

QUI-04

PREPARAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS METILADOS PARA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DOS ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE MATERNO

J. da S. Gonçalves (Bolsista CNPq/PIBIC) & Roberto Figliuolo (Pesquisador INPA/CPPN).

O organismo animal para crescer, desenvolver e reproduzir normalmente necessita de alguns nutrientes essenciais, isto é, aqueles que o organismo animal é incapaz de sintetizar e devem constar, obrigatoriamente, dos alimentos que constituem a dieta desses organismos. Alguns aminoácidos, vitaminas e ácidos graxos são nutrientes essenciais para os animais. A não ingestão de nutrientes essenciais de qualquer tipo provoca doenças denominadas “doenças carenciais”. Entre outros, existem dois tipos de ácidos graxos essenciais para os animais:

- 1- Ácido araquidônico (C18:3, AA) (série ômega-6), e
- 2- Ácido docosaexaenóico (C22:6, DHA).(série ômega-3).

As importâncias fisiológicas e as essencialidades nutricionais do AA e do DHA, especialmente para o organismo humano, são demonstradas com os seguintes fatos:

- a) o ácido linoleico (ácido graxo precursor da série ômega-6) não é eficientemente metabolizado até AA (homólogo superior),
- b) o AA é essencial para o desenvolvimento normal do sistema vascular animal.
- c) o AA é um dos precursores dos eicisanoídes no organismo animal (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, mediadores de várias ações celulares fundamentais),
- d) a sofisticada rede de comunicação do cérebro é executada por sistemas de transferências transmembranas (neurônios e terminações sinápticas) com um notável investimento na biotecnologia lipídica: aproximadamente 60% do material estrutural do cérebro é lipídico.
- e) os lipídios que, predominantemente, constituem o cérebro, e outros tecidos neurais dos animais, são o colesterol e fosfoglicerídios. Os fosfoglicerídios neurais são particularmente ricos em AA e DHA. O DHA é o principal constituinte estrutural do tecido cerebral e da retina animal (CRAWFORD, 1997).

A provisão adequada de AA e DHA, para o desenvolvimento normal do sistema vascular (vias de abastecimento nutricional dos tecidos) e do sistema nervoso dos mamíferos, respectivamente, particularmente do humano, é crítica durante três períodos da vida:

1. Gestação (especialmente último trimestre); 2. Lactação ou amamentação, e 3. Primeira infância (aproximadamente os três primeiros anos pós-natal).

O leite humano é o único alimento para crianças em fase de amamentação (lactentes), hoje disponível, contendo ácidos graxos essenciais com 20 ou mais átomos de carbono. É também o único alimento e a única fonte natural conhecida para lactentes contendo AA e DHA. O perfil de ácidos graxos que compõem o leite materno é prontamente alterado pela dieta e, portanto, reflete o hábito alimentar e a qualidade da dieta, em relação aos ácidos graxos, da lactante.

Os animais não têm a capacidade de biossintetizar ácidos graxos das séries ω -6 e ω -3. Por isso, os ácidos graxos matrizes dessas séries, o linoleico e o alfa-linolênico, respectivamente, são considerados nutrientes essenciais. Esses ácidos graxos são abundantemente encontrados nos óleos de várias sementes e verduras folhosas. No fígado, podem ser convertidos à AA e DHA, mas essa taxa de conversão, é muito baixa. Por isso, os ácidos linoleico e o alfa-linolênico não são considerados como fontes nutricionais de AA e DHA, respectivamente, principalmente para os humanos (SIMOPOULOS, A.P, 1991)..

Entre todos os vegetais, as algas, especialmente as que constituem o fitoplâncton marinho ou de água-doce, são os mais importantes produtores e um dos poucos organismos no planeta que possuem a capacidade de biossintetizar DHA. Portanto, as algas constituem as fontes quase exclusivas desses ácidos graxos na cadeia alimentar animal. Desde que o fitoplâncton é a base da cadeia alimentar, todas as outras formas de vida aquática e terrestres, eventualmente, tornam-se enriquecidas com esses ácidos. Os peixes obtêm DHA através da cadeia alimentar aquática, retendo-os na porção lipídica estrutural dos tecidos. Vários estudos mostram que a quantidade de DHA em peixes e no zooplâncton são similares àquelas encontrados em algumas algas marinhas das mesmas áreas.

O DHA é o principal ácido graxo contendo 6 duplas ligações nos lipídios totais de peixes tropicais e de regiões temperadas e frias e ocorre em níveis que variam entre 0,3 e 30% dos ácidos graxos totais. Os peixes são a mais importantes fontes nutricionais de DHA para os humanos. No geral, a proporção de ácidos graxos ω -3 em relação aos da série ω -6 (ω -3/ ω -6) nos lipídios totais de peixes de água-doce é, tipicamente, na faixa de 0,5 a 3,8. Enquanto que em peixes marinhos varia de 4,7 a 14,4. Os menores valores encontrados são derivados de espécies de peixes tropicais de água-doce (HENDERSON & TOCHER, 1987).

A despeito de ser um dos recursos naturais mais abundantes e utilizados na região amazônica, da importância nutricional exercida pelos peixes na Amazônia e da importância nutricional de DHA na nutrição humana para prevenção de doenças e manutenção de uma vida saudável, além da determinação da quantidade lipídica de alguns peixes da Amazônia, pouco sabe-se sobre a composição lipídica desses peixes (FIGLIUOLO, 1992).

Em conclusão, algumas questões básicas devem ser estudadas:

1) Existe carência nutricional humana de ácidos graxos da série $\omega 3$ e $\omega 6$ na Amazônia Central, principalmente nos períodos de gestação, lactação e primeira infância humana.

2) O leite humano produzido por lactantes vivendo na Amazônia Central é suficientemente rico em AA e DHA para um suprimento adequado e a mínima garantia de uma vida adulta vascular e neuro-cerebral normal?

Esse estudo é a parte inicial de uma das várias fases de um projeto de pesquisa que visa avaliar a ocorrência de ácidos graxos essenciais das séries $\omega 3$ e $\omega 6$ nas algas (origem), nos peixes (acumuladores) e no homem (final da cadeia alimentar) na Amazônia Central.

Coleção de amostras: As amostras de leite humano foram coletadas no banco de leite humano do INAMPS. Imediatamente após as coletas, as amostras (30-50 mL) foram congeladas e transportadas para o laboratório em recipientes térmicos. As doadoras responderam um questionário sobre condições sócio-econômicas e hábitos alimentares, para posteriores correlações com os resultados obtidos.

Extração dos lipídios: O conteúdo lipídico total das amostras de leite materno coletadas serão extraídos exaustivamente com a mistura clorofórmio 2:1 metanol (método de Bligh e Dyer).

Determinação quantitativa dos lipídios totais: A determinação quantitativa dos lipídios totais do leite materno, em relação ao peso fresco, serão efetuadas por análise gravimétrica,

Obtenção dos ácidos graxos metilados: Os ácidos graxos metilados das amostras de lipídios totais serão obtidos por saponificação (solução de KOH 0,5N) e transmetilação (BF_3/MeOH).

Análise quali-quantitativa dos ácidos graxos metilados: A composição quali-quantitativa dos ácidos graxos, na forma de ésteres metílicos, das amostras de lipídios totais foi determinada por GLC, usando um sistema HP 6890 Plus equipado com FID e coluna capilar HP 5 - Crosslinked 5% PH ME Siloxane, comp. 30 m, ID 0,32 mm, Film thickness 0,25 μm . Temperatura do detector 300 $^{\circ}\text{C}$, e a do injetor 250 $^{\circ}\text{C}$. Programa de temperatura da coluna: início 4 por 3 min., 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 280 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min., 300 $^{\circ}\text{C}$ até o final. Os estères metílicos dos ácidos araquidônico (ARA) e docosaenóico foram identificados por comparação com os tempos de retenção de amostras autênticas (padrões).

Foram coletadas 30 amostras de leite humano com ampla variação do tempo de amamentação pós-parto (7 dias até 4 meses). A porcentagem do conteúdo lipídico total em relação ao peso fresco das amostras coletadas variou entre 0,25 e 6,20, assim distribuídos:

36% das amostras (11 amostras) variaram entre 0,1 e 1,0%; 36% (11 amostras) entre 1,0 e 2,0%; 13,3% (4 amostras) entre 2,0 e 3,0% e 3,3% (1 amostra) entre 6,0 e 7,0%.

A quantidade média dos lipídios totais no leite humano, em mulheres saudáveis, varia entre 1.49 e 3.30 % em relação ao peso fresco da amostra (Nettleton,1995).

Das 30 amostras coletadas e das quais extraiu-se o conteúdo lipídico total, 10 foram escolhidas aleatoriamente para análise quali-quantitativa dos ácidos graxos AA e DHA. A faixa de variação de AA foi de 0,12 a 0,6% e a de DHA foi de 0,00 a 0,18% do conteúdo total de ácidos graxos.

A variação nos níveis individuais dos ácidos graxos na porção de ácidos graxos do conteúdo lipídico total do leite humano foi estudada por Harzes *et al.* (1983). Para o ácido araquidônico (ARA) e docosaexenóico (DHA) a faixa de variação reportada foi de 0.4 a 0.8% e de 0,04 a 0.25%, respectivamente. No entanto, níveis muito elevados de DHA (aprox.1.9%) têm sido reportados em lactantes suplementando a dieta com cápsulas de óleo de peixes ricos em ácidos graxos ω -3 (Harris *et al.*, 1984).

Embora o número de amostras analisadas até o momento seja muito reduzido para qualquer conclusão definitiva, pode-se aludir que, se a tendência atual da variação do conteúdo lipídico total e a variação específica de ARA e DHA no total de ácidos persistirem, o leite humano coletado em Manaus não esteja suprimindo as necessidades nutricionais mínimas desses ácidos graxos essenciais para o desenvolvimento normal dos tecidos neural e vascular dos lactentes.

CRAWFORD, M.A. *et al.* 1997. Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies? *Am. J. Clin. Nutr.* **66** (suppl):1032S-41S..

FIGLIUOLO, R. Catálogo da Coleção de Óleos de Peixes da Amazônia. Versão II, Julho de 1992. Manuscrito não publicado.

NETTLETON, J. A. *Ômega-3 Fatty Acids and Health.* Chapman & Hall, N. York. 359 pp.

HARRIS, W.S. *et al.* 1984. Will dietary ω -3 fatty acids change the composition of human milk? *Am. J. Clin. Nutr.* **40**:780-785.

HARZES, G. *et al.* 1983. Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day. *Am. J. Clin. Nutr.* **37**:612-621.

HENDERSON, R.J. & TOCHER, D.R. 1987. The Lipid Composition and Biochemistry of Freshwater Fish. *Prog. Lipid Res.* **26**, 281-347.

SIMOPOULOS, A.P. 1991. Essencial Fatty Acids. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**:438-463.