

## **ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO.**

Banny Silva BARBOSA<sup>1</sup>; Sergio Massayoshi NUNOMURA<sup>2</sup>; Roberto FIGLIUOLO<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientador CPPN/ INPA; <sup>3</sup>Co-Orientador CPPN/ INPA.

### **1.Introdução**

Os ácidos graxos considerados essenciais para o homem, isto é, imprescindíveis para a sobrevivência humana e que não podem ser sintetizados pelo mesmo, subdividem-se em duas subclasses: os ômega 3 ( $\omega$ -3) e ômega 6 ( $\omega$ -6) (Curi *et al.*, 2002). Os ácidos da série  $\omega$ -6 são responsáveis pela proteção dérmica e pela produção de importantes mediadores farmacológicos lipídicos como os derivados do ácido araquidônico que são os tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos. Os ácidos da série  $\omega$ -3 são responsáveis por evitar distúrbios neurológicos e visuais, porque são importantes no desenvolvimento do cérebro (Kasim-Karakas, 2001). Conseqüentemente o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos poliinsaturados é de vital importância para o homem. Contudo os métodos para análise desses ácidos graxos são complexos, principalmente por causa da reatividade desse tipo de substâncias e a dificuldade de detecção. O método largamente utilizado é a cromatografia gasosa, normalmente acoplada à espectrometria de massas. Esta técnica tem tido um grande impacto sobre o estudo dos ácidos graxos, principalmente devido aos resultados fáceis e a separação mais eficiente, identificação e quantificação dos seus respectivos ésteres metílicos (Milinsk *et al.*, 2008; Christie, 2008). Nessas análises, os procedimentos de preparação da amostra são muito importantes, pois os ácidos graxos e os acilglicerídeos não podem ser analisados diretamente por cromatografia gasosa, devido à sua baixa volatilidade. Devem, portanto ser convertidos em derivados voláteis, de onde se destacam os processos de metilação como a esterificação e transesterificação (Schuchardt *et al.*, 1998; Meher *et al.*, 2004; Milinsk *et al.*, 2008). Apesar dos avanços das pesquisas com ácidos graxos insaturados, existem ainda problemas com os métodos de análise desses ácidos graxos, desde a preparação de amostras até a sua análise. Esses problemas ocorrem porque os métodos de conversão não são completos, o que impede a real quantificação dessas amostras, e/ou porque ocorre a formação de artefatos (produtos secundários) (Christie, 2008).

O objetivo do projeto é desenvolver uma metodologia de análise para ácidos graxos poliinsaturados, baseada na cromatografia gasosa de alta resolução avaliando diferentes colunas, detectores e métodos de preparação de amostra.

### **2.Material e métodos**

As análises dos ácidos graxos derivatizados foram realizadas quali- e quantitativamente por cromatografia gasosa de alta resolução, utilizando um equipamento Agilent, modelo HP 6890 Plus, configurado com duas colunas cromatográficas, uma polar (HP INNOWAX-20) e outra apolar (HP-5) de idênticas dimensões (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25  $\mu$ m), detectores de ionização de chama, injeção automática e Chemstation. A partir de uma mistura de padrões comerciais disponíveis de ésteres metílicos de ácidos graxos, foi desenvolvido um método de separação alterando os parâmetros de temperatura do forno do aparelho, bem como, a temperatura dos detectores de ionização de chama (FID), a pressão dos gases e seleção do gás de arraste. A melhor separação foi analisada injetando-se diferentes amostras de óleos comerciais como o de linhaça, tubarão, bacalhau e de peixe, conhecidos na literatura por conter grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados.

### **3.Resultados e discussão**

Considerando todas as análises realizadas onde se testou diferentes programações de forno (diferentes rampas e gradientes de temperatura), o tipo e o fluxo do gás de arraste; a melhor resolução de picos cromatográficos foi alcançada com a seguinte condição(figura 1): Temperatura do forno a 107 °C, subindo 7 °C/min até 149 °C e mantendo-se nessa temperatura (isoterma) por 54 min , em seguida subindo 6 °C/min até 260°C, e mantendo-se nessa temperatura por 1,50 min, com um tempo de análise de 80 min. Detectores de ionização de chama (FID) programados a 270 °C com fluxos de 30 mL/min de hidrogênio e 300 mL/min de ar sintético; e gás de arraste hidrogênio com fluxo de 2,8 mL/min.

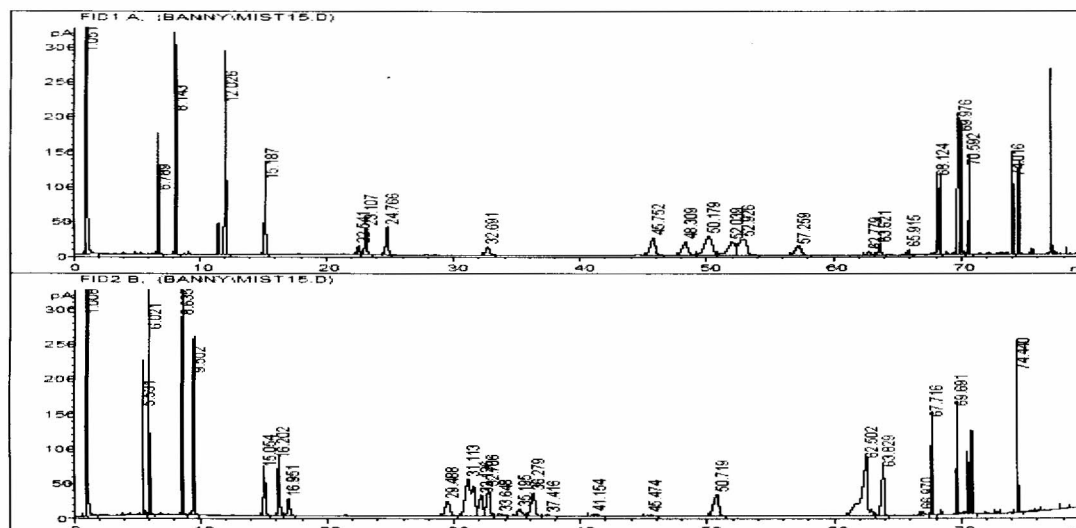


Figura 1. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos de mistura de padrões comerciais de ácidos graxos analisado em coluna apolar (FID1 A) e polar (FID1 B).

Observou-se que na coluna apolar não foi possível separar completamente alguns ésteres metílicos (C18:2 cis9,12 e C18:1 cis9). Contudo na coluna polar foi possível separar todos os ésteres metílicos com excelente resolução, o que permite utilizar esse método na análise de óleos poliinsaturados. Como os cromatogramas das duas colunas são obtidos simultaneamente é possível utilizar boa parte das informações dos dois cromatogramas para a identificação mais confiável de cada éster metílico em cada amostra analisada. Cada padrão comercial de éster metílico de ácido graxo disponível (total de 43 amostras) foi injetado na condição final de análise. Os tempos de retenção obtidos nas duas colunas foram então tabelados possibilitando assim a identificação mais confiável de cada padrão nas amostras a serem analisadas (tabela 1).

Tabela 1. Tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos analisados

	Nome usual	Nome oficial	Fórmula	Apolar (min)	Polar (min)
1	valérico	pentanóico	C 5:0	1,235	1,234
2	capróico	hexanóico	C 6:0	2,285	2,068
3	pelargônico	Nonanóico	C 9:0	3,062	2,653
4		undecanoico	C 11:0	5,347	4,423
5		undecenoico	C 11:1 cis- 10	5,200	5,024
6	laúrico	dodecanóico	C 12:0	6,787	5,557
7	mirístico	tetradecanóico	C 14:0	11,981	8,635
8	miristoléico	cis-9- tetradecenóico	C 14:1 cis- 9	11,518	9,491
9	palmitico	hexadecanóico	C 16:0	24,744	15,084
10	palmitoléico	cis-9 -hexadecenóico	C 16:1 cis -9	22,636	16,259
11	palmitoléico	trans -9 -hexadecenóico	C 16:1 trans-9	23,445	16,511
12	esteárico	octadecanóico	C 18:0	57,155	27,487
13	petroselinico	cis-6-octadecenóico	C 18:1 cis -6	50,924	31,507
14	cis-vaccênico	cis- 11- octadecenóico	C 18:1 cis -11	51,333	31,926
15	oléico	cis- 9- octadecenóico	C 18:1 cis- 9	50,796	31,608
16	trans-vaccênico	trans- 11 -octadecenóico	C 18:1 trans-11	53,978	32,854
17	elaídico	Trans-9-octadecenóico	C 18: 1 trans-9	52,671	32,028
18		cis - 12-octadecenóico	C 18: 1 cis-12	53,507	33,420
19	linolelaídico	trans- 9,12 -octadecadienóico	C 18:2 trans -9,12	51,158	37,672
20	linoléico	cis- 9,12- octadecadienóico	C 18:2 cis- 9,12	49,126	36,975
21	$\alpha$ -Linolênico	cis- 9,12,15-ocatdecatrienóico	C 18:3 cis-9,12,15	49,509	45,795
22	$\gamma$ -linolênico	cis-6,9,12- octadecatrienóico	C 18:3 cis- 6,9,12	44,747	40,485

23		cis-6,9,12,15-octadecatetraenóico	C 18: 4 cis-6,9-12,15	45,926	50,995
24	CLA	Ácido linoléico conjugado		62,476	53,977
25		nonadecanóico	C 19:0	62,436	42,474
26	araquidico	eicosanóico	C 20:0	70,585	61,549
27		cis-5-eicosenóico	C 20:1 cis -5	69,874	62,948
28		cis-11-eicosenóico	C 20:1 cis -11	69,761	62,980
29		cis - 8- eicosenóico	C 20:1 cis -8	69,790	63,050
30		cis-13-eicosenóico	C 20:1 cis 13	70,079	64,259
31		cis -11,14 -eicosenóico	C 20:2 cis 11,14	69,657	66,188
32		cis- 8,11,14 -eicosatrienóico	C 20:3 cis- 8,11,14	68,877	67,038
33		cis- 11,14,17- eicosatrienóico	C 20:3 cis- 11,14,17	69,744	68,462
34	araquidônico	cis-5,8,11,14-eicosatetraenóico	C 20:4 cis-5,8,11,14	68,260	67,894
35	EPA	cis -5,8,11,14,17- eicosapentaenóico	C 20:5 cis- 5,8,11,14,17	68,585	69,912
36			C 21:0	72,754	67,749
37	behênico	docosanóico	C 22:0	74,497	70,533
38	erúxico	cis-13-docosenóico	C 22:1 cis -13	74,105	70,995
39		cis 13,16 docosadienoico	C 22:2 cis -13,16	73,939	71,858
40		cis-13,16,19- docosatrienóico	C 22: 3 cis-13,16,19	74,060	73,049
41		cis- 7,10,13,16 - docosatetraenóico	C 22:4 cis-7,10,13,16	73,148	72,738
42	DHA	cis-4,7,10,13,16,19- docosahexaenóico	C 22: 6 c- 4,7,10,13,16,19	73,023	74,316
43	nervônico	cis -15-tetracoseinóico	C 24:1	77,090	74,550

Para testar o método de análise, foram analisadas diferentes amostras de óleos (bacalhau, tubarão, peixe) previamente convertidos em seus respectivos ésteres metílicos (tabela 2).

Tabela 2. Composição da cadeia graxa dos óleos estudados

linhça		tubarão		bacalhau		peixe	
cadeia	%	cadeia	%	cadeia	%	cadeia	%
C 9:0	2,477	C 14:0	4,123	C 14:0	0,883	C 14:0	9,600
C 16:0	2,535	C 16:0	13,836	C 16:1 c-9	5,234	C 16:0	21,759
C 16:1 c-9	0,027	C 16:1c-9	8,373	C 16:1 t-9	0,95	C 16:1	10,302
C 18:0	1,948	C 18:0	2,71	C 18:2 c-9,12	3,49	C 18:0	4,309
C 18:1 c-6	10,550	C 18:1 c-6	16,763	C 18:3 c-9,12,15	2,295	C 18:1 c-6	14,822
C 18:1 c-9	0,397	C 18:1 c-11	4,669	C 18:4	7,866	C 18:1 c-11	3,871
C18:2 c-9,12	7,649	C 18:2 c-9,12	3,504	C 21:0	1,447	C 18:2 c-9,12	1,321
C 18:3 c-9,12,15	23,177	C 18:3 c-9,12,15	0,828	C 20:5	25,622	C 18:4	1,565
C 20:2 c-11,14	0,010	C 18:4	1,227	C 22:4	1,169	C 20:1 c-5	2,427
C 22:0	0,064	C 20:1 c-11	13,979	C 22:3 c-13,16,19	0,692	C 21:0	0,949
C 22:1 c-13	0,007	C 20:1 c-8	0,684	C 22:6	39,719	C 20:5	11,076
C 22:2 c-13,16	0,006	C 20:2 c11,14	0,26			C 22:1 c-13	1,357
C 22:4 c-7,10,13,16	0,042	C 21:0	0,239			C 22:4	0,491
C 22:6	0,050	C 20:5	4,302			C 22:3 c-13,16,19	1,471
C 24:1	0,068	C 22:0	14,594			C 22:6	6,641
		C 22:4	0,871				
		C 22:6	6,654				
Total	49,007	Total	97,616	Total	89,367	Total	91,961

Uma vez definido o método cromatográfico de análise, foram avaliados também dois diferentes métodos de preparação de amostras. O primeiro método de preparação de amostra envolve a conversão do óleo, em seus respectivos ésteres metílicos, em duas etapas. A primeira etapa envolve a transesterificação/saponificação da amostra adicionando-se ao óleo uma mistura de metilato de sódio em metanol. A segunda etapa é uma etapa de esterificação com a adição de um ácido de Lewis, normalmente uma mistura de  $\text{BF}_3$  em metanol. O segundo método de preparação de amostra envolve a simples transesterificação do óleo em meio básico e metanol. Este último método somente pode ser aplicado em amostras de óleo com baixo índice de acidez.

Os dois métodos de preparação foram aplicados para a amostra comercial de óleo de peixe, que é uma amostra que possui um alto teor de ácidos graxos poliinsaturados. A análise prévia do índice de acidez indicou que o óleo de peixe possuía baixo índice de acidez ( $\text{IA}_{\text{peixe}} = 1,53 \pm 0,09$ ). Os cromatogramas das duas amostras em coluna polar indicam que os dois métodos analisados resultaram em resultados semelhantes no cromatograma (figura 2), porém um monitoramento por cromatografia por camada delgada mostrou que a amostra que sofreu apenas transesterificação obteve melhor conversão de óleo em ésteres metílicos.

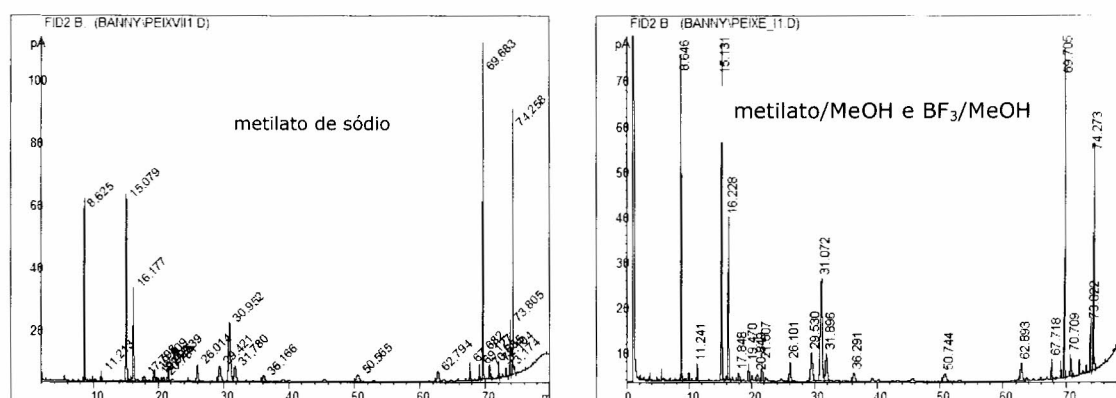


Figura 2. Cromatogramas das amostras de óleo de peixe preparadas com metilato de sódio (esquerda) e com  $\text{NaOH/MeOH}$  e  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  (direita) na coluna polar.

#### 4. Conclusão

Conclui-se que o método de preparação da amostra desempenha um papel muito importante na análise de óleos poliinsaturados. O processo envolvendo apenas a transesterificação com metilato de sódio em metanol, em comparação com o método tradicional utilizando saponificação seguido de esterificação com metilato/MeOH e  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  resultou em uma melhor conversão de óleo em ésteres metílicos, porém isso só foi possível quando aplicados à óleos com baixo índice de acidez, sendo então estabelecida a melhor condição viável, a reação de saponificação/transesterificação utilizando metilato de sódio em metanol em baixa concentração seguido de esterificação com  $\text{BF}_3$  metanólico.

#### 5. Referências

Christie, W.W. (2008). The Lipid library. <http://www.lipidlibrary.co.uk/index.html>. Acesso: 10/02/2009.

Curi, R., Pompéia, C., Miyasaka, C. K., Procopio, J. 2002. *Entendendo a gordura, ácidos graxos*. São Paulo, editora Manole.

Horwitz, W. 2002. *Official methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International, Gaithersburg, vol. II, cap. 41, p.1-69.

Kasim-Karakas, S.E. 2001. Omega-3 fish oils and lipoprotein metabolism. In: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. Editor: Wildman, R.E.C. CRC Press, Boca Raton, 295-305 p.

Meher, L. C.; Sagar, D.V.; Naik, S.N. 2004. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 10: 248-268.

Milinsk, M. C., Matsushita, M., Visentainer, J. V., Oliveira, C. C., Souza, N. E. 2008. Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(8), 1475-1483.

Schuchardt, U.; Sercheli, R.; Vargas, R. 1998. Transesterification of Vegetable Oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 9(1): 199-210.