.

Devidamente liofilizadas, as amostras (cerca de 300 mg) passaram para um tubo de ensaio com tampa, onde receberam uma quantidade de solvente (metanol/clorofórmio; 2:1) três vezes maior que o volume ocupado pela amostra sólida.

Os tubos foram agitados no vortex por dois minutos e colocados no ultrassom, onde permaneceram por vinte minutos, para a extração dos lipídios totais. Terminados os vinte minutos, os tubos foram centrifugados e o líquido passado para um balão; efetuou-se este procedimento três vezes para garantir a extração dos lipídios pelo solvente. As três porções do solvente contendo os lipídios, formavam um volume de aproximadamente 10 mL, que foi reduzido para 2 mL em um rotaevaporador, com banho na temperatura de 50-60 graus.

Uma reação de saponificação dos lipídios (ver Figura 2) foi efetuada com 5 mL de solução KOH/MeOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) em um tubo de ensaio contendo os 2 mL de extrato. Estes tubos permaneceram fechados em estufa por uma hora à $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ao extrato saponificado foi adicionado 3 mL de hexano para a separação dos compostos não saponificáveis, como os esteróis. Repetiu-se o procedimento por mais 2 vezes para total separação; sempre utilizando a centrífuga e uma pipeta Pasteur para recolher a fase orgânica, que foi descartada.

Para que os sais orgânicos passassem para a forma ácida, uma solução de HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada até pH 1. Seguiu-se uma adição de 3mL de hexano para extrair os ácidos e separá-los da fase aquosa, que foi descartada depois de duas outras extrações com hexano. Novamente o extrato foi separado utilizando a centrífuga (2 minutos) e uma pipeta Pasteur para a coleta do mesmo, em um balão de fundo redondo. O volume de hexano foi reduzido para aproximadamente 2 mL e transferido para um tubo com tampa.

A reação de esterificação (ver Figura 4) dos ácidos graxos foi efetuada com 2mL de solução cloreto de acetila em metanol gelado (1:10), adicionada no tubo contendo os ácidos em hexano, juntamente com 1mL de tolueno. Esta solução permaneceu na estufa durante cinco horas à $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Após cinco horas, o tubo contendo os ésteres recebeu 1 mL de CH_2Cl_2 e 1 mL de solução 10% de KCl (p/v); esta mistura foi centrifugada e separada, tomando-se a fase inferior (que contém os ésteres) e descartando-se a fase superior após outras duas extrações com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$. Posteriormente o extrato de CH_2Cl_2 foi submetido a uma coluna de sulfato de sódio anidro; o eluato contendo os ésteres foi recolhido em um tubo e concentrado em fluxo de nitrogênio até um volume apropriado (Maia e Amaya, 1993; Hansel, 2000). Os tubos permaneceram no congelador até sua utilização.

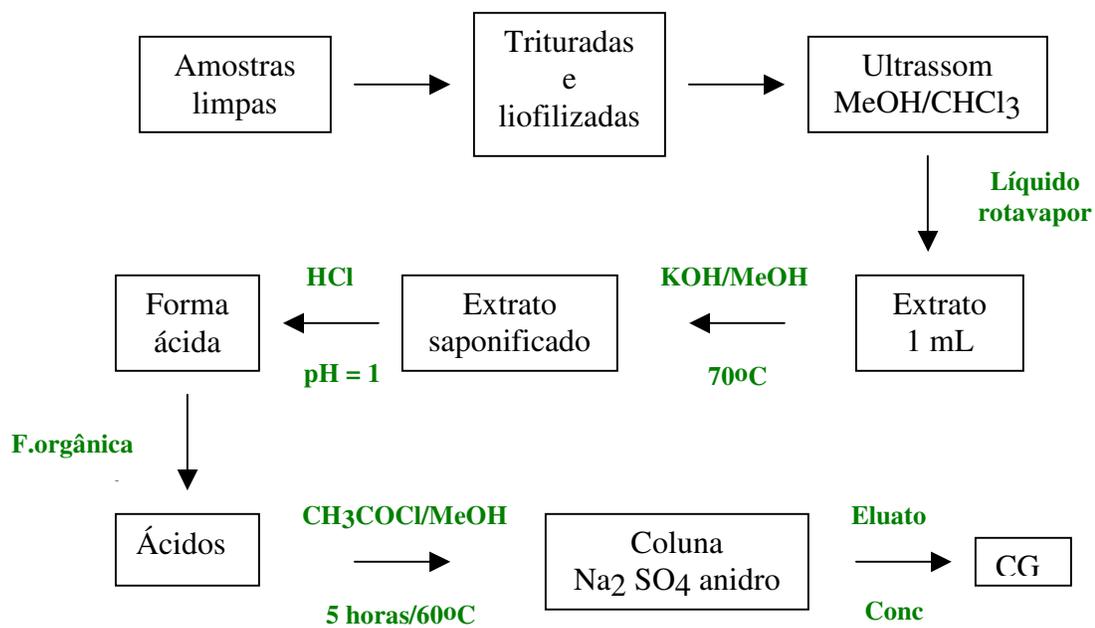


Figura 5-Fluxograma do procedimento de extração das amostras

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foram preparadas soluções padrão de dois ésteres metílicos para testar a resposta do detector diante de compostos com diferentes números de átomos de carbono e saturações. Para isso foram usados os compostos estearato de metila (C18:0, saturado) e metil cis-13-docosenoato (C23:1; insaturado). Foram preparadas cinco soluções contendo estas duas substâncias juntas, nas concentrações mostradas na Tabela 6.

Tabela 6- Concentração das soluções padrão usadas para determinar a resposta do detector

Solução	Conc.C18:0($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc.C23:1($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	5,05	5,03
2	10,10	10,03
3	20,20	20,02
4	30,10	30,01
5	50,19	50,03

Aproximadamente 2 μL de cada padrão foram injetados no cromatógrafo com programação de temperatura nº1 (ver item 3.2.2.b) e coluna DB-1.

Cada padrão foi injetado em triplicata e utilizou-se as áreas para calcular os fatores resposta do detector para cada substância nas diferentes concentrações (ver Figura 1 no Anexo II). Um teste Q foi aplicado a cada conjunto de triplicatas antes do cálculo do fator resposta (Fr); nenhum valor de área foi rejeitado. A fórmula para o cálculo do Fr encontra-se no Anexo I.b.

Um Fr médio foi obtido através da média aritmética dos três Fr individuais em cada concentração. A Tabela 7 apresenta os dados correspondentes aos cálculos mencionados acima.

Tabela 7- Resultados dos cálculos das médias das áreas e fator resposta (Fr) para as soluções padrão do estearato de metila (C18:0) e metil cis-13-docosenoato (C23:1)

Solução	$\bar{A}(\text{C18})$	$\bar{A}(\text{C23})$	$\bar{\text{Fr}}(\text{C18})$	$\bar{\text{Fr}}(\text{C23})$
1	178	196	1,049	0,956
2	340	387	1,075	0,935
3	750	759	1,011	0,989
4	1143	1237	1,043	0,956
5	1856	2043	1,052	0,953
< $\bar{\text{Fr}}$ >			1,046	0,958
S			0,0230	0,020

\bar{A} : média das áreas de cada conjunto de triplicata.

$\bar{\text{Fr}}$: fator resposta médio das triplicatas.

< $\bar{\text{Fr}}$ >: média dos fatores médios.

S: desvio padrão dos $\bar{\text{Fr}}$ (anexo I).

Cada média do fator resposta recebeu um teste Q antes do cálculo da média dos valores médios; um teste F também foi realizado para comprovar que os valores têm precisões comparáveis para nível de 95% (ver Anexo I). Desta forma, os valores dados na Tabela 8 podem ser usados para cálculos posteriores com grande segurança.

De posse dos valores de concentração (Tabela 6) e área média (Tabela 7), é possível determinar qual dos padrões possui uma resposta mais linear. O composto C18:0 apresentou um valor mais próximo à linearidade, pois o coeficiente de correlação calculado para este composto é 0,9996, muito próximo de 1. O composto C23:1 apresentou um coeficiente de correlação menor, na ordem de 0,9994. Uma vez que a linearidade foi comprovada, pôde-se obter a equação da reta correspondente com o auxílio do programa Origin versão 5.0 (ver Anexo II) (Barbetta,1994; Jeffery *et al*,1992).

Segundo Ribani *et al* (2004 e referências), o limite de detecção e a quantidade mínima detectável podem ser calculados através dos parâmetros angular e linear da curva do padrão. Os valores obtidos para o limite de detecção e limite de quantificação foram 1,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estes valores consideram a precisão e exatidão do método que está vinculado à regressão linear da curva.

Para concluir o estudo da relação entre o sinal detectado e as percentagens dos compostos usados como padrões, uma hipótese teve que ser admitida: a percentagem não irá mudar mesmo que se use o Fr igual a “1” nos cálculos de percentual para ambos os padrões. Os seguintes cálculos foram realizados para confirmar esta hipótese:

- cálculo do percentual de C23:1, nas soluções padrão, usando os Fr médio da média dos fatores (mostrados na Tabela 7).
- cálculo do percentual de C23:1, nas soluções padrão, usando o Fr igual a 1 para ambos (C23:1 e C18:0).

A Tabela 8 apresenta os valores calculados acima utilizando a fórmula do Fr em anexo (Anexo I.b).

Tabela 8- Percentual de C23:1 usando os fatores resposta propostos

Solução	Fr=< \bar{Fr} >	Fr=1
1	50,21	52,20
2	51,04	52,86
3	48,10	49,85
4	49,78	51,81
5	50,20	52,24
Mp	49,87	51,79
S	1,088	1,149

Mp: média dos percentuais

S: desvio padrão dos percentuais

Um teste Q e um teste F foram aplicados nos valores de percentagens. O teste F resultou em precisões comparáveis possibilitando assim a aplicação do teste de student “t” sobre as médias (Anexo I.a); o valor encontrado para t demonstrou que a diferença entre as médias não possui significância para nível de 95% ($p=0,05$) de confiança. Conclui-se então que é possível utilizar o valor “1” para o fator resposta em ambos os padrões; da mesma forma, o detector responderá para todos os ésteres de ácidos graxos. O fato de haver insaturações na molécula parece não interferir significativamente no sinal do detector e conseqüentemente não vai alterar a percentagem dos ésteres considerados no presente trabalho.

Após as conclusões acima seguiu-se com a análise das amostras de peixe já extraídas e derivatizadas (ver item 3.2.3). Primeiramente foi necessário determinar a seqüência dos picos de interesse; para tal utilizou-se uma coluna DB-WAX (polar) com a programação de temperatura nº2 (ver item 3.2.2.b). A seqüência eluída pode ser identificada através da comparação com a referência AOAC (1995). Utilizando a referência, é possível identificar os compostos de maior percentagem, presentes nas amostras. Os compostos identificados na coluna DB-WAX serviram de referência para determinar a seqüência de eluição na coluna DB-1 (apolar); isso só foi possível porque o percentual de cada composto não muda. Se a mesma amostra for injetada na coluna polar ou apolar, ocorrerá apenas a inversão dos picos insaturados devido a maior interação dos mesmos com a fase estacionária. Os cromatogramas utilizados nestas identificações são provenientes da injeção de uma das amostras de sardinha em ambas as colunas. A Figura 6 ilustra a seqüência de eluição em uma coluna DB-WAX (polar) para uma das amostras de sardinha; a seqüência de eluição em uma coluna DB-1 (apolar) para a mesma amostra pode ser vista no Anexo III (Figura 3).

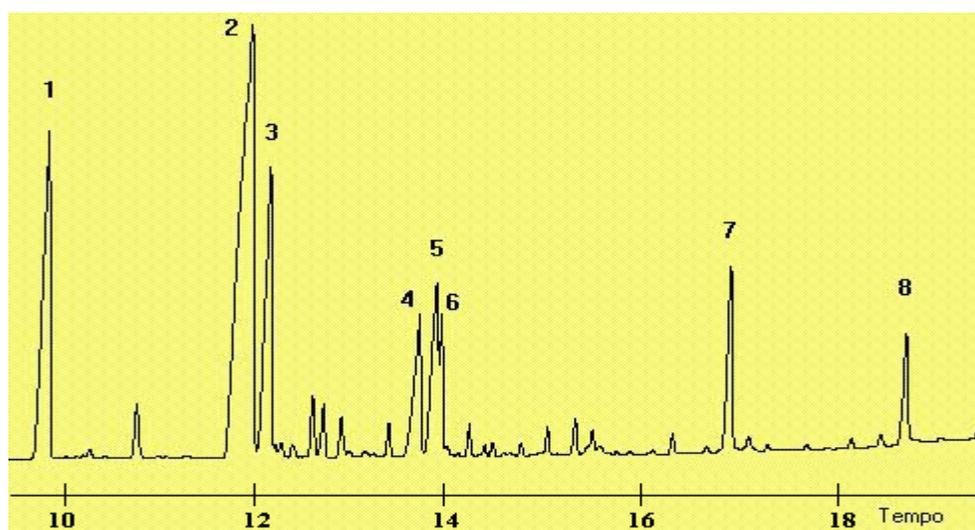


Figura 6-Seqüência de eluição por tempo de retenção (minutos) de uma das amostras de sardinha em uma coluna DB-WAX (polar): 1-C14:0 (9.858 min); 2-C16:0 (11.975 min); 3-C16:1(12.170 min); 4-C18:0 (13.724 min); 5-C18:1 ω 9 (13.904 min); 6-C18:1 ω 7 (13.953 min); 7-EPA C20:5 ω 3 (16.974 min); 8-DHA 22:6 ω 3 (18.803 min)

As três amostras de cada espécie de peixe foram injetadas no cromatógrafo com programação de temperatura nº1 e coluna DB-1 (ver item 3.2.2.b). Devidamente identificados os picos em cada cromatograma, foi possível obter os percentuais dos ácidos EPA e DHA, que são mostrados na Tabela 9 (Figuras 3 e 4; Anexo III).

Tabela 9-Percentuais de EPA e DHA em relação ao total de ácidos identificados no cromatograma em anexo (anexo III, Figura 3)

Amostra	% EPA	% DHA	C.V (EPA)	C.V (DHA)
G1	4,61	9,02	0,15	0,47
G2	3,89	8,35		
G3	6,52	17,1		
S1	2,90	3,06		
S2	9,48	7,97	0,70	0,50
S3	5,93	5,27		

C.V: Coeficiente de variação das triplicatas (ver Anexo I)

G: Referente ao peixe galo

S: Referente a sardinha

As amostras G1 e S2 foram injetadas em triplicata e os valores apresentados na “Tabela 9” representam a média dos valores. Com o valor do desvio padrão das triplicatas foi calculado o coeficiente (C.V) de variação, que representa o erro relativo dado em porcentagem (ver Tabela 9). Os coeficientes de variação têm valor pouco significativo sobre as médias das triplicatas permitindo-se afirmar que a grande diferença encontrada nos percentuais desses ácidos, em cada espécie e indivíduo, não é causada por erros durante as análises. No que diz respeito ao processo de extração, todos os procedimentos foram realizados conforme orientação do trabalho de Hansel (2000). Portanto, a diferenças acentuadas entre os percentuais desses ácidos, nas presentes amostras, deve-se ao metabolismo do próprio indivíduo no que se refere ao consumo e produção pelo seu organismo.

Embora não seja possível comparar as duas espécies tendo apenas três indivíduos, um dado importante pode ser observado na Tabela 9. O peixe galo apresentou valores para o DHA aproximadamente duas vezes acima dos valores para o EPA, nas três amostras. Entretanto nas amostras de sardinha ocorreram variações acentuadas entre esses ácidos, mas esse comportamento pode não ser incomum, pois é sabido que dentro de uma mesma espécie a composição do óleo varia muito de indivíduo para indivíduo.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos foi possível observar que a utilização de uma coluna apolar na quantificação de ésteres de ácidos graxos fornece resultados com grande precisão em termos de porcentagem. Melhores resultados necessitariam da utilização dos padrões de todos os ésteres dos ácidos escolhidos na quantificação, desta forma os fatores resposta (Fr) seriam obtidos e empregados com maior eficiência.

Embora exista uma grande variação na composição dos ácidos EPA e DHA no óleo de peixe, os valores de porcentagem do DHA encontrados no peixe-galo superaram os valores do EPA em cerca de duas vezes, para todas as amostras. Isso pode revelar uma tendência que esse peixe possui em ter uma maior quantidade do ácido DHA. Essa informação necessita de uma comprovação efetiva para confirmar esta tendência tomando-se um número maior de indivíduos para amostragem. O peixe galo pode até mesmo ser explorado comercialmente para a retirada desse ácido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. – Official Methods of Analysis, volume II, ed. 16^o, Virgin, USA, 1995, cap 41, p 17-23.
- BANG, H.O.; DYEBERG, J.; HJORNE, N. The composition of food consumed by greenland Eskimos. *Acta Med Scand* 1976:200:69-73.
- BARBETTA, P. A. Estatística aplicada às ciências sociais. Editora da UFSC, Florianópolis, 1994, p 160-213.
- CUNHA, C. A. C. Identificação e quantificação do teor de ácidos graxos poliinsaturados - ômega 3 - em frangos de corte. Florianópolis, 2001, p 7-25. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- DYERBERG, J .; BANG, H.O.; HJORNE, N. Fatty acid composition of the plasma lipid in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr*; v 28, 1975, p 958-66.
- HANSEL, F. A. Análise de biomarcadores lipídicos em sedimentos de manguezais. Florianópolis, 2000, p 37-41. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina.
- JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. Análise química quantitativa. Quinta edição, editora LTC, RJ, 1992, p 194-206.
- JORGE, P.A.R.; NEYRA, L.C.; OZAKI, R.M E.; ALMEIDA, E. Efeito dos ácidos graxos ômega-3 sobre o relaxamento dependente do endotélio em coelhos hipercolesterolêmicos. Artigo, *Arq Bras Cardiol*, v69(n^o 1), 1997. [on line]. Disponível na internet via www.scielo.br. Capturado em 16 de outubro de 2004.

- LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. Tradução W. R. Lodi e A. A. Simões, editora Sarvier, SP, 1991, p 223-239.
- MAHAN, L. K. Nutrição e dietoterapia. Tradução: Alessandra Favano e Andréa Favano. Editora Roca Ltda, SP, 1998, p 50-61.
- MAIA, L. E.; AMAYA, D. B. R. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídeos de diversas espécies de peixes. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 53(1/2): 27-35, 1993.
- MITCHELL, H. S; RYNBERGEN, H. J; ANDERSON, L; DIBBLE, M. V. Nutrição. Tradução de CALÇADO, A.C. Décima sexta edição, Ed Interamericana, RJ, 197. p 24-258.
- MORELATTO, J. C. Estudo da composição da gordura de suínos terminados em dois sistemas intensivos de criação: confinamento e ao ar livre. Florianópolis, 1998, p 15-50. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- MOSCHEN, F. V. A.; CERQUEIRA, V. R. Efeito da artemia enriquecida com ácidos graxos essenciais na larvicultura do robalo-peva *Centropomus parallelus* (Poey, 1860). Florianópolis, 2000, p 2-17. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- MOURA, J. G. P. A revolução dos nutrientes. Segunda edição, editora Livraria Mundial, RS, 1998, p175-182.
- O LAN ONLINE. Tecnologia do pescado. [on line]. Disponível na internet via www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Tecnologia%20do%20Pescado. Arquivo capturado em 16 de outubro de 2004.

PRATES, J.A.M. e MATEUS, C.M.R. Componentes com actividade fisiológica dos alimentos de origem animal. Revista portuguesa de ciências veterinárias, 2002. Disponível na internet via www.rpcv.fmv.utl.pt/PDF/pdf3_2002/componentes.

Arquivo capturado em 16 de outubro de 2004.

REGO, O. A. Suplementação de vacas leiteiras com óleo de peixe. 2003. [on line]. Disponível na internet via www.angra.uac.pt/.../MPA/P%E1ginas%20do%20Mestrado/Mestrado/Prod.%20de%20Ruminantes/Oldemiro/O.%20Peixe. Capturado em 16 de outubro de 2004.

VIANNI, R. e BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. Química nova, 19(4), p 400-407, 1996.

WARDLAW, G. M. Nutrition. Third edition, ed Mosby-Year book, St. Louis-Missouri, 1996, p 110-113.

ANEXOS

Anexo I.a- Fórmulas

Teste Q

$$Q = \frac{|V_x - V_p|}{|VM - V_m|}$$

V_x: valor questionado

V_p: valor mais próximo

VM: valor máximo

V_m: valor mínimo

Nota: para rejeitar valores, Q deve ser menor do que Q-crítico (tabelado).

Teste F

$$F = \frac{S_A^2}{S_B^2}$$

S_A: desvio padrão de valores para uma amostra A

S_B: desvio padrão de valores para uma amostra B

Nota: o valor de F (calculado) deve ser menor que o valor crítico de F (tabelado).

Teste t-student para comparação entre médias

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_p \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}} \quad S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2) - 2}}$$

\bar{x} : média de n valores para uma amostra

n: número de amostras

S_p: desvio padrão agregado

S: desvio padrão

Anexo I.b- Fórmulas e estruturas

Fator resposta (Fr) para um composto A

$$Fr_A = \frac{C_A}{C_T} / \frac{A_A}{A_T}$$

C_A : concentração de A

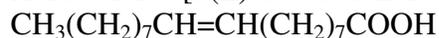
C_T : soma das concentrações de todos os compostos de uma amostra

A_A : área do pico correspondente ao composto A

A_T : soma dos picos de todos os compostos de uma amostra

Estruturas (fórmulas dos ácidos graxos)

Ácido oléico [9(Z)-Octadecanóico]:



Ácido linoléico [9(Z),12(Z)-Octadecadienóico]:



Ácido α -linolênico [9(Z), 12(Z), 15(Z)-Octadecatrienóico]:



Ácido araquidônico [5(Z), 8(Z), 11(Z), 14(Z)-Eicosatetraenóico]:



EPA [5(Z), 8(Z), 11(Z), 14(Z), 17(Z)-Eicosapentaenóico]:



DHA [4(Z), 7(Z), 10(Z), 13(Z), 16(Z), 19(Z)-Docosaheptaenóico]:



Nota: (Z)- Representa configuração espacial do tipo *cis*.

Anexo II- Figuras 1 e 2



Figura 1-Sequência de eluição por tempo de retenção (min) dos padrões: A- estearato de metila C18:0 (18.780 min); B-metil cis-13-docosenoato C23:1 (22.107 min)

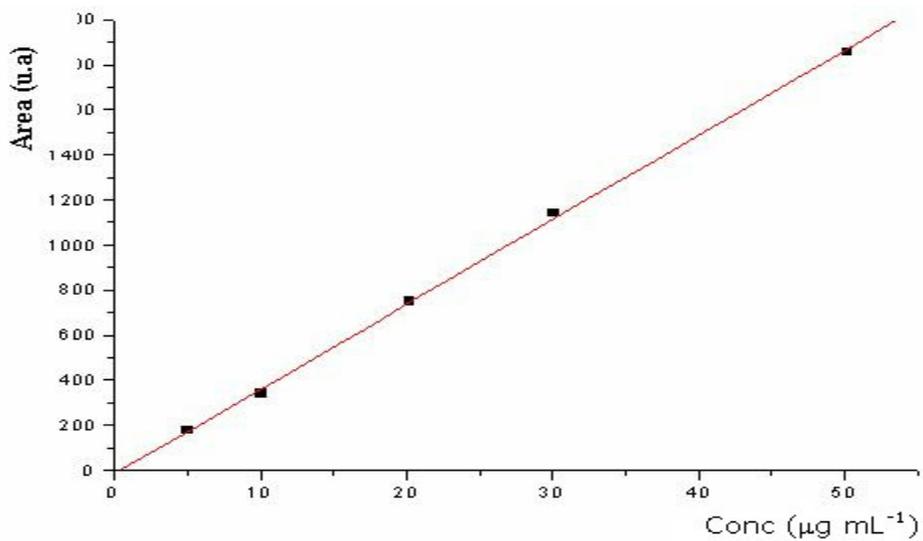


Figura 2-Curva plotando Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) X Área para o padrão C18:0 com sua respectiva equação

Anexo III- Figuras 3 e 4

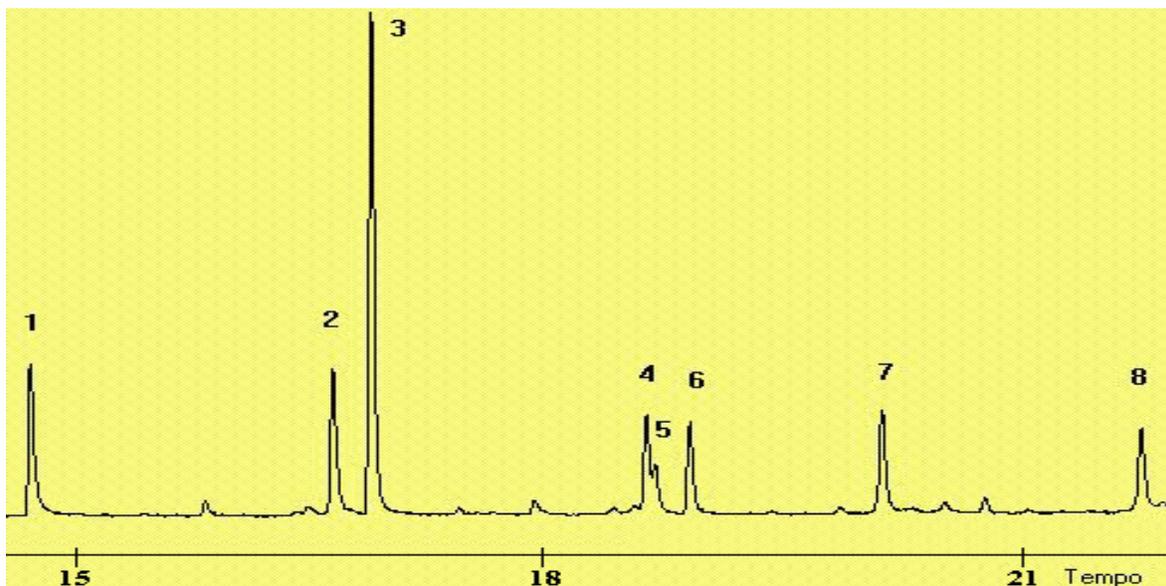


Figura 3-Sequência de eluição por tempo de retenção (min) para a amostra de sardinha S2: 1-C14:0 (14.663 min); 2-C16:1 (16.555 min); 3-C16:0 (16.794 min); 4-C18:1 ω 9 (18.515 min); 5-C18:1 ω 7 (18.569 min); 6-C18:0 (18.786 min); 7-EPA-C20:5 ω 3 (19.989 min); 8-DHA-C22:6 ω 3 (21.607 min)

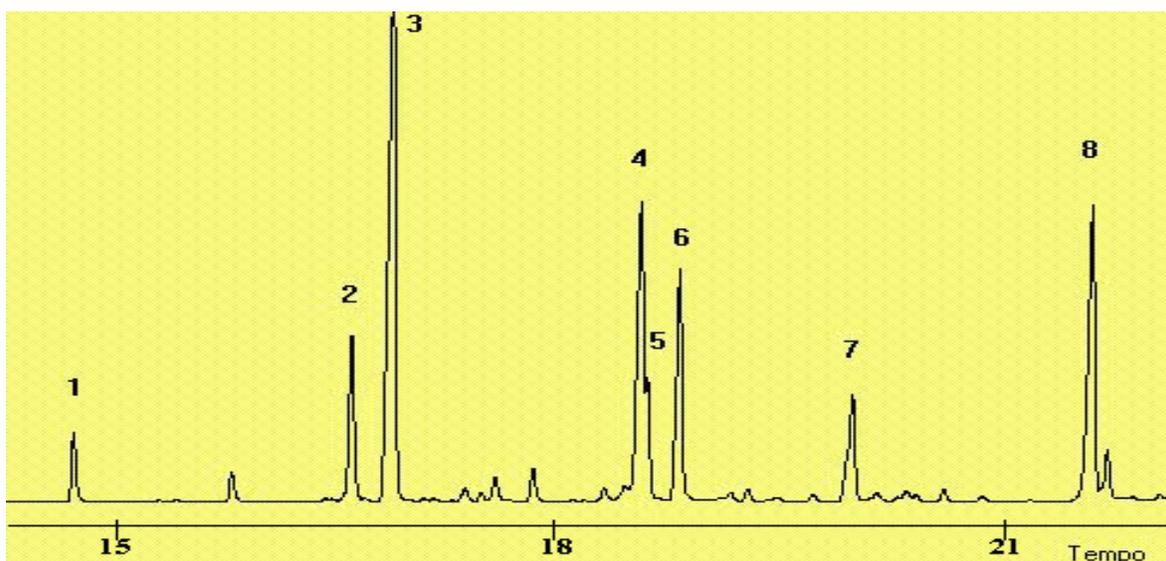


Figura 4-Sequência de eluição por tempo de retenção (min) para a amostra de peixe-galo G1: 1-C14:0 (14.659 min); 2-C16:1 (16.555 min); 3-C16:0 (16.824 min); 4-C18:1 ω 9 (18.522 min); 5-C18:1 ω 7 (18.570 min); 6-C18:0 (18.788 min); 7-EPA-C20:5 ω 3 (19.985 min); 8-DHA-C22:6 ω 3 (21.602 min)