

Desenvolvimento e validação de uma metodologia para a determinação da composição em ácidos gordos da membrana de eritrócitos por cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama

Helena da Conceição Fernandes da Costa

Relatório Projeto Final apresentado à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança
para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Este trabalho foi efetuado sob orientação de:

Professora Doutora Joana Amaral

Professor Doutor Rui Lima

Este Relatório Projeto Final inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Setembro 2014

Agradecimentos

Queria agradecer em primeiro lugar aos meus pais e à minha irmã por todo o apoio dado desde o primeiro momento, pela confiança, pelo incentivo e pela compreensão demonstrada pela minha ausência.

Ao meu namorado também o meu obrigado pela paciência, pelo carinho, pelo incentivo e por nunca me deixar desistir.

Queria também agradecer à minha orientadora Professora Doutora Joana Amaral, pelos conhecimentos científicos transmitidos, pela sua simpatia, pela sua disponibilidade, pelas horas perdidas comigo, pelo seu sacrifício pessoal, pela sua generosidade, pela sua amizade e principalmente pela sua imprescindível ajuda sem a qual esta dissertação não seria possível.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Rui Lima pelos conhecimentos que me transmitiu, pela ajuda e pelo seu esforço em proporcionar todos os meios necessários para a realização deste trabalho.

Um obrigado especial à Raquel Rodrigues por toda a ajuda que me prestou, pelo tempo perdido comigo, pela sua simpatia constante, pelas vezes que ficou a fazer-me companhia no laboratório, pela disponibilidade e claro, por todos os incentivos que foi dando ao longo do trabalho.

Obrigada também à Diana Pinho por todo o apoio dado, pela sua vontade em colaborar e pelos incentivos. Também agradecer ao Rui Ribeiro por sempre se mostrar disponível quando precisei.

Aos meus amigos pela presença na minha vida, pela amizade e pelo auxílio durante o percurso académico.

Agradeço também o apoio financeiro concedido pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do projeto PTDC/SAU-ENB/116929/2010, COMPETE, QREN e União Europeia (FEDER).

Resumo

Atualmente, é consensual a ideia de que a composição lipídica da dieta influencia de forma determinante o risco de algumas doenças crónicas. A ingestão de grandes quantidades de ácidos gordos saturados e ácidos gordos *trans* tem sido associado com dislipidémias, exacerbar de processos inflamatórios e aumento do risco de doenças cardiovasculares, pelo contrário o consumo de ácidos gordos polinsaturados, em especial os ómega-3, tem sido associado a diversos benefícios para a saúde. Pelo facto de os glóbulos vermelhos apresentarem um tempo de vida útil elevado, cerca de 120 dias, tem sido sugerido que o perfil em ácidos gordos das membranas destas células poderá ser usado não apenas como um biomarcador que reflita a ingestão de macronutrientes da dieta, mas também como um biomarcador associado a diferentes padrões metabólicos e patologias tais como diabetes, cancro e doenças cardiovasculares.

Por este motivo, e devido a um interesse crescente na definição de possíveis relações entre perfis de ácidos gordos e o risco de doenças crónicas, várias têm sido as metodologias propostas para a extração, separação, identificação e quantificação de diversos lípidos, em particular de ácidos gordos em matrizes tão diversas como alimentos e tecidos biológicos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método simples e rápido para a identificação e quantificação de ácidos gordos presentes na membrana de eritrócitos utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID). Para tal, foram testados diferentes protocolos, um dos quais incluiu um passo de extração de lípidos com base na adaptação de um método clássico (método de Folch) e outros protocolos, em que se testaram diferentes parâmetros tais como realização de saponificação, diferentes tempos de metilação e realização da extração e derivatização num único passo.

Depois de selecionado e otimizado o método procedeu-se ao estudo dos parâmetros de validação, tais como a gama de linearidade e curvas de calibração, precisão e exatidão, limite de deteção e limite de quantificação.

Palavras-chave: Eritrócitos, Ácidos gordos, Cromatografia Gasosa, Validação de metodologia

Abstract

Currently, it is general accepted idea that the lipid composition of the diet strongly influences the risk of some chronic diseases. The ingestion of large amounts of saturated fatty acids and trans fatty acids have been associated with dyslipidemia, exacerbated inflammatory processes and increased risk of cardiovascular diseases. In contrast, the consumption of polyunsaturated fatty acids, especially Omega-3 fatty acids, has been associated with several health benefits. Due to the fact that red blood cells have a high lifetime, about 120 days, it has been suggested that the fatty acid profile of these cells membranes can be used not only as a biomarker that reflects dietary macronutrient intake, but also as a biomarker associated with different metabolic patterns and pathologies such as diabetes, cancer and cardiovascular diseases.

For this reason, and due to a growing interest in the definition of possible relationships between profiles of fatty acids and the risk of chronic diseases, several methodologies have been proposed during the last years for the extraction, separation, identification and quantification of various lipids, in particular of fatty acids in diverse matrices such as foods and biological tissues.

Thus, the main objective of the present work consisted in developing a simple and rapid method for the identification and quantification of fatty acids existing in the erythrocyte membrane, by using gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). To accomplish this goal, different protocols were tested, one of which included a step of lipid extraction based on the adaptation of a classic method (Folch method) and other protocols, which included the evaluation of different parameters such as including a saponification reaction, different times of methylation and using a one-step protocol (for lipid extraction and derivatization reaction).

After selected and optimized, the method was validated based on the study of the generally used parameters for this purpose, such as range of linearity and calibration curves, precision and accuracy, limit of detection and limit of quantification.

Keywords: red blood cells, fatty acids, gas chromatography, method validation

Conteúdo

Capítulo 1	1
1.1 Motivação e objetivos	1
1.2 Organização da Dissertação	3
Capítulo 2	5
Revisão da Literatura	5
2.1 Sangue	5
2.1.1 Constituição do sangue	5
2.1.2 Eritrócitos	6
2.1.3 Lípidos e o seu transporte na corrente sanguínea	8
2.2 Técnicas utilizadas na análise de lípidos	18
2.2.1 Cromatografia	20
2.3 Validação de métodos	23
2.3.1 Seletividade e Especificidade	23
2.3.2 Linearidade e curva de calibração	23
2.3.3 Precisão	24
2.3.4 Exatidão	25
2.3.5 Limite de deteção e Limite de Quantificação	25
Capítulo 3	29
Parte Experimental	29
3.1 Material e métodos	29
3.1.1 Amostras	29
3.1.2 Reagentes e padrões	29
3.1.3 Processo extrativo	30
3.1.4 Análise cromatográfica	32

Capítulo 4	35
Resultados e Discussão	35
4.1. Otimização das condições cromatográficas	36
4.2. Otimização da preparação da amostra	36
4.3 Validação do método analítico	45
4.3.1 Linearidade e Curvas de Calibração	46
4.3.2 Precisão.....	49
4.3.3 Exatidão	50
4.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	51
Capítulo 5	53
Conclusão.....	53
Referências bibliográficas.....	55

Lista de Abreviaturas

AA- Ácido araquidónico

AGL- Ácido gama linolénico

AL-ácido linoleico (*linoleic acid*)

ALA- ácido α -linolénico (*alpha – linolenic acid*)

CG- Cromatografia Gasosa (*gas chromatography*)

DCM - Diclorometano

DHA- Ácido Docosahexenóico (*docosahexenoic acid*)

EPA- Ácido Eicosapentenóico (*eicosapentenoic acid*)

FA- Ácido (s) Gordo (s) (*Fatty acids*)

FAME - Ésteres metílicos de ácidos gordos (*fatty acid methyl esters*)

FID- Detetor de ionização em chama (*Flame ionisation detector*)

HDL – Lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoprotein*)

IUPAC- União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*)

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados (*monounsaturated fatty acids*)

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*)

rpm – Rotação por minuto

SFA - Ácidos gordos saturados (*saturated fatty acids*)

TFA - Ácidos gordos *trans* (*trans fatty acids*)

TG – Triacilglicerol

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein*)

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores normais para glóbulos vermelhos humanos (Smith, 2006).....	8
Tabela 2: Percentagem de ácidos gordos presentes no plasma, eritrócitos e dieta de 306 mulheres com idades compreendidas entre 43 e 69 anos (adaptado de Sun et al., 2007).	17
Tabela 3: Valor médio das áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{min}$) obtidas para cada método e diferentes tempos de metilação testados.....	39
Tabela 4: Gama de Linearidade, equação da reta e respetivo coeficiente de correlação para cada ácido gordo metilesterificado presente na mistura Supelco 37.	48
Tabela 5: Percentagem do Coeficiente de Variação (%CV) para cada FAME.	49
Tabela 6: Percentagem de recuperação para cada FAME presente na amostra (média de dois níveis de adição).	51
Tabela 7: Limite de deteção e limite de quantificação para cada composto.	52

Lista de Figuras

Figura 1: Representação dos Eritrócitos (Lima, 2013).....	6
Figura 2: Metabolismo dos ácidos gordos essenciais (Leonard <i>et al</i> , 2004).....	12
Figura 3: Exemplo de constituição de um cromatografo gasoso (adaptado de Lípidos em Ciência Animal).....	21
Figura 4: Exemplo de funcionamento de um detetor FID	22
Figura 5: Separação de fases da amostra	31
Figura 6: Sistema cromatográfico utilizado.....	33
Figura 7: Cromatograma da mistura Supelco de 37 FAMES concentrada.	36
Figura 8: Representação gráfica dos valores médios obtidos para cada FAME	40
Figura 9: Cromatograma obtido com a utilização do Método DCM (imagem sem (A) ou com ampliação (B)).	41
Figura 10: Cromatograma obtido com a utilização do Método Rápido com metilação 60 minutos (imagem sem (A) ou com ampliação (B)).	42
Figura 11: Cromatograma obtido com a utilização do Método Rápido com KOH com metilação 60 minutos (imagem sem (A) ou com ampliação (B)).....	43
Figura 12: Representação gráfica do comportamento do padrão interno C19:0.	46

Capítulo 1

1.1 Motivação e objetivos

As propriedades benéficas e prejudiciais dos lípidos, bem como a sua identificação e caracterização em diversas matrizes, é uma temática que tem sido alvo de numerosos estudos nos últimos anos. No que respeita aos ácidos gordos em particular, sabe-se que estes podem exercer efeitos, quer positivos quer negativos, no metabolismo e fisiologia humano. Atualmente, e de uma forma geral, considera-se que a ingestão de quantidades elevadas de ácidos gordos saturados e ácidos gordos *trans* pode potenciar o exacerbar de dislipidémias e aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV), ao passo que o consumo de ácidos gordos polinsaturados, com especial destaque para os ómega-3, tem sido associado a diversos benefícios para a saúde (Pottala et al., 2012). Por este motivo, e devido a um interesse crescente na definição de possíveis relações entre perfis de ácidos gordos e o risco de doenças crónicas, várias têm sido as metodologias propostas para a extração, separação, identificação e quantificação de diversos lípidos, em particular de ácidos gordos em matrizes tão diversas como alimentos e tecidos biológicos.

São várias as amostras biológicas descritas na literatura como tendo sido utilizadas para a avaliação do perfil em ácidos gordos, nas quais se incluem o sangue total, plasma, plaquetas, glóbulos brancos, eritrócitos, células bucais, entre outras (Pottala et al., 2012). Destas, a utilização de eritrócitos apresenta algumas vantagens tais como apresentarem uma baixa variabilidade biológica, serem representativos no que respeita a composição de outras membranas e refletirem uma exposição de relativamente longo termo a diferentes ácidos gordos (Pottala et al., 2012). Segundo alguns autores, pelo facto dos glóbulos vermelhos apresentarem um elevado tempo de vida (cerca de 120 dias), o perfil em ácidos gordos das membranas destas células pode ser usado não apenas como um biomarcador que reflita a ingestão de macronutrientes da dieta, mas também como um biomarcador associado a diferentes padrões metabólicos e patologias

(Harris et al., 2005; Magnusardottir et al., 2008). Até à presente data, a maioria dos estudos disponíveis na literatura foca sobretudo a análise do perfil de ácidos gordos no sangue total (Bicalho et al., 2008) ou plasma (Sun et al., 2007). No que respeita aos trabalhos realizados com eritrócitos, alguns apresentam o resultado apenas em percentagem relativa, não sendo realizada uma quantificação objetiva do teor dos diferentes compostos (Sun et al., 2007) e outros não referem qualquer validação prévia da metodologia usada (Araújo et al., 2008).

A análise de ácidos gordos das membranas de eritrócitos tipicamente engloba dois passos principais, nomeadamente a extração dos lípidos existentes na amostra e a sua metilação (derivatização), a qual pode ou não ser precedida de uma reação de saponificação (Clayton et al., 2012). O procedimento para extração de lípidos totais de eritrócitos é geralmente feito recorrendo a métodos convencionais utilizados mundialmente, nomeadamente o método de Folch (Folch et al., 1957), o método de Bligh e Dyer (Bligh e Dyer, 1959) ou modificações destes usando outros volumes, outras proporções de solventes na mistura extrativa, ou utilizando solventes menos tóxicos. No caso de serem usados outros solventes, deverá sempre ter-se em consideração que os solventes usados para extração devem solubilizar todos os compostos lipídicos e serem suficientemente polares para promoverem as dissociações das membranas celulares sem que ocorra reação química. A extração é considerada uma etapa crítica pois durante este passo as amostras devem ser preparadas e analisadas cuidadosamente para evitar a oxidação dos lípidos, pois a produção de artefactos pode comprometer a identificação e quantificação dos componentes da fração lipídica.

Frequentemente, os dois passos referidos (extração e derivatização) são realizados separadamente (a fase orgânica contendo os lípidos é retirada para um novo vial onde se procede à reação de derivatização), contudo existem alguns trabalhos que propõem a realização de um único passo conjunto, por exemplo para o caso de análise de plasma humano (Lepage and Roy, 1986) e mais recentemente em amostras de eritrócitos de sangue de ovelha (Clayton et al., 2012). A principal vantagem da realização deste tipo de procedimento deve-se ao facto de ser menos demorado e estar associado a menos perdas de amostra, acrescentando precisão e simplicidade ao procedimento (Lepage e Roy, 1986).

Ao longo dos anos foram sendo realizados estudos comparativos entre diferentes métodos de extração de lípidos, os quais foram avaliados de acordo com a eficiência de extração. No entanto, segundo a bibliografia consultada, continua a existir a necessidade de desenvolvimento de um método simples, rápido e preciso para análise quantitativa de ácidos gordos em membranas de eritrócitos humanas. Desta forma o objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver, otimizar e validar um método para a análise de FAMES da membrana de eritrócitos humanos. Para tal foram testados diferentes procedimentos em que as etapas de extração lipídica e derivatização foram realizadas num único passo, os quais foram comparados com os resultados obtidos pela aplicação de um método clássico em que se utilizou 2 etapas (extração seguida de derivatização). O método que forneceu os melhores resultados foi depois validado segundo os parâmetros convencionais. Com este procedimento pretendeu-se desenvolver uma metodologia que possa ser útil em trabalhos futuros tais como estudos clínicos.

1.2 Organização da Dissertação

Esta dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos, os quais se enumeram seguidamente para uma melhor compreensão dos temas que vão ser abordados ao longo da mesma. No presente capítulo, apresenta-se a motivação, os objetivos fundamentais e uma breve abordagem à disposição do trabalho.

No segundo capítulo encontra-se a revisão da literatura onde se abordam temas diretamente relacionados com o presente trabalho tais como o sangue, os lípidos e a determinação analítica da composição lipídica do sangue. Mais concretamente, refere-se a constituição do sangue dando relevo aos glóbulos vermelhos e ao transporte de lípidos no sangue, bem como às funções dos lípidos no organismo humano. Neste capítulo referem-se ainda as técnicas de extração e separação de ácidos gordos mais frequentemente utilizadas, assim como os parâmetros necessários à validação de um método.

O capítulo três apresenta a secção de material e métodos onde são descritos os equipamentos e reagentes utilizados, bem como todas as metodologias experimentais levadas a cabo durante a atividade laboratorial que foi realizada neste trabalho.

Seguidamente, no quarto capítulo, são apresentados os resultados referentes à parte experimental do trabalho e a discussão dos mesmos.

No capítulo seguinte é feita uma síntese apresentando as principais conclusões desta dissertação e referidas algumas sugestões para trabalhos futuros.

Por último, apresentam-se as referências bibliográficas utilizadas e que permitiram adquirir conhecimentos essenciais para a execução desta dissertação.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2.1 Sangue

O sangue é um tecido que transporta os nutrientes entre os órgãos, constituído por elementos sólidos em suspensão num meio líquido, o plasma. Na porção líquida, também flutuam outras substâncias, tais como as lipoproteínas que são os agentes transportadores dos lípidos. Nas principais classes de lípidos do plasma humano, destacam-se os triacilgliceróis (TG), constituídos por diferentes ácidos gordos (AG) que exercem funções importantes no organismo humano como constituintes da membrana celular e precursores de metabolitos que controlam processos fisiológicos e patológicos.

Uma das funções do sangue é transportar os lípidos no plasma através de combinações destes com proteínas. O estudo dos constituintes lipídicos é importante para avaliar os ácidos gordos circulantes no corpo humano bem como as suas concentrações, pois estas serão reflexo dos níveis de ingestão de ácidos gordos através da alimentação e da produção pelo próprio organismo, o que torna possível o entendimento da relação entre a dieta de um individuo e o desenvolvimento de doenças.

2.1.1 Constituição do sangue

O sangue é um tecido constituído por células sanguíneas, nomeadamente glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas, e por uma parte líquida denominada de plasma, onde flutuam os sais, aminoácidos, proteínas, lípidos, entre outras substâncias.

Os glóbulos vermelhos, também designados de eritrócitos ou hemácias, são elementos celulares anucleados e apresentam forma de disco bicôncavo. Esta forma bicôncava (Figura 1) proporciona uma grande superfície que por sua vez facilita as trocas gasosas. Uma característica também importante é o facto de estes apresentarem grande flexibilidade permitindo-lhes adaptar-se à forma dos capilares que apresentam menor diâmetro.

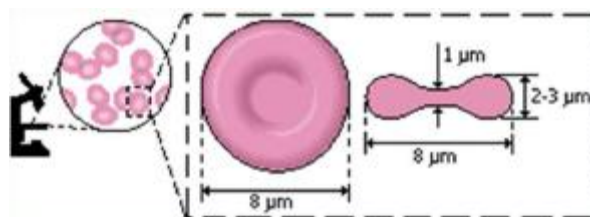


Figura 1: Representação dos Eritrócitos (Lima, 2013).

As propriedades do fluxo de eritrócitos na circulação do sangue são importantes uma vez que estes ocupam quase metade do volume do sangue.

A viscosidade do sangue aumenta com o aumento da fração de hematócrito (volume de eritrócitos no sangue). Além disso, o sangue é um fluido não-newtoniano, isto é, a sua viscosidade diminui com uma elevada tensão de corte devido à deformação dos eritrócitos, por outro lado, com uma baixa tensão de corte a sua viscosidade aumenta devido à agregação dos eritrócitos (Smith, 2006; Takeshi et al., 1990; Teixeira, 2011).

2.1.2 Eritrócitos

A quantidade de eritrócitos presentes no sangue varia entre 3,0 e 5,6 milhões/mm³ de sangue na mulher e entre 4,5 e 6,5 milhões/mm³ de sangue no homem.

A principal função dos eritrócitos é transportar nutrientes e oxigénio para as células e retirar destas o dióxido de carbono, água e resíduos resultantes das reações celulares. Para cumprirem o seu objetivo no que respeita as trocas gasosas, os eritrócitos contêm, no seu citoplasma, uma proteína especializada designada hemoglobina, sendo esta a responsável pela cor vermelha das hemácias. Para que haja esta troca gasosa os eritrócitos devem deformar-se para passarem através das secções dos vasos mais estreitos que eles. Quando o caudal diminui, os eritrócitos tendem a formar agregados dependendo da

composição do plasma e por este motivo, a deformabilidade do eritrócito e a agregação dos eritrócitos, bem como hematócrito capilar, são os principais determinantes da passagem capilar e suprimento de oxigênio para os tecidos (Teixeira, 2011).

Quando os glóbulos vermelhos transportam oxigênio, o sangue fica vermelho “vivo”, indicando que estamos perante o sangue arterial. Por outro lado, quando os glóbulos vermelhos transportam dióxido de carbono, o sangue fica vermelho “escuro”, ou seja, temos o sangue venoso (Teixeira, 2011).

Ao fim de 120 dias em circulação no sangue, as enzimas do eritrócito atingem um nível crítico, tornando-se insuficientes. Sendo assim, o eritrócito torna-se frágil e é destruído ao passar, principalmente, no baço. Num adulto normal, cerca de 200×10^9 eritrócitos envelhecidos são destruídos e substituídos por igual número de eritrócitos jovens (Teixeira, 2011).

As propriedades mecânicas dos eritrócitos são grandemente influenciadas pela membrana, especialmente pela estrutura do citoesqueleto, pela concentração de hemoglobina e pela forma da célula. A membrana dos glóbulos vermelhos consiste essencialmente numa camada dupla de fosfolípidos, estabilizada com colesterol, encontrando-se igualmente presentes proteínas e glicoproteínas. Os fosfolípidos da membrana são principalmente fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilcolina (lecitina) e esfingomiélin. A bicamada lipídica estabiliza as proteínas da membrana (que, entre outras funções, formam o citoesqueleto da membrana e funcionam como canais iônicos), contribuindo assim para a manutenção da forma e a flexibilidade da célula, bem como do seu bom funcionamento. O volume das hemácias no sangue, as quais constituem cerca de 45% da parte sólida do sangue, depende totalmente da produção na medula óssea. A sua diminuição no sangue, identificada por um baixo valor de hematócrito, pode constituir um sinal de anemia. Outras características como o desvio do tamanho normal, a forma, a concentração de hemoglobina e o número de hemácias podem ser importantes indicadores de doença (Smith, 2006) (Teixeira, 2011). A Tabela 1 apresenta os valores normais de parâmetros associados aos glóbulos vermelhos humanos para ambos os sexos.

Tabela 1: Valores normais para glóbulos vermelhos humanos (Smith, 2006).

	Homem	Mulher
Hemoglobina (g/dl)	13,5 – 17,5	11,5 – 15,5
Quantidade ($\times 10^{12}/l$)	4,5 – 6,5	3,0 – 5,6
Hematócrito	0,40 – 0,52	0,36 – 0,48
Média de Volume celular (fl)	80 – 95	80 – 95
Peso das hemácias (ml/kg)	30 \pm 5	25 \pm 5
Volume de Plasma (ml/kg)	45 \pm 5	45 \pm 5

2.1.3 Lípidos e o seu transporte na corrente sanguínea

Relativamente à definição do termo “lípidos” não existe um consenso comum, contudo é usualmente utilizado para designar um conjunto de biomoléculas insolúveis em água e solúveis em solventes não polares. Os lípidos abrangem um elevado número de substâncias que são comumente agrupados em classes de acordo com as suas estruturas químicas, tais como ácidos gordos (FA) e seus ésteres de glicerol (entre os quais se destacam os triacilgliceróis), ceras, fosfoglicerídeos, esfingolípidos e esteróis.

Os ácidos gordos, entre outras funções, fornecem energia e são parte integrante das membranas celulares. Estes consistem em cadeias que contêm elementos como o carbono (C), o hidrogénio (H) e o oxigénio (O), apresentando um grupo carboxilo na extremidade (- COOH) (Zurier, 1991). Os ácidos gordos são a unidade estrutural das gorduras, formando e caracterizando os triacilgliceróis. Segundo o comprimento da cadeia hidrocarbonada, os ácidos gordos podem ser classificados em ácidos gordos de cadeia curta (4 a 6 átomos de carbono), de cadeia média (8 a 10 átomos de carbono), de cadeia longa (12 a 22 átomos de carbono) e de cadeia muito longa (22 ou mais átomos de carbono) (Breda, 2003). A dimensão da cadeia de átomos de carbono determina, em muitas instâncias, as propriedades químicas, físicas e metabólicas do ácido gordo. Quando as cadeias apresentam todos os átomos de carbono ligados a átomos de hidrogénio, não apresentando qualquer ligação dupla entre os átomos de carbono, são designados por

ácidos gordos saturados (SFA). Por outro lado, quando a cadeia apresenta uma dupla ligação os ácidos gordos são designados de monoinsaturados (MUFA), ao passo que a designação de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) refere-se aos que têm mais do que uma ligação dupla ao longo da cadeia (Breda,2003). Quando os FA apresentam ligações duplas, estas apresentam usualmente a configuração *cis* e quando existe mais do que uma insaturação, regra geral encontram-se separadas por um grupo metileno (isto é, não conjugadas). Os FA com ligações duplas *trans* podem ser ocasionalmente encontrados na natureza, mas surgem, sobretudo, em resultado do processamento dos alimentos. De uma forma geral, os lípidos são importantes para a saúde pois exercem nos seres vivos funções energéticas, estruturais e hormonais. São macronutrientes de importância biológica que podem ser sintetizados no organismo pela síntese “de novo” (fontes não lipídicas) ou obtidos através da dieta.

Uma das funções do sangue é transportar os lípidos endógenos e exógenos no plasma, através de combinações de lípidos com proteínas, que proporcionam um veículo para o transporte da gordura num meio predominantemente aquoso. As albuminas são as proteínas transportadoras dos ácidos gordos não esterificados ou livres, sendo estes uma parte mínima de gordura no plasma. As lipoproteínas, complexos macromoleculares sintetizados no fígado e no intestino delgado, são outro meio de transporte. Elas são formadas por uma fração proteica e outra lipídica, esta constituída por triacilgliceróis, fosfolípidos, colesterol e ésteres de colesterol. As lipoproteínas são divididas em quatro classes baseadas na relação lípido-proteína que se refletirá na sua densidade, ou seja, quanto maior a fração lipídica, menor será a fração proteica e menor a densidade, e vice-versa. Assim, as lipoproteínas podem ser: lipoproteínas de alta densidade (HDL – High Density Lipoprotein), lipoproteínas de baixa densidade (LDL – Low Density Lipoprotein), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL – Very Low Density Lipoprotein) e quilomicras.

2.1.3.1 Os lípidos e suas funções e efeitos no organismo humano

Na última década, houve por parte dos consumidores um maior interesse em relação à composição lipídica dos alimentos, como consequência da relação existente entre a dieta e a saúde, uma vez que a composição das gorduras ingeridas está diretamente relaciona-

da com o risco de doenças cardiovasculares. Frequentemente, devido a este facto, os consumidores têm associado a gordura a uma conotação negativa, considerando-a muitas vezes como insalubre (não saudável). Inicialmente foi recomendada uma redução total da gordura ingerida a fim de reduzir os potenciais efeitos adversos desta na obesidade e nas doenças cardiovasculares, contudo, recentemente, as orientações nutricionais estão a mudar no sentido da qualidade em vez da quantidade da gordura ingerida. Isto significa que as recomendações não se referem apenas às quantidades de gordura ingeridas, mas também à composição de ácidos gordos dos alimentos.

Os ácidos gordos são nutrientes fundamentais à vida, sendo utilizados pelo organismo como fonte energética (Breda, 2003). Contudo, dependendo da estrutura da sua cadeia hidrocarbonada desempenham diferentes funções e podem ter efeitos diversos no organismo. Assim, os ácidos gordos saturados (SFA) tendem a favorecer o aumento de todas as lipoproteínas, a diminuição do tamanho das quilomicras, a indução de trocas na composição de VLDL e HDL, a diminuição da síntese hepática e da atividade do recetor – LDL e apresentam também diferentes respostas colesterolémicas. O ácido láurico (ácido dodecanóico, C12:0), o ácido mirístico (ácido tetradecanóico, C14:0) e o ácido palmítico (ácido hexadecanóico, C16:0) são hipercolesterolémicos, enquanto o ácido esteárico (C18:0) e os SFA de cadeia curta (C4:0 e C6:0) são considerados neutros neste aspeto (Givens, 2005; Lee et al., 2006). Dentro dos SFA hipercolesterolémicos, o ácido C14:0 possui um efeito superior relativamente aos ácidos C12:0 e C16:0 no aumento do colesterol total e no colesterol LDL (Kris-Etherton and Yu, 1997).

Outro grupo de FA cujo consumo é considerado como tendo potencialmente efeitos nefastos para a saúde humana, são os ácidos gordos *trans* (TFA), uma vez que existem estudos que demonstram que os TFA podem contribuir para o aumento de LDL e reduzir os níveis de HDL. Os isómeros *trans* também impedem a ação de enzimas de dessaturação dos ácidos gordos essenciais inibindo a biossíntese de importantes ácidos gordos, como o ácido araquidónico e o ácido docosahexaenóico (Troisi et al., 1992). Os efeitos dos SFA e dos TFA sobre os níveis de LDL são similares. No entanto, segundo alguns autores, os TFA promovem uma redução nos níveis de HDL, diferente dos SFA. Além disso, estes isómeros promovem a inibição da atividade da paraoxonase, uma

enzima que está envolvida na prevenção da oxidação lipídica e, conseqüentemente, do risco de doenças cardiovasculares (Ross et al., 2002).

Os PUFA, e principalmente os MUFA, estão relacionados com alterações do perfil lipídico sanguíneo com a redução dos níveis de colesterol LDL e aumento moderado de colesterol HDL, tendo igualmente outras atividades tais como a redução da pressão arterial, tendo como resultado global a redução do risco de doenças cardiovasculares.

Em particular, o ácido oleico, C18:1n9c (MUFA) é conhecido por ter propriedades hipocolesterolémicas, ou seja, reduz os níveis de colesterol LDL e aumenta as concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no sangue, o que conduz a um menor risco de problemas coronários (Katan et al., 1994).

Quanto aos ácidos gordos polinsaturados das famílias ómega-3 e ómega-6, aos quais estão associados inúmeros efeitos benéficos, refira-se o caso dos ácidos linolénico e linoleico, ambos indispensáveis à vida humana por não poderem ser sintetizados pelo organismo. A sua importância em humanos deve-se ao facto destes ácidos gordos intervirem em diversas funções tais como manterem em condições normais a fluidez das membranas celulares, as funções cerebrais, a transmissão de impulsos nervosos, participam na transferência de oxigénio para o plasma sanguíneo, na síntese da hemoglobina, na divisão celular, entre outras. São chamados de ácidos gordos essenciais e devem ser ingeridos obrigatoriamente na alimentação.

A família ómega-3 compreende o ácido gordo essencial alfa-linolénico (ALA, C18:3n3), do qual, por alongamento e dessaturação, são gerados no organismo outros PUFA, também da mesma família, dos quais se destacam os ácidos eicosapentanóico (EPA, C20:5n3) e docosahexaenóico (DHA, C22:6n3). O ácido docosahexaenóico (DHA) exerce uma função importante na formação, desenvolvimento e funcionamento do cérebro bem como da retina, sendo este ácido gordo predominante na maioria das membranas celulares desses órgãos. A diminuição dos níveis de DHA nos tecidos da retina foi associada, em recém-nascidos, com a anormalidade do desenvolvimento do sistema visual, e em adultos, com a diminuição da acuidade visual (Chen et al., 1996).

De uma forma geral, considera-se que os PUFA ómega-3 favorecem a diminuição do colesterol no sangue (propiciando contudo uma elevação do colesterol HDL), têm propriedades anti-trombóticas, anti-aterogénicas, anti-hipertensivas, anti-arrítmicas, anti-inflamatórias, estando por este motivo associados a um efeito protetor no aparecimento

de perturbações do ritmo cardíaco e de doenças cardiovasculares. Refira-se ainda que, epidemiologicamente, tem sido sugerido que estes compostos apresentam um efeito benéfico na prevenção de vários tipos de cancro (Curi et al., 2002).

A família de PUFA's ómega-6 compreende o ácido gordo essencial linoleico, que pode originar outros PUFA também por alongamento e dessaturação, de entre os quais se destaca o ácido araquidónico. A Figura 2 apresenta os dois ácidos gordos essenciais referidos e os PUFA que deles podem ser obtidos no organismo. Como se pode observar, todos os FA sintetizados com base no ALA pertencem à série ómega-3, ao passo que partindo-se do LA se obtêm apenas PUFA da série ómega-6, não existindo qualquer cruzamento ou interconversão entre os compostos das duas séries.

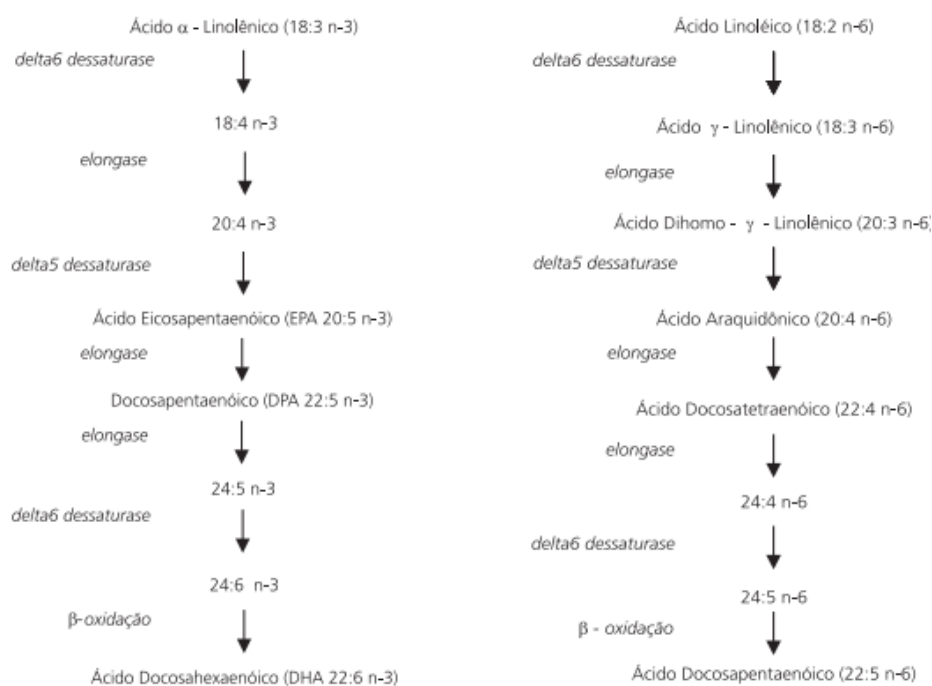


Figura 2: Metabolismo dos ácidos gordos essenciais (Leonard *et al*, 2004).

Os ácidos gordos ómega-6 têm diversas funções sendo de particular relevo o importante papel fisiológico que exercem como potentes mediadores da inflamação e um efeito benéfico sobre o sistema imune (Champe et al., 1997).

Ambas as famílias de PUFA apresentam efeitos hipocolesterolémicos e reduzem os níveis de LDL, através de modificações na composição das membranas celulares e das

lipoproteínas, além de induzirem o aumento das excreções biliar e fecal do colesterol, reduzindo a síntese de VLDL no fígado.

Refira-se ainda que estas famílias de PUFA são precursores de um conjunto de substâncias com atividades fisiológicas e farmacológicas denominadas eicosanóides, que abrangem os tromboxanos, as prostaglandinas, as prostaciclina e os leucotrienos, de diferentes séries conforme o composto que origina a formação destas substâncias e, como tal, com diferentes atividades no organismo. Os eicosanóides (lípidos bioativos derivados do metabolismo de PUFA geralmente presentes em membranas) estão associados à regulação de determinadas funções corporais, como é o caso da frequência cardíaca, pressão sanguínea, coagulação sanguínea, fertilidade e desempenham papéis importantes em vários processos biológicos, incluindo a divisão celular, cicatrização de feridas e respostas imune, através da regulação da inflamação e estímulo do organismo a combater infecções (Bagga et al., 2003; Jones, 2002; Vanek et al., 2007). Alguns autores têm referido que o equilíbrio entre a produção de prostaglandinas e tromboxanos inibe o aparecimento de doenças cardiovasculares (Turatii et al., 2002). Contrariamente aos eicosanóides obtidos a partir do EPA, os obtidos a partir do ácido araquidónico (AA, *C20:4n6*) são tendencialmente pró-trombóticos, pró-inflamatórios e vasoconstritores (Dobson, 2002). Segundo alguns autores, o consumo excessivo de ácidos gordos ómega-6 poderá conduzir à predominância de AA nas membranas celulares, potenciando uma maior formação dos eicosanóides sintetizados com base neste composto, o que poderá estar relacionado com algumas doenças imunitárias, inflamatórias, cardiovasculares e até mesmo cancro (Okuyama et al., 1997; Volker e Garg, 2000).

Por último, para além dos SFA, PUFA e MUFA, refira-se também a existência de um outro grupo de particular interesse que são os isómeros do ácido linoleico conjugado (CLA). Estes têm vindo a ser estudados quanto ao seu efeito na redução da adiposidade e da sensibilidade em relação à insulina humana, controlam a função imunológica e, segundo alguns autores poderão potencialmente ser utilizados como marcadores de patologias tais como aterosclerose, diabetes e risco de obesidade (Brown et al., 2005).

2.1.3.2 Ácidos gordos e saúde humana

De uma maneira geral, como referido anteriormente, os ácidos gordos essenciais estão relacionados com efeitos benéficos para a saúde humana exercendo funções relacionadas com os sistemas cardiovascular, reprodutivo, imunológico e nervoso, sendo importantes para o bom crescimento das crianças, particularmente para o desenvolvimento neuronal e maturação dos sistemas sensoriais. Desta forma, tem sido sugerido que a ingestão de forma controlada de ácidos gordos ómega-3 e ómega-6 pode conduzir a melhorias em indivíduos com determinadas patologias.

No tipo de doenças de cariz inflamatório o consumo de ácidos gordos ómega-3 pode diminuir e modular a atividade inflamatória enquanto os ácidos gordos ómega-6 têm efeito oposto, tendendo a aumentar a inflamação (Belluzzi et al., 2000; Nagakura et al., 2000; Oddy et al., 2005; Schwartz, 2000; Volker e Garg, 2000; Mickleborough et al., 2004). Desta forma, uma medida preventiva de doenças deste cariz, como a artrite, poderá residir no consumo de suplementos dietéticos de óleo de peixe ricos em ácidos gordos polinsaturados (Bagga et al., 2003). Em doenças de pele também caracterizadas por inflamação, tais como a psoríase e o eczema, o ácido eicosapentaenóico (EPA) pode funcionar como uma solução terapêutica bem como a administração intravenosa de ácidos gordos ómega-3. Em pacientes vítimas de queimaduras, os ácidos gordos essenciais têm sido referidos como sendo capazes de reduzir a inflamação e promover a cicatrização da pele, sendo ainda considerados úteis em casos de fotodermatite (Alexander et al., 1986; Mayser et al., 2002). Também a ingestão de ácidos gordos ómega-3 em doentes com Osteoporose poderá ser benéfica para a saúde óssea pois estes apresentam um efeito protetor sobre o metabolismo ósseo, ajudando a aumentar os níveis de cálcio no organismo, propiciando o depósito de cálcio nos ossos e melhorando assim a resistência óssea (Griel et al., 2007; Vanek et al., 2007).

A ingestão de ácidos gordos ómega-3, presente tanto nos alimentos como em forma de suplementos contendo DHA e EPA, fazem aumentar o “bom” colesterol (HDL) promovendo a diminuição dos triglicéridos e da pressão arterial (Calabresi et al., 2004), estando igualmente associados a uma maior proteção contra derrames provocados pela formação de coágulos sanguíneos nas artérias que levam ao cérebro (Martirosyan et al., 2007). De facto, já desde há vários anos atrás tem sido sugerido que as dietas ricas em

ácido α -linolénico diminuem a probabilidade de ocorrer um ataque cardíaco fatal (Simpson et al., 1982). Atualmente continua a ser preconizada a ingestão de ácidos gordos essenciais em vez de gorduras saturadas e *trans*, uma vez que estes contribuem para a redução de fatores de risco de doenças cardiovasculares (DCV), tais como colesterol elevado e pressão sanguínea elevada (Martirosyan et al., 2007). Adicionalmente, são várias as propriedades benéficas já referidas para os FA ómega-3 a nível deste tipo de patologias, tais como propriedades hipolipidémicas, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, anti-trombóticas e anti-arrítmicas (Dobson, 2002; Seppänen-Laakso et al., 2002). A nível do sistema nervoso, é conhecido que os ácidos gordos ómega-3 desempenham um papel fundamental no seu desenvolvimento e funções, sendo componentes importantes das membranas das células nervosas e permitindo a ocorrência de uma salutar comunicação entre estas. Devido ao facto dos ácidos gordos influenciarem as propriedades biofísicas das membranas neuronais, a ingestão equilibrada de ácidos gordos ómega-3 e ácidos gordos ómega-6 tem sido preconizada em doenças do sistema nervoso central, como depressão e esquizofrenia, podendo contribuir para a redução e/ou prevenção dos sintomas de depressão. Para além disso, tem sido descrito que os ómega-3 melhoram e estabilizam o estado de pacientes com desordem bipolar, havendo igualmente evidências preliminares que sugerem que pessoas com esquizofrenia e outros transtornos psiquiátricos notam uma melhoria dos sintomas quando lhes são administrados esses ácidos gordos (Laugharne et al., 1996; Emsley et al., 2003; Sagduyu et al., 2005; Tiemeier et al., 2003). Por último, foi igualmente descrito que a suplementação com ácidos gordos ómega-6, sob a forma de ácido gama-linolénico, por parte de indivíduos diabéticos, pode ajudar na função nervosa e na prevenção de doenças do foro nervoso (Brown et al., 2005).

No que respeita casos de cancro, também o consumo elevado de alimentos ricos em ácidos gordos ómega-3 tem sido referido como podendo reduzir o risco de cancro colo rectal, cancro da mama e cancro da próstata (Maillard et al., 2002; Kuriki et al., 2006; Shannon et al., 2007). Segundo Kuriki e colaboradores (2006), tem sido sugerido que o risco de cancro colo rectal pode ser reduzido pelo consumo de peixe rico em PUFAs ómega-3, tal como o DHA, através da inibição da cascata do ácido araquidónico relacionada com processos de proliferação celular.

Por último, refira-se que o consumo de ácidos gordos ómega-3 e ingestão de elevadas quantidades de peixe é muito importante em algumas doenças oculares como a degeneração macular pois o seu consumo pode reduzir e proteger o risco de desenvolver esta patologia ou melhorar a acuidade visual. A degeneração macular afeta pessoas com mais de 65 anos de idade, podendo levar à cegueira e como o tratamento não “restaura” a visão, este apenas vai prevenindo a progressão da doença. Além disso, o ácido docosahexaenóico (DHA) aumenta a sobrevivência dos fotorreceptores em degenerações da retina e é importante para o funcionamento normal da mesma. Os ácidos gordos essenciais podem também ser benéficos em patologias de “olho seco”, tais como a síndrome de Sjögren, em que a inflamação é um dos principais mecanismos comuns a todas as formas desta patologia. É, ainda, de salientar que os ácidos gordos ómega-6 aumentam o nível de prostaglandinas dos pacientes com este tipo de síndrome, melhorando os sinais da superfície ocular e sintomas de desconforto ocular (Aragona et al., 2005).

2.1.3.3 Perfil de ácidos gordos em amostras sanguíneas como biomarcadores de patologias

Em estudos clínicos e epidemiológicos, a avaliação da ingestão alimentar de nutrientes é geralmente realizada por meio de métodos de inquéritos alimentares, como os questionários de frequência alimentar e registos alimentares. Neste tipo de estudos, é igualmente importante a utilização de ácidos gordos como marcadores biológicos do consumo de gorduras, com especial ênfase para os FA essenciais pois estes não são sintetizados pelos seres humanos e, sobretudo, por terem um papel fundamental na saúde. Nesse sentido, os ácidos gordos essenciais em especial os ómega-3, tanto no tecido adiposo como em lípidos têm sido estudados em diversos trabalhos. Em indivíduos saudáveis, Tjonneland et al. (1993) observaram uma correlação positiva entre os ácidos gordos essenciais do tecido adiposo e os da dieta, especialmente quando esta foi avaliada por intermédio de registo alimentar com a pesagem de alimentos. Andersen et al. (1999) num estudo em que avaliaram indivíduos saudáveis, observaram uma fraca correlação entre o questionário de frequência alimentar e os ácidos gordos linoleico, α -linolénico, EPA e DHA, tanto no tecido adiposo como nos lípidos totais. Neste estudo, o EPA e o DHA apresentaram valores superiores de correlação quando comparados aos ácidos

linoleico e α -linolénico, provavelmente devido ao facto de os primeiros não estarem sujeitos a processos metabólicos como dessaturação, alongação, esterificação e oxidação, como ocorre com seus precursores.

Um estudo holandês, realizado com indivíduos obesos com diabetes *mellitus* tipo 2, também demonstrou a existência de correlação positiva entre o conteúdo de EPA e DHA no tecido adiposo e os seus conteúdos na dieta (Santos *et al*, 2006).

De acordo com Sun *et al.* (2007) os FA presentes nos eritrócitos comparativamente aos presentes no plasma poderão apresentar uma capacidade superior de refletir a longo termo a ingestão de ácidos gordos na dieta. Para comprovar esta hipótese, a composição percentual de FA do plasma e de eritrócitos foi avaliada em 306 mulheres com idades compreendidas entre 43 e 69 anos, sendo a ingestão de FA da dieta avaliada por meio de um questionário de frequência alimentar. Os autores concluíram que o DHA foi o FA que apresentou uma correlação mais elevada entre a dieta e a presença nas matrizes biológicas analisadas, sendo que esta foi mais elevada quando considerada a composição de DHA dos eritrócitos comparativamente ao plasma. De igual forma, os autores constataram a existência de uma correlação superior entre os ácidos gordos *trans* da dieta e dos eritrócitos comparativamente ao plasma. O perfil de ácidos gordos presentes no plasma, eritrócitos e dieta do referido estudo (Sun *et al.*, 2007) apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2: Percentagem de ácidos gordos presentes no plasma, eritrócitos e dieta de 306 mulheres com idades compreendidas entre 43 e 69 anos (adaptado de Sun *et al.*, 2007).

Fatty acid	Plasma	Erythrocytes	Diet	
			Total fat	Total energy
	% of total fatty acids		%	
Saturated fatty acids				
12:0	0.02 ± 0.03	0.002 ± 0.01	0.67 ± 0.45	0.21 ± 0.15
14:0	0.58 ± 0.28	0.19 ± 0.10	3.98 ± 1.37	1.27 ± 0.56
16:0	19.31 ± 2.41	18.65 ± 1.86	21.60 ± 2.58	6.87 ± 1.78
18:0	7.29 ± 0.78	13.14 ± 1.00	7.88 ± 1.56	2.53 ± 0.84
Total	28.71 ± 2.38	34.37 ± 1.60	33.74 ± 4.48	10.75 ± 2.87
Monounsaturated fatty acids				
16:1n-7	1.94 ± 0.84	0.49 ± 0.26	1.94 ± 0.43	0.62 ± 0.20
18:1n-9	18.60 ± 2.43	13.26 ± 1.17	29.21 ± 3.08	9.29 ± 2.31
20:1n-12	0.02 ± 0.01	0.003 ± 0.01	0.29 ± 0.15	0.09 ± 0.05
Total	22.86 ± 3.01	18.64 ± 1.24	38.33 ± 2.70	12.18 ± 2.76
Polyunsaturated fatty acids				
n-3				
18:3n-3	0.50 ± 0.15	0.18 ± 0.05	1.66 ± 0.54	0.52 ± 0.18
20:5n-3 ²	0.49 ± 0.21	1.15 ± 0.91	0.12 ± 0.11	0.04 ± 0.03
22:5n-3	0.44 ± 0.09	1.85 ± 0.28	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.01
22:6n-3	1.56 ± 0.60	3.71 ± 1.09	0.29 ± 0.22	0.08 ± 0.06
Total ²	2.94 ± 0.75	7.06 ± 1.90	2.11 ± 0.69	0.65 ± 0.20
n-6				
18:2n-6	30.58 ± 4.33	13.66 ± 1.80	16.54 ± 4.20	5.21 ± 1.64
20:4n-6	7.80 ± 1.62	14.63 ± 1.29	0.23 ± 0.09	0.07 ± 0.03
Total	41.16 ± 4.60	33.91 ± 1.79	16.79 ± 4.21	5.29 ± 1.64
Total polyunsaturated fatty acids	44.87 ± 4.81	43.48 ± 1.77	19.03 ± 4.12	5.97 ± 1.55
trans Fatty acids³				
<i>t</i> -16:1n-7	0.15 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.26 ± 0.06	0.08 ± 0.03
Total 18:1 <i>trans</i> isomers	1.10 ± 0.51	1.16 ± 0.35	3.71 ± 1.27	1.18 ± 0.47
9 <i>t</i> ,12 <i>t</i> -18:2n-6	0.26 ± 0.10	0.12 ± 0.05	0.25 ± 0.08	0.08 ± 0.03
9 <i>c</i> ,12 <i>t</i> -18:2n-6	0.28 ± 0.07	0.14 ± 0.04	0.45 ± 0.18	0.14 ± 0.06
Total 18:2 <i>trans</i> isomers	0.72 ± 0.24	0.36 ± 0.10	0.69 ± 0.23	0.22 ± 0.09
Total <i>trans</i> fatty acids	1.98 ± 0.71	1.65 ± 0.43	4.67 ± 1.42	1.48 ± 0.54

Como referido, o consumo de determinados ácidos gordos tem sido associado ao desenvolvimento de doenças crónicas, tais como diabetes, cancro e doenças cardiovasculares. Assim, com o objetivo de relacionar o perfil de ácidos gordos com determinadas patologias vários são os estudos já realizados nos quais se avalia a possibilidade de utilização do perfil/composição de ácidos gordos como biomarcadores de patologias, tais como asma (Broadfield et al., 2004), doenças cardiovasculares (Dai et al., 2014, Shearer et al., 2009), diabetes (Yu et al., 2012) e doenças renais (Oh et al., 2012).

Para tal, a análise da composição de FA tem sido sobretudo realizada em matrizes tais como eritrócitos, plaquetas, tecido adiposo, lípidos totais do plasma e em frações lipídicas (ésteres de colesterol, triglicédeos e fosfolípidos) do plasma.

2.2 Técnicas utilizadas na análise de lípidos

As metodologias mais comumente utilizadas para a análise de lípidos com a finalidade de avaliar a composição em ácidos gordos, dividem-se basicamente em duas grandes etapas, sendo a primeira a extração e derivatização dos lípidos da amostra e a segunda que engloba a separação, identificação e quantificação dos ácidos gordos. A separação e a identificação podem ser realizadas através de cromatografia líquida ou cromatografia gasosa acopladas a detetores adequados.

Uma das maiores dificuldades na análise de AG reside principalmente na etapa da extração, podendo levar assim a resultados que não representem a realidade. Durante a extração lipídica são alguns os fatores que devem ser considerados, entre eles, a facilidade de execução, o baixo custo operacional e a rapidez com que a mesma é executada. Adicionalmente, as amostras devem ser preparadas e analisadas cuidadosamente para evitar a oxidação e degradação dos lípidos por hidrólise, pois a produção de artefactos pode comprometer a identificação e a quantificação dos componentes da fração lipídica. Os métodos de extração lipídica por solventes são geralmente baseados em quatro etapas:

- Preparação da amostra;
- Homogeneização da amostra com o solvente;
- Separação das fases;
- Remoção dos solventes;

A preparação da amostra depende da sua natureza, por exemplo, no caso do plasma humano é feita a centrifugação para isolá-lo do sangue. A etapa seguinte, que passa pela escolha do solvente utilizado, depende do(s) composto(s) que se pretende extrair, isto porque, para a extração de lípidos de uma forma global é necessário a utilização de um solvente com características mais polares, de modo a extrair os fosfolípidos e os ácidos gordos livres, e outro com características apolares de forma a extrair os triacilgliceróis (TAG). A mistura de solventes, isto porque os TAG apresentam alta solubilidade em clorofórmio e os lípidos polares em metanol. No entanto, esta mistura extrai grandes quantidades de compostos não lipídicos e é considerada como sendo de elevada toxicidade. Outra etapa importante na extração lipídica é a separação das fases que pode ser instantânea ou ser morosa afetando o tempo final de análise. Além disso, sistemas em que a fase orgânica, que contém os lípidos, se encontra na parte superior são mais convenientes e menos sujeitos a contaminações por substâncias não-lipídicas presentes na fase aquosa. Os métodos clássicos para extração de lípidos em amostras biológicas foram propostos por Folch (1957) e Bligh e Dyer (1959) ambos utilizando como solventes extratores clorofórmio/metanol na proporção 2:1. Outros métodos de extração muito utilizados são o método de Rose-Gottlieb, o qual é realizado em meio alcalino (hidróxido de amónio) e o de Gerber que envolve a extração em meio ácido (ácido sulfúrico). Estes utilizam ácido ou uma mistura de álcool e base para desfazer a interação entre a proteína e os lípidos nas lipoproteínas, facilitando assim a remoção dos lípidos totais, contudo, apesar de Rose-Gottlieb também ser usado na extração de lípidos do plasma, estes métodos são principalmente aconselhados para a extração de ácidos gordos de leite e dos seus derivados (Campbell-Platt, 2009; Richmond, 1927).

Depois da etapa de extração, caso a análise decorra por cromatografia gasosa, seguidamente é necessário proceder à derivatização dos FA em ácidos gordos metilesterificados (FAMES) de forma a obter compostos volatilizáveis e ser possível a sua separação e identificação por este tipo de cromatografia. A principal razão para se analisar FAMES e não ácidos gordos na sua forma livre, isto é, não derivatizados, reside no facto de que estes últimos podem ser compostos altamente polares podendo tender a formar pontes de hidrogénio levando a problemas de adsorção. Desta forma, a sua conversão a FAMES permite reduzir a sua polaridade, tornando-se mais fácil a sua análise (Sigma-Aldrich, 2014). Aquando da derivatização é importante usar reagentes de alta qualidade para

garantir que nenhum artefacto está presente durante a análise. Além disso o reagente de derivatização deve apresentar baixa humidade, caso contrário a reação de derivatização dos FA em FAMES será prejudicada pela presença da água (Sigma-Aldrich, 2014).

2.2.1 Cromatografia

O termo cromatografia é atribuído ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett que, empregou a técnica para a separação de pigmentos presentes em folhas de plantas, através da passagem de extratos de folhas, arrastados por éter de petróleo, através de leitos de carbonato de cálcio finamente dividido. As espécies separadas (clorofilas e xantofilas) apareciam nos leitos como bandas coloridas, e por isso Tswett chamou o método de cromatografia, junção de duas palavras de origem grega *Kroma* [cor] + *Graph* [escrever].

Em 1993, a IUPAC definiu cromatografia da seguinte forma: “cromatografia é o método físico de separação no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma das quais estacionária, enquanto a outra se movimenta numa direção definida”.

A cromatografia gasosa é a técnica mais utilizada para analisar ácidos gordos, apresentando diversas vantagens devido à possibilidade de acoplar detetores muito eficientes na saída de uma coluna cromatográfica de um cromatógrafo, ao progresso da computação, à introdução de colunas capilares, à redução de problemas de interferências e até mesmo ao facto da aquisição deste tipo de equipamento se ter tornado economicamente mais acessível ao longo dos últimos anos.

A cromatografia em fase gasosa é uma forma particular de separação dentro do processo geral de cromatografia. Neste tipo de separação, a fase móvel é um gás inerte (transportador ou de arraste) e a fase estacionária consiste num líquido de elevado peso molecular e que se encontra depositado à superfície de partículas finamente divididas (colunas de empacotamento) ou sobre as paredes de um longo tubo fino aberto (colunas tubulares abertas ou colunas capilares) (Neves et al.,1996):

Como já referido a cromatografia gasosa é utilizada somente na análise de gases e substâncias voláteis que sejam termicamente estáveis. Compostos que não apresentem estas

características, como o caso de substâncias de alta massa molar ou contendo grupos funcionais fortemente polares, podem ser transformados através de reações específicas em derivados volatilizáveis. A identificação dos compostos separados por esta técnica é mais comumente feita por comparação dos tempos de retenção com soluções padrão. Já a quantificação pode ser feita através de normalização, normalização com área corrigida, padronização externa e padronização interna. Para que seja possível a realização desta técnica é necessário todo um conjunto de componentes fundamentais que constituem um cromatógrafo gás-liquido. Assim, o conjunto instrumental (Figura 3) é constituído pelos seguintes elementos (Neves et al.,1996):

- 1- Um sistema fornecedor de gás de arrastamento acoplado a um sistema de controlo regulador de fluxo gasoso;
- 2- Um sistema de injeção de baixo volume capaz de permitir a introdução da amostra de uma forma reprodutível e representativa da sua composição real;
- 3- Um forno utilizável a temperatura constante ou a temperatura programada linearmente;
- 4- Um detetor sensível de baixo volume adequado a cromatografia de alta velocidade e análise de traços;
- 5- Um registor de tempo curto ou um sistema de dados com velocidades analógico-digitais elevadas para um registo preciso.

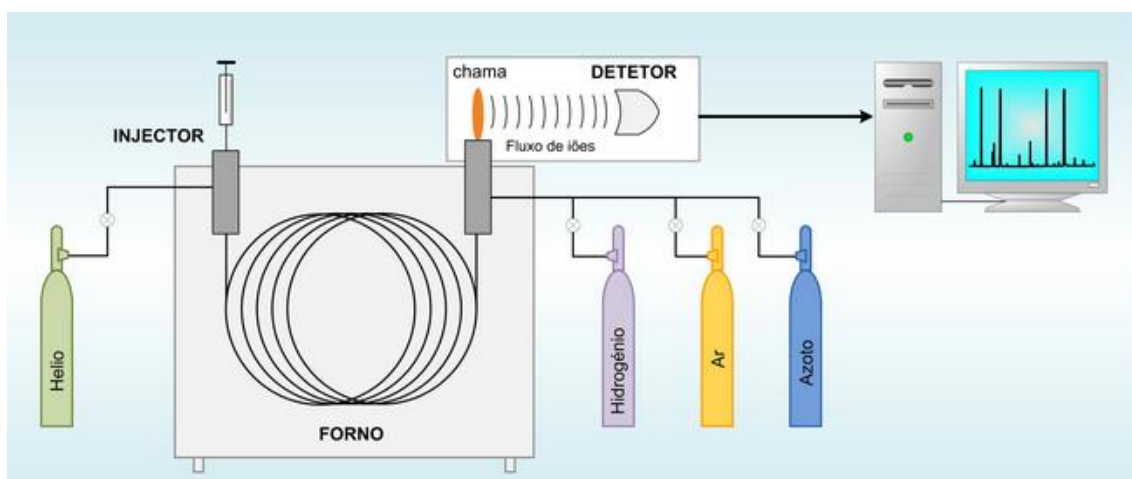


Figura 3: Exemplo de constituição de um cromatógrafo gasoso (adaptado de Lípidos em Ciência Animal).

Para que se possa proceder ao mecanismo de separação é necessário que a amostra seja injetada no injetor para ser depois arrastada pela fase móvel através da coluna que contém a fase estacionária. Devido à interação existente entre os componentes da amostra e a fase estacionária (coluna) ocorre a separação destes. Após a separação as substâncias saem da coluna dissolvidas na fase móvel e passam por um detetor. No caso do detetor utilizado neste trabalho, detetor de ionização em chama (FID), os compostos irão sofrer pirólise à temperatura da chama de ar, pela acção do hidrogénio, produzindo iões e electrões que conduzem eletricidade através da chama (Neves et al.,1996).

Muitos podem ser os tipos de detetores acoplado a um cromatógrafo gasoso, sendo o detetor FID (Figura 4) possivelmente o mais conhecido e utilizado em cromatografia gasosa. A sua utilização generalizada deve-se à sua elevada sensibilidade aos compostos carbonados, ao seu elevado intervalo de linearidade (10^7), excelente estabilidade de linha de base e constante de tempo de resposta muito rápida. Além disso, como acontece em temperatura programada é relativamente insensível a pequenas variações de fluxo de gás da coluna, é extremamente fiável e de fácil utilização. Contudo este tipo de detetores também apresenta algumas limitações. Por exemplo, a sua resposta é nula ou muito baixa a compostos como o CO , CO_2 , H_2O , O_2 , NH_3 , N_2O , SiF_4 , SiCl_4 , N_2O_3 , entre outros. O detetor FID é destrutivo e a sua resposta é fortemente dependente da estrutura dos compostos detetados sendo esta diminuída com a presença de oxigénio ou enxofre na molécula. Um problema que pode originar instabilidade no detetor é a presença de solventes clorados incompletamente queimados, contudo este problema pode ser minimizado pelo uso de uma chama mais quente e menos rica em hidrogénio (Neves et al.,1996).

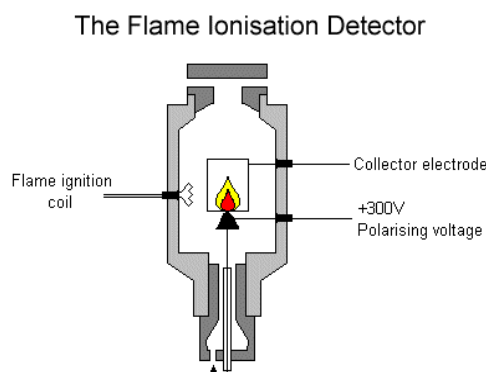


Figura 4: Exemplo de funcionamento de um detetor FID (Adaptado de Gas Chromatography).

2.3 Validação de métodos

O processo de validação possibilita uma avaliação da eficiência de um processo analítico, daí que deva ser sempre realizado aquando da proposta de uma nova metodologia de análise. A validação garante que um método analítico oferece informações confiáveis, interpretáveis e reproduzíveis sobre uma amostra, contudo o seu conceito é amplamente diversificado na literatura e por este motivo os parâmetros num processo de validação são ainda motivo de discussão pelos órgãos reguladores. Contudo, geralmente os parâmetros avaliados num processo de validação são a especificidade e seletividade, gama de linearidade/curva de calibração, precisão (repetibilidade), reprodutibilidade, exatidão, limite de deteção e limite de quantificação.

2.3.1 Seletividade e Especificidade

Ambos estes parâmetros estão relacionados com o processo de deteção do método. A seletividade é a capacidade de distinção entre um analito e outro, ou interferentes da matriz, quando um método gera respostas para vários compostos. Este é um parâmetro avaliado qualitativamente.

A especificidade é verificada quando o método gera respostas para apenas uma amostra/analito pretendido.

De modo a evitar confusão entre estes dois conceitos a IUPAC recomenda que se utilize o termo seletividade, uma vez que poucos são os métodos cromatográficos que respondem a apenas um analito.

2.3.2 Linearidade e curva de calibração

O conceito de linearidade está relacionado com a capacidade de um método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração de uma amostra num determinado intervalo de concentrações. Com isto torna-se necessário o uso de soluções padrão dos analitos a serem avaliados, pois na prática a linearidade é verificada através da curva de

calibração. Através desta curva é gerado um gráfico, representado por uma reta, que relaciona a resposta do equipamento com as várias concentrações da amostra em estudo. A curva de calibração pode ser descrita pela equação $y=ax+b$, onde y representa a variável dependente; a é o coeficiente angular da reta; x é a variável independente e b representa o coeficiente linear da reta de calibração. O coeficiente de correlação, r^2 , é outro parâmetro utilizado para verificar a linearidade de uma curva, sendo que valores acima de 0,98 são geralmente considerados satisfatórios (Silva et al., 2011).

2.3.3 Precisão

Define-se precisão de um procedimento analítico como sendo a concordância entre vários resultados entre uma série de medições obtidas de uma mesma amostra. Tanto a precisão como a exatidão de um processo analítico são considerados importantes no processo de validação pois permitem estimar erros e variações associados a um determinado método.

Normalmente a precisão é numericamente estimada através do desvio padrão (DP) ou do coeficiente de correlação (CV).

O CV pode ser calculado pela equação 1 abaixo apresentada:

$$CV = \frac{DP}{M} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde,

DP corresponde ao desvio padrão das amostras e M corresponde à média das amostras.

Segundo o International Conference for Harmonization (ICH), a precisão pode ser considerada a três níveis (Huber, 2010):

- **Repetibilidade:** expressa a precisão da mesma operação, sob as mesmas condições, durante um curto período de tempo (mesmo operador e o mesmo equipamento).
- **Precisão intermediária:** concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

• **Reprodutibilidade:** concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica.

2.3.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico diz respeito à proximidade de resultados encontrados em relação ao valor verdadeiro. É importante observar que o valor verdadeiro é uma medida obtida num processo perfeito, sendo que este valor é então impossível de se obter, considerando-se então como valor verdadeiro aquele estimado e convencionalmente aceite como o verdadeiro.

A exatidão pode ser calculada pela equação 2 abaixo apresentada:

$$Exatidão = \frac{Concentração\ Média\ Experimental}{Concentração\ Teórica} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

A metodologia normalmente utilizada para avaliar a exatidão de um método pode envolver (Huber, 2010):

- (i) A comparação dos resultados obtidos com os resultados obtidos com um método de referência (neste caso assume-se que a incerteza do método de referência é conhecida);
- (ii) A utilização de uma amostra de referência cuja concentração é conhecida;
- (iii) A utilização do método da adição de padrão, na qual se realizam de ensaios de recuperação.

2.3.5 Limite de detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção pode ser definido como a quantidade mínima de uma amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada como valor exato.

Este parâmetro pode ser determinado por várias metodologias:

•**Baseado na avaliação visual:** O limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas, estabelecendo o nível mínimo em que a amostra pode ser detectada de forma confiável

•**Baseado no estudo de sinal-ruído:** É aplicada para procedimentos analíticos que exibem linha de base, sendo determinada a razão sinal-ruído a partir da comparação de medidas de amostras com baixas concentrações com um branco. A razão sinal-ruído entre 3:1 ou 2:1 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção.

•**Baseado no desvio padrão com base na inclinação da curva analítica:** A curva de calibração específica é utilizada usando amostras que contenham concentrações na faixa do limite de detecção. Este pode ser determinado pela equação 3 de seguida apresentada:

$$LOD = \frac{3,3 DP_a}{IC} \quad \text{Equação 3}$$

Onde,

LOD- Limite de detecção, DP_a- Desvio padrão da interseção com o eixo y (coeficiente linear) no mínimo de 3 curvas e IC- inclinação da curva de calibração (coeficiente angular)

Em cromatografia, o limite de detecção é a quantidade injetada que resulta num pico com uma altura de, pelo menos, duas ou três vezes maior do que o ruído da linha de base.

O Limite de Quantificação pode ser definido como sendo a menor concentração da amostra que pode ser determinável com um nível aceitável de exatidão e precisão. Este parâmetro pode ser determinado por:

•**Baseado na avaliação visual:** O limite de quantificação é geralmente determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas por estabelecendo um nível mínimo em todas podem ser quantificadas com precisão e exatidão aceitáveis.

•**Baseado no estudo de sinal-ruído:** É aplicada para procedimentos analíticos que exibem linha de base, é determinado comparando sinais medidos a partir de amostras com baixas concentrações e amostras em branco. Uma relação típica de sinal-ruído é de 10:1.

•**Baseado no desvio padrão com base na inclinação da curva analítica:** Este parâmetro pode ser determinado pela equação 4 de seguida apresentada.

$$LOQ = \frac{10 DPa}{IC} \quad \text{Equação 4}$$

Onde,

LOQ- Limite de Quantificação, DPa- Desvio padrão da interseção com o eixo y (coeficiente linear) no mínimo de 3 curvas e IC- inclinação da curva de calibração (coeficiente angular) (Food and Drug Administration, 1998).

Para que seja possível validar o método é necessário que estes parâmetros sejam respeitados.

Capítulo 3

Parte Experimental

3.1 Material e métodos

3.1.1 Amostras

As amostras de sangue venoso utilizadas ao longo deste trabalho foram recolhidas de uma doadora do sexo feminino, saudável, com idade entre os 25-30 anos. As amostras foram recolhidas em tubos BD-Vacutainers de 10 mL. Após a recolha do sangue, este foi submetido a um processo de lavagem com soro fisiológico (Solução salina fisiológica (PSS) contendo NaCl a 0,9%) através de centrifugação a 2500 rpm, durante 10 minutos a 4°C, para que seja possível retirar plasma e outras substâncias presentes neste. Após este processo e obtidos os glóbulos vermelhos (RBC), a amostra foi dividida em alíquotas de 500 µL e colocada em eppendorfs, tendo-se adicionado BHT (butil-hidroxitolueno) como antioxidante a uma concentração final de 90 µM para que os RBC sejam preservados. Os eppendorfs foram devidamente identificados e congelados a uma temperatura de cerca de -20°C até as amostras serem analisadas.

3.1.2 Reagentes e padrões

O Butil-hidroxitolueno (BHT), o Hidróxido de potássio, o Sulfato de magnésio e o Diclorometano foram adquiridos à Sigma-Aldrich Chemical Co., o Cloreto de sódio e o Metanol foram adquiridos à AnalaR Normapur, o triflureto de boro (solução de BF₃ em metanol a 14%) foi adquirido Merck Schuchardt e o *n*-Heptano, com pureza adequada para GC, foi comprado à Chromanorm Co. Para identificação dos compostos e constru-

ção de curvas de calibração utilizou-se uma mistura de 37 FAME puros (material de referência certificado CRM47885) da Supelco. Durante este trabalho utilizou-se ainda como padrão interno o ácido nonadecanóico (C19:0 FA) e o éster metílico do ácido nonadecanóico (C19:0 FAME), ambos da Supelco.

Todos os reagentes foram guardados segundo indicação do fabricante até ao momento da sua utilização.

3.1.3 Processo extrativo

3.1.3.1 Preparação da amostra usando o método de Folch (método tradicional)

A extração de ácidos gordos pelo método clássico foi feita recorrendo ao tradicional método de Folch com ligeiras modificações no protocolo (Folch et al., 1957). De um modo geral, 150 μL de hemácias foram lisadas com 300 μL de água desionizada. Esta mistura foi centrifugada a 14000 rpm durante 2 minutos e de seguida adicionou-se 1000 μL de solução DCM: Metanol (2:1, v/v), 25 μL de padrão interno C19:0 (1mg/mL em DCM, 100 μL de solução BHT em metanol (1 μM) e 375 μL de MeOH. Esta mistura foi vigorosamente agitada durante 30 segundos, seguida de centrifugação a 14000 rpm durante 2 minutos para separação de fases. Seguidamente, retirou-se da camada inferior, contendo DCM-MeOH, uma quantidade de 800 μL a qual foi transferida para um vial de vidro de 4ml e submetida a evaporação em corrente de azoto à temperatura ambiente. Após a secura completa, adicionou-se no mesmo vial 2 mL de BF_3 e levou-se à estufa a 90°C durante 30 minutos, para que ocorra a metilação dos ácidos gordos originando a formação de ácidos gordos metilesterificados (FAMES).

De seguida a amostra foi arrefecida e adicionou-se 1mL de *n*-Heptano e 200 μL de solução aquosa saturada de NaCl de modo a provocar o *salting-out* dos FAMES para a camada superior (fase orgânica contendo *n*-heptano). Da fase superior retirou-se 700 μL para um novo vial de 4 mL tendo-se novamente levado à secura em corrente de azoto. Após secura, retomou-se a amostra em 100 μL de *n*-Heptano e estes são transferidos para um *insert*, o qual foi colocado num vial de 2 mL com septo, ficando assim a amostra pronta para a análise por GC-FID.

3.1.3.2 Preparação da amostra usando o Método Rápido

Neste método, a extração de ácidos gordos foi realizada recorrendo ao procedimento descrito por Bicalho e co-autores com algumas modificações (Bicalho et al., 2008). A extração realizou-se num vial de 4 mL, tendo-se utilizado 150 μL de hemácias às quais se adicionou 100 μL de solução BHT em metanol a 1 μM , 25 μL de padrão interno C19:0 (1mg/mL em DCM) e 2 mL de solução metanólica de BF_3 . Esta mistura foi agitada vigorosamente no vórtex por 30 segundos e o vial foi levado à estufa a 90°C por um período de 30 ou 60 minutos para ocorrer a transesterificação dos ácidos gordos.

De seguida a amostra foi arrefecida, adicionou-se 1 mL de *n*-heptano e vortexou-se a mistura de modo a proporcionar a mistura das duas fases e a passagem dos FAMES para o *n*-heptano. Após deixar repousar, centrifugou-se 1 minuto a 1000 rpm para melhor separação de fases. A Figura 5 apresenta os viais após este passo.

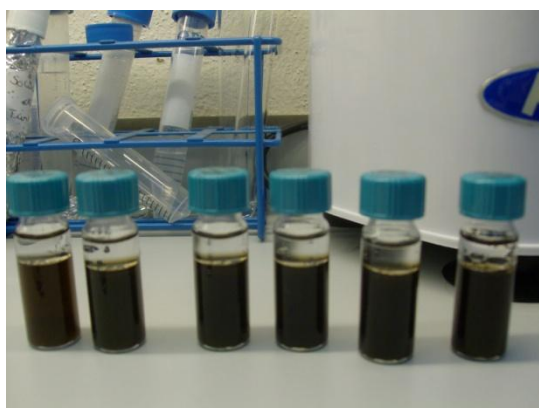


Figura 5: Separação de fases da amostra.

Da fase superior retirou-se 700 μL para um novo vial de 4mL tendo-se procedido seguidamente à re-extração da amostra, adicionando-se novamente 1 mL de *n*-heptano. Os dois sobrenadantes foram recolhidos no mesmo vial e levou-se a amostra à secua em corrente de azoto. Após evaporar o solvente, a amostra foi retomada em 100 μL de *n*-heptano. Imediatamente antes de se proceder à análise por GC-FID, transferiu-se este volume para um insert colocado num vial de 2 mL com septo.

3.1.3.3 Extração de lípidos usando Método Rápido com KOH

Neste método, a extração dos ácidos gordos realizou-se igualmente num vial de 4 mL. Para tal, adicionou-se 100 µL de solução de BHT (1 µM) a um volume de 100 µL ou 150 µL de amostra. Seguidamente adicionaram-se 25 µL de padrão interno (C19:0 a 1mg/mL) e 500 µL de solução metanólica de KOH com uma concentração de 11g/L. Após este processo, o vial foi levado ao vórtex de modo a homogeneizar a amostra e colocado na estufa a 90°C por um período de 10 minutos.

Após este período, as amostras foram retiradas da estufa e arrefecidas. Seguidamente adicionou-se 2ml de solução metanólica de BF₃ e levou-se novamente o vial à estufa a 90 °C, durante um período de 30 ou de 60 minutos. Seguidamente as amostras foram tratadas de forma similar à descrita no método anterior até serem colocadas num *insert* e serem analisadas por GC-FID.

3.1.4 Análise cromatográfica

Após preparação das amostras, estas foram analisadas num cromatógrafo gasoso (GC), Bruker® SCION 436-GC, equipado com um injetor split-splitless, um detetor de ionização em chama (FID) e um amostrador automático Bruker CP-8410. A separação de ácidos gordos foi realizada numa coluna cromatográfica de sílica CP-Sil 88 (50m x 0.25mm i.d x 0.39mm e.d., Agilent J&W).

O injetor foi colocado a 260°C, o volume de injeção foi de 1 µL de amostra, como gás de arraste foi utilizado hélio com um caudal na coluna de 1 mL/min e utilizou-se uma razão de split de 1:25. O forno foi colocado a uma temperatura inicial de 160°C, a qual foi mantida durante três minutos, após o que foi programada para aumentar a 3°C/min até atingir a temperatura final de 229 °C, a qual foi mantida durante dois minutos. A temperatura do detetor FID foi fixada em 270°C com os seguintes fluxos de gases: Ar=350mL/min, Hidrogénio=35mL/min e Azoto=30mL/min.

A recolha e tratamento dos dados cromatográficos foram efetuados utilizando o software CompassCDS 3.0 (BRUKER, Alemanha). Os picos de FAMES das amostras de sangue foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os obtidos com uma mistura de 37 FAMES da Supelco. Alguns dos picos (C18:1n7, C18:1n6, C22:4n6,

C22:5n6, *C24:2n6*, *C22:5n3*) foram ainda tentativamente identificados com base nas informações obtidas na literatura (Bicalho et al.,2008) Os resultados de cada FAME foram calculados em $\mu\text{g/mL}$ RBC. Para tal utilizou-se o FAME C19:0 como padrão interno e foram construídas curvas de calibração, com 6 pontos, para cada um dos compostos presentes na mistura Supelco 37 FAMES e para o C19:0 FAME. Os compostos tentativamente identificados com base na bibliografia foram quantificados utilizando a curva de calibração obtida para o C19:0 FAME. Todas as amostras (extratos de RBCs e soluções padrão) foram injetadas em duplicado, no mínimo.

Na Figura 6 encontra-se apresentado o sistema cromatográfico utilizado.



Figura 6: Sistema cromatográfico utilizado.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Apesar de existirem já diversos trabalhos publicados relativos à identificação da composição em ácidos gordos de amostras de sangue, a sua maioria diz respeito a frações específicas tais como plasma (Djoussé et al., 2014; Raatz et al., 2000,) ou em sangue total (Bicalho et al., 2008). Alguns trabalhos referem a determinação do perfil de FA em RBCs, contudo em muitos deles os resultados são apresentados em % relativa dos compostos (Broadfield et al., 2004; Shearer et al., 2009; Oh et al., 2012; Yu et al., 2012; Dai et al., 2014), uma vez que não utilizam um padrão interno que permita realizar a quantificação dos compostos. De referir ainda que, nos casos em que os compostos são alvo de quantificação efetiva, na maioria dos casos os autores não referem se a metodologia utilizada foi, ou não, previamente validada para a matriz em causa. Desta forma, a parte experimental deste trabalho consistiu inicialmente no desenvolvimento e otimização de uma metodologia cromatográfica que permitisse separar e identificar os compostos de interesse num tempo de análise razoável. De igual forma, pretendeu-se testar diferentes metodologias de preparação de amostra por forma a selecionar aquela que permitisse a extração de elevadas quantidades/número superior de compostos. Pretendeu-se ainda que o método fosse de fácil execução, rápido e com elevada repetibilidade. Assim, para uma mesma amostra, realizou-se a extração recorrendo a um método tradicional (método de Folch com ligeiras modificações) e a outros dois métodos, ambos mais simples e rápidos, em que num deles se incluiu uma etapa de saponificação com KOH (Hidróxido de Potássio). As extrações por cada método foram realizadas, no mínimo, em duplicado. Com base nos resultados obtidos, o método selecionado como sendo o que deu melhores resultados, foi seguidamente validado.

4.1. Otimização das condições cromatográficas

Ao longo do estudo, foram experimentadas diferentes condições cromatográficas para o sistema cromatográfico utilizado de forma a obter uma melhor resposta do sistema num curto espaço de tempo e com vista a minimizar todos os gastos. Inicialmente, a escolha da coluna foi feita com base na literatura, bem como pela empresa fornecedora do equipamento, visto ser a melhor opção para a separação e identificação de FAMES por apresentar uma fase estacionária de alta polaridade. Assim, utilizando a mistura Supelco contendo 37 FAMES, foram testados diferentes programas de temperaturas por forma a obter a melhor separação possível dos compostos num tempo de análise razoável (Figura 7). Adicionalmente, foram também testadas diferentes razões de split, utilizando uma amostra de sangue humano extraída pelo método de Folch. Após seleção das melhores condições cromatográfica, procedeu-se à otimização da metodologia de preparação da amostra.

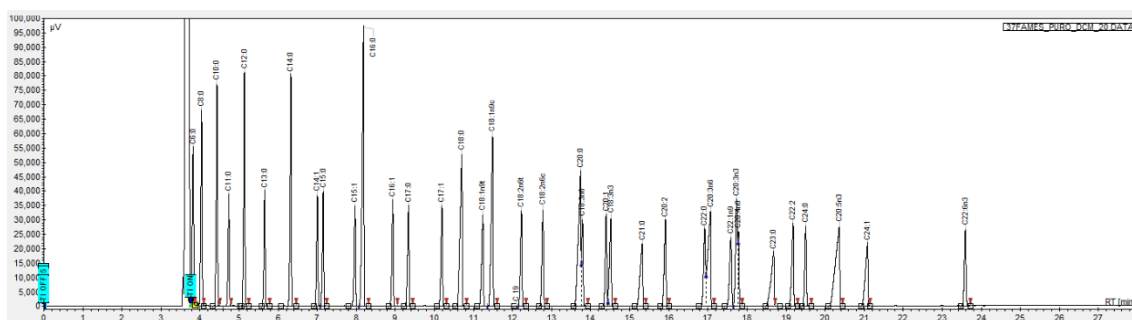


Figura 7: Cromatograma da mistura Supelco de 37 FAMES concentrada.

4.2. Otimização da preparação da amostra

A aplicação de cada método nas amostras de sangue foi feita recorrendo a ligeiras alterações de protocolos já existentes na literatura. Protocolos como o método tradicional de *Folch* e o descrito por Bicalho e colaboradores (2008) foram sucessivamente adaptados para que, a cada novo passo adicionado/testado, se conseguisse extrair e identificar o maior número possível de FA presentes na amostra em estudo.

Inicialmente, como ponto de comparação, optou-se por utilizar uma metodologia clássica de extração de FA, nomeadamente o método de Folch com ligeiras adaptações. Assim, para o método tradicional foi utilizado uma mistura DCM-metanol em vez de clorofórmio-metanol e foi-se reajustando as temperaturas de metilação bem como o tempo desta de forma a permitir estabelecer comparações entre os diferentes protocolos. Também a quantidade de *n*-Heptano utilizada para a extração dos FAMES foi sendo ajustada ao longo do trabalho, sendo que inicialmente esta era de 200 μL , tendo-se testado a adição de volumes superiores (1000 μL) e, posteriormente, a realização de re-extração da amostra. Como referido anteriormente, a análise de FA em matrizes biológica, requer geralmente um procedimento que envolve duas etapas/passos principais: extração e derivatização. Alguns autores descrevem no entanto a possibilidade de realização de ambos utilizando procedimentos com apenas um passo, referindo a sua aplicação na análise de diversas matrizes entre as quais se destacam o plasma (Lepage and Roy, 1986), matrizes alimentares e, mais recentemente, na análise de RBCs de ovelhas (Clayton et al., 2012). A principal vantagem da utilização destes procedimentos mais simplificados (“one-step” em vez de “two-steps”) reside claramente na sua maior rapidez, permitindo ainda obter aumentos a nível da precisão do método (Lepage and Roy, 1986). Desta forma, adicionalmente ao método clássico, testaram-se dois procedimentos simplificados (designados como Método Rápido), similares entre si, contudo diferindo no facto de um deles incluir uma reação de saponificação com KOH. De referir que a inclusão de uma reação de saponificação é frequentemente utilizada, sobretudo na análise de FA em matrizes alimentares (ISO, 2000; Amaral et al., 2003). A temperatura utilizada durante a reação de metilação dos FA foi selecionada com base no trabalho de Bicalho e coautores (2008). Estes autores estudaram igualmente o efeito do tempo da referida reação, tendo concluído que os resultados obtidos com 30 minutos ou 60 minutos de derivatização conduziam a resultados similares, pelo que optaram por realizar a metodologia com o menor tempo. Tendo-se optado por utilizar um catalisador diferente (BF_3) ao utilizado por Bicalho et al. (2008) (cloreto de acetilo 5% em metanol), no presente trabalho decidiu-se avaliar o efeito do fator tempo de derivatização nos resultados obtidos, tendo-se testado os tempos de 30 e 60 minutos para ambos os métodos rápidos propostos (com e sem saponificação). Refira-se que o catalisador cloreto de acetilo foi selecionado por Bicalho et al. (2008) por permitir obter um maior rendimento de

FAMEs obtidos, comparativamente à utilização de outros catalisadores ácidos. Contudo os autores referem que o aumento de área cromatográfica verificado estaria associado a uma maior eficácia da reação face a esteres de colesterol. Como este tipo de composto poderá estar presente em quantidades elevadas no sangue total (devido à sua presença em lipoproteínas), não sendo contudo tal expectável de acontecer em membranas de RBCs, optou-se pela utilização do reagente BF_3 pela sua maior conveniência de obtenção e utilização face a outros catalisadores ácidos.

Por último, refira-se que ao longo do procedimento da preparação da amostra para extração de ácidos gordos da membrana de eritrócitos foram aplicados os seguintes passos com vista à melhoria de resultados: (i) *flush* com azoto para proteger a amostra de oxidação, (ii) homogeneização vigorosa com vórtex de modo a que amostra fique devidamente uniformizada e (iii) centrifugação para garantir a deposição de substâncias presentes na amostra por forma a não interferirem com os FAMEs presentes na parte superior da amostra. Posteriormente, testou-se ainda a utilização de um passo de re-extração da amostra, por forma a permitir uma melhor recuperação de FAMEs. Avaliou-se ainda a utilização de quantidades diferentes de amostra de RBCs, nomeadamente 100 e 150 μL , tendo-se optado por utilizar o menor volume.

Os resultados obtidos para os diferentes protocolos testados (método de Folch com modificações, métodos rápido com e sem saponificação (ambos realizados com 30 minutos ou 60 minutos de duração da reação de derivatização) apresentam-se na Tabela 3.

Os resultados apresentados na Tabela 3 correspondem à área dos picos de FAMEs identificados por cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama. Estes resultados são provenientes de injeções em triplicado, sendo que estão apresentados os valores médios obtidos das três injeções. Para facilitar a visualização dos resultados, estes apresentam-se igualmente na forma de gráfico (Figura 8).

Tabela 3: Valor médio das áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{min}$) obtidas para cada método e diferentes tempos de metilação testados.

FAME	DCM	MR	MR	MR-KOH	MR-KOH
		30'	60'	30'	60'
C12:0	nd	nd	10,20	4,51	5,03
C14:0	12,03	29,88	52,77	37,78	43,38
C15:0	3,52	8,04	11,23	11,95	11,01
C16:0	715,52	2139,06	3223,83	3109,99	3170,55
C16:1	nd	35,94	49,28	50,47	58,95
C17:0	3,59	14,64	31,50	22,82	30,44
C18:0	576,50	1621,38	2290,51	2464,26	2268,35
C18:1n9t	nd	nd	nd	60,65	42,68
C18:1n9c	123,29	1029,22	1357,56	1453,75	1342,40
C18:1n7	9,56	86,59	112,93	121,73	109,86
C18:1n6	nd	36,13	58,13	35,35	69,93
C18:2n6c	98,29	741,56	1005,43	997,13	939,00
C20:0	5,18	13,68	49,05	18,37	36,54
C18:3n6	nd	6,11	9,21	8,30	12,16
C20:1	2,50	7,19	9,22	9,83	10,21
C18:3n3	2,23	18,50	23,05	25,16	23,60
C20:2	nd	24,34	33,47	35,11	33,24
C22:0	19,92	185,44	362,18	248,25	319,54
C22:1n9	nd	nd	nd	26,61	14,69
C20:4n6	125,80	1271,62	1732,37	1667,80	1612,38
C23:0	nd	nd	30,00	nd	16,38
C22:2	nd	nd	6,64	nd	5,11
C24:0	nd	25,12	37,77	33,26	37,86
C20:5n3	7,69	67,94	404,11	74,62	338,30
C24:1	5,33	70,07	434,05	73,53	375,83
C22:4n6	27,68	351,74	415,67	463,46	446,29
C22:5n6	nd	75,45	111,34	103,33	112,97
C24:2n6	nd	11,40	68,39	11,29	58,41
C22:5n3	nd	121,52	162,86	159,94	142,97
C22:6n3	42,85	504,74	714,78	657,03	623,24

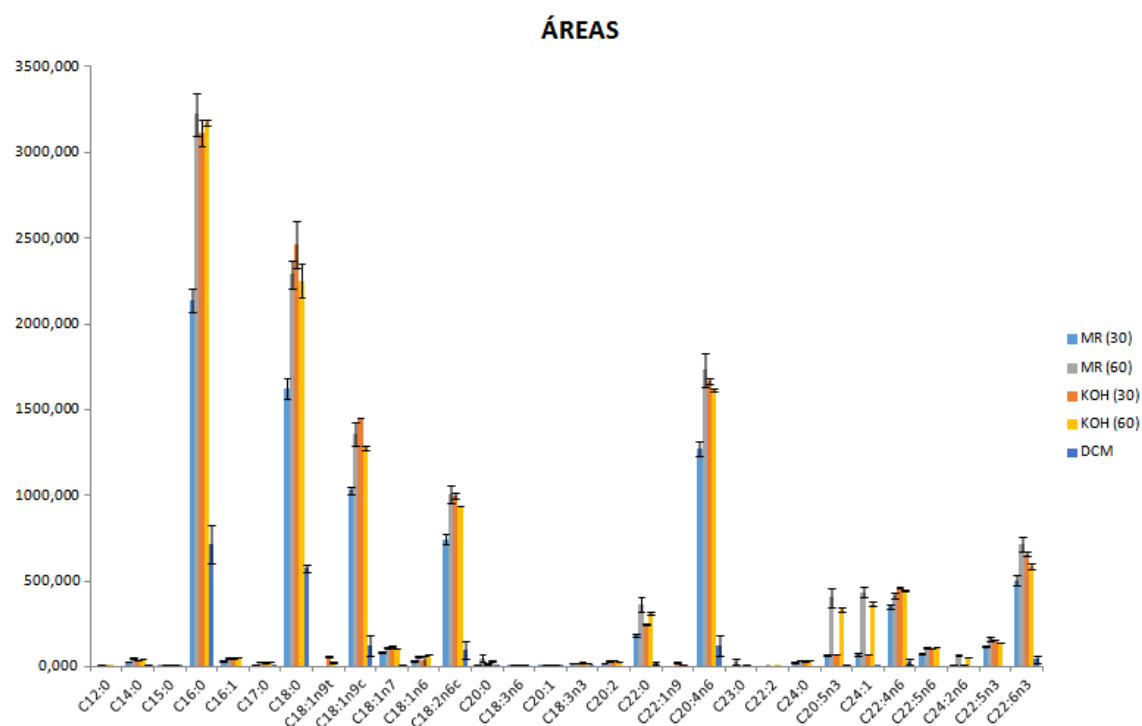


Figura 8: Representação gráfica dos valores médios obtidos para cada FAME.

Pela observação da Tabela 3, e das Figuras 8 e 9, pode verificar-se que, de uma forma geral, comparando os três métodos aplicados, o que apresenta piores resultados é o método tradicional utilizando DCM. Este método apresentou resultados qualitativos e quantitativos piores, tendo-se observado um menor rendimento de extração (verificado pelas áreas inferiores na maioria dos compostos) e a identificação de um menor número de FAMES, relativamente aos outros dois métodos. Este facto pode acontecer devido às perdas consideráveis que podem existir no decorrer do processo uma vez que este é demasiado longo e requer diversas recolhas de sobrenadantes e transferências de amostra para vias diferentes. Os resultados obtidos pelos métodos rápidos testados (Figura 10 e Figura 11) são bastante similares entre si apresentando ambos melhores resultados que o método tradicionalmente utilizado (Figura 9).

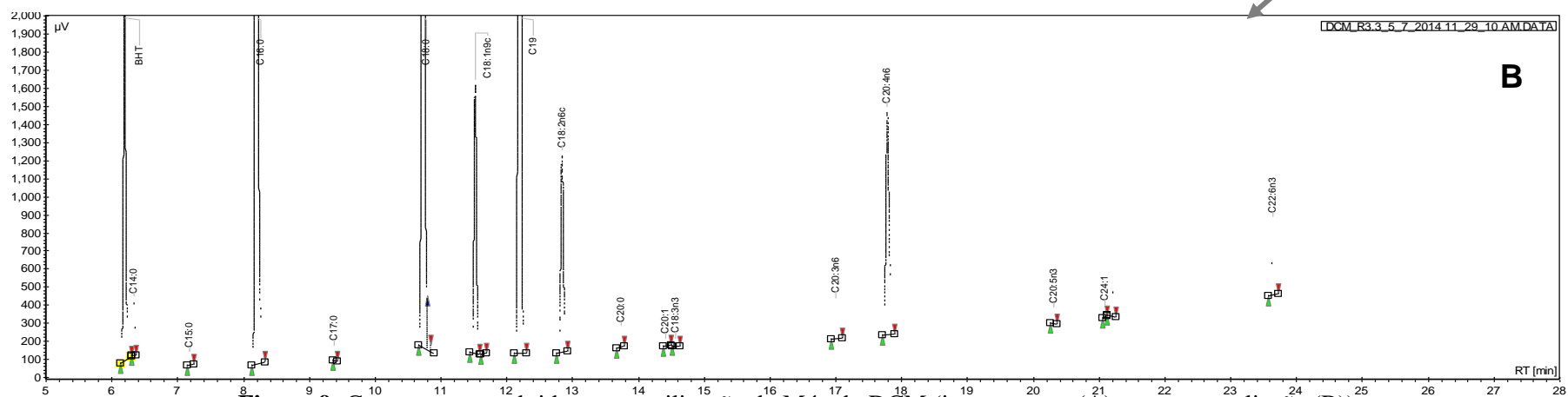
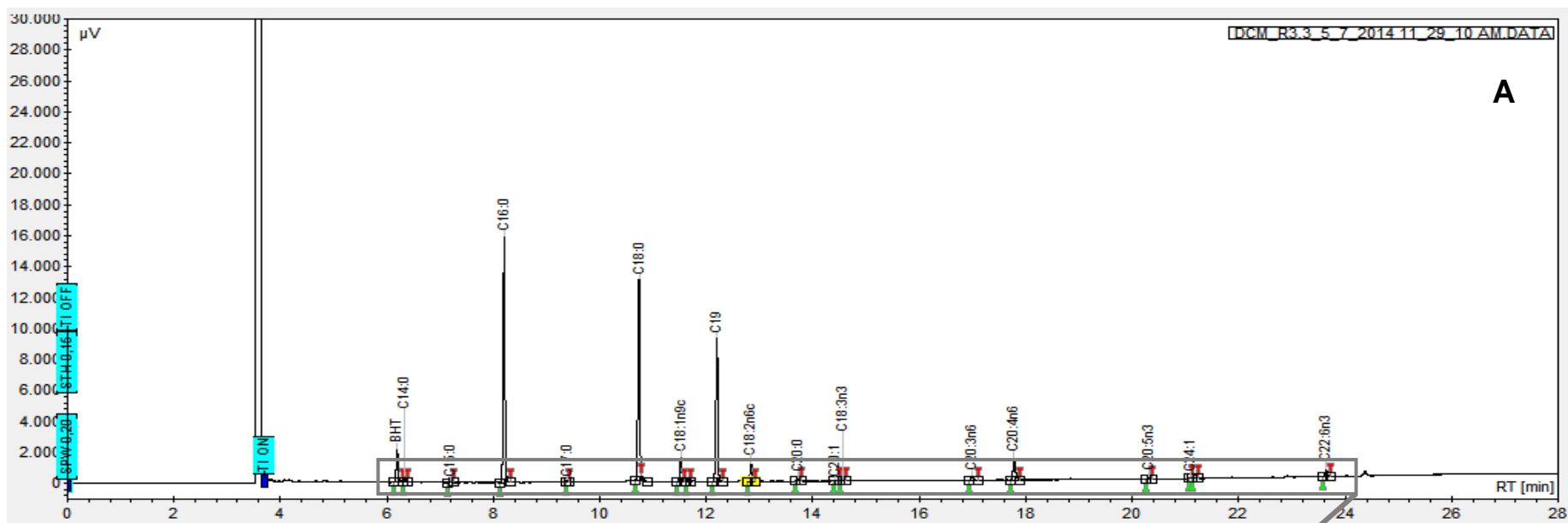


Figura 9: Cromatograma obtido com a utilização do Método DCM (imagem sem (A) ou com ampliação (B)).

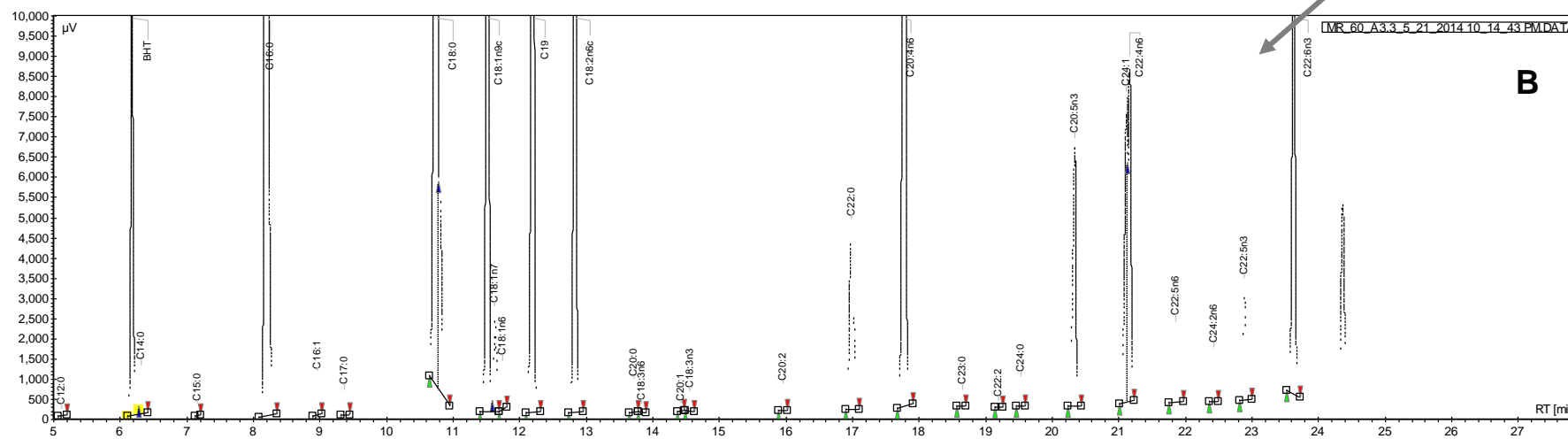
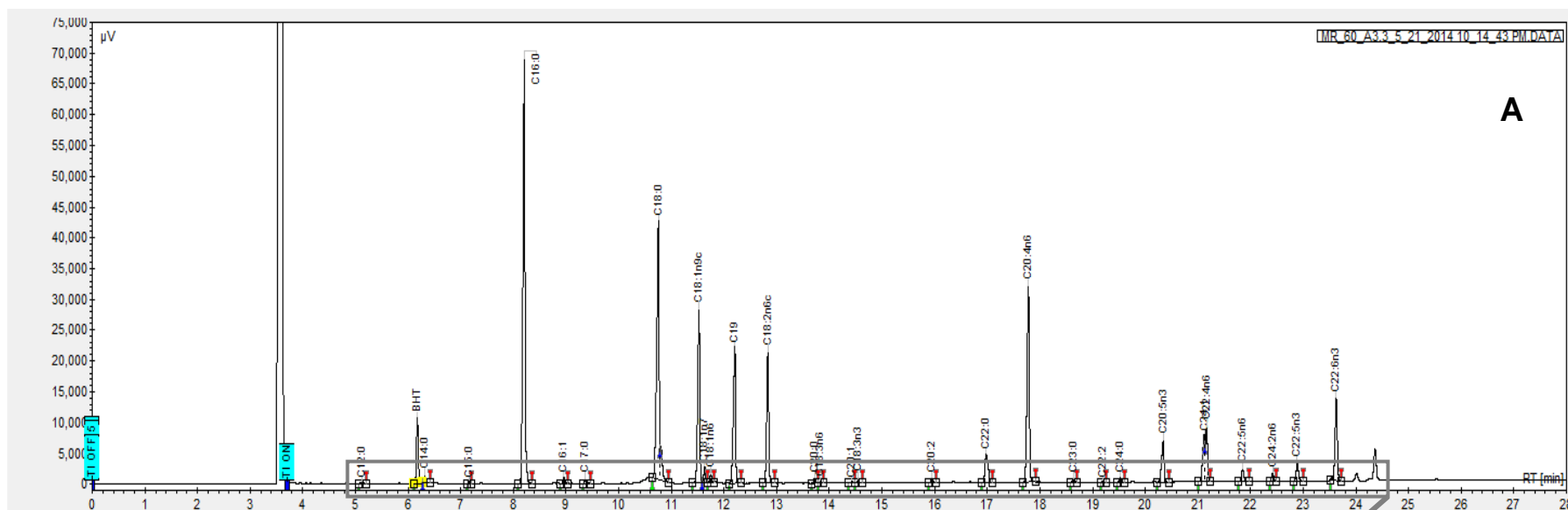


Figura 10: Cromatograma obtido com a utilização do Método Rápido com metilação 60 minutos (imagem sem (A) ou com ampliação (B)).

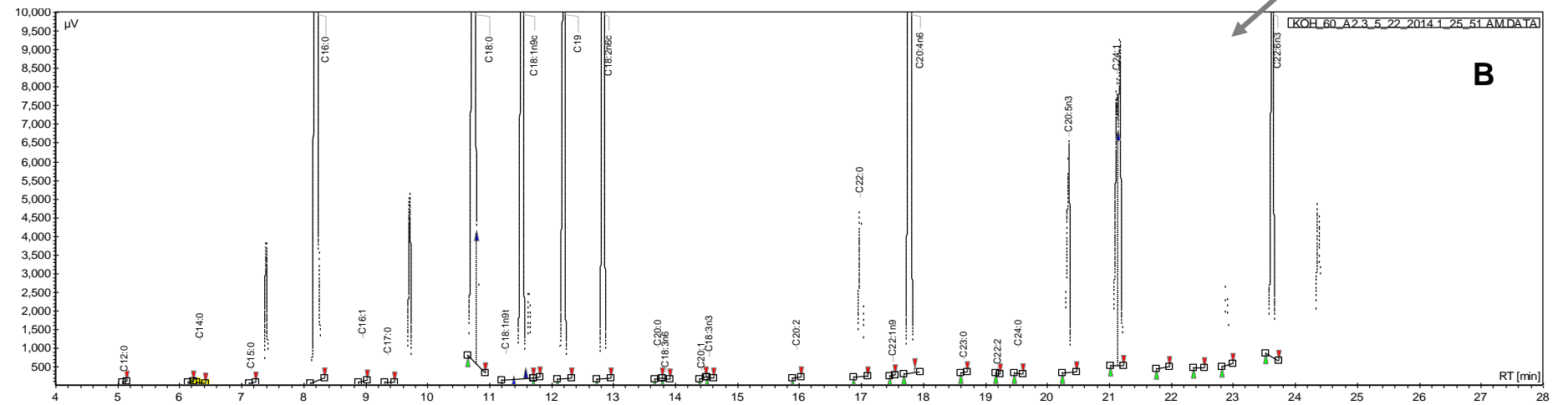
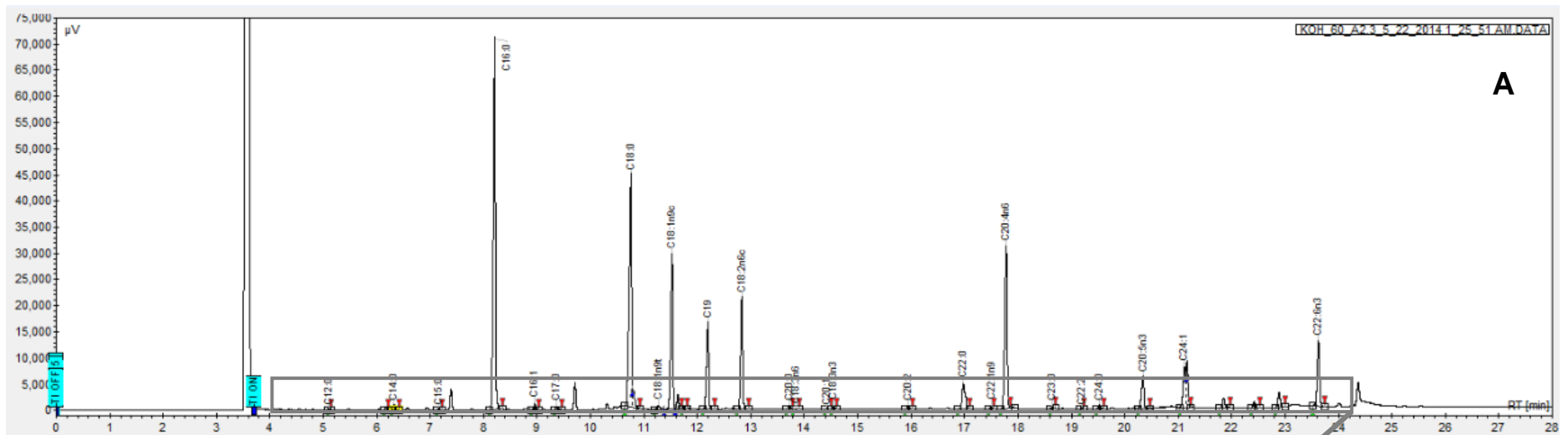


Figura 11: Cromatograma obtido com a utilização do Método Rápido com KOH com metilação 60 minutos (imagem sem (A) ou com ampliação (B)).

Ambos os métodos rápidos testados (com e sem saponificação) foram realizados com tempos de metilação de 30 e de 60 minutos, utilizando sempre a mesma temperatura de reação (90 °C, como proposto por Bicalho et al. (2008)). No que respeita o período da reação de metilação, para a maioria dos compostos, verificou-se não existirem grandes diferenças entre os dois tempos utilizados visto que as áreas obtidas para a maioria dos compostos são muito similares. Contudo, como se pode observar na Tabela 2, existem algumas exceções, como é o caso do EPA que apresenta área bastante mais elevada quando o tempo de metilação é superior, independentemente do facto de se realizar, ou não, saponificação. Verifica-se igualmente em ambos os casos (com e sem saponificação) um maior número de FAMES detetados para o tempo de metilação superior. Considerando sobretudo a particular importância do EPA para a saúde humana, considerou-se o tempo de metilação de 60 minutos como o mais adequado para a deteção e identificação de FAMES de membranas de eritrócitos.

No que respeita a comparação entre os métodos com e sem saponificação, verificou-se que a utilização da referida reação permitiu detetar um maior número de compostos. Mais concretamente, a vantagem de utilizar KOH reside principalmente no facto de permitir a deteção e quantificação do ácido gordo *trans C18:1n9t*, o qual é tem sido associado a malefícios para a saúde pois, como referido anteriormente, o consumo de elevadas quantidades de ácidos gordos *trans* tem sido associado ao aumento do risco de doenças coronárias pela indução do aumento de LDL e diminuição de HDL (Troisi *et al*, 1992). Também é possível verificar que o FA *C22:1n9* só é extraído na presença de KOH, sendo este também um ómega 9, tal como o *C18:1n9t*. Pelos motivos referidos, selecionou-se o método com saponificação e reação de metilação de 60 min (designado como método rápido KOH 60') como sendo o mais adequado para o objetivo proposto nesta dissertação.

No que respeita o perfil em ácidos gordos da amostra de eritrócitos analisada, independentemente do método utilizado, verificou-se que os ácidos gordos saturados predominantes foram o ácido palmítico (*C16:0*) e o ácido esteárico (*C18:0*), ao passo que os ácidos gordos insaturados mais abundantes foram o ácido oleico (*C18:1n9c*), o ácido linoleico (*C18:2n6c*), o ácido araquidónico (*C20:4n6*) e o ácido docosahexénico (*C22:6n3*, DHA). De referir que o ácido eicosapentanóico (*C20:5n3*, EPA), à seme-

lhança do DHA, apresentou valores elevados, o que poderá estar relacionado com o facto de a voluntária que cedeu sangue para a realização destas análises encontrar-se a tomar um suplemento alimentar contendo ómega-3.

Por último, de referir que, através das áreas obtidas, poderá ser calculada a concentração final de cada FAME presente na amostra em estudo. Para tal é necessário é necessário obter curvas de calibração para cada um dos compostos presentes na amostra.

4.3 Validação do método analítico

Para que o método possa ser validado é necessário garantir que todos os parâmetros anteriormente descritos no capítulo 4, ponto “Validação de Métodos”, são respeitados.

Para tal, inicialmente recorreu-se à injeção da mistura de 37 FAMES da Supelco, a qual contém uma mistura de 37 esteres metílicos dos seguintes ácidos gordos:

C4:0 (Ácido Butírico); C6:0 (Ácido Capróico); C8:0 (Ácido Caprílico); C10:0 (Ácido Cáprico); C11:0 (Ácido Undecanóico); C12:0 (Ácido Láurico); C13:0 (Ácido Tridecanóico); C14:0 (Ácido Mirístico); C14:1 (Ácido Miristoléico); C15:0 (Ácido Pentadecanóico); C15:1 (Ácido 10-Pentadecenóico); C16:0 (Ácido Palmítico); C16:1 (Ácido Palmitoleico); C17:0 (Ácido Margárico); C17:1 (Ácido 10-Heptadecenóico); C18:0 (Ácido Esteárico); C18:1n9t (Ácido Elaidico); C18:1n9c (Ácido Oleico); C18:2n6t (Ácido Linolelaídico); C18:2n6c (Ácido Linoleico); C20:0 (Ácido Araquídico); C18:3n6 (Ácido γ -Linolénico); C20:1 (Ácido Eicosanóico); C18:3n3 (Ácido α -Linolénico); C21:0 (Ácido Heneicosanóico); C20:2 (Ácido Eicosadienóico); C22:0 (Ácido Beénico); C20:3n6 (Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico); C22:1n9 (Ácido Erúrico); C20:3n3 (Ácido 11,14,17- Eicosatrienóico); C20:4n6 (Ácido Araquidónico); C23:0 (Ácido Tricosanóico); C22:2 (Ácido Docosadienóico); C24:0 (Ácido Lignocérico); C20:5n3 (Ácido Eicosapentaenóico); C24:1 (Ácido Nervónico); C22:6n3 (Ácido docosahexaenóico).

Uma vez que a mistura Supelco apresentada não inclui o FAMES correspondente ao padrão interno C19:0, este foi injetado individualmente, tendo sido previamente feitas as diluições seriadas necessárias à obtenção da respetiva curva de calibração (Figura

12). Este composto foi escolhido como padrão interno pois na natureza os FA com número par de átomos de carbono são os mais abundantes, sendo relativamente rara a presença de FA de cadeia carbonada com número total de carbonos ímpar na maioria das matrizes biológicas, havendo contudo exceções como a pele (Brena, 2013) possivelmente devido ao metabolismo microbiano.

É importante referir ainda que a curva de calibração obtida pela injeção do padrão interno em diferentes concentrações, foi utilizada para realizar a quantificação dos FA tentativamente identificados com base na literatura, uma vez que estes não constam da mistura de 37 FAMES adquirida.

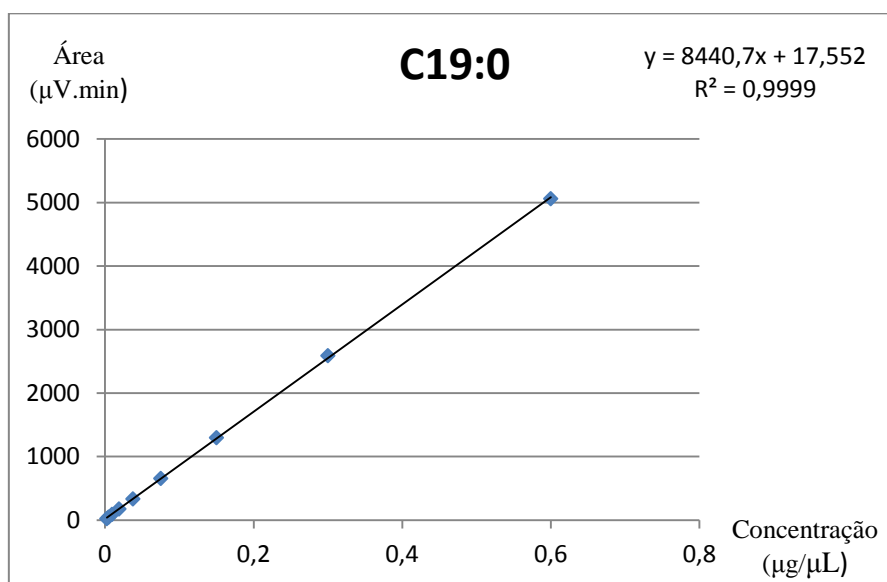


Figura 12: Curva de calibração obtida para o padrão interno (C19:0 FAME).

4.3.1 Linearidade e Curvas de Calibração

Como descrito no capítulo 4, ponto “Validação de Métodos”, o estudo da linearidade consiste essencialmente na obtenção de curvas de calibração. A curva de calibração permite a obtenção de parâmetros como o coeficiente de determinação (r^2) que possibilitam a avaliação da linearidade do método para cada analito em estudo. Para cada um

dos 37 FAMEs e para o padrão interno, foram traçadas individualmente as curvas de calibração (relação da área cromatográfica vs concentração de analito), obtidas por regressão linear, tendo-se utilizado 6 níveis de concentrações distintas (o nível de concentração mais elevado de cada composto varia segundo a concentração na mistura Supelco de 37 FAMEs). Para cada ponto foi utilizada a média de injeções em duplicado. Nas condições utilizadas, foram obtidas relações lineares entre a concentração de analito e a resposta do detetor FID, para cada um dos compostos estudados. Na Tabela 4, para cada um dos 37 FAMEs presentes na mistura Supelco, apresentam-se os valores correspondentes à gama de linearidade, equação da reta e respetivo valor de coeficiente de correlação. Pela análise dos coeficientes de correlação quadráticos obtidos, os quais invariavelmente excederam 0,999, verifica-se que existe uma boa correlação entre as áreas cromatográficas e a concentração dos padrões.

Tabela 4: Gama de Linearidade, equação da reta e respetivo coeficiente de correlação para cada ácido gordo metilesterificado presente na mistura Supelco 37.

FAME	Gama Linearidade [µg/µl]	Equação da reta	Coefficiente de correlação
C6:0	0,002-0,399	$y = 5418,4x - 17,359$	$R^2 = 0,9996$
C8:0	0,002-0,399	$y = 6534,4x + 15,797$	$R^2 = 0,9998$
C10:0	0,002-0,399	$y = 6975x + 13,516$	$R^2 = 0,9998$
C11:0	0,001-0,200	$y = 7053,1x + 7,3095$	$R^2 = 0,9999$
C12:0	0,002-0,400	$y = 7432,2x + 10,832$	$R^2 = 0,9996$
C13:0	0,001-0,197	$y = 7363x + 5,7671$	$R^2 = 0,9997$
C14:0	0,002-0,400	$y = 7656,8x + 6,9795$	$R^2 = 0,9995$
C14:1	0,001-0,204	$y = 7263,1x + 5,8904$	$R^2 = 0,9997$
C15:0	0,001-0,200	$y = 7625,1x + 5,5019$	$R^2 = 0,9996$
C15:1	0,001-0,198	$y = 7486x + 5,4354$	$R^2 = 0,9995$
C16:0	0,003-0,599	$y = 7895x + 8,9142$	$R^2 = 0,9995$
C16:1	0,001-0,199	$y = 7779,9x + 4,5856$	$R^2 = 0,9995$
C17:0	0,001-0,200	$y = 7806,1x + 4,6884$	$R^2 = 0,9995$
C17:1	0,001-0,199	$y = 7897,4x + 1,2463$	$R^2 = 0,9994$
C18:0	0,002-0,399	$y = 7984,7x + 8,8242$	$R^2 = 0,9996$
C18:1n9t	0,001-0,200	$y = 7595,5x + 5,3695$	$R^2 = 0,9996$
C18:1n9c	0,002-0,399	$y = 8051,9x + 7,8448$	$R^2 = 0,9996$
C19:0	0,002-0,600	$y = 8440,7 + 17,552$	$R^2 = 0,9999$
C18:2n6t	0,001-0,199	$y = 7746,5x + 3,6165$	$R^2 = 0,9995$
C18:2n6c	0,001-0,200	$y = 7851,2x + 5,0025$	$R^2 = 0,9995$
C20:0	0,002-0,402	$y = 8611,2x - 9,3735$	$R^2 = 0,9989$
C18:3n6	0,001-0,200	$y = 6801,6x + 22,034$	$R^2 = 0,9996$
C20:1	0,001-0,199	$y = 7824,9x + 4,3625$	$R^2 = 0,9995$
C18:3n3	0,001-0,200	$y = 8062,8x + 6,6298$	$R^2 = 0,9996$
C21:0	0,001-0,199	$y = 8067,3x + 6,3684$	$R^2 = 0,9996$
C20:2	0,001-0,200	$y = 7901,8x + 5,4429$	$R^2 = 0,9996$
C22:0	0,002-0,401	$y = 3807,5x + 36,071$	$R^2 = 0,9923$
C20:3n6	0,001-0,200	$y = 15101x - 47,103$	$R^2 = 0,9928$
C22:1n9	0,001-0,201	$y = 7436,5x + 5,38$	$R^2 = 0,9996$
C20:3n3	0,001-0,200	$y = 8609,5x - 0,5697$	$R^2 = 1,000$
C20:4n6	0,001-0,203	$y = 6753x + 9,6193$	$R^2 = 0,9984$
C23:0	0,001-0,200	$y = 8000,1x + 7,4673$	$R^2 = 0,9997$
C22:2	0,001-0,199	$y = 8067,6x + 8,2187$	$R^2 = 0,9997$
C24:0	0,002-0,399	$y = 3559,1x + 5,7934$	$R^2 = 0,9996$
C20:5n3	0,001-0,199	$y = 16297x + 12,781$	$R^2 = 0,9997$
C24:1	0,001-0,200	$y = 8026,3x + 7,0397$	$R^2 = 0,9997$
C22:6n3	0,001-0,201	$y = 7654,6x + 6,1988$	$R^2 = 0,9997$

4.3.2 Precisão

A precisão avalia a tendência dos resultados entre ensaios independentes, repetidos em amostras idênticas, nas mesmas condições analíticas, com o mesmo operador e no mesmo local. A precisão é geralmente expressa como coeficiente de variação (CV).

Neste trabalho, calculou-se a precisão intraday e interday, cujos valores são apresentados na Tabela 5. A primeira corresponde a injetar a amostra n vezes no mesmo dia ao passo que a segunda corresponde a injetar a amostra durante n dias seguidos. Neste estudo a precisão intraday foi obtida tendo-se realizado 6 injeções no mesmo dia, tendo esta variado entre 1,0% e 4,9%. A precisão interday foi calculada com base na análise da mesma amostra durante 5 dias seguidos (1 injeção/dia) tendo variado entre 2,2% e 6,5%. A precisão do método de análise revelou-se adequada uma vez que os coeficientes de variação obtidos foram baixos para ambos os casos, sendo geralmente inferiores a 5%.

Tabela 5: Percentagem do Coeficiente de Variação (%CV) para cada FAME.

FAME	Intraday	Interday	FAME	Intraday	Interday
C12:0	4,0	3,7	C18:3n3	4,9	5,8
C14:0	2,2	4,5	C20:2	2,4	3,5
C15:0	3,0	5,3	C22:0	1,9	3,5
C16:0	2,1	3,1	C22:1n9	1,4	4,6
C16:1	2,6	2,3	C20:4n6	2,3	3,4
C17:0	1,6	2,6	C23:0	3,4	4,6
C18:0	2,2	3,8	C22:2	4,0	3,6
C18:1n9t	2,3	2,2	C24:0	2,5	3,3
C18:1n9c	2,0	3,1	C20:5n3	2,2	3,5
C18:1n7	2,1	2,6	C24:1	2,9	5,7
C18:1n6	1,0	3,2	C22:4n6	2,5	5,7
C18:2n6c	2,1	3,2	C22:5n6	4,6	6,5
C20:0	2,2	3,9	C24:2n6	1,8	4,5
C18:3n6	4,9	5,2	C22:5n3	1,7	3,0
C20:1	2,6	5,3	C22:6n3	1,6	2,8

4.3.3 Exatidão

A exatidão refere-se à concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. Neste trabalho, a exatidão do método cromatográfico foi avaliada através de ensaios de recuperação, os quais demonstram a eficácia da extração de um método analítico dentro de determinados limites de variabilidade. Neste caso, a exatidão deve ser calculada pela razão entre a quantidade de substância adicionada e a quantidade de substância recuperada, expressa em percentagem. Contudo, como o padrão foi adicionado a uma amostra de eritrócitos, primeiramente procedeu-se à quantificação dos compostos na referida amostra, para que estes valores fossem tidos em consideração nos cálculos. Posteriormente, procedeu-se à fortificação da amostra (100 µL de eritrócitos) com a mistura de padrões, tendo-se realizado a adição de padrão a dois níveis diferentes (adição de 15 µL e de 25 µL da mistura de 37 FAMES da Supelco e, em ambos os casos mantendo-se a adição da mesma quantidade de padrão interno utilizada para as amostras). Determinadas as áreas de cada pico obtido no cromatograma para os diferentes compostos em estudo, calculou-se a percentagem de recuperação média para cada ácido gordo, tendo em conta o nível de concentração de 37 FAMES adicionado à matriz. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 6.

De uma maneira geral, verificou-se a ocorrência de recuperações superiores na quantidade dos compostos presentes quando a quantidade de FAMES adicionada é menor. Isto pode dever-se ao facto de a fase orgânica ficar saturada pelo que com menor quantidade adicionada a recuperação seja melhor. A menor percentagem de recuperação corresponde aos ácidos gordos *C10:0*, *C11:0*, *C12:0* e *C13:0*, o que poderá dever-se ao facto de estes compostos apresentarem uma cadeia carbonada mais curta, logo sendo menos solúveis na fase de orgânica de n-heptano comparativamente com os restantes FA de cadeia mais longa. Refira-se que destes compostos, a sua existência no sangue apenas foi referida para o caso do *C12:0*.

De uma maneira geral pode considerar-se que as recuperações obtidas são aceitáveis para os vários compostos, uma vez que a maioria dos resultados obtidos se situam entre 90% e 110%. Contudo, verificam-se algumas exceções, como o caso do ácido araquidónico (*C20:4n6*) para o qual foi obtido um valor excessivamente elevado. Tal relaciona-

se com o facto deste composto ter um tempo de retenção muito próximo do C20:3n3, sendo que nas amostras mais concentradas se verificou uma sobreposição dos picos, dificultando o cálculo correto da concentração deste composto.

Tabela 6: Percentagem de recuperação para cada FAME presente na amostra (média de dois níveis de adição).

FAME	Recuperação média (%)	FAME	Recuperação média (%)
C10:0	23,7	C20:0	90,3
C11:0	48,4	C18:3n6	93,2
C12:0	65,5	C20:1	88,1
C13:0	77,7	C18:3n3	97,4
C14:0	86,0	C21:0	96,7
C14:1	79,7	C20:2	97,9
C15:0	91,0	C22:0	107,2
C15:1	87,1	C20:3n6	112,3
C16:0	97,6	C22:1n9	87,5
C16:1	91,4	C20:3n3	101,6
C17:0	99,3	C20:4n6	198,2
C17:1	92,6	C23:0	102,4
C18:0	99,2	C22:2	93,3
C18:1n9t	98,0	C24:0	93,6
C18:1n9c	102,4	C20:5n3	97,2
C19	106,9	C24:1	106,1
C18:2n6t	79,2	C22:6n3	155,8
C18:2n6c	138,8		

4.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de deteção (LOD) representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para cada um dos ácidos gordos encontram-se registados na Tabela 7.

Tabela 7: Limite de detecção e limite de quantificação para cada composto.

FAME	LOD	LOQ
C10:0	0,0004	0,0012
C11:0	0,0004	0,0012
C12:0	0,0004	0,0011
C13:0	0,0004	0,0011
C14:0	0,0004	0,0011
C14:1	0,0004	0,0011
C15:0	0,0004	0,0011
C15:1	0,0004	0,0011
C16:0	0,0003	0,0010
C16:1	0,0004	0,0011
C17:0	0,0003	0,0011
C17:1	0,0003	0,0010
C18:0	0,0003	0,0010
C18:1n9t	0,0004	0,0011
C18:1n9c	0,0003	0,0010
C18:1n7	0,0003	0,0010
C18:1n6	0,0003	0,0010
C19	0,0003	0,0010
C18:2n6t	0,0004	0,0011
C18:2n6c	0,0003	0,0011
C20:0	0,0003	0,0010
C18:3n6	0,0004	0,0012
C20:1	0,0003	0,0011
C18:3n3	0,0003	0,0010
C21:0	0,0003	0,0010
C20:2	0,0003	0,0010
C22:0	0,0007	0,0022
C20:3n6	0,0002	0,0005
C22:1n9	0,0004	0,0011
C20:3n3	0,0003	0,0010
C20:4n6	0,0004	0,0012
C23:0	0,0003	0,0010
C22:2	0,0003	0,0010
C24:0	0,0008	0,0023
C20:5n3	0,0002	0,0005
C24:1	0,0003	0,0010
C22:4n6	0,0003	0,0010
C22:5n6	0,0003	0,0010
C24:2n6	0,0003	0,0010
C22:5n3	0,0003	0,0010
C22:6n3	0,0004	0,0011

Capítulo 5

Conclusão

Com esta dissertação pretendeu-se desenvolver e validar um método cromatográfico para extração e análise quantitativa de ácidos gordos da membrana de eritrócitos que fosse simples, rápido e preciso. Dado a existência de uma vasta gama de metodologias utilizadas na extração destes compostos, a comparação de resultados obtidos com diferentes métodos e seleção da melhor metodologia também consistiu num dos objetivos do trabalho.

Desta forma, iniciou-se o estudo com a otimização das condições cromatográficas de forma a obter uma melhor resposta do sistema num espaço de tempo tão curto quanto possível. Assim testaram-se diferentes temperaturas da coluna, forno, injetor de forma a obter a melhor separação possível dos compostos num tempo de análise razoável e foram testadas também diferentes razões de split, utilizando uma amostra de sangue humano extraída pelo método de Folch. Após a seleção das melhores condições cromatográficas, procedeu-se à otimização da metodologia de preparação da amostra.

A otimização da metodologia analítica para a determinação de ácidos gordos da membrana de eritrócitos foi sendo adaptada tendo sido testados vários parâmetros de derivatização diferentes (tempo, temperatura, quantidades de soluções).

O trabalho laboratorial foi iniciado com um procedimento de extração de ácidos gordos mais tradicional, utilizando DCM e um protocolo de duas etapas principais (extração dos lípidos e derivatização em diferentes vias), tendo como base o método tradicional de *Folch*. Contudo, por este ser um processo moroso, com muitos passos e como tal, muito sujeito à ocorrência de perdas de amostra, iniciaram-se novos procedimentos mais rápidos e de fácil execução tendo por base protocolos como o descrito por Bicalho e colaboradores (2008). Estes métodos foram adaptados para que, a cada novo passo adi-

cionado/testado, se conseguisse extrair e identificar o maior número possível de FA presentes na amostra em estudo.

Com base nos resultados obtidos pode verificar-se que para uma melhor extração e identificação de ácidos gordos da membrana de eritrócitos, os melhores resultados foram obtidos pela utilização de um método rápido com derivatização de 60 minutos e à temperatura de 90°C com reação de saponificação utilizando KOH. Este tipo de método de extração permite, quando comparado com os outros, uma maior quantidade extraída de alguns dos ácidos gordos da membrana, permitindo ainda a extração e identificação de ácidos gordos *trans*, os quais não são detetados sem utilização de KOH.

De forma a validar a metodologia selecionada foi realizado um estudo da gama de linearidade, a obtenção das equações da reta dos compostos e o seu coeficiente de correlação, dos limites de detecção e de quantificação, da precisão e da recuperação do método. De uma forma geral, o método demonstrou uma boa linearidade para as gamas de concentração testadas (demonstrada pelos elevados coeficientes de correlação quadráticos das curvas de calibração), uma elevada precisão, elevada sensibilidade (demonstrada pelos baixos valores de LOD e LOQ) e uma exatidão razoavelmente elevada para a maioria dos compostos, demonstrando assim a sua adequabilidade para a avaliação quantitativa da composição em ácidos gordos das membranas de eritrócitos.

A metodologia proposta poderá assim vir a ser utilizada em trabalhos futuros que visem estudar a possibilidade de utilização de determinados ácidos gordos da membrana de eritrócitos, ou os seus rácios, como biomarcadores de patologias específicas. De igual forma, sabendo-se que os ácidos gordos polinsaturados estão associados a uma maior fluidez membranar comparativamente com os ácidos gordos saturados, seria também interessante a realização de estudos que visem estabelecer correlações entre a composição da membrana de eritrócitos e a sua deformabilidade em microcanais, deformabilidade esta que poderá por sua vez ser associada ao desenvolvimento de determinadas patologias.

Resumindo, com esta dissertação pretendeu-se contribuir para um melhor conhecimento da constituição da membrana de eritrócitos, através do desenvolvimento de uma metodologia cromatográfica que possa ser utilizada em trabalhos futuros, fornecendo uma ferramenta útil, visando a análise de FAME, que possa ser utilizada em estudos clínicos.

Referências bibliográficas

Alexander J.W., Saito H., Trocki O., Ogle C.K. (1986). The importance of lipid type in the diet after burn injury, *Annals of Surgery*, 204, 1-8.

Amaral J.S., Casal S., Pereira J.A., Seabra R.M., Oliveira M.B.P.P. (2003). Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7698-7702.

Andersen L.F., Solvoll K., Johansson L.R., Salminen I., Aro A., Drevon C.A. (1999) Evaluation of a food frequency questionnaire with weighed records, fatty acids, and alpha-tocopherol in adipose tissue and serum, *American Journal of Epidemiology*, 150, 75-87.

Aragona P., Bucolo C., Spinella R., Giuffrida S., Ferreri G. (2005). Systemic omega-6 essential fatty acid treatment and PGE₁ tear content in Sjögren's syndrome patients, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46, 4474-4479.

Araújo P., Nguyen T., Frøyland L., Wang J., Kang J.X. (2008) Evaluation of a rapid method for the quantitative analysis of fatty acids in various matrices, *Journal of Chromatography A*, 1212, 106 – 113.

Bagga D., Wang L., Farias-Eisner R., Glaspy J. A., Reddy S.T. (2003). Differential effects of prostaglandin derived from ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100, 1751–1756.

Belluzzi A., Bosch. S., Brignola C., Munarini A., Cariani G., Miglio F. (2000). Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammatory Bowel Disease, *American Journal of Clinical Nutrition*, 71,339-342.

Bicalho B., David F., Rumble K., Kindt E., Sandra P. (2008). Creating a fatty acid methyl ester database for lipid profiling in a single drop of human blood using high resolution capillary gas chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1211,120 – 128.

Breda J. (2003). Fundamentos de Alimentação. Nutrição e Dietética, Mar da Palavra – Edições Lda, 21-25.

Broadfield E.C., McKeever T.M., Whitehurst A., Lewis S. A., Lawson N., Britton J., Fogarty A. (2004). A case – control study of dietary and erythrocyte membrane fatty acids in asthma . *Clin Exp Allergy*, 34,1232 –1236.

Brown J.M., McIntosh M.K. (2005). Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity, *The Journal of Nutrition*, 133, 3041-3046.

Calabresi L., Villa N., Canavesi M., Sirtori C.R., James R.W., Bernini F., Franceschini G. (2004). An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate increases plasma high-density Lipoprotein 2 Cholesterol and Paraoxonase levels in patients with familial combined hyperlipidemia, *Metabolism*, 53,153-158.

Campbell-Platt G. (2009). *Food Science and Technology*, 1st Edition, Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom.

Champe P.C., Harvey R.A. (1997). *Bioquímica ilustrada*. Ed. Artes Médicas. Porto Alegre

Chen Y., Houghton L.A., Brenna J.T., Noy N. (1996) Docosahexaenoic acid modulates the interactions of the interphotoreceptor retinoid-binding protein with 11-cis-tetinal. *Journal Biology Chemical*, 271, 20507-20515.

Clayton E.H., Gulliver C.E., Piltz J.W., Taylor R.D., Blake R.J., Meyer R.G. (2012). Improved extraction of saturated fatty acids but not omega-3 fatty acids from sheep red blood using a one-step extraction procedure, *Lipids*, 47, 719-727.

Curi R., Pompéia A., Miyasaka C.K., Procopio J. (2002). *Entendendo a Gordura: os ácidos Graxos*.

Dai X., Zhang B., Wang P., Chen C., Chen Y., Su Y. (2014). Erythrocyte membrane n-3 fatty acid levels and carotid atherosclerosis in Chinese men and women. *Atherosclerosis*, 232, 79-85.

Djoussé L., Matsumoto C., Hanson N.Q., Weir N.L., Tsai M.Y., Gaziano J.M. (2014). Plasma cis-vaccenic acid and risk of heart failure with antecedente coronary heart disease in male physicians. *Clinical Nutrition*, 33, 478-482.

Dobson G., Hurst W.J. (2002). Analysis of fatty acids in functional foods with emphasis on ω -3 fatty acids and conjugated linoleic acid In *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. Ed. CRC Press: Boca Raton, US,

Emsley R., Oosthuizen P., Rensburg S.J. (2003). Clinical potential of omega-3 fatty acids in the treatment of schizophrenia, *CNS Drugs*, 17, 1081-1091

Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. (1998). *Validation of analytical procedures: Methodology*, VICH GL2, October 1998.

Folch J., Lees M. and Sloane Stanley G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biology Chemical*, 226, 497-509
Gas Chromatography. Disponível em: <http://www.shu.ac.uk/schols/sci/chem/tutorials/chrom/gaschrm.htm>, consultado em Agosto de 2014

Givens D.I. (2005). The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64, 395-402.

Griel A.E., Kris-Etherton P.M., Hilpert K.F., Zhao G., West S.G., Corwin R.L. (2007). An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. *Nutrition Journal*, 6, 1-8

Guia RELACRE nº13 (2000), Validação de métodos internos de ensaio em análise química. *Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal*, Disponível em <http://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/Guia%20RELACRE%2013.pdf> (consultado em Julho de 2014).

Harris R.B., Foote J.A., Hakim I.A., Bronson D.L., Alberts D.S. (2005). Fatty acid composition of red blood cells membranes and risk of squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 14, 906-912.

Huber L. (2010). Agilent Technologies. Validation of analytical methods. Disponível em <http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>

ISO, International Organization for Standardization (2000). Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fattyacids, ISO 5509.

Jones P.J. (2002). Functional foods-more than just nutrition. *Clinical Nutrition*: 7, 166, 1555-1563

Katan M.B., Zock P.L., Mensink R.P. (1994). Effects of fats and fatty acid on blood lipids in humans: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60, 1017-1022

Kris-Etherton P., Yu Shaomei. (1997). Individual fatty acids effects on plasma lipids and lipoproteins, human studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 1628-1644.

Kuriki K., Wakai K., Hirose K., Matsuo K., Ito H., Suzuki T., Saito T., Kanemitsu Y., Hirai T., Kato T., Tatematsu M., Tajima K. (2006). Risk of colorectal cancer is linked to erythrocyte compositions of fatty acids as biomarkers for dietary intakes of fish fat and fatty acids. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15, 1791-1798.

Laugharne J.D., Mellor J.E., Peet M. (1996). Fatty acids and schizophrenia. *Lipids*, 31, 163-165.

Lee M.R.F., Tweed J.K.S., Dewhurst R.J., Scollan N.D. (2006). Effect of forage: concentrate ratio on ruminal metabolism and duodenal flow of fatty acids in beef steers. *Journal of Animal Science*, 82, 31-40.

Leonard A.E., Pereira S.L., Sprecher H., Huang Y.S. (2014). Elongation of long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 43, 36-54.

Lepage, G., Roy, C.C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, 27, 114-120.

Lima R. (2013). Apontamentos de Micro/Nanotecnologias e Aplicações Biomédicas. ESTiG, IPB, Bragança Portugal

Lípidos em ciência animal. Disponível em: <http://lipidanimal.fmv.utl.pt/index.php/pt/dossiers/157-caracterizacao-estrutural-de-acidos-gordos>, consultado em Agosto 2014.

Magnusardottir A.R., Skuladottir G.V. (2006). Effects of storage time and added antioxidant on fatty acid composition of red blood cells at -20 °C. *Lipids* 41, 401 – 404.

Maillard V., Bougnoux P., Ferrari P., Jourdan M.L., Pinault M., Lavillonniere F., Body G., Le Floch O., Chajes V. (2002). N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in tours, France. *International Journal of Cancer*, 98, 78-83.

Martirosyan D.M., Miroshnichenko L.A., Kulakova S.N., Pogojeva A.V., Zoloedov V.I. (2007). Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids in Health and Disease*, 6, 1-12.

Mayser P., Grimm H., Grimminger F. (2002). N-3 fatty acids in psoriasis. *British Journal of Nutrition*, 87, 77-82

Mickleborough T.D., Ionescu A.A., Rundell K.W. (2004). Omega-3 fatty acids and airway hyperresponsiveness in asthma. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 10, 1067-1075

Nagakura T., Matsuda S., Shichijyo K., Sugimoto H., Hata K. (2000). Dietary supplementation with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial. *Asthma European Respiratory Journal*, 16,861-865

Neves. H.J.C. Freitas. A.M.C. (1996). *Introdução à cromatografia gás-liquido de alta-resolução*. 1ª Edição, Dias de Sousa Lda., Póvoa de Santa Iria, Portugal.

Oddy W., Klerk N., Kendall G., Mhrshahi S., Peat J. (2005). Ratio of omega-6 to omega-3 fatty acids and childhood asthma. *Journal of Asthma*, 41, 319-26.

Oh J.S., Kim S.M., Sin Y.H., Kim J.K., Park Y., Bae H.R., Son Y.K., Nam H.K., Kang H.J., Na W.S. (2012). Comparison of erythrocyte membrane fatty acid contents in renal transplant recipients and dialysis patients. *Transplantation Proceedings*, 44, 2932–2935.

Okuyama H., Kobayashi T., Watanabe S. (1997). Dietary fatty acids - the n-6/n-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative n-3 deficiency syndrome seen in Japan. *Prog. Lipid Res.*, 35, 409-457

Pottala J. V., Espeland M. A., Polreis J., Robinson J., Harris W. S., (2012) Correcting the effects of -20 °C storage and aliquot size on erythrocyte fatty acid content in the women's health initiative, *Lipids*, 47, 835–846.

Raatz S.K., Bibus D., Thomas W., Kris-Etherton P. (2000). Total fat intake modifies plasma fatty acid composition in humans. *Human Nutrition and Metabolism*, 131,231-234

Richmond H.D. (1927) The Rose-Gottlieb Method of milk analysis, *The Lancet*, 209, 1061-1072.

Roos N.M., Siebelink E., Bots M.L., Van T. A., Schouten. E.G., Katan M.B. (2002). Trans monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilation. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 674-679.

Sagduyu K., Dokucu M.E., Eddy B.A., Craigen G., Baldassano C.F., YıldıZ A. (2005). Omega-3 fatty acids decreased irritability of patients with bipolar disorder in an add-on. *Nutrition Journal*, 4, 1-6.

Santos J., Deboni F., Azevedo M. J., Gross J.L., Zelvanovitz. (2006) Fatty acids as biological markers of fat intake. *Revista Nutrição*, 19,489-500.

Schwartz J. (2000). Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 393-396.

Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., Hiltunen, R. (2002) Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465, 39 – 62.

Shannon J., King I.B., Moshofsky R., Lampe J.W., Gao D.L., Ray R.M., Thomas D.B. (2007). Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1090-1097.

Shearer G.C., Pottala J. V., Spertus J.A., Harris W.S. (2009). Red Blood cell fatty acid patterns and acute coronary syndrome. *Fatty Acids and ACS Status*, 4, 1-8.

Sigma-Aldrich Chemical Co.website: www.sigmaaldrich.com/, consultado em Agosto de 2014.

Silva J.M., Zini C.A. (2011).Aplicação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente com microdetector de captura de elétrons para determinação de agrotóxicos em sedimentos. *Química Nova*, 34, 962-967.

Simpson H.C.R., Barker K., Carter R.D., Cassels E., Mann J.I. (1982). Low dietary intake of linoleic acid predisposes to myocardial infarction. *British Medical Journal*, 285, 683-684.

Smith. T. G. (2006). Red blood cells. *Basic science*, 25, 57-60.

Sun Q., Ma J., Campos H., Hankinson S. E., Hu F. B. (2007) Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86, 74–81.

Takeshi S., Maeda N., Kazunori K. (1990). Erythrocyte rheology. *Oncology/ Hematology*, 10, 9-38

Teixeira C. (2011). *Apontamentos teóricos de Anatomo-Histo-Fisiologia I*, Bragança, Portugal.

Tiemeier H., Tuijl H.R.V., Hofman A., Kiliaan A.J., Breteler M. (2003). Plasma fatty acid composition and depression are associated in the elderly: the Rotterdam Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 40-6.

Tjonneland A., Overvad K., Thorling E., Ewertz M. (1993). Adipose tissue fatty acids as biomarkers of dietary exposure in Danish men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57,629-633.

Troisi R., Willet W.C., Weiss S.T. (1992). *Trans*-fatty intake in relation to serum lipid concentrations in adult men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 56, 1019-1024.

Turatii J.M., Gomes R.A.R., Athié I. (2002). *Lipídeos: Aspectos funcionais e novas tendências*. Campinas, 40, 78.

Vanek C., Connor W.E. (2007). Do n-3 fatty acids prevent osteoporosis? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 647-648.

Volker D. H., Garg M. L., Wildman R.E.C. (2000). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis. In *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, Ed. CRC Press: Boca Raton, Florida.

Yu D.X., Sun Q., Ye X.W., Pan A., Zong G., Zhou Y. H., Li H.X., Hu F.B., Lin X. (2012). Erythrocyte trans-fatty acids, type 2 diabetes and cardiovascular risk factors in middle-aged and older Chinese individuals. *Diabetologia*, 55, 2954 – 2962.

Zurier B. (1991). Essential fatty acids and inflammation. *Annals of Rheumatic Disease*, 50, 745-746.