

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS – *CAMPUS* DE BAURU
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO LICENCIATURA EM QUÍMICA

DANIELE RODRIGUES

OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS EM PLASMA SANGUÍNEO DE RATO

BAURU
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS – *CAMPUS* DE BAURU
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO LICENCIATURA EM QUÍMICA

DANIELE RODRIGUES

OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS EM PLASMA SANGUÍNEO DE RATO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como etapa final do curso
de Licenciatura em Química do
Departamento de Química da Faculdade
de Ciências da UNESP de Bauru.

Orientador: Profº Dr. Manoel Lima de
Menezes

BAURU
2015

RODRIGUES, D..

Otimização de um método analítico para determinação de ácidos graxos em plasma sanguíneo de rato, Bauru, SP: Faculdade de Ciências – UNESP, 2015.

Número de pag 33.

Monografia apresentada para a conclusão do curso de Licenciatura em Química pela Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências – Bauru, 2015.

Área de atuação: Química

Orientador: Prof.º Drº Manoel Lima de Menezes

DANIELE RODRIGUES

OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS EM PLASMA SANGUÍNEO DE RATO

RESUMO

Este trabalho tem como temática principal otimizar o método de determinação de ácidos graxos, como octanoato de metila, palmitato de metila, estearato de metila, oleato de metila, linoleato de metila e linolenato de metila, em amostras de plasma sanguíneo de ratos. O método mostrou-se muito adequado para a análise realizada, na qual foram obtidos os seguintes coeficientes lineares: 0,9992, 0,9989, 0,9996, 0,9995, 0,9999 para os ácidos linoleato de metila, oleato de metila, palmitato de metila, estearato de metila e octanoato de metila, respectivamente.

A esterificação das amostras permitiu uma boa leitura dos cromatogramas das amostras, sem picos interferentes. Os resultados foram obtidos conforme o esperado a partir da dieta dos ratos.

ABSTRACT

This work has as main theme optimize the method of determination of fatty acids such as methyl octanoate, methyl palmitate, methyl stearate, methyl oleate, methyl linoleate and methyl linolenate in blood plasma samples from mice. The method proved to be very suitable for the analysis, in which we obtained the following linear coefficients: 0.9992, 0.9989, 0.9996, 0.9995, 0.9999 for methyl linoleate acid, methyl oleate , methyl palmitate, methyl stearate and methyl octanoate, respectively.

Esterification of the samples gave good reading of chromatograms of samples without interfering peaks. The results obtained were as expected from the diet of mices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Uso Justaposição de ácidos graxos em agregados estáveis.....	13
Figura 2 - Sistema de cromatografia gasosa, acoplado ao <i>headspace</i>	19
Figura 3 - Cromatograma obtido após a injeção de 1,0 µL de uma solução-padrão contendo os ésteres octanoato de metila (1), palmitato de metila (2), estearato de metila (3), oleato de metila (4), linoleato de metila (5), linolenato de metila (6).....	23
Figura 4 - Cromatograma obtido após a injeção de 1,0 µL de amostra de soro sanguíneo contendo os ésteres dos ácidos graxos estudados.....	24
Figura 5 - Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 µL de solução-padrão de octanoato de metila.....	25
Figura 6 - Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 µL de uma solução-padrão de palmitato de metila.....	26
Figura 7- Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 µL de uma solução-padrão de estearato de metila.....	27
Figura 8 - Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 µL de uma solução-padrão de oleato de metila.....	28
Figura 9 - Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 µL de uma solução-padrão de linoleato de metila.....	29
Figura 10 – Curva Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 µL de uma solução-padrão de, linolenato de metila.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns ácidos graxos de ocorrência natural.....	11
Tabela 2 - Ácidos graxos saturados que ocorrem com mais frequência na natureza.....	14
Tabela 3 - Ácidos graxos insaturados que ocorrem com mais frequência na natureza.....	15
Tabela 4 - Teor de ácidos graxos trans (%) em amostras de gorduras presentes em produtos comerciais brasileiros.....	16
Tabela 5 - Condições cromatográficas empregadas para a separação dos ésteres de ácidos graxos originados a partir do plasma sanguíneo de ratos.....	21
Tabela 6 - Equações das curvas analíticas obtidas através das soluções-padrão dos ésteres em estudo.....	24
Tabela 7 - Determinação dos níveis de concentração de ácidos graxos presentes em amostras de soro sanguíneo de ratos.....	31

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Considerações sobre ácidos graxos.....	10
1.2. Ácidos graxos na saúde humana e bioindicadores de células cancerosas.....	13
1.3. Considerações sobre métodos analíticos para determinação de ácidos graxos.....	17
1.4. Técnica de cromatografia gasosa.....	18
2.0. OBJETIVOS.....	19
3.0. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Reagentes.....	19
3.1.2. Preparação das Soluções-Padrão Estoque de ésteres de ácidos graxos.....	19
3.1.3. Preparação das Soluções-Padrão diluídas de ésteres de ácidos graxos.....	19
3.1.4. Amostras.....	20
3.2 Instrumentação.....	20
3.3. Métodos.....	21
3.3.1. Preparação da amostra de soro sanguíneo para a determinação de ácidos graxos.	21
3.3.2 Condições cromatográficas para determinação dos ésteres de ácidos graxos, presentes em amostras de soro sanguíneo de ratos.....	21
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Otimização cromatográfica para a determinação dos ésteres de ácidos graxos presentes na solução de padrão misto.....	22
4.2. Determinações dos níveis de concentração dos ácidos graxos estudados, presentes em amostras de soro sanguíneo de ratos.....	30

5.0. CONCLUSÃO.....	32
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre ácidos graxos

Os ácidos graxos são constituintes de um grupo de compostos biológicos, denominado lipídios, o qual possui como característica com uma insolubilidade em água.

As gorduras e óleos responsáveis pelo armazenamento de energia nos organismos vivos são derivados de ácidos graxos que, por sua vez, são derivados de hidrocarbonetos. A oxidação celular de ácidos graxos é altamente exergônica.

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos cujas cadeias possuem de 4 a 36 carbonos e são saturadas ou parcialmente insaturadas. Essas cadeias podem conter anéis de três carbonos, grupos hidroxila ou ramificações através do grupo metila. Os compostos de ocorrência mais frequente possuem número par de átomos de carbono e não possuem ramificações. Com algumas exceções, a ligação dupla dos ácidos graxos monoinsaturados está entre os carbonos 9 e 10, sendo que o carbono 1 é o carboxílico. Nos compostos poli-insaturados, as duplas geralmente encontram-se nos carbonos 12 e 15. Além disso, as ligações duplas não costumam ser conjugadas, ou seja, essas ligações são alternadas com ligações simples (Tabela 1).

A nomenclatura simplificada desses compostos segue o seguinte padrão: número de átomos de carbono:número de insaturações ($\Delta^{\text{posições das insaturações}}$). O ácido linoléico, por exemplo, é nomeado simplificada dessa maneira: 18:2($\Delta^{9,12}$). Outra forma, muito comum, de classificar os ácidos graxos é identificar o número da posição da primeira dupla ligação a partir do grupo metila, depois da letra grega ômega (ω). O ácido oléico, por exemplo, é identificado como $\omega 9$.

A pequena solubilidade, em água, dos ácidos graxos se deve à polaridade do grupo ácido carboxílico. Quanto maior a cadeia de hidrocarboneto (não-polar) e menor o grau de insaturação, menor a solubilidade em água (Tabela 1).

O ponto de fusão dos ácidos graxos é influenciado pelo tamanho e grau de insaturação da cadeia. As duplas ligações em cis provocam uma curvatura na cadeia, dificultando o empacotamento das moléculas e, conseqüentemente, as interações entre elas são mais fracas. Quanto mais fracas as interações, menor o

ponto de fusão. Já nas cadeias saturadas, o empacotamento ocorre facilmente, estabelecendo forças de van der Waals entre as moléculas. À temperatura ambiente (25 °C), ácidos graxos saturados com número de carbonos de 12 a 24 são cerosos, enquanto os insaturados com o mesmo número de carbonos são oleosos (Figura 1).

Tabela 1: Alguns ácidos graxos de ocorrência natural

Esqueleto carbônico	Estrutura*	Nome sistemático **	Nome comum (derivação)	Ponto de fusão (°C)	Solubilidade a 30°C (mg/g solvente)	
					Água	Benzeno
12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -dodecanóico	Ácido láurico (do latim, <i>laurus</i> , “árvore do louro”)	44,2	0,063	2,600
14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -tetradecanóico	Ácido mirístico (do latim, <i>Myristica</i> , Gênero da noz moscada)	53,9	0,024	874
16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -hexadecanóico	Ácido palmítico (do latim, <i>palma</i> , “palmeira”)	63,1	0,008 3	348
18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -dodecanóico	Ácido esteárico (do grego, <i>stear</i> , “gordura dura”)	69,6	0,003	124
20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -eicosanóico	Ácido araquídico (do latim, <i>Arachis</i> , gênero dos legumes)	76,5		
24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	Ácido <i>n</i> -tetracosanóico	Ácido lignocérico (do latim, <i>lignum</i> , “madeira” + <i>cera</i>)	86,0		
16:1(Δ^9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -9-hexadecenóico	Ácido palmitoléico	-0,5		
18:1(Δ^9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenóico		13,4		

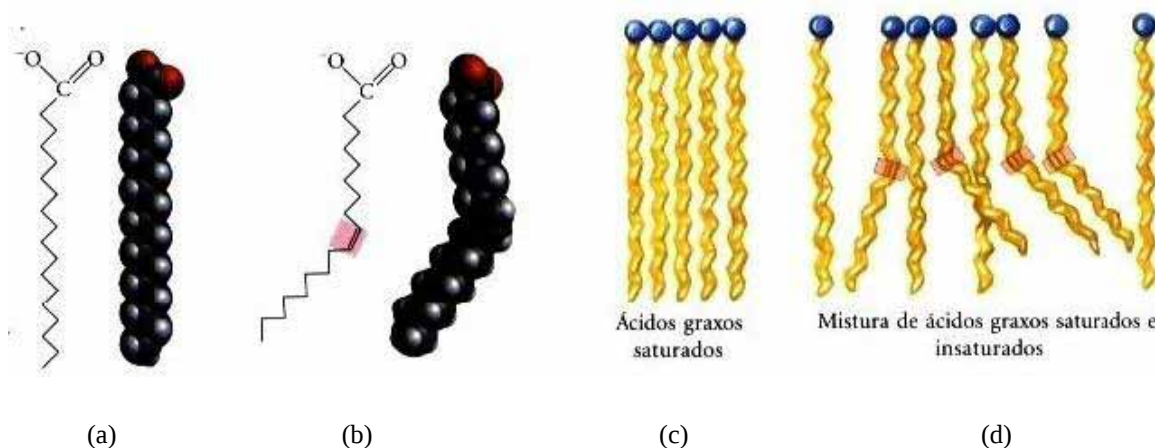
18:2($\Delta^{9,12}$)	$\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	octadecenóico	Ácido oléico	-5		
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}$ $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -,9,12-octadecadienóico	(do latim, <i>oleum</i> , “óleo”)			
18:3($\Delta^{9,12,15}$)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}$ $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -,9,12,15-octadecatrienóico	Ácido linoleico	-11		
	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$		(do grego, <i>linon</i> , “linho”)			
20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}$ $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -,5, 8, 11, 14-icosatetraenóico	Ácido α -linolênico	-49,5		
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}$ $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$					
	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$		Ácido araquidônico			

*Todos os ácidos têm suas fórmulas apresentadas na forma não-ionizada. Em pH 7, todos os ácidos graxos livres têm um carboxilato ionizado. Note que a numeração dos átomos de carbono se inicia no carbono carboxílico.

**O prefixo “*n*” indica uma estrutura “normal”, não-ramificada. Por exemplo, “dodecanóico” simplesmente indica 12 átomos de carbono, que poderiam ser dispostos em uma variedade de formas ramificadas; “*n*-dodecanóico” especifica a forma linear, não ramificada. Para ácidos graxos insaturados, a configuração de cada dupla ligação está indicada; em ácidos graxos biológicos, a configuração é quase sempre *cis*.

Fonte: (NELSON; COX, 2002, p. 281)

Figura 1: Justaposição de ácidos graxos em agregados estáveis



A extensão do empacotamento depende do grau de saturação. **(a)** Duas representações de ácido esteárico completamente saturado (estearato em pH 7) na sua conformação usual estendida. Cada segmento de linha em ziguezague representa uma ligação simples entre carbonos adjacentes. **(b)** A dupla ligação *cis* (sombreada em vermelho) no ácido oleico (oleato) não permite rotação e introduz uma curvatura rígida na cadeia hidrocarbônica. Todas as outras ligações da cadeia são livres para girar. **(c)** Ácidos graxos totalmente saturados, na forma estendida, ajustam-se em arranjos quase cristalinos, estabilizados por muitas interações hidrofóbicas. **(d)** A presença de uma ou mais ligações *cis* interfere nesse empacotamento rígido e, como resultados, os agregados são menos estáveis.

Fonte: (NELSON; COX, 2002, p. 281).

Nos animais vertebrados, ácidos graxos livres (ácidos graxos não-esterificados tendo um grupo carboxilato livre) circulam no sangue ligados não covalentemente a uma proteína carregadora, a soroalbumina. Entretanto, ácidos graxos do plasma sanguíneo estão presentes principalmente como derivados de ácidos carboxílicos, tais como ésteres ou amidas. Esses derivados de ácidos graxos não têm o grupo carboxilato carregado e, como consequência, são ainda menos solúveis em água que os ácidos graxos livres. (NELSON; COX, 2002, p. 282)

1.2 Ácidos graxos na saúde humana e bioindicadores de células cancerosas

Os ácidos graxos saturados tem grande influência na incidência de doenças cardiovasculares pois, aumentam o colesterol sanguíneo (Tabela 2). Já os ácidos

graxos $\omega 3$ e $\omega 6$, se ingeridos em quantidades ideais, são benéficos e reduzem os níveis de LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade), além de reduzirem o risco de doenças como hipertensão e aterosclerose. Os ácidos $\omega 3$ originam eicosanóides com atividades antiinflamatória, anticoagulante, vasodilatadora e antiagregante, e os ácidos $\omega 6$ são estimulantes do sistema imune, vasoconstritores e pró-coagulantes. Entretanto, altas concentrações de $\omega 6$ pode influenciar na incidência de artrites e doenças inflamatórias crônicas. Os ácidos graxos monoinsaturados não influenciam os níveis de colesterol (Tabela 3). Os ácidos graxos trans, estruturalmente similares às gorduras saturadas, modificam as funções metabólicas das gorduras poliinsaturadas e competem com os ácidos graxos essenciais em vias metabólicas complexas (Tabela 4). (JORGE; MALACRIDA, 2008)

Tabela 2: Ácidos graxos saturados que ocorrem com mais frequência na natureza

Nome comum	Nome químico	Átomos de carbono	Duplas ligações	Fonte
Butírico	Butanóico	4	0	Gordura de leite
Capróico	Hexanóico	6	0	Gordura de leite
Caprílico	Octanóico	8	0	Óleo de coco
Cáprico	Decanóico	10	0	Óleo de coco
	Dodecanóico	12	0	Óleo de coco, óleo de palmeira
Láurico	Tetradecanóico	14	0	Gordura de leite, óleo de coco
Mirístico	Hexadecanóico	16	0	Óleo de palmeira, gordura animal
	Octadecanóico	18	0	Manteiga de cacau, gordura animal
Palmítico	Eicosanóico	20	0	Óleo de amendoim
Estearico				

	Docosanóico	22	0	
Araquídico				Óleo de amendoim
Behênico				

Fonte: (KRUMMEL apud JORGE; MALACRIDA, 2008, p.19)

Tabela 3: Ácidos graxos insaturados que ocorrem com mais frequência na natureza

Nome comum	Nome químico	Átomos de carbono	Duplas ligações	Fonte
Caproléico	9-Decenóico	10	1	Gordura de leite
Lauroléico	9-Dodecenóico	12	1	Gordura de leite
Miristoléico	9-Tetradecenóico	14	1	Gordura de leite
Palmitoléico	9-Hexadecenóico	16	1	Alguns óleos de peixe e gordura bovina
Oléico	9-Octadecenóico	18	1	Azeite, óleo de canola
Elaídico	9-Octadecenóico	18	1	Gordura de leite
Vacênico	11-Octadecenóico	18	1	Gordura de leite
Linoléico	9, 12-Octadecadienóico	18	1	Maioria dos óleos vegetais: milho, algodão
Linolênico	9, 12, 15-Octadecatrienóico	18	3	Óleo de soja, canola, nozes
Gadoléico	9- Eicosenóico	20	1	Alguns óleos de peixe

Araquidônico	5,8, 11, 14-Eicosatetraenóico	20	4	Banha, carnes
-	5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenóico	20	5	Alguns óleos de peixe e marisco
Erúcico	13-Docosenóico	22	1	Óleo de canola
-	4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexanóico (DHA)	22	6	Alguns óleos de peixe e marisco

Fonte: (KRUMMEL *apud* JORGE; MALACRIDA, 2008, p.20)

Tabela 4: Teor de ácidos graxos trans (%) em amostras de gorduras presentes em produtos comerciais brasileiros

Produtos	Ácidos graxos trans (%)
Sopas e caldos	32,3 – 36,4
Coberturas achocolatadas e chocolates granulados	1,3 – 49,9
Pães e bolos	19,5 – 29,9
Biscoitos recheados	21,4 – 48,3
Sorvetes, cremes e margarinas	27,0 – 36,3
Frituras	7,7 – 30,4
Doces e confeitos	3,3 – 40,3

Fonte: (RIBEIRO et al. *apud* JORGE; MALACRIDA, 2008, p.25)

A proliferação de diversos tipos de tumores é estimulada pelo ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas. Os efeitos benéficos do consumo de óleo de peixe na prevenção do câncer devem-se aos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que inibem a síntese destes eicosanóides a partir do ácido araquidônico. (JORGE; MALACRIDA, 2008)

Estudos sobre ácidos graxos em órgãos e tecidos de mamíferos com células tumorais inoculadas, são importantes para a compreensão dos mecanismos de resposta do organismo em relação ao crescimento do tumor, e conseqüentemente, para o desenvolvimento de terapias antitumorais baseadas na adequação da composição destes ácidos. Derivados de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia

longa das famílias ômega-3 e ômega-6 estão relacionados com processos patológicos como inflamação e carcinogênese. (KULAGINA; ARIPOVSKY; GAPEYEV, 2012)

Estudos mostram que as quantidades de ácidos graxos em tecidos e órgãos de camundongos com tumor e camundongos que não sofreram inoculação de células tumorais, variam. Altos níveis de ácidos graxos monoinsaturados são observados nos animais com tumor, já que estes compostos aumentam a fluidez das membranas proporcionando um aumento na taxa de divisão celular.

Os níveis de ácidos graxos no timo se alteram como uma resposta do sistema imunológico porque sua membrana celular responde rapidamente a mudanças, como presença de antígenos estranhos, alterando sua composição estrutural e organização do microdomínio e aumentando o nível de ácido mirístico e palmítico. Já os ácidos graxos poliinsaturados diminuem, provavelmente devido a liberação de timócitos de metabólitos destes ácidos para defesa do organismo.

No fígado, há um decréscimo no nível de ácido pentadecanóico por motivos ainda desconhecidos. Já o ácido oleico, sintetizado no fígado, é transportado pelo plasma sanguíneo, aumenta devido a ativação da síntese deste ácido para necessidades de outros tecidos.

O ácido oleico, em diferentes tecidos, atua como ativador da secreção de uma enzima relacionada a progressão do tumor, por isso seus níveis sofrem variações. (KULAGINA; ARIPOVSKY; GAPEYEV, 2012)

1.3 Considerações sobre métodos analíticos para determinação de ácidos graxos

A cromatografia gasosa é a técnica mais indicada para a determinação de ácidos graxos em óleos, gorduras e tecidos animais. O preparo da amostra consiste em duas etapas principais: a extração dos lipídeos totais e a esterificação dos ácidos graxos (JORGE; MALACRIDA, 2008). A esterificação dos ácidos graxos livres e triacilgliceróis é necessária para aumentar a volatilidade da amostra e evitar a

adsorção de solutos na coluna (DROZD, 1975; GUTNIKOV, 1995*apud* MILINSK, 2007).

As reações de esterificação se processam via catálise ácida ou básica. A catálise básica, na qual se utiliza hidróxido de sódio (NaOH) ou de potássio (KOH) em metanol ou metóxido de sódio (NaOCH₃) em metanol, apesar de rápida a temperatura ambiente, não converte ácidos graxos livres em ésteres metílicos devido à reação de saponificação. A catálise ácida, na qual se utiliza trifluoreto de boro em metanol (BF₃/MeOH), ácido clorídrico em metanol (HCl/MeOH) ou ácido sulfúrico em metanol (H₂SO₄/MeOH), converte acilgliceróis e ácidos graxos livres. (CETINKAYA E KARAOSMANOGLU, 2004; BANNON, *et al.*, 1982B; GUTNIKOV, 1995 METCALFE E WANG, 1981*apud* MILINSK, 2007)

Neste trabalho, utilizou-se o método proposto por Hartman e Lago (1973). Este método consiste em duas etapas: saponificação e esterificação por catálise ácida. O reagente utilizado para a esterificação é uma solução metanólica de ácido sulfúrico e cloreto de amônio. Segundo os autores, o cloreto de amônio aumenta a eficiência do reagente e reduz efeitos drásticos, pois há um equilíbrio entre o ácido sulfúrico e o ácido clorídrico formado. (MILINSK, 2007).

1.4 Técnica de cromatografia gasosa

Para determinação dos ésteres metílicos é indicado o uso de colunas capilares de fase estacionária com polaridade elevada para a separação dos ésteres metílicos pelo grau de insaturação, isomeria geométrica e posição das duplas ligações, e detectores de ionização de chama, já que possuem faixa de linearidade ampla, simplicidade de operação e resposta rápida. A quantificação é baseada na porcentagem relativa de área do ácido graxo em relação a área total de todos os ácidos e, a identificação, no tempo de retenção. (JORGE; MALACRIDA, 2008)

2.0 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi efetuar as determinações de ácidos graxos em amostras de soro sanguíneo de ratos, a fim de avaliar a formação de tumor maligno no pâncreas do mesmo.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

3.1.1

Os solventes hexano, metanol (grau CLAE) foram adquiridos junto a Mallinckrodt. O ácido sulfúrico, hidróxido de sódio (p.a), foram adquiridos junto a Merck (Merck-E, Merck RgaA, Germany). Os padrões de estearato de metila, linoleato de metila, palmitato de metila, oleato de metila, linolenato de metila e octanoato de metila foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich, (Sigma-Aldrich Chemical Company, USA).

3.1.2 - Preparação das Soluções-Padrão Estoque de ésteres de ácidos graxos

As soluções-padrão foram preparadas, dissolvendo-se quantidade conhecidas de estearato de metila, linoleato de metila, palmitato de metila, oleato de metila, linolenato de metila e octanoato de metila em heptano, obtendo as concentrações de 0,25; 0,50 e 1,0 g.L⁻¹, respectivamente.

3.1.3 Preparação das Soluções-Padrão diluídas de ésteres de ácidos graxos

As soluções padrões foram preparadas, diluindo-se quantidades conhecidas de estearato de metila, linoleato de metila, palmitato de metila, oleato de metila, linolenato de metila e octanoato de metila completando o volume final para 10,0 ml em hexano, obtendo uma solução contendo as seguintes concentrações: 4,7, 9,4,

18,8, 23,50 e 47,00 mg.L⁻¹ para o estearato de metila, linoleato de metila, palmitato de metila, oleato de metila, linolenato de metila e octanoato de metila, respectivamente.

3.1.4 Amostras

As amostras de soro sanguíneo foram fornecidas pelo laboratório de fisiologia do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências, UNESP, campus de Bauru.

3.2 Instrumentação

Para efetuar a otimização dos métodos analíticos para a determinação dos ésteres de ácidos graxos, foi empregado um sistema de cromatografia gasosa, equipado com *headspace*, *autosample*, detector de ionização de chama, detector de captura de elétrons e uma coluna Elite-Wax (30m x 0,25mm DI x 0,25µm) e injetor Split/splitless modelo *Clarus600*, adquirido junto a *PerkinElmer*, (Waltham, MA, USA).



Figura 2 - Sistema de cromatografia gasosa, acoplado ao *headspace*.

3.3 Métodos

3.3.1 Preparação da amostra de soro sanguíneo para a determinação de ácidos graxos.

Os ensaios foram realizados de acordo com o método desenvolvido por Hartman e Lago [26]. 0,2 mL da amostra de soro sanguíneo foram transferidas para um tubo de ensaio com tampa rosqueável e a este foi transferido 0,5 mL de uma solução metanólica de NaOH 0,5 mol L⁻¹, e mantido em banho-maria a 95°C por 20 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 1,5 mL de uma solução metanólica, previamente preparada com 3,0 mL de ácido sulfúrico e 2,0 g de cloreto de amônio, sob-refluxo. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 95°C por 20 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 10 mL de água destilada, seguido pela adição de 5,0 mL de n-hexano. Após agitação e repouso, foram transferidos 2,0 mL da fase orgânica para um frasco de amostra do *autosample*.

3.3.2 Condições cromatográficas para determinação dos ésteres de ácidos graxos, presentes em amostras de soro sanguíneo de ratos.

A otimização cromatográfica empregada para efetuar a separação dos padrões de ésteres de ácidos graxos, foi realizada de acordo com as condições cromatográficas apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições cromatográficas empregadas para a separação dos ésteres de ácidos graxos originados a partir do plasma sanguíneo de ratos.

Parâmetros cromatográficos	
Equipamento	Sistema GC/Headspace-Clarus 600, Perkin Elmer
Coluna capilar	Elite Wax (30mm x 0,25mm x 0,25µm) polietilenoglicol

Gás de arraste	Nitrogênio (1,0 mL min ⁻¹)
Modo de injeção	Split 1:20
Volume de injeção	1 µL
Deteção	Ionização de chama
Temperatura detector	300 °C
Temperaturainjetor	250 °C
Temperaturainicial	100°C
Tempo inicial	1,5 min
Taxa de aquecimento	32,3°C/min/220°C
Temperatura final	223°C/3,2 min
Tempo final	10:01 min

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização cromatográfica para a determinação dos ésteres de ácidos graxos presentes na solução de padrão misto:

Considerando-se que em uma amostra de soro sanguíneo de ratos seriam determinados os níveis de concentrações de ácidos graxos; esteárico, linoléico, palmítico, oleico, linolênico e octanoico, estes não são vaporizados na forma *in natura*, dentro da coluna cromatográfica, por possuírem pontos de ebulição relativamente altos. Neste caso a injeção de uma amostra de soro sanguíneo na coluna cromatográfica Elite-Wax, sem a prévia derivatização na forma de ésteres, poderia ocorrer adsorções irreversíveis na coluna cromatográfica, diminuindo a sua eficiência de separação e conseqüentemente alterando os tempos de retenções dos componentes em estudo. Objetivando evitar danos maiores à coluna cromatográfica e conseguir efetuar as determinações dos ésteres de ácidos graxos contidos nas

amostras de soro sanguíneo, fez-se necessário efetuar a esterificação da amostra de acordo com protocolo de Hartman. É importante ressaltar que, a coluna cromatográfica Elite Wax, é específica para as determinações de ésteres de ácidos graxos. De acordo com as Figuras 3 e 4, pode-se observar que a otimização cromatográfica mostrou-se adequada para efetuar a separação e quantificação dos ácidos graxos estudados, uma vez que os mesmos foram separados sem a presença de picos interferentes. É importante ressaltar que a metodologia apresentou uma excelente linearidade do método, como pode ser observado pelos valores dos coeficientes lineares apresentados na Tabela 6.

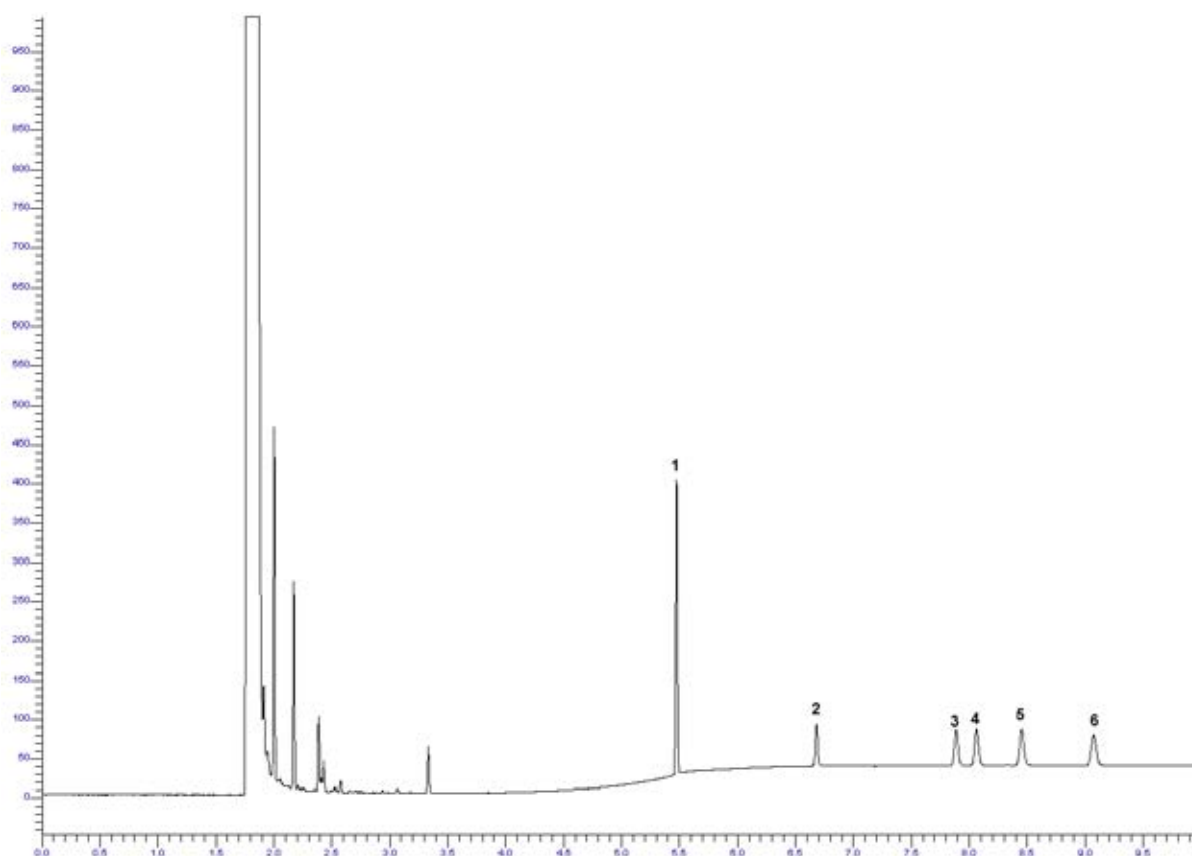


Figura 3: Cromatograma obtido após a injeção de 1,0 μL de uma solução-padrão contendo os ésteres octanoato de metila (1), palmitato de metila (2), estearato de metila (3), oleato de metila (4), linoleato de metila (5), linolenato de metila (6).

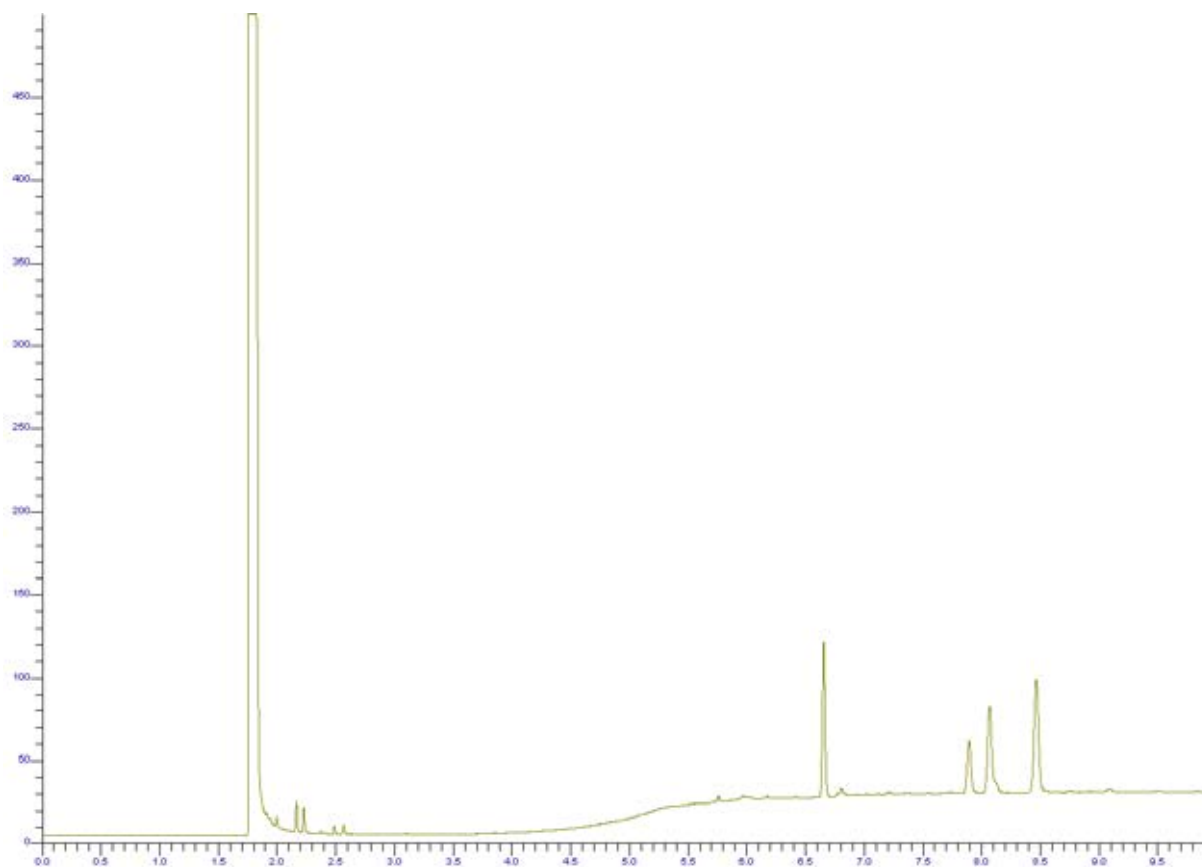


Figura 4: Cromatograma obtido após a injeção de 1,0 μL de amostra de soro sanguíneo contendo os ésteres dos ácidos graxos estudados.

As determinações dos níveis de concentrações foram efetuadas empregando a metodologia de quantificação de padrão externo. Desta forma a Tabela 6, apresenta as curvas e os coeficientes de regressão linear das respectivas curvas analíticas.

Tabela 6: Equações das curvas analíticas obtidas através das soluções-padrão dos ésteres em estudo.

Componente	Curva Analítica	R^2
Linoleato de metila	$Y = -846,25 + 2328,13X$	0,9992
Oleato de metila	$Y = -867,31 + 2235,94X$	0,9989

Palmitato de metila	$Y = -478,93 + 1582,56X$	0,9996
Estearato de metila	$Y = -406,05 + 2065,76X$	0,9995
Octanoato de metila	$Y = 344,62 + 1148,73X$	0,9999

As Figuras 5 à 10 apresentam as curvas analíticas obtidas após a injeção de um microlitro de uma solução-padrão contendo os ésteres de ácidos graxos: octanoato de metila, palmitato de metila, estearato de metila, oleato de metila, linoleato de metila, linolenato de metila.

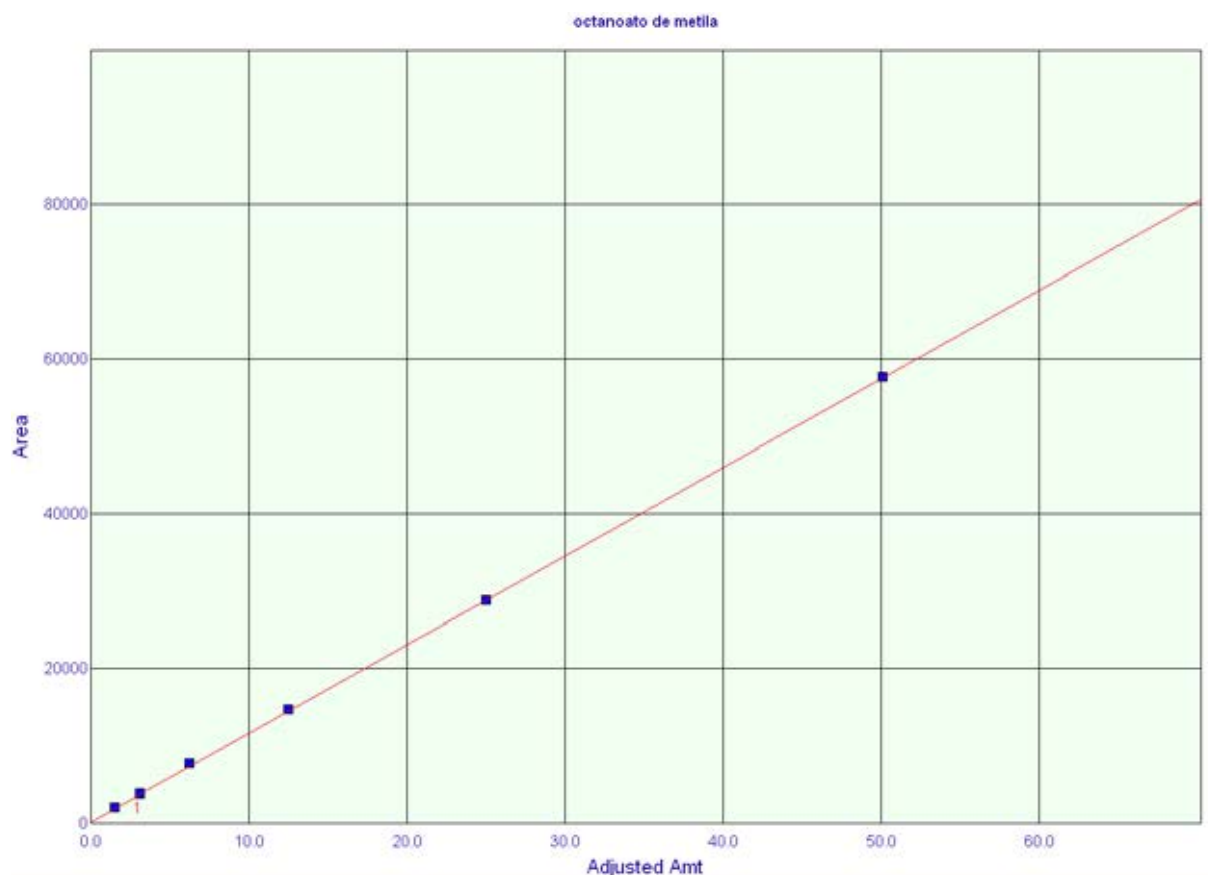


Figura 5: Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 µL de solução-padrão de octanoato de metila.

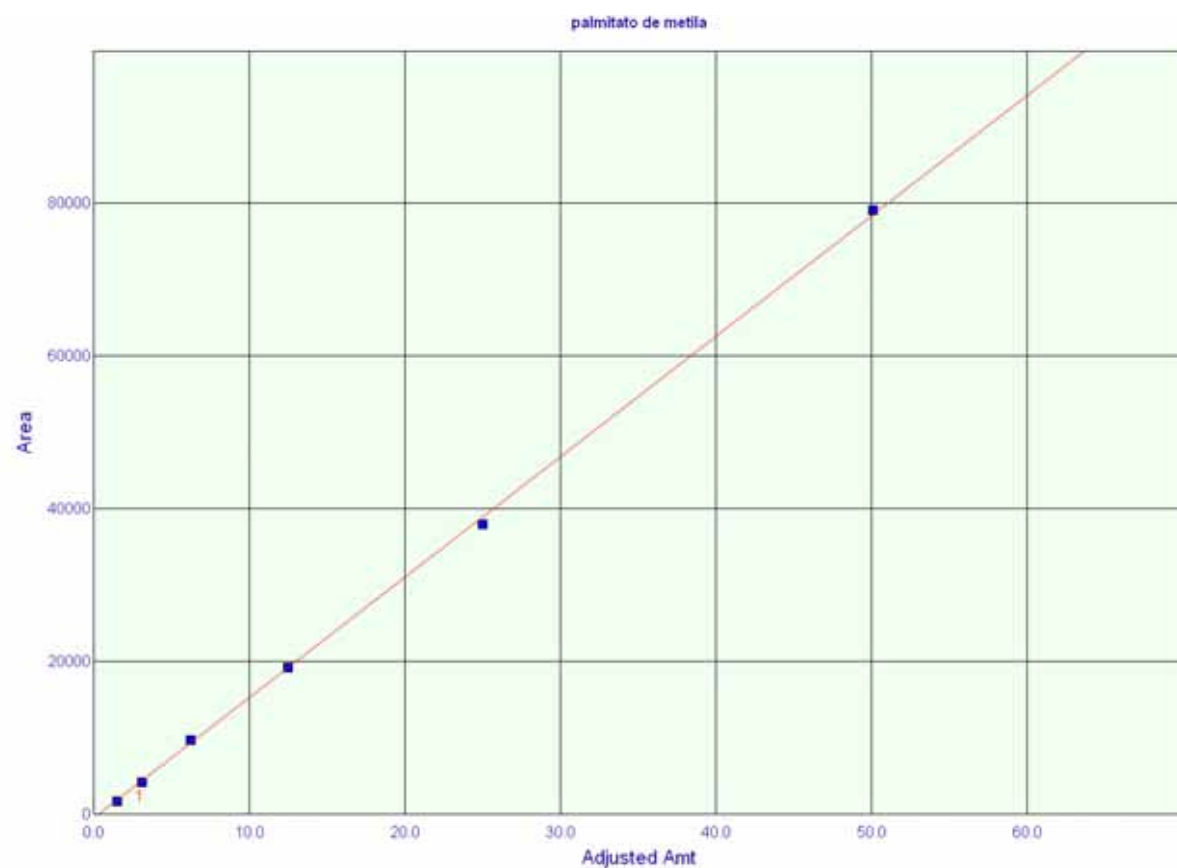


Figura 6: Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 μL de uma solução-padrão de palmitato de metila.

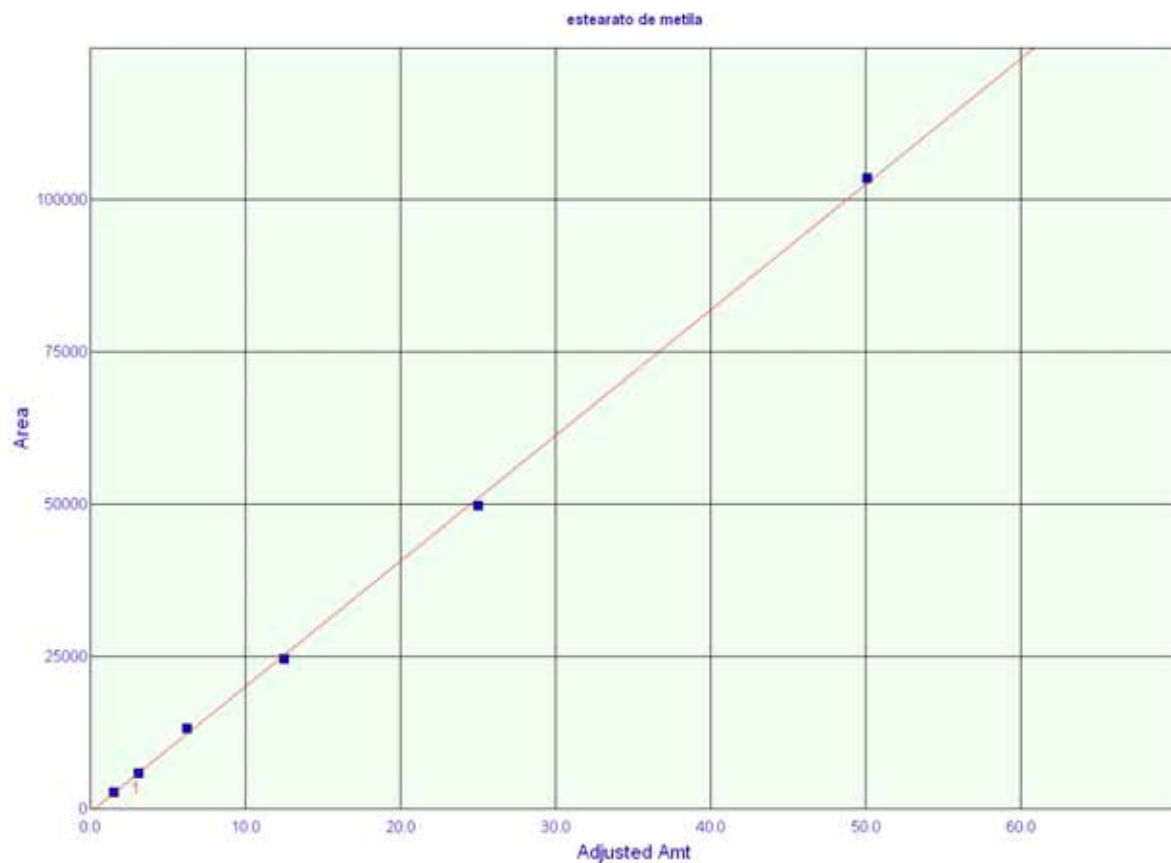


Figura 7: Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 μL de uma solução-padrão de estearato de metila.

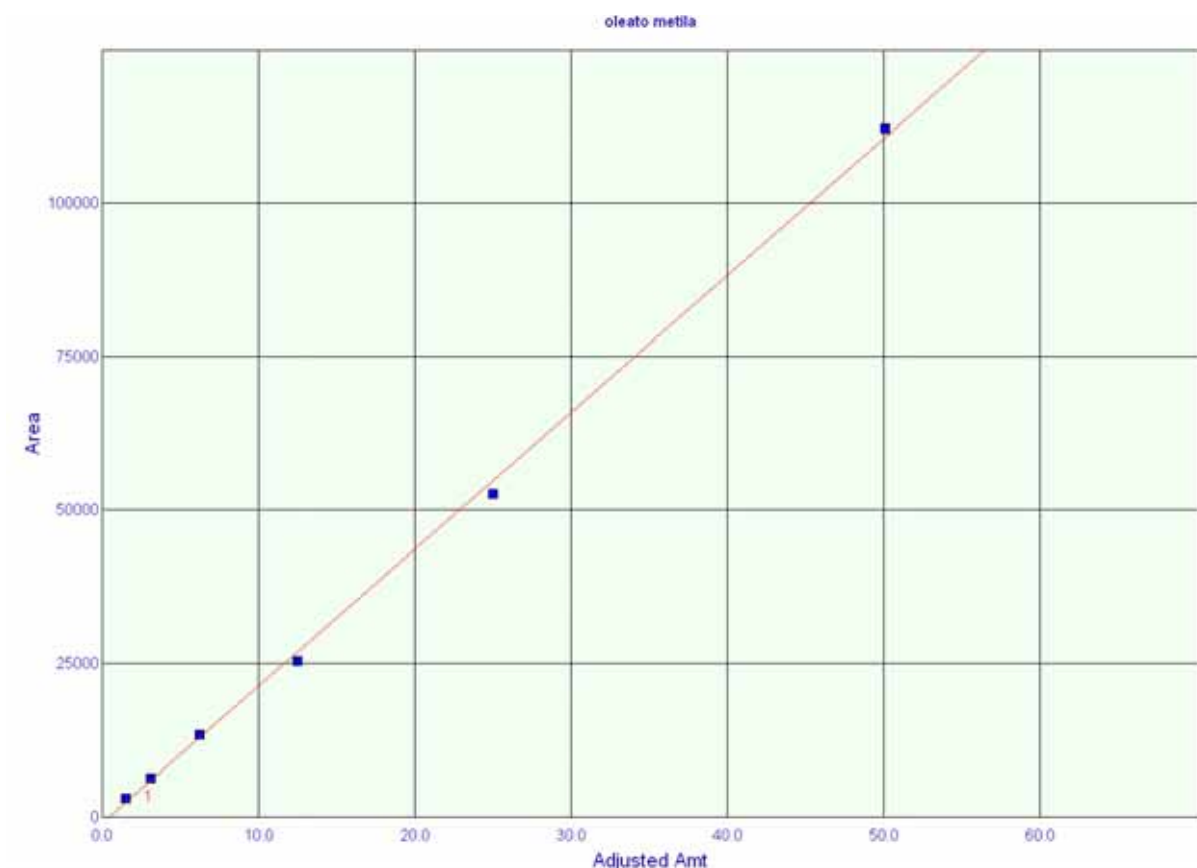


Figura 8: Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 μL de uma solução-padrão de oleato de metila.

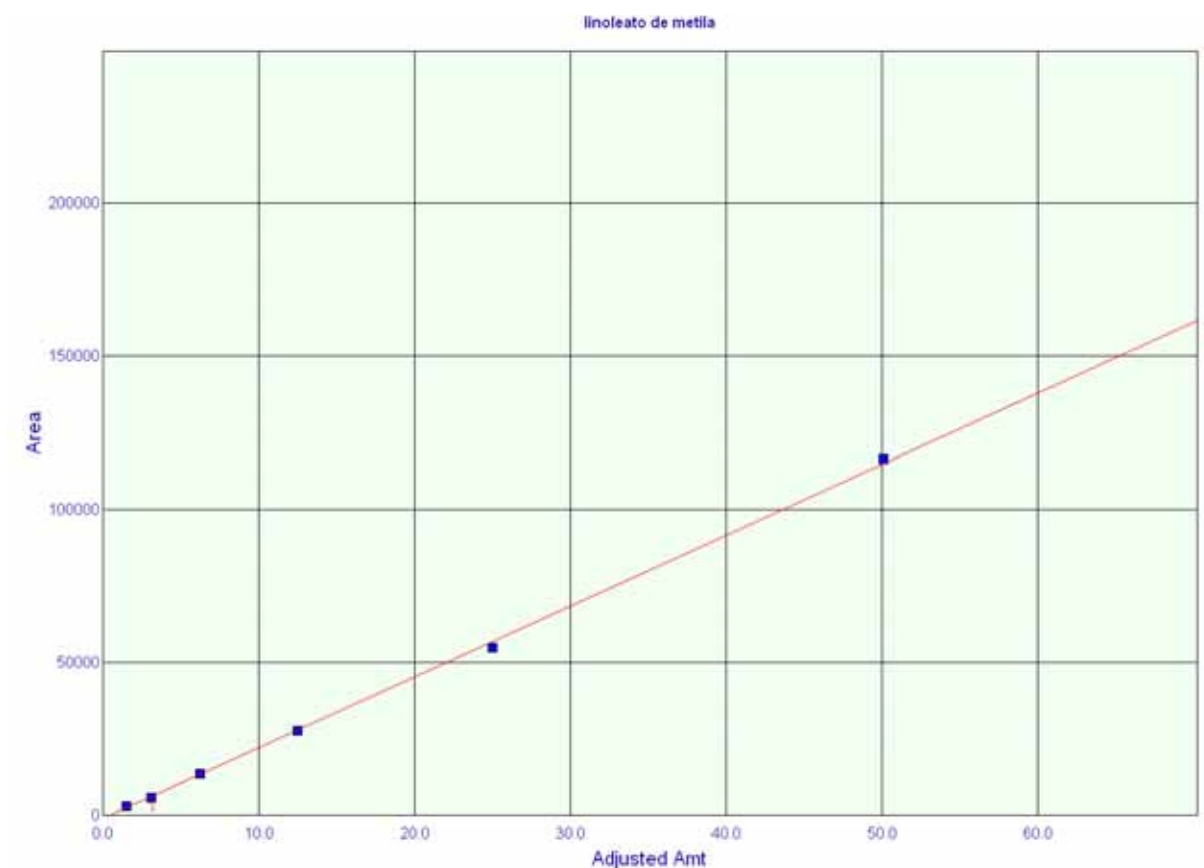


Figura 9: Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 μL de uma solução-padrão de linoleato de metila.

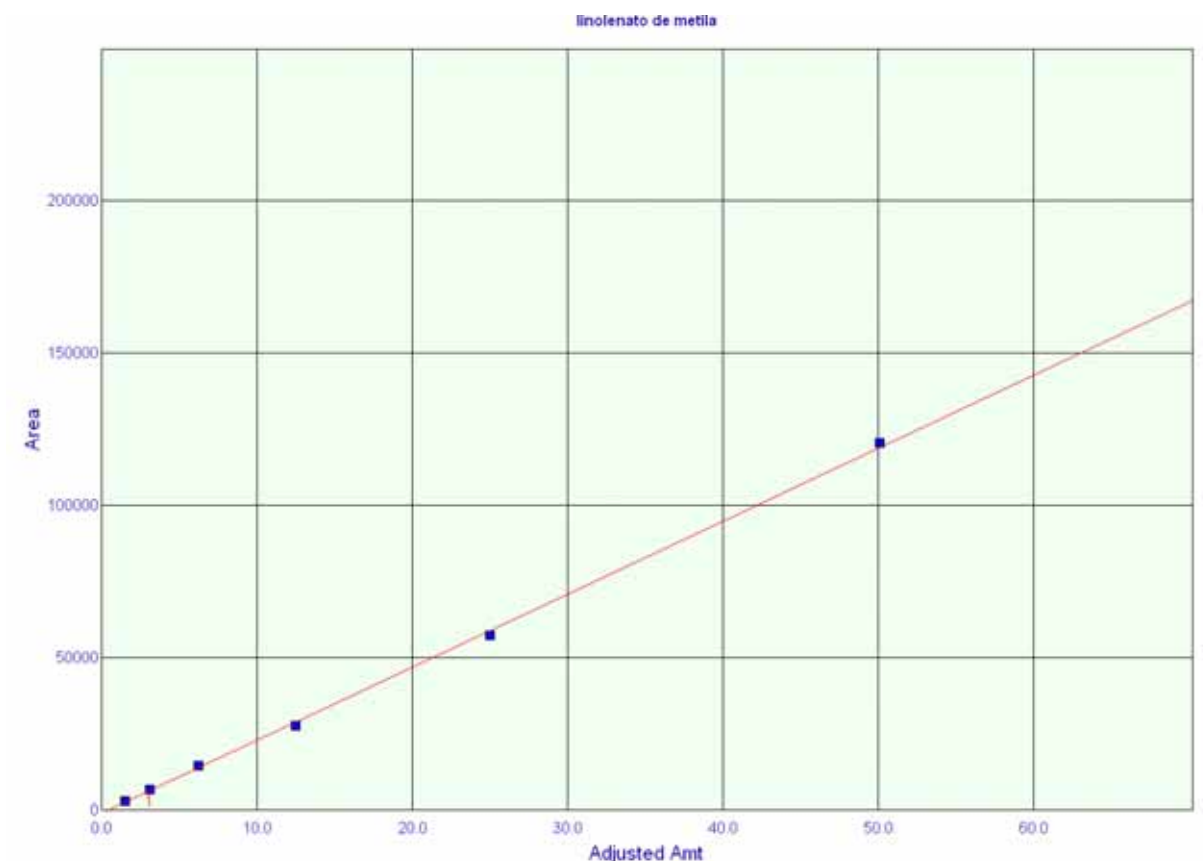


Figura 10: Curva analítica obtida após a injeção de 1,0 µL de uma solução-padrão de, linolenato de metila.

De acordo com as equações das curvas analíticas e os respectivos coeficientes de correlação (R^2), apresentados na Tabela 6 e as curvas analíticas apresentadas nas Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10, permite inferir que esta metodologia mostrou-se adequada para efetuar as determinações quantitativas dos ésteres de ácidos graxos presentes em amostras de soro sanguíneo.

4.2 Determinações dos níveis de concentração dos ácidos graxos estudados, presentes em amostras de soro sanguíneo de ratos.

O método otimizado para as determinações dos ácidos graxos mostrou-se eficiente, permitindo obter bons resultados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 : Determinação dos níveis de concentração de ácidos graxos presentes em amostras de soro sanguíneo de ratos.

Amostra	Ác. Graxos (µg/mL)					
	Octanoico	Palmitico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolênico
C1	0,66	189,72	113,66	169,99	172,92	13,22
C2	nd	309,79	124,13	153,03	290,83	154,59
C3	nd	274,12	114,61	153,28	245,64	24,30
C4	0,33	282,76	155,35	147,27	261,19	53,42
C6	0,75	298,25	158,54	222,68	186,48	13,12
C7	0,23	196,58	86,73	74,30	210,04	38,93
C8	0,34	294,28	109,97	210,92	270,50	28,09
C9	0,91	245,28	112,15	136,50	267,41	20,17
C10	1,12	430,06	174,37	229,81	469,21	26,22
D1	0,96	912,88	317,09	329,67	833,49	47,64
D2	1,54	682,38	293,52	274,13	682,44	31,96
D3	1,37	483,39	138,89	159,93	253,77	33,56
D4	1,64	479,53	152,65	218,78	465,78	18,50
D5	1,42	1007,95	389,38	708,91	796,46	56,22
D6	nd	576,61	177,33	249,63	576,86	24,81
D7	nd	162,56	73,90	108,93	164,09	12,27
D8	1,23	784,53	236,38	497,48	829,25	48,12
D9	0,52	882,50	318,22	472,64	726,64	27,38
D10	1,71	415,25	140,88	227,98	423,48	20,68
B1	1,87	273,72	103,09	142,78	187,61	20,05
B2	0,46	195,17	117,69	124,74	129,67	17,31
B3	2,10	140,85	65,29	76,33	86,32	9,68
B4	1,01	263,81	131,50	143,78	118,32	26,23
B5	0,91	344,23	159,81	162,62	251,07	8,26

B6	1,08	117,18	77,37	60,28	60,20	17,04
B7	0,55	131,95	86,05	70,84	145,76	8,37
B8	2,69	171,98	83,63	73,47	119,27	6,38
B9	nd	192,15	87,35	99,43	192,86	8,32
B10	1,01	241,36	92,57	125,58	212,60	6,37
BD1	1,78	456,72	165,77	199,64	302,13	8,92
BD2	1,16	334,91	119,27	179,64	226,36	11,22
BD3	1,75	331,77	127,78	132,58	253,64	14,46
BD5	1,67	876,15	272,56	460,05	533,23	15,24
BD6	1,47	430,28	124,79	244,00	305,14	6,19
BD7	0,79	288,28	109,23	145,13	199,20	6,75
BD8	nd	323,93	144,64	127,43	190,35	5,24
BD10	1,47	179,96	68,84	94,17	125,47	5,94

Fonte – Arquivo pessoal, 2014

Pode-se constatar, através dos valores obtidos na análise, que os teores de ácidos graxos encontrados nas diferentes amostras de soro, estavam em concordância com os resultados esperados em função da dieta ao quais estes animais foram submetidos.

5.0 CONCLUSÃO

O método otimizado mostrou ser adequado para a determinação dos níveis de concentrações de ácidos graxos em diferentes amostras de plasma sanguíneo de ratos através da esterificação dos ácidos graxos, e os coeficientes de correlação das curvas dos padrões encontrados estão muito próximos da exatidão.

Os níveis de ácidos graxos encontrados nas amostras são proporcionais à dieta que os ratos foram submetidos.

Portanto, o método é válido e muito importante para estudos e avanços na área de saúde humana.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th ed. W. H. Freeman: New York, 2008. 1100p.

JORGE, Neuza.; MALACRIDA, Cassia Roberta. **Efeito dos ácidos graxos na saúde humana**. São José do Rio Preto: Cultura acadêmica, 2008. 64 p.

GROB, R.L. **Modern Practice of Gas Chromatography**. 3^a ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995. 888 p.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 3^a ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 1998 . 224 p.

RIBANI, M, **Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**; *Quim. Nova*, vol. 27, (5), 771-780, 2004 .

T.P. Kulagina; A.V. Aripovsky; A.B. Gapeyev. **Changes in fatty acid composition of thymus cells, liver, blood plasma, and muscle tissue in mice with solid Ehrlich carcinoma**. Moscow, Rússia, *Biochemistry (Moscow)*, 2012, vol. 77, nº2, pp.187-193: Pleiades Publishing, Ltd.

HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. **Rapid preparation on fatty acid methyl esters from lipids**. *Laboratory Practice*, London, 20:475-476, 1973.

<http://www.pqu.uem.br/arquivos/documentos/do019c.pdf>, consultado em 19/05/2014.