

AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO SIMPLES E ECONÔMICO PARA A METILAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS COM LIPÍDIOS DE DIVERSAS ESPÉCIES DE PEIXES

Everaldo Lima MAIA*
Délia B. RODRIGUEZ-AMAYA*

RIALA6/743

MAIA, E.L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. – Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):27-35, 1993.

RESUMO: Existem diversas técnicas disponíveis para a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, cada uma tendo vantagens e desvantagens. O método de METCALFE *et alii* utiliza o reagente $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ que é caro e importado, o método de HARTMAN & LAGO emprega reagentes comuns, mas requer mais vidrarias e maiores manipulações. Aproveitando os aspectos vantajosos dos dois métodos citados, foi experimentado um método que proporciona rapidez, simplicidade e baixo custo. Utilizou-se o reagente esterificante de HARTMAN & LAGO e as demais etapas descritas por METCALFE *et alii*, sendo que as reações de hidrólise e esterificação foram realizadas em tubo de ensaio. O método proposto foi comparado com o método de METCALFE *et alii*, utilizando os lipídios musculares de pacu, *Piaractus mesopotamicus* e sardinha, *Sardinella brasiliensis*. Para a separação e quantificação dos ácidos graxos foi utilizada cromatografia gasosa de alta resolução. Não houve diferença significativa ao nível de 5% nas porcentagens de 18 ácidos graxos de pacu. De 36 ácidos graxos de sardinha, uma diferença significativa a nível de 5% foi observada em apenas dois. Mesmo para estes dois ácidos graxos, a diferença não foi significativa a nível de 1%. Portanto, os dois métodos são equivalentes. Estes dois métodos também apresentaram resultados semelhantes para os lipídios de curimatá, tilápia e tambaqui, demonstrando a alta aplicabilidade do método proposto.

DESCRIPTORIOS: metilação, ácidos graxos, peixe, cromatografia gasosa.

INTRODUÇÃO

No exterior, nos últimos anos, os lipídios de peixes têm sido objeto de numerosos estudos, por serem uma fonte rica de ácidos graxos polinsaturados da série ômega-3 (AGP n3)^{3, 13, 15, 21, 28, 29}. Estudos epidemiológicos correlacionam a baixa incidência de doenças cardiovasculares nos esquimós e japoneses, com o consumo destes ácidos graxos provenientes de peixes^{10, 11, 12, 18, 19}. Tentativas de reduzir os riscos às doenças cardiovasculares enfatizam a importância do consumo de peixes ou de seus produtos ricos em AGP n3 e pobres em AGP n6^{8, 16, 22, 27}. Os AGP n3 e óleos de peixes são tão intimamente ligados que os

peixes como um todo são considerados fontes ricas. Na verdade, há uma diferença marcante nos perfis de ácidos graxos entre diferentes espécies de peixes e entre as classes (lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídios) e subclasses (triacilgliceróis, lecitina, cefalina, etc.) de lipídios.

Por outro lado, a porção lipídica de alimentos pode estar associada positiva ou negativamente às diversas propriedades dos alimentos como sabor, estabilidade da cor, características emulsificantes e conteúdo calórico. A diferença entre espécies, em relação à composição de ácidos graxos, representa uma das variáveis mais significativas que determinam as características de processamento, palatabilidade e

* Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas
C.P. 6121, 13081-970 Campinas, SP, Brasil

estocagem de alimentos como peixes, carnes, frangos, etc. Os ácidos graxos insaturados, especialmente os poliinsaturados, são lábeis à oxidação, um problema sério no processamento e estocagem de alimentos.

No Brasil, o efeito benéfico dos AGP n3 já está sendo divulgado, mas são poucos os trabalhos sobre a composição de ácidos graxos em peixes brasileiros. Este tipo de análise é geralmente conduzido por cromatografia gasosa e, por se tratar de uma composição complexa, com uma coluna capilar. Apenas quatro trabalhos realizados no Brasil foram encontrados na literatura, os quais utilizaram coluna empacotada^{9, 23, 24, 26}. Os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA) em óleo de sardinha e em suplementos alimentares à base de óleo de sardinha foram determinados usando uma coluna capilar de sílica fundida Carbowax 20M.

Com o desenvolvimento de instrumentos altamente sofisticados, sensíveis e precisos, as etapas anteriores à medida instrumental tornaram-se os passos mais passíveis de erros, portanto, limitantes na obtenção de dados exatos. Erros cometidos nestes passos preliminares não são corrigidos na etapa instrumental por mais moderno e sofisticado que seja o instrumento.

A determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa é uma análise largamente realizada em várias áreas da ciência. Ácidos graxos de cadeia curta podem ser injetados diretamente no cromatógrafo. Ácidos graxos de cadeia longa, no entanto, não são suficientemente voláteis para uma análise direta, necessitando a sua transformação em ésteres. Duas fontes de erros devem ser evitadas nesta derivação: (1) a conversão incompleta dos ácidos graxos (ligados ou livres) aos ésteres desejados, e (2) alterações da estrutura durante a liberação e esterilização dos ácidos graxos.

Existem vários métodos para a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, cada um tendo vantagens e desvantagens. Envolvem uma transesterificação ou uma hidrólise (saponificação) da amostra, seguida de esterificação dos ácidos graxos livres. O método de Metcalfe *et alii*²⁵, amplamente utilizado internacionalmente, envolve a hidrólise com hidróxido de sódio e a metilação dos ácidos graxos liberados com BF₃-MeOH. A análise é simples, rápida e realizada em tubo de ensaio. O reagente BF₃-MeOH, porém, é caro (importado), tóxico e tem uma vida útil curta. Quando envelhecido, pode causar danos à produção de artefatos. Como alternativa, a metilação pode ser efetuada com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico metanólico. No Brasil, foi introduzido em 1973 o método de Hartman & Lago¹⁴ que emprega reagentes comuns, como uma solução de cloreto de amônio, ácido sulfúrico e metanol para esterificação. Requer, no entanto, mais vidrarias (inclusive condensador de água) e maiores manipulações. Aproveitando os aspectos vantajosos dos dois métodos citados, foi experimentado neste trabalho um método que

proporciona rapidez, simplicidade e baixo custo. Utilizou-se o reagente esterificante de Hartman & Lago e as demais etapas descritas por Metcalfe *et alii*, sendo que as reações de hidrólise e esterificação foram, diferentemente de Hartman & Lago realizadas em tubos de ensaio, permitindo assim a análise simultânea de um grande número de amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sardinha e curimatá foram adquiridas no Frigorífico Tavares (Campinas, SP). Amostras de pacu, tilápia e tambaqui foram coletadas de tanques de criação no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura (CEPTA, Pirassununga, SP). Uma outra amostra de tambaqui (alevinos), utilizada para comparar o método proposto e o de Hartman & Lago¹⁴, foi obtida de um cultivo intensivo na Universidade Estadual de Campinas.

Para cada amostra, uma polpa de peixe (uma pasta de tecidos musculares contendo fragmentos de espinhas intramusculares e isenta de pele) foi preparada em moedor de carne de marca Britânia (contendo um disco com furos de aproximadamente 4 mm de diâmetro) a partir de filés sem pele de 6 a 10 exemplares.

Empregou-se o método de Bligh & Dyer⁷ para a extração dos lipídios totais da polpa de pescado, levando-se em conta as proporções recomendadas entre os solventes metanol, clorofórmio e água tissular.

O extrato de lipídios totais foi fracionado em lipídios neutros e fosfolipídios por cromatografia em coluna, num tubo cromatográfico de vidro de 30 cm de comprimento por 2,0 cm de diâmetro interno, contendo sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) como adsorvente, de acordo com especificações de Johnston *et alii*¹⁷. O adsorvente foi submetido a um pré-tratamento que consistiu numa lavagem com metanol e depois com clorofórmio, agitando-o por uma hora para cada solvente com agitador magnético. Os solventes foram removidos sob filtração com trompa d'água e o adsorvente foi colocado em dessecador a vácuo até apresentar-se com aspecto bem seco. Vinte e cinco gramas do adsorvente pré-tratado foram misturadas com 60 ml de clorofórmio e colocadas na coluna. Depois do empacotamento, uma camada de 1 cm de sulfato de sódio anidro foi colocada no topo e a altura total do leito foi de aproximadamente 12 cm. Após aplicação da amostra na coluna, utilizou-se a seguinte seqüência de eluição para separação das classes de lipídios: 1) Fração I (lipídios neutros) – eluída com 200 ml de 20% de acetona em CHCl₃ e 2) Fração II (fosfolipídios) – eluída com 200 ml de metanol.

As amostras de lipídios totais, lípidos neutros e fosfolipídios foram saponificadas e os ácidos graxos metilados pelo método de Metcalf *et alii*²⁵, usando trifluoreto de boro em metanol (BF₃-MeOH) como reagente esterificante, ou pelo método proposto no qual o BF₃-MeOH foi substituído por

$\text{NH}_4\text{Cl-H}_2\text{SO}_4\text{-MeOH}$. O procedimento encontra-se esquematizado na Figura 1.

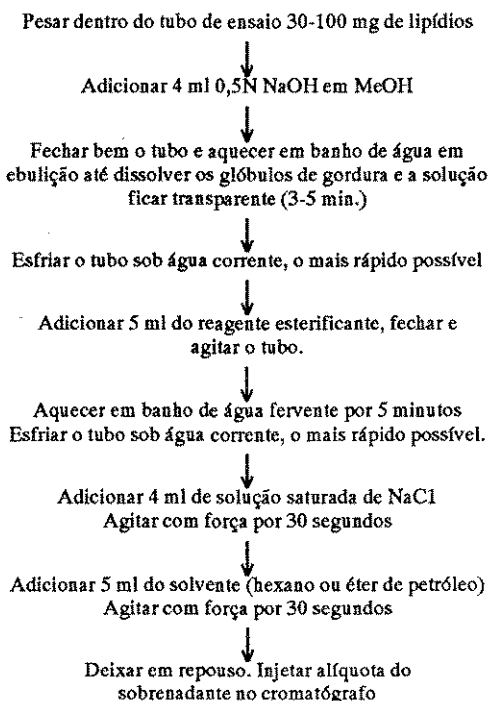


FIGURA 1

Procedimento para a metilação dos ácidos graxos.

O $(\text{BF}_3\text{-MeOH})$ (Merck, Alemanha) foi usado como reagente. Para preparar o reagente $\text{NH}_4\text{Cl-H}_2\text{SO}_4\text{-MeOH}$, 10 g de NH_4Cl foram adicionados a 300 ml de MeOH, seguido por 15 ml de H_2SO_4 concentrado, adicionado em pequenas porções com agitação¹⁴.

A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo Varian, modelo 3300, equipado com detector de ionização de chama, injetor do tipo "split/splitless", coluna capilar de sílica fundida, (50 cm de comprimento x 0,22 mm de diâmetro interno) (WCOT, SGE, Austrália), contendo polietileno glicol (Carbowax 20M) e integrador processador INTRALAB 4290. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do detector, 280°C, temperatura do injetor, 250°C, temperatura da coluna, 200°C por 42 min., programada a 2°C/min. até 210°C, gás de arraste, hidrogênio com fluxo de 0,8 ml/min, gás "make-up", nitrogênio a 30 ml/min., técnica de injeção, "split" (com razão de "split" de 100:1).

A identificação dos ácidos graxos realizou-se de acordo com os seguintes procedimentos: 1) comparação do tempo de retenção não corrigido e corrigido de ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras e de padrões, 2) técnica de co-eluição de padrões e amostras, 3) comparação com óleos de origem marinha (PUFA-1) e de origem animal (PUFA-2) da

Supelco (EUA), 4) comparação com óleo de fígado de bacalhau (Sigma, EUA), 5) fatores de separação^{14, 20}, 6) comparação da ordem de eluição em coluna capilar SE-54 (apolar) e Carbowax 20M (polar), 7) comprimento equivalente da cadeia (ECL), 8) método gráfico no qual os logaritmos dos tempos de retenção e ECL são plotados contra o número de átomos de carbono dos ácidos graxos², 9) espectrometria de massa por impacto eletrônico a 70 eV, utilizando um cromatógrafo gasoso - espectrômetro de massa Shimadzu QP 2000 A.

Os resultados da comparação de métodos de metilação para os ácidos graxos dos lipídios totais de pacu e sardinha foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo procedimento de modelos lineares gerais, aleatorizado (um fator, dois níveis e três repetições), usando-se o pacote estatístico SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método proposto foi comparado com o de Metcalfe *et alii*²⁵, utilizando lipídios totais musculares de pacu e sardinha, cujas composições de ácidos graxos são diferentes (Tabela 1).

Os cromatogramas obtidos pelos dois métodos não mostraram nenhuma diferença perceptível, tanto para o pacu, como para a sardinha, que apresentaram, respectivamente, um total de 66 e 61 picos. Desses totais apenas os componentes com teores $\leq 0,1\%$ estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença significativa, a nível de 5%, nas percentagens de 18 ácidos graxos de pacu submetidos à análise estatística. De 36 ácidos graxos de sardinha, apenas em dois ácidos graxos (i-17:0 e 16:2n7) obteve-se uma diferença significativa, a nível de 5%. Mesmo para estes dois ácidos graxos, a diferença não foi significativa a nível de 1%. Portanto, os dois métodos foram considerados equivalentes.

O método proposto teve desvios padrões em geral um pouco maiores do que o método de Metcalfe *et alii*²⁵. De acordo com AOAC⁵, a diferença entre os resultados para os ácidos graxos principais ($> 5\%$), obtidos no mesmo dia, pelo mesmo operador e com a mesma amostra, não deve diferir por mais de 3% relativo e valor absoluto de 1%. Para o pacu os desvios, mesmo para o método proposto, ficaram dentro destas especificações. Para a sardinha, nenhum desvio absoluto foi superior a 1%, mas os desvios relativos foram superiores a 3% para 14:0 (6%), 20:5n3 (4%) e 22:6n3 (5%). No entanto, no decorrer do trabalho, as duplicatas obtidas por este método ficaram dentro das exigências da AOAC.

Os dois métodos também foram aplicados às frações lipídios neutros e fosfolipídios de pacu e de outras espécies (curimbatá, tilápia e tambaqui) Tabelas 2 a 5. Os resultados revelaram-se muito semelhantes, demonstrando a ampla aplicabilidade do método proposto.

TABELA 1

Composição percentual* de ácidos graxos de lipídios totais de pacu, *Piaractus mesopotamicus* e sardinha, *Sardinella brasiliensis*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido graxo	Pacu		Sardinha	
	Método A	Método B	Método A	Método B
11:0	-----	-----	0,07±0,01	0,07±0,01
12:0	-----	-----	0,25±0,01	0,25±0,03
14:0	4,03±0,22	3,69±0,23	7,60±0,09	7,69±0,47
14:1n5	0,45±0,02	0,42±0,04	-----	-----
i-15:0	-----	-----	0,09±0,00	0,10±0,01
15:0	0,18±0,01	0,17±0,01	0,40±0,01	0,39±0,02
i-16:0	-----	-----	0,05±0,00	0,05±0,01
16:0DMA	0,20±0,01	0,21±0,01	-----	-----
16:0	26,33±0,43	25,54±0,31	20,60±0,22	20,90±0,59
16:1n7	9,12±0,15	9,12±0,13	8,75±0,03	8,92±0,30
i-17:0	-----	-----	0,38±0,02**	0,44±0,02**
16:2n7	-----	-----	0,43±0,02**	0,48±0,02**
16:2n4	-----	-----	1,29±0,02	1,26±0,03
17:0	0,19±0,01	0,20±0,02	0,42±0,02	0,45±0,01
17:1n11	-----	-----	1,37±0,10	1,38±0,05
17:1n9	0,19±0,01	0,20±0,02	-----	-----
i-18:0	-----	-----	0,11±0,01	0,11±0,02
16:4n3	-----	-----	2,25±0,07	2,17±0,12
18:0	8,19±0,16	8,03±0,20	3,94±0,02	3,93±0,07
18:1n9+n7	38,16±0,54	39,65±1,06	11,26±0,06	11,37±0,10
18:1n4	-----	-----	0,40±0,06	0,39±0,01
18:2n6	9,55±0,13	9,40±0,05	0,83±0,05	0,79±0,01
18:2n4	-----	-----	0,30±0,06	0,25±0,01
18:3n6	0,10±0,02	0,11±0,04	0,26±0,12	0,18±0,04
19:1n11	-----	-----	0,09±0,01	0,08±0,02
18:3n3	0,5±0,03	0,48±0,02	0,63±0,01	0,60±0,07
18:4n3	-----	-----	2,52±0,04	2,47±0,06
19:2n6	-----	-----	0,36±0,01	0,35±0,01
20:0	-----	-----	0,28±0,01	0,26±0,02
20:1n9	0,66±0,03	0,70±0,05	1,54±0,05	1,43±0,09
20:2n9	0,19±0,03	0,18±0,04	0,46±0,01	0,45±0,03
20:2n6	-----	-----	-----	-----
+	0,61±0,09	0,64±0,03	0,09±0,01	0,08±0,01
20:3n9	-----	-----	-----	-----
20:4n6	0,86±0,03	0,76±0,09	1,49±0,04	1,51±0,05
20:4n3	-----	-----	0,86±0,09	0,79±0,06
20:5n3	-----	-----	17,77±0,11	17,67±0,70
22:1n11	-----	-----	0,86±0,06	0,76±0,14
22:5n6	-----	-----	0,22±0,01	0,22±0,02
22:5n3	-----	-----	1,68±0,04	1,68±0,10
22:6n3	0,47±0,01	0,50±0,11	10,28±0,08	10,09±0,53

* Os valores são médias e desvios padrão de determinações em triplicatas para cada método.

** Significativamente diferentes ao nível de 5%, porém sem diferença significativa ao nível de 1%. Os teores dos demais ácidos graxos não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5%.

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*; Método B – Método proposto; i – iso; DMA – dimetilacetal.

TABELA 2

Composição percentual de ácidos graxos de lípidios neutros e fosfolípidios de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido graxo	Lípidios neutros		Fosfolípidios	
	Método A	Método B	Método A	Método B
14:0	3,9	4,1	0,8	0,6
14:1n5	0,5	0,4	----	----
15:0	0,2	0,2	----	----
15:1n9	----	----	0,6	0,4
16:0DMA	----	----	6,4	6,2
16:0	26,9	27,0	23,1	20,5
16:1n7	9,2	9,1	2,5	2,3
17:0	0,2	0,2	----	----
17:1n9	0,2	0,2	----	----
18:0DMA	----	----	1,4	1,3
18:1DMA	----	----	0,9	0,9
18:0	8,2	8,1	10,0	9,4
18:1n9+n7	40,1	40,1	16,5	19,7
18:2n6	9,6	9,6	8,9	8,7
18:3n3	0,5	0,5	----	----
20:1n9	0,6	0,5	----	----
20:3n6	----	----	2,8	2,9
20:4n6	----	----	10,6	11,0
22:5n6	----	----	5,2	6,1
22:6n3	----	----	8,5	9,8

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*; Método B – Método proposto; DMA – dimetilacetal.

TABELA 3

Composição percentual de ácidos graxos de lipídios neutros e fosfolipídios de Curimatá, *Prochilodus scrofa*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido Graxo	Lipídios Neutros		Fosfolipídios	
	Método A	Método B	Método A	Método B
12:0	0,3	0,3	-	-
XI	0,1	0,1	-	-
13:0	0,5	0,5	-	-
i-14:0	0,4	0,4	-	-
14:0	5,5	5,4	0,7	0,7
14:1n7	0,1	0,1	-	-
14:1n5	0,1	0,1	-	-
i-15:0	1,8	1,8	-	-
ai-15:0	0,7	0,7	-	-
X2	0,2	0,2	-	-
15:0	2,9	2,9	1,2	1,2
15:1n9	0,2	0,2	0,4	0,4
15:1n7	0,2	0,2	-	-
i-16:0	0,8	0,8	-	-
16:0DMA	-	-	3,0	3,1
16:0	22,1	22,0	24,3	24,6
16:1n7	15,0	14,9	3,7	3,7
16:1n5	1,2	1,2	0,8	0,8
i-17:0	1,6	1,6	0,4	0,5
ai-17:0	1,0	1,0	0,5	0,6
17:0	1,9	1,9	1,2	1,1
17:1n9	1,6	1,6	0,4	0,5
i-18:0	0,7	0,7	-	-
18:0DMA	-	-	1,1	1,1
17:2n5	0,4	0,4	-	-
18:0	5,1	5,2	7,5	7,4
18:1n9+n7	13,7	13,7	8,4	8,3
18:2n6	2,9	2,8	2,2	2,2
18:3n6	0,4	0,3	-	-
19:0	0,4	0,3	-	-
19:1n11	0,5	0,4	-	-
18:3n3	4,6	4,3	2,2	1,9
18:4n3	1,0	1,0	-	-
20:0	0,5	0,5	-	-
20:1n9	1,7	1,9	-	-
20:2n6+20:3n9	0,6	0,6	-	-
20:3n6	0,5	0,6	-	-
20:4n6	2,4	2,5	12,2	12,3
20:3n3	0,6	0,7	-	-
20:4n3	1,5	1,5	-	-
20:5n3	2,2	2,4	6,5	6,8
22:5n6	-	-	6,0	6,4
22:5n3	-	-	2,6	3,1
22:6n3	2,0	2,2	14,3	13,0

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*, Método B – Método proposto, X – não identificado; i – Iso, ai – anteiso, DMA – dimetilacetato.

TABELA 4

Composição percentual de ácidos graxos de lipídios neutros e fosfolipídios de tilápia, *Oreochromis niloticus*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido Graxo	Lipídios Neutros		Fosfolipídios	
	Método A	Método B	Método A	Método B
12:0	0,1	0,1	-	-
14:0	5,6	5,9	1,0	1,0
i-15:0	0,3	0,3	-	-
15:0	0,3	0,3	0,2	0,2
16:0DMA	-	-	2,5	2,6
16:0	28,6	29,0	29,2	27,8
16:1n7	7,3	7,7	1,8	1,9
i-17:0	0,1	0,1	-	-
ai-17:0	0,1	0,1	-	-
17:0	0,2	0,2	0,2	0,2
17:n9	0,2	0,2	0,2	0,2
18:0DMA	-	-	0,9	0,9
18:1DMA	-	-	1,2	1,5
18:0	5,6	5,5	9,4	8,6
18:1n11	0,1	0,2	-	-
18:1n9+n7	31,2	31,1	17,0	16,4
18:1n5	0,1	0,1	-	-
18:1n4	0,2	0,2	-	-
18:2n6	12,9	13,1	14,5	14,0
18:3n6	0,6	0,6	0,3	0,3
18:3n3	0,6	0,6	0,2	0,2
20:0	0,2	0,2	-	-
20:1n9	1,9	1,4	0,3	0,5
20:2n6+20:3n9	1,0	0,7	1,5	1,6
20:3n6	0,6	0,6	2,0	2,2
20:4n6	0,7	0,6	7,4	7,8
22:4n6	0,6	0,5	-	-
22:5n6	0,4	0,4	4,9	5,6
22:5n3	-	-	0,4	0,7
22:6n3	0,5	0,3	4,9	5,8

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*; Método B – Método proposto; i – iso, ai – anteiso, DMA – dimetilacetil.

TABELA 5

Composição percentual de ácidos graxos de lipídios neutros e fosfolipídios de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido Graxo	Lipídios Neutros		Fosfolipídios	
	Método A	Método B	Método A	Método B
14:0	1,5	1,7	-	-
14:n5	0,1	0,1	-	-
15:0	0,1	0,1	-	-
16:0DMA	-	-	5,4	5,9
16:0	29,6	30,4	19,9	21,6
16:1n7	6,3	6,6	1,7	2,4
17:0	0,2	0,1	-	-
17:1n9	-	-	1,3	1,3
18:0	10,7	10,4	13,9	11,7
18:1n9+n7	40,5	39,9	21,9	22,1
18:2n6	8,5	8,5	10,4	10,8
18:3n3	0,6	0,5	-	-
20:1n9	1,3	1,2	-	-
20:3n6	0,4	0,3	3,7	3,3
20:4n6	0,2	0,2	8,8	8,9
22:5n6	-	-	3,0	3,1
22:6n3	-	-	10,0	8,9

Abreviaturas: Método A – Método de Metcalfe *et alii*; Método B – Método proposto; DMA – dimetilacetil.

TABELA 6

Composição percentual de ácidos graxos de lipídios totais de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Comparação de dois métodos de metilação.

Ácido Graxo	Lipídios Totais	
	Método A	Método C
14:0	1,3	1,2
15:0	0,2	0,2
16:0DMA	0,5	0,6
6,0	29,3	29,1
16:1n7	5,9	5,2
17:0	0,2	0,2
18:0 DMF	0,2	0,3
18:0	8,2	8,9
18:1n9+N7	30,6	31,4
18:2n6	16,7	16,0
18:3n6	0,2	0,2
18:3n3	0,8	0,7
20:1n9	0,8	1,0
20:2n6+20:3n9	0,8	0,8
20:3n6	0,9	0,9
20:4n6	1,4	1,3
22:5n6	0,6	0,6
22:6n3	1,2	1,2

abreviaturas: Método B – Método proposto, Método C – Método de Hartman & Lago; DMA – dimetilacetil.

Este método foi também comparado com o de HARTMAN e LAGO¹⁴ em uma amostra de tambaqui (Tabela 6), demonstrando a equivalência dos dois métodos.

CONCLUSÕES

O reagente BF₃-MeOH pode ser substituído por NH₄C1-H₂SO₄MeOH no método de METACALFE *et alii*, sem comprometer a confiabilidade dos resultados. O método proposto demonstrou o mesmo desempenho que o de Metcalfe *et alii* com lipídios de diversas espécies de peixes, amostras reconhecidamente complexas. Portanto, além de simplicidade, rapidez e baixo custo, este método apresenta ampla aplicabilidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

RIALA6/743

MAIA, E.L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. – Evaluation of a simple and inexpensive method for the methylation of fatty acid with lipids of various fish species. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):27-35, 1993.

ABSTRACT: Different techniques are available for the preparation of fatty acid methyl esters, each having advantages and disadvantages. The method of METACALFE *et alii* utilizes the reagent BF₃-MeOH which is expensive and imported that of HARTMAN and LAGO employs common reagents but requires great amount of glassware and manipulations. Putting together the beneficial features of the two methods mentioned, a new method that provides speed, simplicity and low cost was evaluated. The methylating reagent of HARTMAN and LAGO and the rest of the procedure of METACALFE *et alii* were used, all the stages being carried out in a test tube. This method was compared with that of METACALFE *et alii*, utilizing the muscle lipid of *Piaractus mesopotamicus* and *Sardinella brasiliensis*. Separation and quantitation of the fatty acids were accomplished by high resolution gas chromatography. No significant differences were observed at 5% level in the percentages of 18 fatty acids of *P. mesopotamicus*. Of 36 fatty acids of *S. brasiliensis*, only two showed significant difference at 5% level. Even with this two fatty acids, the difference was not significant at 1% level. The two methods were therefore shown to be equivalent. These two methods also gave similar results with lipids of *Prochilodus scrofa*, *Oreochromis niloticus* and *Colossoma macropomum*, demonstrating the wide applicability of the proposed method.

DESCRIPTORS: methylation, fatty acids, fish, gas chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKMAN, R.G. - An analysis of separation factors applicable in the gas-liquid chromatography of unsaturated fatty acid methyl esters on a polyester substrate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40:564-67, 1963.
2. ACKMAN, R.G. - Structural correlation of unsaturated fatty acid esters through graphical comparison of gas-liquid chromatographic retention times on a polyester substrate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40:558-64, 1963.
3. ACKMAN, R.G. - Nutritional composition of fats in seafoods. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 13:161-241, 1989.
4. ACKMAN, R.G. & BURGHER, R.D. A proposed basis for the systematic identification of unsaturated fatty acid esters through gas-liquid chromatography on polyester substrates. *J. Chromatog.*, 11:185-94, 1963.
5. A.O.A.C. - *Official methods of analysis*, 15th ed., p. 964-65. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1990.
6. BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B. de, TAVARES, M. & AUED-PIMENTEL, S. - Determinação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e decosa-hexaenóico (DHA) em óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira e em suplemento à base de sardinha. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51(1/2):75-81, 1991.
7. BLIGH, E.G. & DYER, W.J. - A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911-17, 1959.
8. BURR, M.L. - Fish and the cardiovascular system. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 13:291-316, 1989.
9. CASTELO, F.P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. & STRONG III, F.C. - Aproveitamento e características da gordura cavitária do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818. *Acta Amazonica*, 10:557-76, 1980.
10. DYERBERG, J. Platelet vessel wall interaction: influence of diet. *Phil. Trans. Royal Soc. London*, B294:373, 1981.
11. DYERBERG, J. & BANG, H.O. - Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet*, ii:433-35, 1979.
12. DYERBERG, J.; BANG, H.O.; STOFFERSEN, E.; MARCADA, S. & VANE, J.R. - Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet*, ii: 117-19, 1978.
13. GIBSON, R.A. - Australian fish - An excellent source of both arachidonic acid and w3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 18: 743-52, 1983.
14. HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. - Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Prac.*, 22:475-6, 94, 1973.
15. HEARN, T.L.; SGOUTAS, S.A.; HEARN, J.A. & SGOUTAS, D.S. - Polyunsaturated fatty acids and fat in fish flesh for selecting species for health benefits. *J. Food Sci.*, 52:1209-11, 1987.
16. HEROLD, P.M. & KINSELLA, J.E. - Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: A comparison of findings from animal and human feeding trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43:566-98, 1986.
17. JOHNSTON, J.J.; GHANBARI, H.A.; WHEELER, W.B. & KIRK, J.R. - Characterization of shrimp lipids. *J. Food Sci.*, 48:33-35, 1983.
18. JORGENSEN, K.A. & DYERBERG, J. Platelets and atherosclerosis. *Adv. Nutr. Res.*, 5:57, 1983.
19. KAGAWA, Y., NISHIZAWA, M. & SUZUKI, M. - Eicosenoic acid of serum of Japanese islanders with low cardiovascular disease. *J. Nutr. Sci.*, 24:441, 1982.
20. KATES, M. - Techniques of lipidology, p. 269-610. North Holland/American Elsevier Publ. Co., 1972.
21. KINSELLA, J.E. - Dietary fat and prostaglandins: Possible beneficial relationships between food processing and public health. *Food Technol.*, 35:89-98, 1981.
22. KINSELLA, J.E. - Food components with potential therapeutic benefits: the n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. *Food Technol.*, 40:89-97, 1986.
23. MACEDO VIEGAS, E.M.; BARRERA-ARELLANO, D. & CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. - Effect of diets with palm oil and soybean oil deodorizer distillate on tambaqui (*Colossoma macropomum*) fatty acid composition. In: BARRERA-ARELLANO, D. & GONÇALVES, L.A.G. (eds.), *Proceedings of the International Meeting on Fats & Oils Technology*, p. 193-96, Campinas, São Paulo, 1991.
24. MAIA, E.L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & AMAYA-FÁRFAN, J. - Proximate, fatty acid and amino acid composition of the Brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Food Chem.*, 12:275-86, 1983.
25. METCALFE, L.D.; SCHMITZ, A.A. & PELKA, J.R. - Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, 38:514-15, 1966.
26. OGAWA, M. PRICE, R.L., BARROSO, M.A.T. & BESERRA, F.J. - Characteristics of shark liver oils from Northeastern Brazil. *Arq. Cienc. Mar.*, 14:57-60, 1974.
27. SINCLAIR, A.J.; O'DEA, K. & NAUGHTON, J.M. - Elevated levels of arachidonic acid in fish from northern Australian coastal waters. *Lipids*, 18:877-81, 1983.
28. VLIEG, P. & BODY, D.R. - Lipid contents and fatty acid composition of some New Zealand freshwater finfish and marine finfish, shellfish, and roes. *New Zealand J. Mar. Fresh. Res.*, 22:151-62, 1988.
29. WANG, Y.J., MILLER, L.A.; PERREN, M. & ADDIS, P.B. - Omega-3 fatty acids in Lake Superior fish. *J. Food Sci.*, 55:71-73, 76, 1990.

Recebido para publicação em 4 de dezembro de 1992.

