

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DERIVATIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS APLICADA À CROMATOGRAFIA GASOSA

LUCAS MORAES BERNEIRA ¹; SAMANTHA COELHO DE FREITAS ²;
CAROLINE NICLODI ²; LUCIANO SISCONETTO ² ALISSON ASSUNÇÃO DA
SILVA ²; CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA ³

¹UFPEl – Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica - luucas.berneira@hotmail.com

²UFPEl – Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica

³UFPEl – Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica – claudiochemistry@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A derivatização é um processo que permite a conversão de grupos funcionais tais como OH, NH e SH em grupamentos menos polares. Esse procedimento aumenta a volatilidade e melhora a estabilidade do analito em técnicas como a cromatografia gasosa (CG). De uma forma geral, ocorre a partir da reação de ácidos graxos (AGs) com metanol na presença de um catalisador básico ou ácido, sob aquecimento, convertendo os AGs a seus respectivos ésteres metílicos (EMAGs).

Devido aos vários tipos de catalisadores existentes, a derivatização pode seguir uma catálise ácida onde são utilizados reagentes como ácido sulfúrico, ácido clorídrico e trifluoreto de boro, ou uma catálise básica onde se utiliza hidróxido de sódio ou de potássio. Há ainda a possibilidade de se utilizar a catálise mista, na qual se utiliza reagentes básicos e ácidos sequencialmente (CHRISTIE; HAN, 2012).

Os AGs são compostos que contém cadeias de carbonos médias ou longas ligados a um grupo terminal carboxila, os quais podem apresentar ou não duplas ligações. Os AGs que não contém duplas ligações em sua estrutura são classificados como saturados (AGSs), os que contém uma dupla ligação são monoinsaturados (AGMIs) e, acima de duas, são poli-insaturados (AGPIs) (NELSON et al., 2008; CHRISTIE; HAN, 2012).

As fontes de AGs encontradas na natureza podem ser provenientes de diversas matrizes vegetais como, por exemplo, frutos, sementes, oleaginosas e algas. Dentre essas matrizes, pode-se destacar as macroalgas da Antártica, as quais podem apresentar uma concentração relativamente alta de AGPIs, a exemplo os ácidos linoléico (18:2n6) e alfa-linolênico (18:3n3). Tais ácidos são considerados importantes tanto para as algas quanto para a nutrição humana visto que estão relacionados com a prevenção de doenças cardiovasculares e de tumores (CORSOLINI et al, 2002).

O processo de derivatização possibilita a identificação de EMAGs através da cromatografia gasosa com detector por ionização em chama, que se apresenta como um detector universal, de alta sensibilidade e baixo custo.

Neste contexto, a adaptação de metodologias de derivatização para análise em GC-FID se torna necessária a fim de se obterem reações mais rápidas e com resultados mais exatos empregando reagentes menos tóxicos (RUIZ-RODRIGUEZ et al., 2010).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar três procedimentos convencionais de derivatização para AGs nas macroalgas antárticas *Gigartina skottsbergii* e *Pyropia endiviifolia*.

2. METODOLOGIA

As algas *G. skottsbergii* e *P. endiviifolia* foram coletadas na Península Antártica durante o mês de dezembro de 2013. As amostras foram liofilizadas e acondicionadas ao abrigo da luz e de altas temperaturas. Para a extração, seguiu-se a metodologia modificada de BLIGH; DYER (1959) onde, em 1 g de biomassa foi adicionado 30 mL de uma solução metanol/clorofórmio (2:1) e agitou-se por 30 min. à temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionou ao sistema 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução aquosa de sulfato de sódio 1,5% (m/v). Após, a mistura foi centrifugada à 3000 rpm durante 30 min. e a fase orgânica foi separada e evaporada em um rotaevaporador.

A derivatização dos AGs foi efetuada de acordo com três diferentes metodologias. No método de HARTMANN; LAGO (1973) a biomassa extraída foi diluída em 6 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio 0,5 M e colocada sob refluxo à 80 °C por 8 min. Posteriormente foi adicionado 15 mL do reagente de Hartmann, mantendo sob refluxo por 5 min., seguido da adição de 25 mL de éter de petróleo e 50 mL de água deionizada. A fase orgânica foi separada, seca em sulfato de sódio anidro e evaporada em um rotaevaporador.

Seguindo a metodologia de MOSS et al. (1974) foram adicionados 6 mL de uma solução de KOH 2 % em metanol (m/v) à fração lipídica, sob agitação e aquecimento à 80 °C por 8 min. Posteriormente foram adicionados 7 mL de BF₃ sob agitação por um período de 2 min. Após, foram acrescentados 5 mL de uma solução aquosa de NaCl 20 % (m/v), sendo resfriado sob repouso. A fase orgânica foi separada com hexano em funil de separação e seca em rotaevaporador.

A terceira metodologia testada seguiu de acordo com JHAM et al. (1982), onde adicionou-se 10 mL de solução metanólica de KOH 0,5 M à fração lipídica e a mistura foi colocada sob refluxo por 5 min. À 100 °C. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de uma solução de HCl em metanol 4:1 (v/v), sendo mantida sob refluxo por um período de 15 min. A fase orgânica foi separada com 6 mL de água destilada e 9 mL de éter de petróleo, e seca em rotevaporador. Os AGs derivatizados através das metodologias descritas foram caracterizados em equipamento

GC-FID Shimadzu com auto-injetor AOC-20i empregando um padrão interno de nonadecanoato de metila (C19:0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As metodologias de MOSS et al. (1974), HARTMANN; LAGO (1973) e JHAM et al. (1982) para as algas *G. skottsbergii* e *P. endiviifolia* (Tabela 1) se mostraram eficientes no processo extrativo, pois os resultados apresentados mostraram diferenças nos perfis analisados, isto é, houve variação entre os tipos de AGs e suas concentrações.

Os métodos de JHAM et al. (1982), HARTMANN; LAGO (1973) e de MOSS et al. (1974), para a macroalga *G. skottsbergii*, apresentaram respectivamente 14, 8 e 7 AGs extraídos sendo que entre os saturados o ácido C16:0 apresentou maior concentração em todos os métodos, bem como o ácido C18:1n9c. Entre os AGPIs, o ácido C18:2n6c apresentou maior concentração para os métodos de Moss et al. (1974) e HARTMANN; LAGO (1973). Porém, para o método de Jham et al. (1982), o AGPI com maior representatividade foi o C20:5n3.

Na alga *P. endiviifolia* foram extraídos 12, 5, e 14 AGs para MOSS et al. (1974), HARTMANN; LAGO (1973) e JHAM et al. (1982), respectivamente. O

mesmo padrão de maior concentração para o ácido C16:0 foi observado em todos os métodos. Entre os AGMIs, o que apresentou melhor resultado foi o C18:1n9c para os métodos de MOSS et al. (1974) e JHAM et al. (1982). Nos três métodos, o AGPI com maior concentração foi o C20:5n3. Os resultados encontrados corroboram com a literatura (PATERNOSTRO, 2013).

TABELA 1. Perfil de ácidos graxos nas algas *G. skottsbergii* e *P. endiviifolia*

Ácido Graxo	<i>Gigartina skottsbergii</i>			<i>Pyropia endiviifolia</i>		
	A	B	C	A	B	C
C14:0	6,46	6,06	1,89	-	-	-
C15:0	-	-	0,68	-	-	-
C16:0	52,63	54,66	13,97	48,24	50,48	37,26
C17:0	-	-	1,55	-	-	-
C18:0	5,27	2,41	4,27	1,81	-	1,11
C20:0	-	-	1,28	-	-	0,58
ΣAGSs	67,36	63,13	23,64	50,05	50,48	38,95
C20:1	-	-	-	4,64	7,99	3,84
C16:1	2,37	-	0,52	2,88	-	4,65
C18:1n9c	19,11	17,51	6,58	5,38	3,35	5,51
C22:1n9	-	-	-	0,68	-	0,58
C24:1	-	-	1,67	-	-	-
ΣAGMIs	21,48	17,51	8,77	13,58	11,34	14,56
C20:2	-	-	-	1,12	-	1,73
C18:2n6c	11,87	10,41	1,92	5,84	7,15	2,77
C18:3n3	-	3,39	0,11	0,96	-	0,74
C20:3n6	-	-	-	1,95	-	2,14
C20:4n6	-	3,49	0,23	2,12	-	2,12
C20:5n3	2,27	2,09	60,25	21,28	31,11	32,5
C22:6n3	-	-	5,06	-	-	3,05
ΣAGPIs	14,14	19,38	67,57	33,27	38,26	45,05

(A) Moss et al. (1974); (B) Hartmann; Lago (1973); (C) Jham et al. (1982); -: não detectado.

De uma forma geral foi possível observar que houve uma diferença na concentração entre as classes de AGs. No processo extrativo de AGSs o método mais eficiente foi o de MOSS et al. (1974), porém para AGPIs a melhor metodologia foi a de JHAM et al. (1982) com rendimentos distintos entre os dois métodos nas algas estudadas. Estes resultados sugerem que, ao se analisar amostras desconhecidas, é necessário utilizar mais de um método a fim de se obter melhores resultados na determinação de AGs (SALIMON et al., 2014).

Alguns motivos podem explicar as variações encontradas entre os EMAGs analisados sendo que os principais podem ser a decomposição dos AGs durante as análises bem como os diferentes reagentes utilizados nas derivatizações. A solução metanólica comercial de trifluoreto de boro, por exemplo, se degrada mais rapidamente do que o ácido sulfúrico e o ácido clorídrico. Esses ácidos oferecem ainda outras vantagens como baixo custo, menor toxicidade e menor impacto ambiental (CHRISTIE, 1989).

Cabe ainda destacar que, para que os resultados sejam confiáveis, essas soluções devem ser preparadas antes das análises evitando sua estocagem e possível degradação. Outro fator importante a ser levado em consideração é a presença de outros compostos interferentes na análise, tais como carboidratos e

proteínas, as quais podem interagir de formas distintas com os acilgliceróis e com os reagentes utilizados no processo (SCHLECHTRIEM et al., 2008; MARTINS et al., 2012).

4. CONCLUSÕES

Os métodos de MOSS et al. (1974), HARTMANN; LAGO (1973) e JHAM et al. (1982) para as macroalgas *G. skottsbergii* e *P. endiviifolia* se mostraram eficientes na derivatização de AGs. Porém, devido a inúmeros compostos interferentes que as algas podem apresentar deve-se fazer uma análise criteriosa na escolha do método de derivatização a fim de se obter resultados mais precisos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- CHRISTIE, W. W.; HAN, X. **Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis**, Woodhead Publishing, 4 ed, 2012.
- CORSOLINI, S., ROMEO, T., ADEMOLLO N., GRECO, S., FOCARDI, S. POPs in key species of marine Antarctic ecosystem. **Microchemical Journal**, v. 73, n.1, p. 187-193, 2002.
- HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 474, 1973.
- JHAM, G. N.; TELES, F. F. F.; CAMPOS, L. G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 59, n. 3, p. 132-133, 1982.
- NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**, Macmillan, 5 ed., 2008.
- MARTINS, A. P.; YOKOYA, A. S.; COLEPICOLO, P. Comparison of extraction and transesterification methods on the determination of fatty acids contents of three Brazilian seaweeds species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 854-860, 2012.
- MOSS, C. W.; LAMBERT, M. A.; MERWIN, W. H. Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. **Journal of Applied Microbial**, v. 28, n. 1, p. 80-85, 1974.
- RUIZ-RODRIGUÉS, A.; REGLERO, G.; IBAÑES, H. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 305-326, 2010.
- MARTINS, A. P. **Avaliação do potencial biotecnológico de macroalgas marinhas**. 2013. 199f. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas. Universidade de São Paulo.
- SALIMON, J.; OMAR, T. A.; SALIH, N. Comparison of two derivatization methods for the analysis of fatty acids and trans fatty acids in bakery products using gas chromatography. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.