

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Derivatização e análise de ácidos carboxílicos de cadeia longa por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência induzida por laser

Carlos Eduardo Rodrigues

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre, março de 2018

Agradecimentos

À minha esposa, Patrícia, pelo amor, compreensão e carinho.

Ao meu filho, Martin, que chegou em 2017, a quem quero ser um exemplo.

Aos colegas do Tribunal Regional do Trabalho da 4ª Região, Alexandre, Cristiano, Edison, Jefferson e Jorge pelo total apoio durante todo o mestrado.

Às colegas Marina Tonial e Laura Schaefer pela ajuda fundamental durante os últimos dois anos.

Ao Dr. Tarso Kist pela troca de conhecimento, amizade e auxílio durante o projeto.

Ao Dr. Giancarlo Pasquali, por sua orientação, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

À Dr^a Viviani Ruffo pela parceria e apoio nos projetos do Laboratório de Métodos.

À minha mãe, Leda e aos meus irmãos Pablo e Rodrigo pelos conselhos.

Ao PPGBCM e ao CBiot, pela excelência no ensino.

Aos professores Arthur Fett Neto e Fabiana Horn por fazerem parte da minha Comissão de Acompanhamento.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos colegas do PPGBCM, pela amizade e parceria que permanecerão para sempre.

Conteúdo

Resumo.....	4
Abstract	5
Lista de figuras	6
Lista de abreviaturas	7
Introdução	9
1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	9
1.2 Ácidos carboxílicos.....	12
1.3 Ácidos graxos (óleos e gorduras)	14
1.3.1 Nomenclatura dos ácidos graxos.....	16
1.4 Métodos de extração de óleos	20
1.4.1 Prensagem mecânica	20
1.4.2 Soxhlet e Soxtec.....	21
1.4.3 Fluido supercrítico.....	23
1.5 Hidrólise enzimática.....	25
1.5.1 Enzima Lipozyme TL IM (TL de <i>Thermomyces lanuginosus</i>)	26
1.6 Importância da estrutura das moléculas na absorção e fluorescência dos compostos.....	29
1.6.1 Absorção.....	29
1.6.2 Lei de Beer-Lambert	32
1.6.3 Fluorescência.....	34
1.6.4 Fluorescência induzida por laser	36
1.7 Derivatização e análise de biomoléculas.....	38
1.7.1 Derivatização de ácidos graxos	39
1.7.2 Limitações das técnicas sensíveis tradicionais	48
2 Objetivos	49
2.1 Objetivo geral.....	49
2.2 Objetivos específicos.....	49
3 Capítulo I.....	50
Manuscrito submetido ao periódico <i>Journal of Chromatography B</i> .	
4 Conclusões/perspectivas.....	74
5 Referências bibliográficas	76
6 CURRICULUM VITAE	84

Resumo

O perfil de ácidos carboxílicos, incluindo os ácidos graxos de cadeia longa, é um parâmetro importante em muitas disciplinas voltadas à saúde humana, à indústria alimentícia, ao estudo da expressão gênica em tecidos vegetais e muitos outros. Além disso, em muitas amostras biológicas, os ácidos graxos de cadeia longa ocorrem em baixas concentrações. Neste trabalho, o reagente 3-[4-(bromometil)fenil]-7-(dietilamino)cumarina (MPAC-Br) foi utilizado como reagente de derivatização para a análise de ácidos carboxílicos numa variedade de amostras. As reações de derivatização são sempre uma questão de preocupação nas análises de rotina, pois são vistas como uma etapa crítica e uma fonte de erros na química analítica. Algumas propriedades deste reagente foram estudadas no presente trabalho, incluindo a robustez da reação de derivatização, a estabilidade dos derivatizados, os limites de detecção e a repetibilidade dos resultados. A versão otimizada do protocolo foi aplicada para determinar o conteúdo e perfis de ácidos graxos e ácidos graxos de cadeia longa em oito fontes de óleos e gorduras nas quais os resultados corresponderam ao que se encontra na literatura. O carbonato de propileno (CP) foi utilizado pela primeira vez como o principal solvente de derivatização para ácidos graxos. Os desvios padrões residuais (%) dos fatores de resposta relativos das corridas cromatográficas dos produtos das cinco reações de derivatização foram menores quando o CP foi utilizado (intervalo de 0,6 a 16,7%) em comparação com acetonitrila. A reação de derivatização com a etiqueta fluorescente proporcionou limites de detecção para os ácidos graxos na faixa de 0,68 a 2,87 nmol.L⁻¹, o que representou um ganho considerável quando comparado aos métodos de detecção direta por absorção. O método proposto mostrou-se confiável, robusto, rápido e conveniente para a análise de ácidos graxos e ácidos graxos de cadeia longa.

Abstract

The knowledge of fatty acid profiles, including long chain fatty acids, is an important parameter in many disciplines dedicated to human health, food sciences, the study of gene expression in plant tissues and many others. Moreover, in many biological samples, long chain fatty acids occur at low concentration. The 3-[4-(bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino)coumarin (MPAC-Br) reagent has been used as a derivatizing reagent for the analysis of carboxylic acids in a variety of samples. Derivatization reactions are always a matter of concern in routine analyses, because they are seen as a critical step and a source of errors in analytical chemistry. Some properties of this reagent were studied in the present work, including the robustness of the derivatization reaction, the stability of the derivatives, the limits of detection and repeatability of the results. The optimized version of the protocol was applied to determine the content and profiles of fatty acids and long chain fatty acids in eight sources of oils and fats in which the results corresponded to what is found in the literature. Propylene carbonate (PC) was used for the first time as major derivatization solvent for fatty acids. The residual standard deviations (%) of the relative response factors of chromatographic runs of the products of the five derivatization reactions were lower when PC was used (range of 0.6 to 16.7%) compared to acetonitrile. The fluorescence derivatization reaction provide detection limits for fatty acids in the range of 0.68 to 2.87 nmol L⁻¹, which represented a considerable gain when compared to direct absorption detection methods. The proposed method proved to be reliable, robust, fast and convenient for the analysis of fatty acids and long chain fatty acids.

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura básica dos ácidos carboxílicos.....	13
Figura 2. Triglicerídeo formado da combinação de três moléculas de ácido esteárico e glicerol. ...	14
Figura 3. Estrutura básica de um ácido graxo	15
Figura 4. Estrutura representando o dímero de ácido etanoico formado quando misturado a um solvente orgânico	16
Figura 5. Estrutura e sistemática de nomenclatura de ácidos graxos	17
Figura 6. Exemplo de prensa mecânica utilizada na extração de óleos de sementes	20
Figura 7. Sistema de extração de Soxhlet.....	22
Figura 8. Sistema de extração automatizado Soxtec	22
Figura 9. Diagrama de fases.....	24
Figura 10. Esquema representando as condições de hidrólise de triglicerídeos.....	28
Figura 11. Transições e energias relativas dos orbitais mais comumente observados em moléculas orgânicas	29
Figura 12. Ilustração esquemática sobre a lei de Beer-Lambert	33
Figura 13. Diagrama de Jablonski.....	35
Figura 14. Espectro de absorção e emissão da rodamina 6G	36
Figura 15. Principais tipos de reagentes fluorescentes utilizados na derivatização de ácidos carboxílicos	41
Figura 16. Estrutura básica da cumarina	42
Figura 17. Reagentes derivatizantes do tipo bromoalquil que têm a cumarina como estrutura básica	43
Figura 18. Reação de derivatização de MPAC-Br com ácidos carboxílicos.....	45

Lista de abreviaturas

18-crown-6	1,4,7,10,13,16-Hexaoxaciclooctadecano
AA	Ácido araquidônico (do inglês, <i>arachidonic acid</i>)
ACN	Acetonitrila
ALA	Ácido α -linolênico (do inglês, <i>α-linolenic acid</i>)
APD	Fotodiodo de avalanche (do inglês, <i>avalanche photodiode</i>)
Br-AMC	3-Bromoacetil-7-metoxicumarina
Br-AMDC	3-Bromoacetil-6,7-metilenodioxicumarina
Br-DMC	4-Bromometil-6,7-dimetoxicumarina
Br-DMEQ	3-Bromometil-6,7-dimetóxi-1-metil-2(1 <i>H</i>)-quinoxalinona
Br-MAC	4-Bromometil-7-acetoxicumarina
Br-MDC	4-Bromometil-6,7-metilenodioxicumarina
Br-MMC	4-Bromometil-7-metoxicourmarina
Br-MMEQ	3-Bromometil-6,7-metilenedióxi-1-metil-2(1 <i>H</i>)-quinoxalinona
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada (do inglês, <i>Coupled Charged Device</i>)
CE	Eletroforese Capilar (do inglês, <i>Capillary Electrophoresis</i>)
DHA	Ácido docosahexaenoico (do inglês, <i>docosahexaenoic acid</i>)
DHGLA	Ácido dihomo- γ -linolênico (do inglês, <i>dihomo-γ-linolenic acid</i>)
DPA-3	Ácido docosapentanoico (n-3) (do inglês, <i>docosapentaenoic acid</i>)
DPA-6	Ácido docosapentanoico (n-6)
EPA	Ácido eicosapentanoico (do inglês, <i>eicosapentaenoic acid</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês, <i>Gas Chromatography</i>)
GLA	Ácido γ -linolênico (do inglês, <i>γ-linolenic acid</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LA	Ácido linoleico (do inglês, <i>linoleic acid</i>)
LCFA	Ácido Carboxílico de Cadeia Longa (do inglês, <i>Long Chain Fatty Acid</i>)
LIF	Fluorescência Induzida por Laser (do inglês, <i>Laser Induced Fluorescence</i>)
MeOH	Metanol
mmol.L ⁻¹	Milimol por litro
MPAC-Br	3-[4-(Bromometil)fenil]-7-(dietilamino)coumarina
MS	Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>)
NA	Ácido nervônico (do inglês, <i>nervonic acid</i>)
NADPH	Diidronicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
nmol.L ⁻¹	Nanomol por litro
OA	Ácido oleico (do inglês, <i>oleic acid</i>)
PA	Ácido palmítico (do inglês, <i>palmitic acid</i>)
PMT	Tubo fotomultiplicador (do inglês, <i>photomultiplier tube</i>)
POA	Ácido palmitoleico (do inglês, <i>palmitoleic acid</i>)
SA	Ácido esteárico (do inglês, <i>stearic acid</i>)

TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
VA	Ácido vacênico (do inglês, <i>vaccenic acid</i>)
VLCFA	Ácido Carboxílico de Cadeia Muito Longa (do inglês, <i>Very Long Chain Fatty Acid</i>)
λ	Comprimento de onda
$\mu\text{mol.L}^{-1}$	Micromol por litro

Introdução

1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O termo cromatografia é atribuído ao botânico italiano de descendência russa, Michael Semenovich Tswett (COLLINS, 2009a) que, em parte de seu estudo do primeiro doutorado em Genebra, estudou a importância da clorofila na assimilação da energia solar pela planta. Em um segundo doutorado, em São Petersburgo, na Rússia, Tswett perseguiu insistentemente maneiras de separar extratos de plantas que continham clorofila, pois julgava que havia uma mistura de diversos componentes nesses pigmentos. Em 1906, publicou dois trabalhos sobre a separação dos extratos com éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), o que levou à separação dos pigmentos em bandas coloridas, o qual chamou de cromatografia (*chrom* = cor; *graphie* = escrita). No entanto, enfatizou que o processo não era dependente de cor, mas das interações das substâncias. Além do termo cromatografia (para denominar o processo que estava ocorrendo), Tswett instituiu também o termo cromatograma, para descrever um desenho das bandas separadas da coluna (ETTRE & SAKODYNSKII, 1993; COLLINS, 2009a). A cromatografia permaneceu negligenciada até meados dos anos 1920, pois as descobertas de Tswett sofreram resistência dos químicos da época por ele ser um botânico e também porque o livro descrevendo seus experimentos com a cromatografia foi escrito em russo, língua pouco acessível à maioria dos pesquisadores da época. Quando foi redescoberta, diversos trabalhos permitiram o grande avanço tecnológico da técnica (DEGANI *et al.*, 1998; PACHECO *et al.*, 2015). Considerados os "inventores" da cromatografia moderna, Martin e Synge descreveram detalhadamente a nova técnica na separação de monoaminoácidos de hidrolisados de

proteínas. Estes pesquisadores determinaram que as separações dos solutos dependiam dos coeficientes de partição entre duas fases líquidas diferentes e não da adsorção na fase sólida; criaram o conceito de “prato teórico”, comparando-o aos pratos das colunas de destilação fracionada; inovaram ao utilizar uma solução indicadora na fase aquosa para visualizar os aminoácidos como bandas coloridas no cromatograma (MARTIN & SYNGE, 1941). Por esse trabalho, os pesquisadores foram agraciados com o prêmio Nobel de química de 1952 pelo desenvolvimento da “cromatografia de partição” (COLLINS, 2009b). A partir desse trabalho, sugeriram que também poderia ser utilizado um gás como fase móvel, que seria forçado por uma coluna com partículas impregnadas com um líquido não-volátil, estabelecendo, assim, as bases para os posteriores estudos sobre cromatografia gasosa (PACHECO *et al.*, 2015).

Em 1941, Tiselius publicou um artigo descrevendo um novo instrumento para a análise de adsorção de Tswett, no qual incorporava uma cubeta para a leitura óptica acoplada ao fluxo do eluente da coluna cromatográfica, tornando possível a análise qualitativa e quantitativa não apenas de compostos coloridos como também de compostos incolores (TISELIUS, 1941). Tiselius ainda desenvolveu outros avanços na técnica cromatográfica, destacando-se a “cromatografia por deslocamento”. Nela, as substâncias a serem separadas são colocadas em pequeno volume no topo da coluna (adsorvidas) e um solvente com maior capacidade de adsorção que o analito é passado pela coluna desorvendo e eluindo o analito com o fluxo do solvente (PACHECO *et al.*, 2015). Em 1948, Moore e Stein criaram um método de análise de aminoácidos por cromatografia, aprimorando a técnica de derivatização com ninhidrina (MOORE & STEIN, 1948) e, finalmente, em 1958, com a colaboração de Daniel Spackman, apresentaram o primeiro cromatógrafo líquido automático, com eluição por gradiente e sistema de derivatização

pós-coluna para a análise de aminoácidos (SPACKMAN, STEIN & MOORE, 1958). Moore e Stein, juntamente com Christian B. Anfinsen, viriam a ganhar o prêmio Nobel de química de 1972 pela elucidação da sequência de aminoácidos e da estrutura espacial da enzima ribonuclease (PACHECO *et al.*, 2015).

Após esses trabalhos fundamentais, a CLAE passou por diversas inovações tecnológicas que culminaram com os modernos cromatógrafos atuais, com os diversos tipos de colunas, sistemas de bombeamento de solventes e diferentes sistemas de detecção, tornando-se um dos métodos analíticos mais utilizados no mundo para fins qualitativos e quantitativos. A versatilidade da técnica tornou-a referência em campos como o da indústria farmacêutica, análises clínicas, análises de alimentos, análises ambientais, análise de combustíveis, pesquisas em bioquímica e muitas outras áreas (TONHI *et al.*, 2002). As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, entre outras. Dentro da CLAE, estima-se que mais de 90% dos laboratórios de análise espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método que aplica a modalidade de CLAE em fase reversa (CLAE-FR - ou RP-HPLC, do inglês *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*; SNYDER & KIRKLAND, 1979). A CLAE-FR possui diversas vantagens quando comparada à CLAE de fase normal (que utiliza solventes como clorofórmio, diclorometano, tetrahidrofurano, etc), como o uso de fases móveis de menor toxicidade e de menor custo como metanol, acetonitrila e água; possibilidade de trabalhar com tampões aquosos em diversas faixas de concentração e pH, fundamentais para o estudo de componentes biológicos; fases estacionárias estáveis, de muitos tipos diferentes e que possibilitam rápido equilíbrio entre as análises; facilidade de utilizar eluição em gradiente; boa reprodutibilidade dos tempos de retenção e maior rapidez

nas análises; são muito empregadas na separação de compostos de diferentes polaridades, massas molares e grupos funcionais (TONHI *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de novas metodologias para a análise dos mais diversos compostos, através da técnica de CLAE, continuam sendo publicadas, contribuindo com as pesquisas no meio científico e para a sociedade como um todo. Entretanto, diversos compostos ainda necessitam ter as metodologias de detecção aprimoradas, como é o caso de várias classes de ácidos carboxílicos, em especial os ácidos graxos de cadeias lineares médias e longas (6 a 10 e 12 a 22 carbonos, respectivamente), sobretudo os insaturados.

1.2 Ácidos carboxílicos

Os ácidos carboxílicos são compostos do tipo RCOOH e constituem uma das mais frequentes funções orgânicas encontrados na natureza. Incontáveis produtos naturais são ácidos carboxílicos ou derivados deles. Alguns ácidos carboxílicos como o ácido acético são conhecidos há séculos. Outros, como as prostaglandinas, poderosas reguladoras de diversos processos biológicos, eram desconhecidos até recentemente (CAREY, 2000). Os ácidos carboxílicos são compostos orgânicos que contêm o grupo carboxil ligado a um grupo alquil ou aril (Figura 1). O grupo carboxil ocorre em um grande número de compostos de interesse na forma de ésteres de glicerol (triglicerídeos) em óleos e gorduras (MOLNÁR-PERL, 2000), como metabólitos celulares (FERDINANDUSSE *et al.*, 2003), em alguns produtos farmacêuticos (YATES *et al.*, 2014), como biomarcadores relacionados à saúde humana (LEE *et al.*, 2014; FERDINANDUSSE *et al.*, 2016), na agricultura (contaminantes ambientais, indicadores de saúde animal, fitormônios; NUMATA *et al.*, 2014); na indústria química e alimentícia (aromatizantes, conservantes,

produtos e processos industriais, biocombustíveis; MOLNÁR-PERL, 2000; ONOREVOLI, 2012).

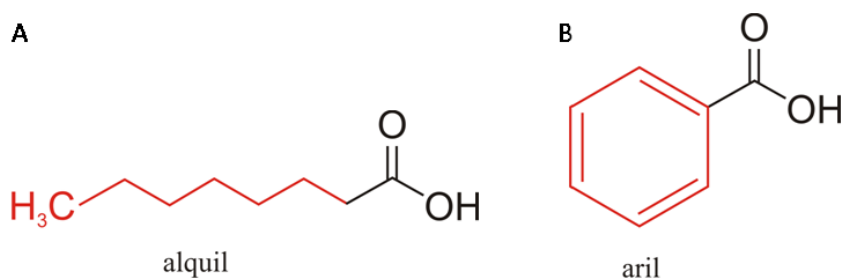


Figura 1. Estrutura básica dos ácidos carboxílicos: A, ácido octanoico; B, ácido benzoico. Outros tipos de estruturas e ramificações podem estar presentes nos grupos alquil e aril, aumentando a complexidade dos ácidos carboxílicos. Em preto a função carboxila.

Os ácidos carboxílicos de cadeia longa (de 12 a 22 carbonos) e de cadeia muito longa (acima de 22 carbonos), constantes nos mais diversos tipos de lipídeos (triglicerídeos, fosfolipídeos, esfingolipídeos, etc), estão envolvidos nos mais diversos processos químicos e metabólicos. São substratos de reserva energética, isolantes térmicos, componentes estruturais das membranas celulares, mensageiros químicos, precursores do metabolismo dos lipídeos, etc. (KREMMYDA *et al.*, 2011). Assim como os aminoácidos, boa parte dos ácidos essenciais não são produzidos pelo organismo (vertebrados) e devem ser adquiridos da dieta (DE OLIVEIRA CARVALHO *et al.*, 2003). Ácidos graxos poliinsaturados como o ácido docosaexaenoico (DHA), o ácido eicosapentaenoico (EPA), o ácido linolênico e o ácido linoleico são responsáveis pela formação dos eicosanoides como o ácido araquidônico, do qual derivam diversos outros metabólitos como as prostaglandinas, que são responsáveis por processos inflamatórios, sinalização hormonal, entre outros (TVRZICKA *et al.*, 2011). Em plantas, diversos ácidos carboxílicos estão envolvidos no metabolismo, na sinalização química, na proteção a estresses ambientais e outras inúmeras funções. A composição e o tipo de ácidos graxos constantes nos fosfolipídeos das membranas celulares têm papel fundamental na proteção contra os

extremos de temperatura (MURAKAMI *et al.*, 2000); a sinalização de defesa contra patógenos envolve diversos ácidos carboxílicos como os ácidos jasmônico, giberélico, abscísico, indolacético, etc (ERB *et al.*, 2012).

1.3 Ácidos graxos (óleos e gorduras)

Os ácidos graxos (ácidos carboxílicos de cadeia linear), saturados ou insaturados, variam de 2 a 36 átomos de carbono e são sintetizados no citoplasma a partir de precursores de 2 carbonos, com a ajuda da proteína carreadora de acilas, NADPH e acetil-CoA-carboxilase. A maioria dos tecidos de plantas e animais apresentam em suas estruturas ácidos graxos com 16 e 18 átomos de carbono como os ácidos palmítico, oleico, linoleico e esteárico. Em mamíferos, as estruturas variam entre 12 e 24 carbonos e podem ser saturadas (sem insaturações) ou ter de 1 a 6 insaturações; porém, cadeias menores que 14 e maiores que 22 carbonos são encontradas em menor quantidade. Lipídeos são classificados por uma propriedade física: sua solubilidade em solventes não-polares (CAREY, 2000). Circulam no sangue na forma de lipoproteínas, que são compostas de colesterol ésteres, triacilgliceróis (Figura 2) e fosfolipídeos (TVRZICKA *et al.*, 2011).

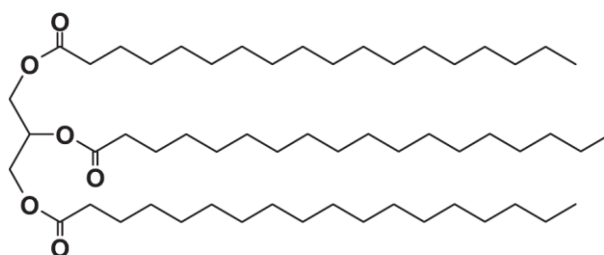


Figura 2. Triglicerídeo formado da combinação de três moléculas de ácido esteárico e glicerol.

Existe um grande número de compostos orgânicos que possuem ligações do tipo carbono-hidrogênio (C-H), as quais são fracamente polares, onde a simetria formada em volta dos átomos de carbono resulta em momentos de dipolo iguais a zero ou próximos

dele. Nesse grupo estão incluídos os hidrocarbonetos saturados de cadeia simples, que possuem somente ligações simples carbono-carbono (C-C). As forças de dispersão de London, que mantêm as moléculas unidas, aumentam com o crescimento do tamanho da cadeia alifática, o que geralmente leva a um decréscimo na solubilidade (MARTINS *et al.*, 2013). Os ácidos carboxílicos são compostos polares, porém o tamanho da cadeia e a quantidade de insaturações afetam a sua solubilidade. Ácidos carboxílicos com até quatro átomos de carbono são completamente miscíveis em água, enquanto que para os ácidos carboxílicos maiores, a solubilidade decresce porque a cadeia carbônica se torna a parte mais significativa da molécula (MARTINS *et al.*, 2013; Figura 3).

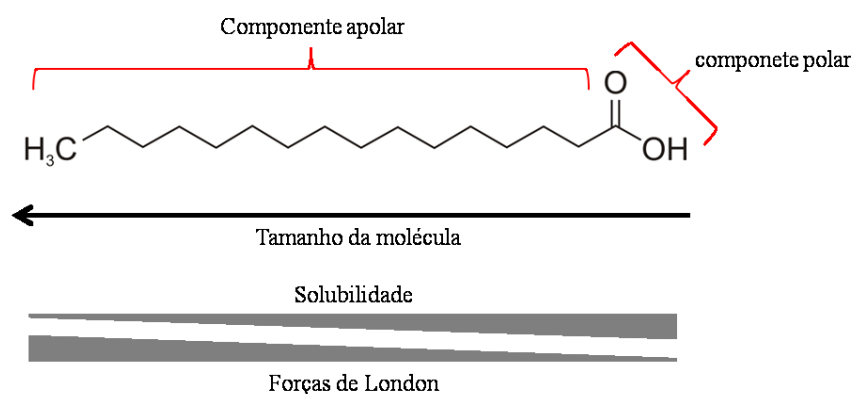


Figura 3. Estrutura básica de um ácido graxo. A seta preta indica o sentido do aumento da cadeia carbônica. Barras cinza indicam a relação entre solubilidade e forças de London com relação ao tamanho da cadeia. No exemplo, ácido palmítico.

Os ácidos carboxílicos também são relativamente solúveis em solventes apolares por que se dissolvem com dímeros (Figura 4). O tamanho e o grau de insaturações nos ácidos graxos também influencia seu ponto de fusão (Tabela 1). Essa propriedade é importante para a fluidez e a manutenção da estrutura das membranas celulares. Por exemplo, plantas de ambientes muito quentes têm predominantemente mais ácidos graxos de cadeia saturada compondo os fosfolípídeos de suas membranas celulares, uma vez que o ponto de fusão destes é mais elevado, enquanto plantas de ambientes muito frios têm a

predominância de ácidos graxos insaturados, que possuem ponto de fusão mais baixo (MURAKAMI *et al.*, 2000).

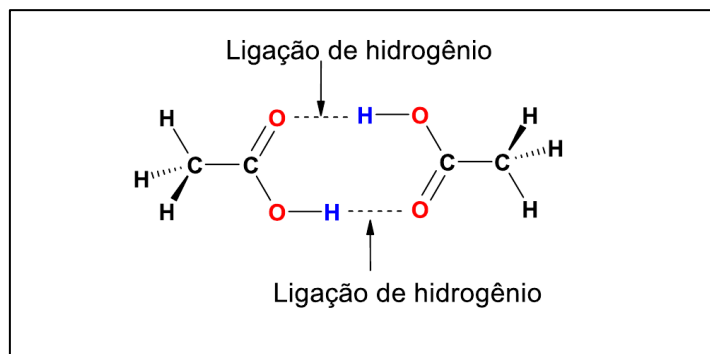


Figura 4. Estrutura representando o dímero de ácido etanoico formado quando misturado a um solvente orgânico. Adaptado de MARTINS *et al.* (2013).

1.3.1 Nomenclatura dos ácidos graxos

Os ácidos graxos têm a típica estrutura RCOOH, com uma cadeia hidrocarbonada (R) e uma carboxila inicial (que dá nome à função). Possuem nome sistemático e nome comum (por exemplo, hexadecanoico e palmítico). Eles também têm uma fórmula sistemática em notação curta, **CN:p n-x**, onde CN representa o número de carbonos; **p**, o número de duplas ligações; **x**, a posição da primeira dupla ligação a partir do último carbono, **n**. Por exemplo, a notação curta para o ácido α -linolênico (ácido *cis, cis, cis*-9,12,15-octadecatienoico) é **18:3n-3**, já que possui 18 carbonos, 3 ligações duplas, com a primeira delas no terceiro carbono a partir do carbono terminal (Figura 5).

Na Tabela 1 são mostrados os ácidos graxos mais relevantes em vertebrados e, na Tabela 2, a composição percentual de ácidos graxos predominantes em sementes e frutos provenientes de várias plantas, a maioria utilizada na dieta humana, estão representados.

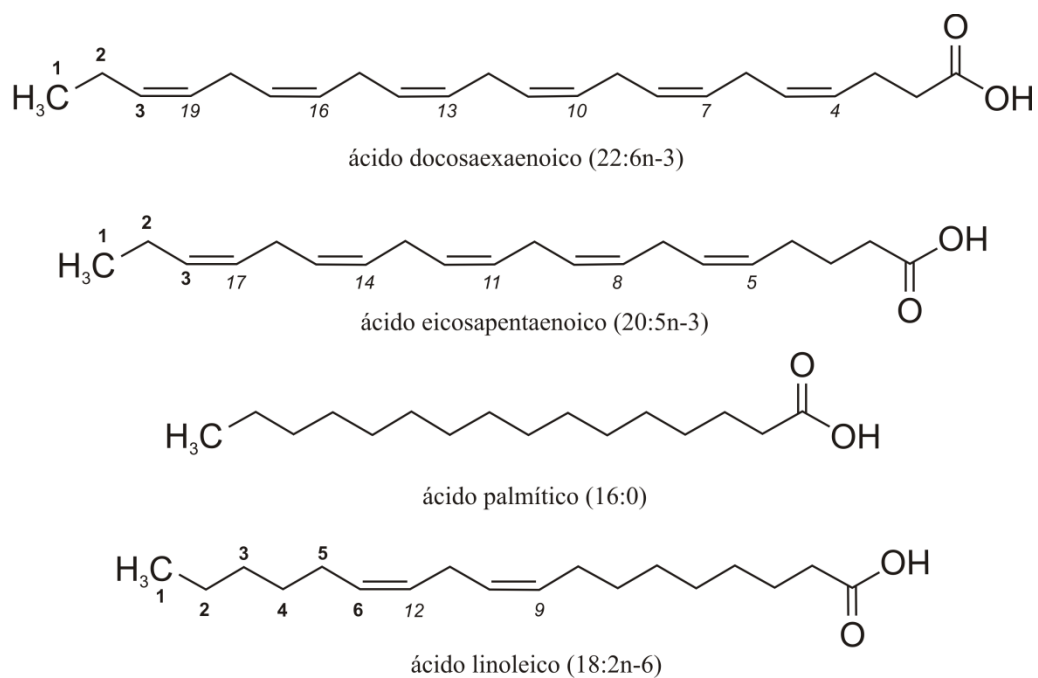


Figura 5. Estrutura e sistemática de nomenclatura de ácidos graxos. Números em negrito indicam a contagem dos carbonos e a posição das ligas duplas a partir do final metil; números em itálico indicam a posição das ligas duplas a partir do grupo funcional carboxila.

Tabela 1. Ácidos graxos relevantes no metabolismo de vertebrados. Modificado de TVRZICKA *et al.* (2011).

Notação	Nome sistemático (IUPAC)	Nome trivial	Abrev.	Ponto de Fusão médio (°C)
4:0	Ácido tetraoico	Ácido butírico		-1,4
6:0	Ácido hexanoico	Ácido caproico		0,5
8:0	Ácido octanoico	Ácido caprílico		16,5
10:0	Ácido decanoico	Ácido cáprico		31,4
12:0	Ácido dodecanoico	Ácido láurico		44,1
14:0	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	MA	54,1
14:1n-5	Ácido <i>cis</i> -9-tetradecanoico	Ácido miristoleico	MOA	
16:0	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	PA	62,5
16:1n-9	Ácido <i>cis</i> -7-hexadecenoico			
16:1n-7	Ácido <i>cis</i> -9-hexadecenoico	Ácido palmitoleico	POA	-0,5
18:0	Ácido esteárico	Ácido esteárico	SA	68,0
18:1n-9	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico	Ácido oleico	OA	16,3
18:1n-9	Ácido <i>trans</i> -9-octadecenoico	Ácido elaídico		44,5
18:1n-7	Ácido <i>cis</i> -11-octadecenoico	Ácido vacênico	VA	44,0
18:2n-6	Ácido <i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico	LA	-7,0
18:3n-6	Ácido <i>cis,cis,cis</i> -6,9,12-octadecatrienoico	Ácido γ -linolênico	GLA	
18:3n-3	Ácido <i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	Ácido α -linolênico	ALA	-14,0
18:4n-3	Ácido <i>cis,cis,cis,cis</i> -6,9,12-15-octadecatrienoico	Ácido estearidônico		
20:0	Ácido eicosanoico	Ácido araquídico	AA	75,0
20:1n-11	Ácido <i>cis</i> -9-eicosenoico	Ácido gondoleico		
20:1n-9	Ácido <i>cis</i> -11-eicosenoico	Ácido gondoico		
20:2n-6	Ácido <i>cis,cis</i> -11,14-eicosadienoico			
20:3n-9	Ácido <i>cis,cis,cis</i> -5,8,11-eicosatrienoico			
20:3n-6	Ácido <i>cis,cis,cis</i> -8,11,14-eicosatrienoico	Ácido di-homo- γ -linolênico	DHGLA	
20:4n-6	Ácido <i>cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	Ácido araquidônico		-49,5
20:5n-3	Ácido <i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14,17- eicosapentaenoico	Ácido timnodônico	EPA	-54,0
22:0	Ácido docosanoico	Ácido behênico		75,0
22:1n-11	Ácido <i>cis</i> -11-docosenoico	Ácido cetoleico		
22:1n-9	Ácido <i>cis</i> -13-docosenoico	Ácido erúico		33,8
22:2n-6	Ácido <i>cis,cis</i> -13,16-docosadienoico			
22:3n-6	Ácido <i>cis,cis,cis</i> -10,13,16-docosatrienoico			
22:4n-6	Ácido <i>cis,cis,cis,cis</i> -7,10,13,16-docosatetraenoico	Ácido adrênico		
22:5n-3	Ácido <i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoico		DPA-3	
22:5n-6	Ácido <i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -4,7,10,13,16-docosapentaenoico		DPA-6	
22:6n-3	Ácido <i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	Ácido clupadônico	DHA	-44,7
24:0	Ácido tetracosanoico	Ácido lignocérico		79,0
24:1n-9	Ácido <i>cis</i> -15-tetracosenoico	Ácido nervônico	NA	42,5
26:0	Ácido hexacosanoico	Ácido cerótico		87,5
28:0	Ácido octacosanoico	Ácido montênico		90,9
30:0	Ácido Melissico	Ácido melissico		93,5

Tabela 2. Composição (%) dos ácidos graxos em óleos de algumas sementes e frutos provenientes de vegetais. Em amarelo os ácidos presentes em maior quantidade.

Óleo ou gordura	Ácido Caproico	Ácido Caprílico	Ácido Cáprico	Ácido Láurico	Ácido Mirístico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Ácido Palmítico	Referência
	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1n-9	C18:0	C18:1n-9	C18:2n-6	C18:3n-3	C20:0	C20:1n-11	C22:0	C22:1n-9	C24:0	C24:1n-9	
	%																	
Abacate	0	0	0	0	0	24	8	1	53	14	0	0	0	0	0	0	0	TANGO <i>et al.</i> (2004)
Algodão	0	0	0	0	1	22	0	3	19	54	1	0	0	0	0	0	0	CODEX ALIMENTARIUS (1999)
Amêndoa	0	0	0	0	0	8	0	2	70	20	0	0	0	0	0	0	0	GUNSTONE <i>et al.</i> (2013)
Amendoim	0	0	0	0	0	11	0	3	53	28	0	2	1	2	0	1	0	GUNSTONE <i>et al.</i> (2013)
Araçá	0	0	0	0	0	6,5	0	4,2	7,5	81,5	0	0,3	0	0	0	0	0	KOBELNIK <i>et al.</i> (2012)
Arroz	0	0	0	0	0	15	0	2	43	40	0	0	0	0	0	0	0	KITTA <i>et al.</i> (2005)
Babaçu	0	6	4	45	17	9	0	3	13	3	0	0	0	0	0	0	0	GUNSTONE <i>et al.</i> (2013)
Canola	0	0	0	0	0	4	0	2	62	22	10	0	0	0	0	0	0	CODEX ALIMENTARIUS (1999)
Cártamo	0	0	0	0	0	7	0	2	13	78	0	0	0	0	0	0	0	CODEX ALIMENTARIUS (1999)
Chia	0	0	0	0	0	7	0	4	9	20	60	0	0	0	0	0	0	AYERZA (1995)
Coco	0	7	5	46,5	20,5	9	0	3	7	2	0	0	0	0	0	0	0	DAUQAN <i>et al.</i> (2011)
Crambe	0	0	0	0	0	2	0	0,9	19	8,8	4,7	0,9	3,6	2,1	57,2	0,8	0,1	ONOREVOLI (2012)
Gergelim	0	0	0	0	0	10	0	4	41	45	0	0	0	0	0	0	0	ANTONIASSI <i>et al.</i> (2013)
Girassol	0	0	0	0	0	7	0	5	19	68	1	0	0	0	0	0	0	CODEX ALIMENTARIUS (1999)
Linhaça	0	0	0	0	0	3	0	7	21	16	53	0	0	0	0	0	0	ZAMBIAZI <i>et al.</i> (2007)
Milho	0	0	0	0	0	11	0	2	28	58	1	0	0	0	0	0	0	CODEX ALIMENTARIUS (1999)
Oliva	0	0	0	0	0	13	0	3	74	9	1	0	0	0	0	0	0	GUNSTONE <i>et al.</i> (2013)
Soja	0	0	0	0	0	11	0	4	24	54	7	0	0	0	0	0	0	MARTIN <i>et al.</i> (2008)
Uva (Semente)	0	0	0	0	0	8	0	4	15	73	0	0	0	0	0	0	0	SHINAGAWA (2015)

1.4 Métodos de extração de óleos

1.4.1 Prensagem mecânica

A prensagem mecânica é o método mais simples e mais popular utilizado para extração de óleos de sementes (Figura 6). O método utiliza uma prensa mecânica simples que não necessita de mão-de-obra especializada para o seu manuseio. O processo não utiliza produtos químicos e o óleo das sementes é retirado simplesmente pela aplicação de pressão. O sistema pode ser instalado em pequenas propriedades rurais e a massa residual pode ser usada na alimentação de animais uma vez que é rica em proteínas e outros componentes, ou como adubo orgânico. Não é um método com alta eficiência, pois a capacidade de extração varia conforme as especificações da prensa e o tipo de amostra. Frações do óleo podem ficar retidas em proporções diferentes na torta residual (VADKE & SOSULKI, 1988; SINGH & BARGALE, 2000).



Figura 6. Exemplo de prensa mecânica utilizada na extração de óleos de sementes. Imagem disponível em ecirtec.com.br.

1.4.2 Soxhlet e Soxtec

O sistema básico de referência para os métodos automatizados de extração pode ser atribuído ao químico alemão Franz Von Soxhlet que, em 1879, criou um sistema de extração sólido/líquido. O sistema consiste de um suporte sólido (geralmente cartucho de celulose) onde a amostra é colocada acima de um balão com um solvente em ebulição (Figura 7). O solvente condensado goteja sobre a amostra contida no cartucho até que preencha todo o volume do cartucho. Ao chegar ao volume máximo, o solvente desce por uma alça de volta ao balão, arrastando os componentes solúveis da amostra novamente ao solvente em ebulição. Após vários ciclos ao longo de muitas horas (aproximadamente 24 h), o aparelho é desmontado e o solvente que contém o extrato é evaporado, deixando apenas o produto bruto extraído para posterior processamento. O procedimento de Soxhlet continua sendo a técnica mais amplamente utilizada na extração de óleos e gorduras com fins analíticos (ANDERSON, 2004; WU *et al.*, 2011) e o principal solvente empregado para extração de óleos vegetais é o n-hexano, com o sistema operando com temperaturas entre 60 e 70 °C. Esse solvente possui alta eficiência de extração, tem baixo custo, possui boa disponibilidade comercial, alta estabilidade, baixa corrosão de equipamentos e sabor e odor residual baixo nas tortas (SETH *et al.*, 2010; FONSECA, 2016). Uma versão automatizada do método, chamada Soxtec, já está disponível e com a promessa de extração bem mais rápida, por volta de 20-25% do tempo do Soxhlet convencional (ANDERSON, 2004), mas é mais indicada para volumes de processamento em escala industrial (como o refino de óleos para consumo humano, por exemplo), pois os equipamentos comerciais possuem alto custo (Figura 8).

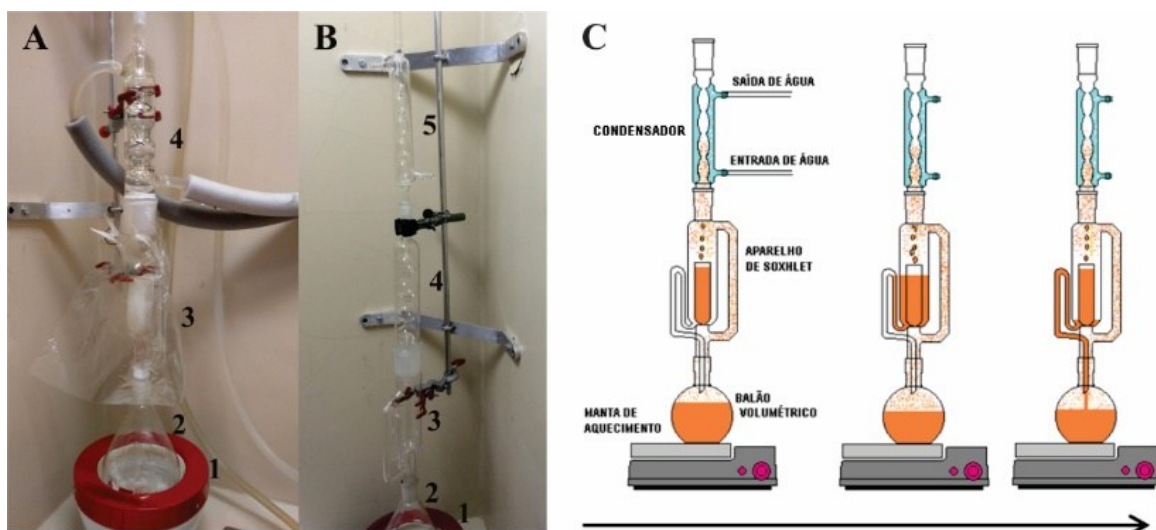


Figura 7. Sistema de extração de Soxhlet. Em A e B, sistema modificado: 1, manta aquecedora; 2, balão volumétrico; 3, aparelho de Soxhlet com cartucho para depósito da amostra; 4, condensador com circulação de óleo a 60 °C; 5, condensador com circulação de água à temperatura ambiente. Em C, ilustração do funcionamento do aparelho de Soxhlet. Figura 7C disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABN34AL/extracao-lipidios-alimentos>.



Figura 8. Sistema de extração automatizado Soxtec. Imagem disponível em: https://www.fossanalytics.com/pt-br/products/soxtec_labtec-st-255.

1.4.3 Fluido supercrítico

Acima de uma determinada temperatura e pressão, os gases podem se comportar tanto como gases quanto como líquidos (Figura 9). O alto poder de solvatação de um líquido é combinado com a baixa viscosidade de um gás (CARRILHO *et al.*, 2001). Isso oferece grande vantagem na extração dos mais variados compostos alimentícios e farmacêuticos. Enquanto os métodos tradicionais podem gerar resíduos indesejáveis e modificações nos componentes como a oxidação dos óleos durante a remoção dos solventes, o fluido supercrítico demanda menos processos de refinamento, resultando em menos alteração das características originais e alto rendimento. O gás mais utilizado no processo de extração por essa técnica é o dióxido de carbono (CO₂), pois possui baixa toxicidade, baixo custo, baixa reatividade, não é inflamável e possui uma ampla gama de propriedades do solvente em diferentes pressões e temperaturas (FRIEDRICH & PRYDE, 1984; DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006). Sua temperatura (31,04 °C) e pressão (73,8 bar) críticas permitem extrações em temperaturas suficientemente baixas de forma a não alterar as propriedades físicas e organolépticas da amostra (MAUL, WASICKY & BACCHI, 1996; LEO *et al.*, 2005). Porém, é um método que demanda mão-de-obra qualificada e grande investimento em equipamento, sendo mais aplicado em processos que necessitam de grandes volumes de extração como o refino de óleos comerciais, por exemplo.

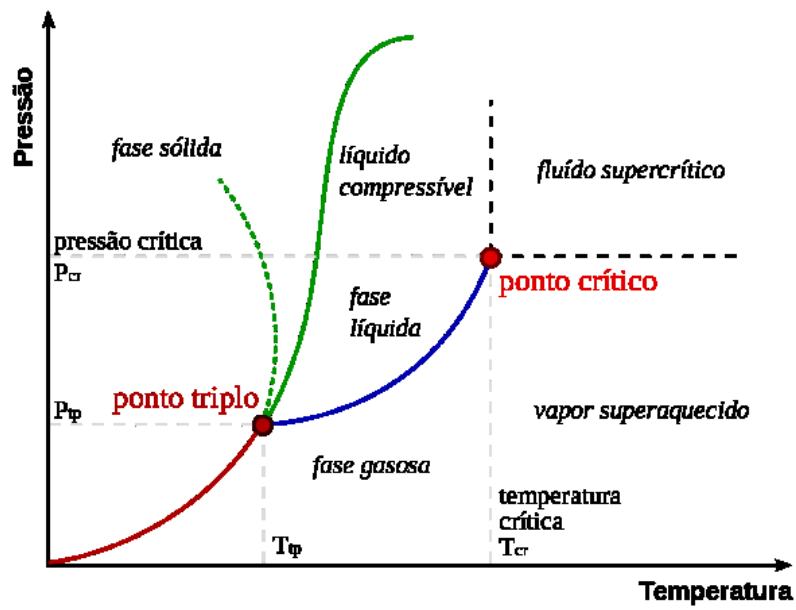


Figura 9. Diagrama de fases. No ponto crítico são exploradas as melhores características dos solventes de extração empregando fluido supercrítico. Imagem disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phase-diag-pt.svg>

1.5 Hidrólise enzimática

Nos últimos anos, a pesquisa de vias alternativas de hidrólise de triglicerídeos se intensificou, gerando um grande número de publicações que descrevem diversos tipos de enzimas capazes de hidrolisar triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol. Os ácidos graxos liberados são empregados na obtenção de outros tipos de ésteres, por exemplo na produção de biodiesel. (SANTIN *et al.*, 2014).

Concebidas pela natureza para efetuar a hidrólise de lipídios, as lipases podem, em condições de reação apropriadas, promover a formação de ésteres por intermédio da reação de ácidos e álcoois (esterificação) ou de ésteres com ácidos (acidólise), álcoois (alcoólise) ou outros ésteres (interesterificação). Comparado aos processos químicos já realizados em escala industrial, as reações enzimáticas ocorrem sob condições mais suaves (e ambientalmente mais corretas), embora possam levar mais tempo para se desenvolverem. A grande variedade e especificidade mostrada pelas enzimas permite a formação de derivados lipídicos que não são facilmente preparados por procedimentos laboratoriais convencionais (GUNSTONE, 1999; GUTIÉRREZ-AYESTA *et al.*, 2007; AVELAR *et al.*, 2013). O melhor processo industrial para a produção de grandes quantidades de ácidos graxos livres é o processo chamado Colgate-Emery, que requer temperatura de operação de 250 °C e pressão de 50 Bar. Nessas condições, reações indesejáveis como oxidação, desidratação e interesterificação dos triglicerídeos podem ocorrer, modificando a característica original de um determinado produto (ROONEY & WEATHERLEY, 2001; MURTY *et al.*, 2002; AVELAR *et al.*, 2013). A hidrólise alcalina, também chamada de saponificação, apesar de ser mais rápida, envolve pelo menos mais uma etapa na obtenção dos ácidos graxos livres e também a formação de produtos adicionais à reação, além de envolver altos custos em energia (MURTY *et al.*, 2002). A hidrólise é realizada

adicionando-se uma base (normalmente hidróxido de potássio - KOH) à fonte que contenha os triglicerídeos. Obtém-se o produto primário formado por glicerol e o sal de ácido graxo. Posteriormente, adiciona-se um ácido forte (normalmente ácido clorídrico – HCl) para promover a neutralização da mistura, resultando na formação do ácido graxo livre e cloreto de potássio (Figura 6-A; SALIMON *et al.*, 2011).

1.5.1 Enzima Lipozyme TL IM (TL de *Thermomyces lanuginosus*)

Recentemente, várias enzimas com capacidade de hidrólise de triglicerídeos têm sido comercializadas também na sua forma imobilizada, o que diminuiu drasticamente os custos de operação com esse tipo de enzima em processos de grande escala, uma vez que, após o processo de hidrólise, a enzima pode ser recuperada para ser novamente utilizada. A enzima Lipozyme TL IM (proveniente do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada em microesferas não-compressíveis de sílica gel) é uma entre várias enzimas disponíveis comercialmente e têm sido amplamente estudada nas mais diversas aplicações na indústria alimentícia, na produção de biodiesel, além de produtos de “química fina” (principalmente em processos químicos onde se deseja enantio e regioseletividade) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; RODRIGUES & AYUB, 2011; AKANBI *et al.*, 2013). A Lipozyme TL IM tem sido utilizada na hidrólise de diferentes óleos e gorduras para produzir ácidos graxos livres (Figura 10-B). Esta enzima possui atividade de 250 IUN g⁻¹ (IUN = unidade de interesterificação, do inglês *interesterification unit*) e é específica para as posições 1 e 3 do triglicerídeo e, portanto, a hidrólise do éster na posição 2 deve seguir um processo de migração do grupo acil para a posição 1 ou 3. Esse processo de migração é dependente de muitas variáveis que ainda vêm sendo estudadas, mas pode ser

controlado pela temperatura, pelo tipo de solvente empregado na hidrólise e pelo tempo de reação (RØNNE *et al.*, 2005; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A alta estabilidade da TL permite que ela seja usada também em meios com solvente orgânico e em combinação com outras lipases (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A inibição da atividade da enzima pode ocorrer com o aumento da quantidade de água e com o aumento no conteúdo de glicerol, os quais promovem a redução do contato da enzima na interface água-óleo. Um aspecto importante para minimizar esse efeito é o contínuo movimento pela agitação ou processos que envolvam o uso de ultrassom, os quais melhoram a dinâmica da superfície de contato da enzima com a fase oleosa que contém os triglicerídeos (BANKOVIC-ILIC *et al.*, 2012).

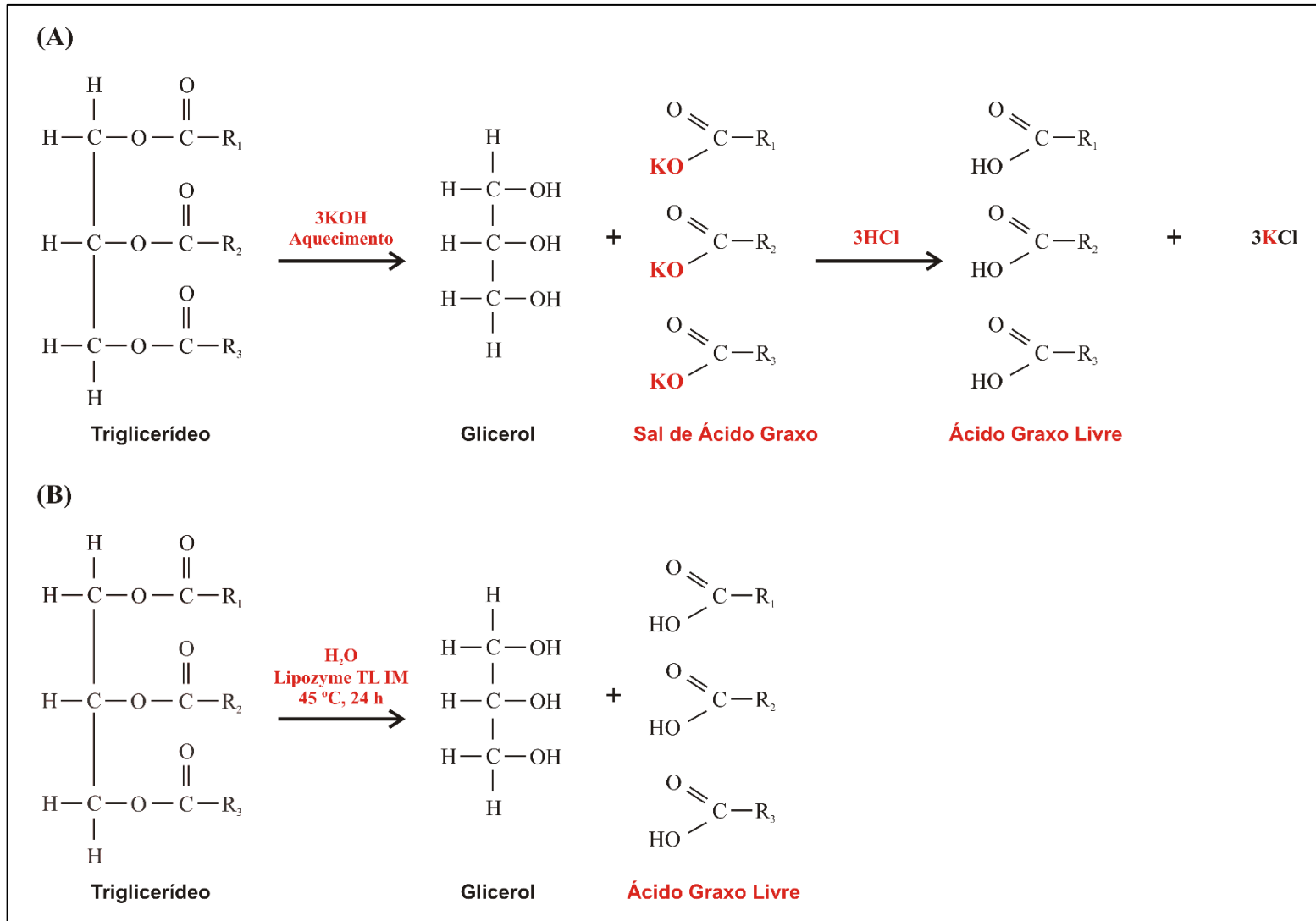


Figura 10. Esquema representando as condições de hidrólise de triglicerídeos. (A), hidrólise alcalina; (B), hidrólise enzimática com a enzima Lipozyme TL IM.

1.6 Importância da estrutura das moléculas na absorção e fluorescência dos compostos

1.6.1 Absorção

A grande maioria das análises em CLAE envolve a detecção de moléculas na faixa do UV-visível (λ 190-800 nm), sendo que o ultravioleta compreende a faixa de 190-400 nm e o visível a faixa de 400-800 nm. O fenômeno utilizado para a detecção das moléculas envolve as mudanças nos níveis de energia eletrônica decorrente da transferência de elétrons entre os orbitais moleculares (Figura 11).

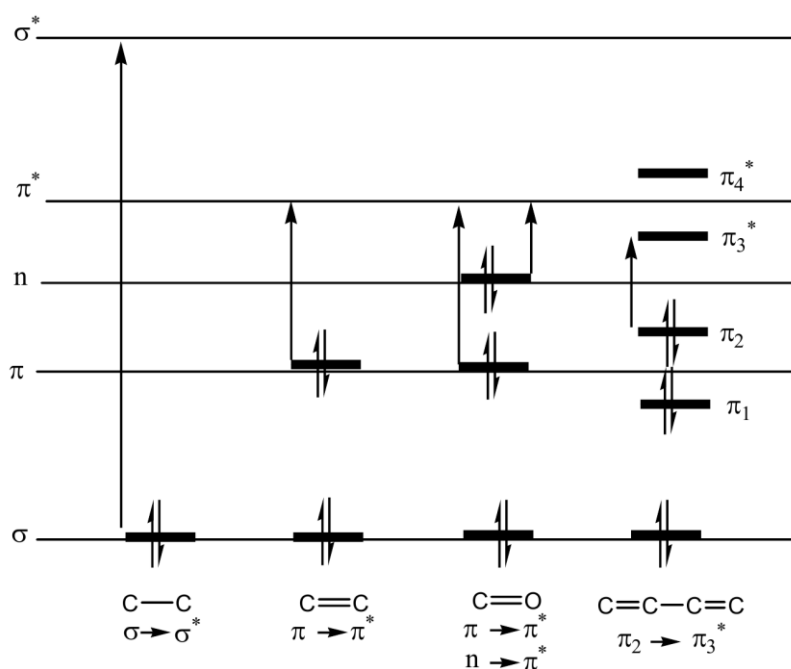


Figura 11. Transições e energias relativas dos orbitais mais comumente observados em moléculas orgânicas. A seta indica o nível crescente de energia. Adaptado de KUMAR (2006).

Hidrocarbonetos alifáticos saturados exibem apenas transições do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$.

Transições desse tipo são de alta energia e envolvem comprimentos de onda muito curtos

no UV (<150 nm) e estão fora da faixa de análise nos espectrofotômetros convencionais. Porém, dependendo dos grupos funcionais, as moléculas orgânicas podem sofrer várias transições possíveis que podem ser colocadas na ordem crescente de suas energias: $n \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \pi \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$ (KUMAR, 2006). Esses fenômenos e as energias envolvidas estão intimamente ligados à estrutura da molécula a ser analisada. O grupo de átomos que contém elétrons responsáveis pela absorção é chamado de cromóforo. Anéis aromáticos, ligações duplas, compostos de coordenação e as diversas combinações dessas estruturas, em posições específicas de cada molécula, influenciam na posição das bandas de absorção (Tabela 3; KLESSINGER & MICHL, 1995). Os trabalhos de Woodward, prêmio Nobel de química de 1965 (WOODWARD, 1941; WOODWARD & CLIFFORD, 1941), complementado pelo trabalho de Fieser e colegas (FIESER *et al.*, 1948) sugeriram regras empíricas para a predição da absorção de determinadas moléculas a partir das estruturas de dienos e polienos (regras de Woodward-Fieser), que seguem a expressão básica: $\lambda_{max} = \text{Valor básico} + \Sigma \text{contribuição dos substituintes} + \Sigma \text{outras contribuições}$. Essas regras foram mais tarde estendidas para outros dienos e polienos (Tabela 2). As regras de Woodward-Fieser podem ser expandidas para calcular o λ_{max} de outros compostos carbonílicos insaturados (Tabela 4).

Tabela 3. Regra de Woodward-Fieser. Contribuição na absorção promovida por novas ligações em dienos acíclicos, homoanulares e heteroanulares. Adaptado de KLESSINGER & MICHL (1995).

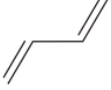

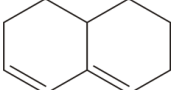
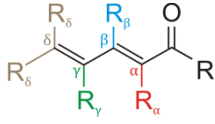
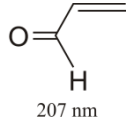
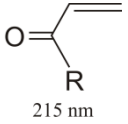
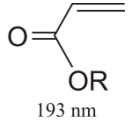
Estrutura química básica		
 Acíclico 217 nm	 Homoanular 253 nm	 Heteroanular 214 nm
Tipo de incremento		Contribuição no comprimento de onda de absorção (nm)
Conjugação de dupla ligação		+ 30
Dupla ligação exocíclica		+ 5
Grupo alquil, resíduo de anel		+5
Substituintes polares:		
O-acil		0
O-alkil (OCH ₃ , OCH ₂ CH ₃ , etc)		+6
S-alkil (SCH ₃ , SCH ₂ CH ₃ , etc)		+30
N(alkil) ₂ (CH ₃ NCH ₃ , CH ₃ CH ₂ NCH ₂ CH ₃ , etc)		+60
Cl		+5
Br		+5

Tabela 4. Regra de Woodward-Fieser aplicada a compostos carbonílicos insaturados. Modificado de KLESSINGER & MICHL (1995).

Estrutura química básica						
	 207 nm	 215 nm	 193 nm			
Tipo de incremento			Contribuição no comprimento de onda de absorção (nm)			
Conjugação de dupla ligação			+ 30			
Dupla ligação exocíclica			+ 5			
Componente homodieno			+39			
Tipo de substituinte			Posições			
			α	β	γ	δ
R			+10	+12	+18	+18
Cl			+15	+12		
Br			+25	+30		
OH			+35	+30		+50
OR			+35	+30	+17	+31
OAc			+6	+6	+6	+6
NR ₂				+95		

O conhecimento dessas regras na predição de absorção de compostos orgânicos é fundamental não apenas no entendimento de estruturas e reações químicas naturais, mas também na síntese de compostos orgânicos com propriedades cromóforas e fluoróforas.

É importante salientar que o fenômeno da absorção da radiação é influenciado também pelas interações com as moléculas do solvente. Ao tentar explicar o efeito do solvente no espectro de uma determinada molécula, é preciso avaliar a mudança na interação soluto-solvente após a excitação. Essa mudança pode envolver muitos fatores tais como ligações de hidrogênio, polarização, forças eletrostáticas e interações de transferência de carga (KLESSINGER & MICHL, 1995).

1.6.2 Lei de Beer-Lambert

Quanto maior o número de moléculas que absorvem a luz de um determinado comprimento de onda, maior “o grau” de absorção da radiação e maior será a intensidade do pico no espectro de absorção. Se houver apenas algumas moléculas que absorvam a radiação, a absorção total de energia será menor e, conseqüentemente, menor pico de intensidade será observado. Isso faz a base da lei de Beer-Lambert que afirma que a fração de radiação incidente absorvida é proporcional ao número de moléculas absorventes em seu caminho (KUMAR, 2006).

Quando a radiação passa por uma solução, a quantidade de luz absorvida ou transmitida é uma função exponencial da concentração molecular do soluto e, também, uma função do comprimento do caminho da radiação através da amostra.

Assim sendo,

$$\text{Log } I_0/I = \epsilon c l,$$

onde I_0 é a intensidade da luz incidente (ou a intensidade da luz passando por uma célula de referência); I é a intensidade da luz transmitida através da solução da amostra; c é a concentração do soluto em mol.L^{-1} ; l é o comprimento do caminho da amostra, em cm, e ϵ

é o coeficiente de absorção molar da substância cuja absorção de luz está sob investigação. É uma constante e é uma característica de uma determinada espécie absorvente (molécula ou íon) em um solvente particular a um determinado comprimento de onda. ϵ é numericamente igual à absorbância de uma solução de concentração molar de uma unidade ($c = 1 \text{ M}$) em uma célula de comprimento de uma unidade ($l = 1 \text{ cm}$) e as unidades de ϵ são **litro.mol⁻¹.cm⁻¹** (Figura 12). A razão I/I_0 é conhecida como transmitância T e o logaritmo do seu inverso, $\text{Log}(I_0/I)$, é conhecida como absorbância, A .

Portanto,

$$-\text{Log } I/I_0 = -\text{Log } T = \epsilon c l$$

e,

$$\text{Log } I_0/I = A = \epsilon c l$$

ou

$$A = \epsilon c l$$

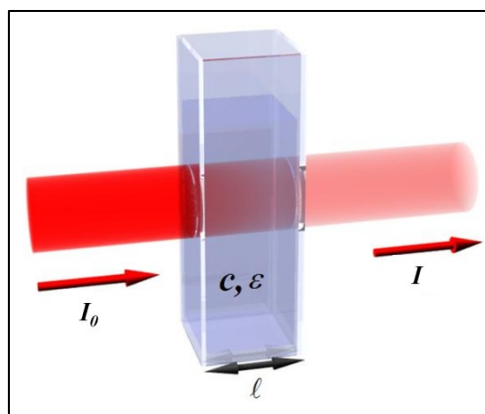


Figura 12. Ilustração esquemática sobre a lei de Beer-Lambert. Em vermelho um feixe de luz atravessando uma cubeta de referência (com 1 cm de caminho óptico). I_0 , luz incidente; I , luz transmitida; l , largura da cubeta. Modificado de Lima, S. (2011), disponível em: http://wikiciencias.casadasciencias.org/wiki/index.php/Lei_de_Lambert%E2%80%93Beer

1.6.3 Fluorescência

A luminescência é o fenômeno da emissão de luz de qualquer substância como consequência de um processo de excitação, retornando ao seu estado fundamental logo após a emissão. Existem vários fenômenos luminescentes, tais como: fluorescência, fosforescência, quimiluminescência, bioluminescência, termoluminescência, incandescência, eletroluminescência e outras (KLESSINGER & MICHL, 1995). Porém, no que diz respeito a fenômenos que envolvem a excitação de moléculas para a análise de biomoléculas, a fluorescência e a fosforescência se destacam. Fenomenologicamente, a fluorescência difere da fosforescência pelo tempo de vida, que é bem mais curto no primeiro, da ordem de nanossegundos (LAKOWICZ, 1999). Assim, a fluorescência é intrinsecamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência, competindo eficientemente com processos de desativação não-radiativos do estado excitado. Como consequência direta disso, é possível observar facilmente a fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução em muitos compostos, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico bastante simples (KLESSINGER & MICHL, 1995; LAKOWICZ, 1999).

A energia adquirida por uma molécula quando absorve um fóton faz com que um elétron seja promovido para um nível de energia eletrônica mais alto. O diagrama de Jablonski (Figura 13) permite ilustrar os principais processos fotofísicos radiativos e não-radiativos exibidos pelas moléculas orgânicas em solução.

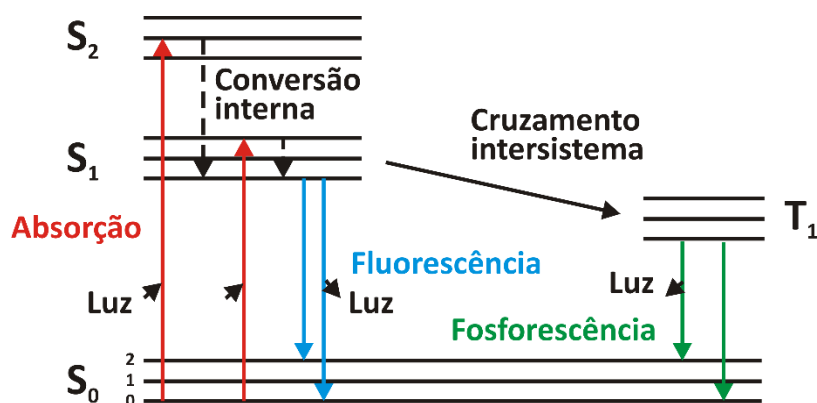


Figura 13. Diagrama de Jablonski. Os símbolos S₀, S₁, T₁ referem-se ao estado eletrônico de um fóton, com S₀ representando o estado fundamental, S₁ o primeiro estado de singleto excitado e T₁ o primeiro estado de tripleto excitado. As linhas horizontais representam os níveis vibratórios de cada estado eletrônico. As setas diretas indicam transições radiativas, e as setas tracejadas indicam transições não-radiativas. Modificado de LAKOWICZ (1999).

A absorção de um fóton no UV ou no visível por uma molécula produz um estado eletrônico excitado. A distribuição dos elétrons em torno dos núcleos muda, bem como as forças entre os núcleos atômicos de uma molécula. Como resultado, as moléculas em estados eletrônicos excitados geralmente possuem propriedades físicas e químicas muito diferentes do que no estado eletrônico fundamental. Examinando o diagrama de Jablonski, nota-se que a energia de emissão é menor que a energia de absorção, ou seja, a fluorescência normalmente ocorre em energias menores e, conseqüentemente, em comprimentos de onda maiores. Esse fenômeno foi primeiramente observado por G. G. Stokes. A diferença de energia entre a excitação e a emissão é observada de maneira universal para todas as moléculas fluorescentes em solução (Figura 14). Outra propriedade da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão pode ser observado para diferentes comprimentos de onda de excitação. O espectro de emissão de um fluoróforo é, na maioria dos casos, praticamente independente do comprimento de onda de excitação (LAKOWICZ, 1999).

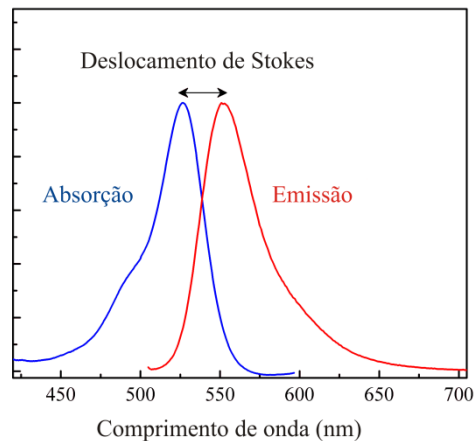


Figura 14. Espectro de absorção e emissão da rodamina 6G com deslocamento de Stokes de aproximadamente 25 nm em direção ao vermelho. Imagem de domínio público disponível em https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift.

O coeficiente de absorção molar, o rendimento quântico e o deslocamento de Stokes são talvez as mais importantes características de um fluoróforo. O rendimento quântico é a razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. Substâncias com um grande rendimento quântico, aproximando-se de 1, tais como alguns derivados da rodamina, apresentam um elevado brilho (produto do coeficiente de absorção molar pelo rendimento quântico). O deslocamento de Stokes é a diferença entre o máximo da banda de emissão e da banda de absorção situada mais à direita. Grandes deslocamentos de Stokes tornam mais fácil a tarefa de separar a radiação da fluorescência da radiação da excitação, aumentando assim a sensibilidade dos detectores ou a relação sinal-ruído (LAKOWICZ, 1999).

1.6.4 Fluorescência induzida por laser

A fluorescência de qualquer composto pode ser estimulada com os mais diversos tipos de fontes de excitação luminosa, tais como: lasers, LEDs, lâmpadas dicróicas, etc (SCOTT, 1996). O fator fundamental é fornecer energia suficiente para que ocorram as transições eletrônicas que resultem na fluorescência, a qual pode ser observada e detectada

pelos mais diversos tipos de detectores (PMT, APD e CCD, por exemplo), e até mesmo o olho humano (SCOTT, 1996; MEYER, 2004).

Até o final da década de 1990, as tecnologias que envolviam a análise de biomoléculas com o uso de LIF na faixa do visível eram bastante limitadas devido ao alto custo e baixa durabilidade dos lasers disponíveis com emissão em 488, 532 e 635 nm (MELANSON & LUCY, 2000). Apenas recentemente os lasers de diodo, que são mais compactos e duráveis, tornaram-se comercialmente disponíveis e cujos modos de emissão mais comuns são em 405, 445-465, 510-525, 635, 650-660 e 670 nm e vários outros no infravermelho.

O avanço na construção de novos tipos de lasers de diodo possibilitou operar com detectores de baixo custo (é possível construir detectores eficientes com valores inferiores a mil dólares), quando comparados aos detectores de absorção UV-Vis. A disponibilidade de lasers em faixas de comprimento de onda no violeta (405 nm) permitiu utilizar diversos fluoróforos muito interessantes nas reações de derivatização de moléculas (MELANSON & LUCY, 2000), possibilitando grande especificidade e melhorando, entre outros fatores, os limites de detecção e a sensibilidade nas análises. O uso da LIF permite obter limites de detecção, em concentração, de 1 a 5 ordens de magnitude maiores do que a absorção UV-Vis e a fluorescência induzida por lâmpadas convencionais, tornando-a ideal para análise de amostras ao nível de traços (TOYO'OKA, 1999).

1.7 Derivatização e análise de biomoléculas

Os compostos de importância biológica são muito difíceis de serem analisados por que geralmente ocorrem em matrizes bastante complexas (misturados com aminoácidos, álcoois, açúcares, ácidos carboxílicos, ésteres, lipídeos, etc). A escolha de um método adequado que forneça boa reprodutibilidade é essencial para obter resultados úteis (TOYO'OKA, 1999).

A derivatização é uma técnica muito usada em ciências da separação, tais como EC, CG, CLAE e outras. Vários reagentes foram desenvolvidos para aumentar a eficiência da separação, a seletividade e a sensibilidade. Devido ao desenvolvimento de vários tipos de instrumentos de detecção, como os detectores de UV-Vis, de fluorescência (FL), de quimioluminescência (QL) e os eletroquímicos (EQ), o uso da derivatização serve principalmente para melhorar as propriedades cromatográficas e a sensibilidade da detecção (TOYO'OKA, 1999).

Existem diversos tipos de reagentes derivatizantes e cujos máximos de absorção, em sua maioria, estão entre o violeta e o verde, mas também no UV-A, num extremo, e até no infravermelho, no outro extremo. As reações de derivatização são basicamente de dois tipos: fluorogênicas e de marcação (*labelling*). Nas reações fluorogênicas, o reagente de derivatização (fluoróforo) é uma molécula que não é naturalmente fluorescente e apenas após reagir com um grupo funcional específico de um analito de interesse forma um produto (reagente + analito) fluorescente. Nas reações do tipo marcação, o reagente de derivatização é naturalmente fluorescente, mas possui especificidade para reagir com o grupo funcional do analito de interesse, funcionando como uma etiqueta de marcação, permitindo detectar o analito no comprimento de onda do fluoróforo (TOYO'OKA, 2002).

As reações de derivatização normalmente são realizadas adicionando-se um excesso de 10 vezes do reagente de derivatização em relação ao total de moléculas do analito de interesse para garantir que todos eles tenham o acoplamento de um fluoróforo no local específico de ligação. Por esse motivo, reagentes de derivatização fluorogênicos são mais interessantes que os de marcação porque, em uma análise cromatográfica, por exemplo, não existem picos de excesso de reagente derivatizante que podem coeluir com os picos dos analitos, tornando a análise mais trabalhosa (TOYO'OKA, 2002).

1.7.1 Derivatização de ácidos graxos

A maior dificuldade na análise de ácidos graxos está no fato de eles possuírem poucos grupos cromóforos que facilitem a sua detecção direta por absorção ou fluorescência. Diversos reagentes de derivatização pré- e pós-coluna estão disponíveis para reforçar a sensibilidade e a seletividade na detecção dos ácidos graxos (LIMA & ABDALLA, 2002).

No entanto, um fator importante na escolha do reagente derivatizante envolve primeiramente a preparação da amostra antes de se realizar a reação de derivatização. Dependendo do tipo de fluoróforo a ser utilizado e o comprimento de onda que será utilizado na análise dos derivatizados, a amostra terá de ser submetida a um processo de purificação mais refinado (LIMA & ABDALLA, 2002). Nas análises onde se utilizam fluoróforos que absorvem/fluorescem nas regiões mais baixas do UV pode ocorrer a interferência de componentes presentes na amostra que não são alvos do derivatizante, mas que também absorvem e fluorescem naquele comprimento de onda. Nesse ponto, o uso da fluorescência na faixa do visível (acima de 400 nm) e principalmente no vermelho e infravermelho oferece diversas vantagens, pois nessa faixa muito poucos compostos

presentes na amostra podem interferir na análise, fazendo que o pré-tratamento da amostra seja menos trabalhoso, mantendo suas características originais e gerando resultados mais precisos (TOYO'OKA, 1999; 2002).

1.7.1.1 Derivatização de ácidos graxos e análise por fluorescência

A derivatização com reagentes fluorescentes é um procedimento interessante a ser aplicado em analitos que possuem baixos coeficientes de absorção molar como os ácidos graxos e, também, naqueles que ocorrem em concentrações muito baixas (TOYO'OKA, 1999; 2002). Existem disponíveis muitos novos detectores de luz (PMT, CCD, APD) que podem ser acoplados a equipamentos de CLAE e que tornam esses instrumentos mais acessíveis e confiáveis (SCOTT, 1996).

Diversos reagentes fluorescentes têm sido utilizados para a análise de ácidos graxos, resultando na detecção sensível e seletiva dos derivatizados, melhorando significativamente os limites de detecção quando comparados a análises diretas por absorção no UV e Vis, em que as concentrações detectadas raramente são inferiores a $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (MOLNÁR-PERL, 2000). Um bom fluoróforo deve possuir os seguintes requisitos: (I) a reação de derivatização deve ser quantitativa e ocorrer em condições brandas (sem requerer temperaturas muito altas, altas pressões ou outras condições severas); (II) nenhuma reação paralela deve ocorrer; (III) caso ocorra hidrólise do fluoróforo, o produto resultante não deve ser fluorescente; (IV) o derivatizante deve reagir com os ácidos graxos de forma rápida e seletiva; (V) deve possuir um deslocamento de Stokes razoavelmente bom, elevado coeficiente de absorção molar e uma alta eficiência quântica; (VI) os derivativos devem ter alta estabilidade e apresentar fluorescência nos mais longos comprimentos de onda possíveis para evitar a interferência de componentes

presentes em amostras biológicas (fluorescência de fundo); (VII) a separação dos reagentes e do fluoróforo deve ser relativamente fácil (LIMA & ABDALLA, 2002; TOYO'OKA, 2002).

A) Reagentes derivatizantes fluorescentes para a análise de ácidos carboxílicos

Os reagentes específicos para ácidos carboxílicos estão divididos em seis grupos em função do grupo funcional que reage com o grupo carboxila do ácido (Figura 15).

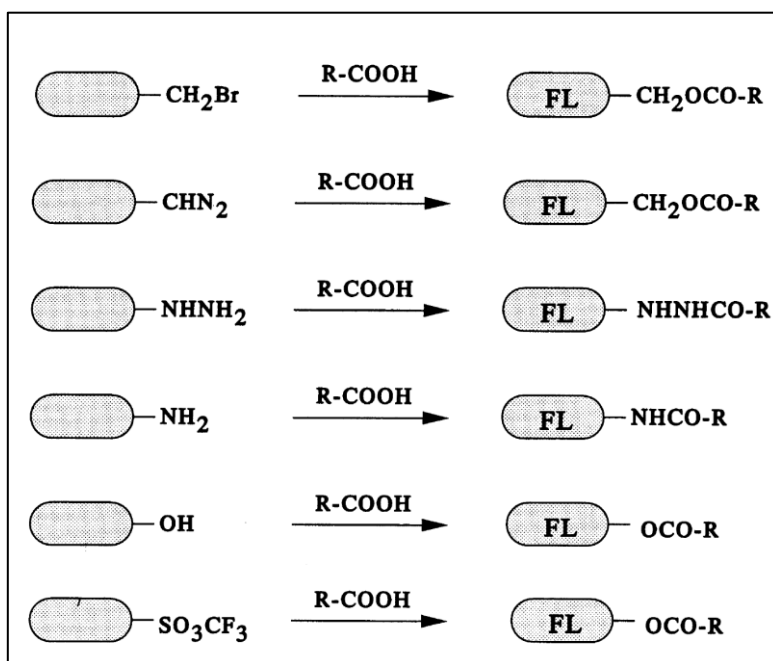


Figura 15. Principais tipos de reagentes fluorescentes utilizados na derivatização de ácidos carboxílicos. De cima para baixo à esquerda: bromoalquil, diazometano, hidrazina, amina, álcool, sulfonato. Adaptado de TOYO'OKA (2002)

Os reagentes do tipo bromoalquil estão entre os principais reagentes para a detecção fluorescente de ácidos carboxílicos. O primeiro reagente derivatizante produzido para a derivatização de ácidos carboxílicos foi o Br-MMC (4-bromometil-7-metoxicumarina) sintetizado por Baker e Collins em 1949 e aplicado para ácidos carboxílicos alifáticos e aromáticos, herbicidas, drogas, barbituratos e prostaglandinas. Esse reagente foi importante porque logo depois outros reagentes do tipo bromometil foram sintetizados e aplicados a

amostras reais (TOYO'OKA, 2002). Nessa categoria de reagentes derivatizantes destacam-se os compostos que contêm a cumarina em sua estrutura (LIMA & ABDALLA, 2002; TOYO'OKA, 2002; PHATANGARE *et al.*, 2014; Tabela 5). O rendimento quântico desses reagentes é fortemente afetado pelo grupo substituinte na posição 7 da estrutura da cumarina (Figuras 16 e 17).

Tabela 5. Principais reagentes fluorescentes para ácidos carboxílicos sintetizados a partir de modificações no anel de cumarina.

Reagente	Grupo funcional reativo	Comprimentos de onda do fluoróforo		Referências
		Excitação	Emissão	
Br-MMC	CH ₂ Br	330	390	WOLF & KORF (1992)
Br-DMC	CH ₂ Br	354	425	KELLY <i>et al.</i> (1987)
Br-MDC	CH ₂ Br	355	435	KELLY <i>et al.</i> (1987)
Br-MAC	CH ₂ Br	370	470	TSUCHIYA <i>et al.</i> (1982)
MPAC-Br	CH ₂ Br	403	474	TAKECHI <i>et al.</i> (1996)
Br-DMEQ	CH ₂ Br	375	450	YAMAGUCHI <i>et al.</i> (1986)
Br-AMC	COCH ₂ Br	365	415	TAKADATE <i>et al.</i> (1992b)
Br-AMDC	COCH ₂ Br	388	475	TAKADATE <i>et al.</i> (1992a)

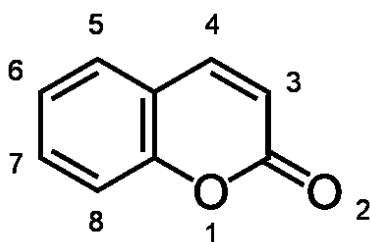


Figura 16. Estrutura básica da cumarina.

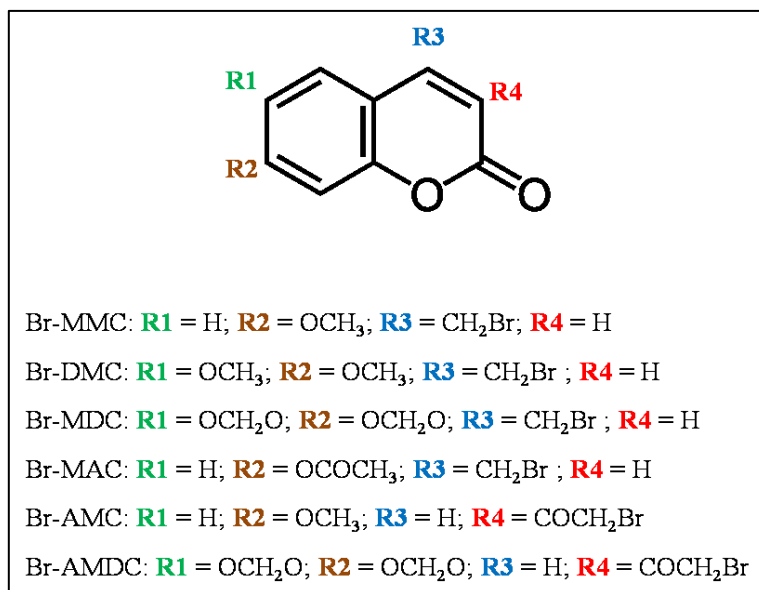


Figura 17. Reagentes derivatizantes do tipo bromoalquil que têm a cumarina como estrutura básica. As letras “R” representam a posição de cada grupo substituinte indicado abaixo da figura.

Takechi *et al.* (1996) desenvolveram o reagente de derivatização 3-[4-(bromometil)fenil]-7-(dietilamino)cumarina (MPAC-Br) entre uma série de outros derivados de 7-alquilaminocumarina a serem utilizados como reagentes de derivatização de ácidos carboxílicos. Estudaram o efeito de grupos substituintes nos carbonos 3 e 4 do anel de cumarina e verificaram que os ésteres de MPAC são cerca de uma ordem de magnitude mais brilhantes do que os correspondentes ésteres de MMC, que são formados pela reação de 4-bromometil-7-metoxocumarina (Br-MMC) com ácidos carboxílicos (Tabela 6). Esse reagente é muito interessante, pois seu comprimento de onda de excitação encontra-se na faixa do visível (403 nm), muito próximo, portanto, do máximo da banda de excitação de um laser violeta ($\lambda = 405$ nm) com excelente resposta e alta sensibilidade para todos os derivados. O MPAC-éster (ácido carboxílico derivatizado com MPAC-Br) possui intensidade de fluorescência quase 15 vezes maior que o MMC-éster, além de a reação ser mais sensível e estável, permitindo detecções ao nível de femtomol ($1 \text{ fmol} = 10^{-15} \text{ mol}$) (TAKECHI *et al.*, 1996).

Tabela 6. Propriedades de absorção e fluorescência do MPAC-éster em relação ao MMC-éster.

Composto	Absorção ^(a)		Fluorescência ^(b)		
	λ_{\max} (nm)	ϵ	Excitação (nm)	Emissão máxima (nm)	IFR
MPAC-éster	401	36300	403	474	14,7
MMC-éster	322	14400	323	393	1,0

Os ésteres são derivatizados de ácido acético. IFR, índice de fluorescência relativa, com atribuição arbitrária do valor 1 para o MMC-éster. (a) concentração de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (b) concentração de 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Adaptado de TAKECHI *et al.* (1996).

A escolha do solvente que será empregado como fase móvel é um passo importante nas análises envolvendo fluorescência. Na Tabela 7 estão apresentados os valores de absorção e fluorescência relativos aos solventes comumente usados em CLAE-FR.

Tabela 7. Propriedades de absorção e fluorescência do MPAC-éster nos principais solventes utilizados em CLAE-FR.

Solvente	Absorção ^(a)		Fluorescência ^(b)		
	λ_{\max} (nm)	ϵ	Excitação (nm)	Emissão máxima (nm)	IFR
Etanol	401	37200	403	474	1,00
Metanol	402	36900	403	475	0,98
Metanol:água (90:10)	406	36700	407	480	1,01
Acetonitrila	398	36800	400	473	1,02

Os ésteres são derivatizados de ácido acético. IFR, índice de fluorescência relativa, com atribuição arbitrária do valor 1 para o etanol. (a) concentração de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (b) concentração de 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Adaptado de TAKECHI *et al.* (1996).

É interessante notar o deslocamento de Stokes dependendo da polaridade do solvente utilizado. A mistura de metanol e água apresenta um deslocamento maior, o que a torna adequada como fase móvel para as análises dos ácidos graxos (TAKECHI *et al.*, 1996). Cabe lembrar que o solvente também afeta o brilho (produto do coeficiente de absorção molar pelo rendimento quântico), e o brilho em soluções aquosas costuma ser menor quando comparado com solventes não aquosos (KLESSINGER & MICHL, 1995; LAKOWICZ, 1999).

A reação com reagentes do tipo bromoalquil com ácidos carboxílicos ocorre exclusivamente em solventes orgânicos como acetonitrila, acetona e tetraidrofurano (THF), com leve aquecimento para acelerar a reação, na presença de um catalisador básico (por exemplo, KHCO_3) e um éter coroa como o 18-crown-6 (TAKECHI *et al.*, 1996; Figura

18). Este último é usado para evitar a hidrólise do anel de cumarina durante a reação de esterificação pelo catalisador básico caso haja presença de alguma fração de água na reação e também para promover a solubilização dos ácidos graxos nas soluções hidrofílicas. A hidrólise do anel de cumarina pode gerar produtos de degradação não fluorescentes, alguns deles portadores de um grupo carboxila, o que, por sua vez, reage com o excesso de reagente de derivatização produzindo picos indesejáveis no cromatograma (ERTEL & CARSTENSEN, 1987).

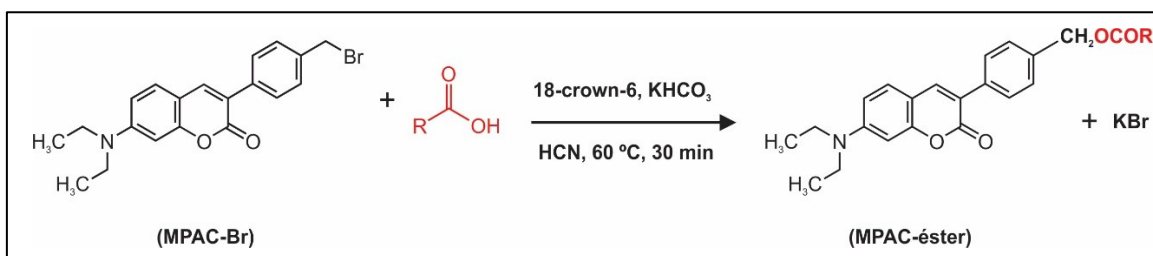


Figura 18. Reação de derivatização de MPAC-Br com ácidos carboxílicos.

No entanto, no que diz respeito à derivatização de ácidos graxos, o fato de a reação ocorrer em solventes orgânicos pode ser considerada uma grande vantagem, uma vez que os ácidos graxos são muito pouco solúveis em água.

Outros reagentes importantes na derivatização de ácidos carboxílicos, em especial ácidos graxos, pertencem ao grupo dos diazometanos, como é o caso do 9-antrildiazometano (ADAM - excitação: 255 nm; emissão: 415 nm), que reage com os ácidos em condições brandas, à temperatura ambiente, sem a presença de um catalisador e na presença de água (YAMAGUCHI *et al.*, 1986). As limitações do seu uso incluem a presença de contaminantes e produtos de degradação, além da sua instabilidade (LIMA & ABDALLA, 2002). Outro reagente dentro desse grupo é o 1-pirenildiazometano (PDAM), que é mais estável que o ADAM e produz ésteres derivatizados intensamente fluorescentes (excitação: 340 nm; emissão: 395 nm). Ele tem sido usado para determinar ácidos graxos

em plasma sanguíneo, em ovários, em testículos, em peixes e em plâncton (TOYO'OKA, 1995). Diversos reagentes derivados de quinoxialinonas (Br-DMEQ, Br-MMEQ) para a derivatização de ácidos graxos foram desenvolvidos e tem capacidade de chegar ao nível de femptomol (TOYO'OKA, 1995). Porém, não são adequados para compostos instáveis, uma vez que as condições para a reação de derivatização são consideradas drásticas (LIMA & ABDALLA, 2002).

Reagentes do tipo hidrazida podem ser utilizados na presença de um meio catalítico de condensação, como com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto)/piridina (EDC/piridina), permitindo com que ácidos graxos presentes no plasma humano possam ser derivatizados diretamente com 6,7-dimetoxil-metil-2(1*H*)-quinoxialinona-3-ácido propionilcarboxílico hidrazida (DMEQ-Hz), sem a necessidade de extração com clorofórmio (LIMA & ABDALLA, 2002; TOYO'OKA, 1995; 2002).

CHEN *et al.* (2013) desenvolveram o reagente derivatizante (2-(2-(4-(dimetilamino)-fenil)-1*H*-fenantro-[9,10-*d*]-imidazol-1-il)-etil-4-metilbenzenosulfonato (PPMB), aplicando-o na análise de ervas chinesas tradicionais, onde conseguiram limites de detecção na ordem de femptomol. Porém, relataram perdas de até 10% devido à decomposição do PPMB. Além do mais, a excitação dos derivatizados ocorre a 260 nm e a emissão em 430 nm, o que necessita de sistemas de detecção que excitem o fluoróforo na região do UV. MERTENS & GÜTSCHOW (2013) relataram a síntese de dois novos derivatizantes baseados em cumarinas com capacidade para a separação quiral de ácidos carboxílicos. Entretanto, o processo de derivatização é demorado e requer purificação para remoção de subprodutos, o que pode aumentar os erros analíticos. Outro reagente, o 2-(12-benzo[*b*]acridin-5-(12*H*)-il)-aceto-hidrazida (BAAH), desenvolvido por Xie *et al.* (2012) foi utilizado para a análise e detecção de ácidos graxos em ervas tradicionais chinesas, com

a detecção acoplada com espectrometria de massas. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 280 e 510 nm, respectivamente. Os pesquisadores relataram que a reação de derivatização foi significativamente afetada pela variação da temperatura, com formação de subprodutos indesejados. Também descreveram que com um excesso molar menor que 17 vezes, as reações com os ácidos carboxílicos foram incompletas. Os limites de detecção, em concentração, para esse reagente ficaram na faixa de 3,89 a 12,5 nmol.L⁻¹.

Existem muitos fatores a serem considerados na escolha de um fluoróforo para a derivatização de ácidos carboxílicos, sendo que cada um possui suas vantagens e desvantagens. Fluoróforos pequenos, que sejam excitados em comprimentos de onda no verde e no vermelho e que emitam em comprimentos de onda longos, seriam considerados ideais. No entanto, a realidade é distinta. Fluoróforos que são excitados em comprimentos de onda longos normalmente possuem estruturas muito grandes, por vezes requerem condições de derivatização mais drásticas como altas temperaturas, misturas de solventes agressivos, etc., podendo gerar perdas durante a reação e aumentando, assim, as dificuldades na análise.

Muitos reagentes baseados em estruturas com cumarinas têm sido desenvolvidos para a derivatização de ácidos carboxílicos. Porém, muitos têm sido negligenciados nos últimos anos devido às técnicas de separação (CLAE, CG e EC) acopladas aos espectrômetros de massas. Esses equipamentos normalmente são caros, com elevados custos de manutenção e não estão disponíveis a todos os pesquisadores.

1.7.2 Limitações das técnicas sensíveis tradicionais

1.7.2.1 Cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC)

Os ácidos graxos são tipicamente submetidos a uma reação de esterificação antes da separação por cromatografia gasosa (CG) de modo a promover mais facilmente a sua volatilização para a fase gasosa (fase móvel). No entanto, a análise dos ácidos graxos insaturados comuns e da maioria dos ácidos graxos de cadeia longa (LCFA) em CG apresenta algumas dificuldades adicionais como (I) a modificação estrutural dos ácidos graxos poliinsaturados pode ocorrer durante a sua conversão em ésteres metílicos; (II) a degradação térmica na fase móvel gasosa quente é muito comum; e (III) vidas mais curtas das colunas são observadas nestas condições de operação e com a utilização dessas amostras (GUTNIKOV, 1995; MOLNÁR-PERL, 2000; LIMA & ABDALLA, 2002). A eletroforese capilar (EC) de ácidos graxos precisa ser realizada em misturas de tampões aquosos e solventes orgânicos para se obter a resolução e a seletividade desejadas. Porém, a maioria dos métodos utiliza a detecção indireta por absorção UV, o que resulta em baixa sensibilidade. Por outro lado, limites de detecção na faixa de attomol são possíveis quando se utiliza a derivatização (BRANDO *et al.*, 2002). Como resultado, existem poucos métodos de separação utilizando essa técnica e os que estão disponíveis estão limitados a separações muito específicas ou que envolvem poucos ácidos graxos (BRANDO *et al.*, 2002; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; PRADO & OLIVEIRA, 2017).

Portanto, metodologias robustas, sensíveis e de elevada eficiência de separação ainda têm amplo espaço para serem desenvolvidas e podem ser alternativas confiáveis e de baixo custo na análise de ácidos carboxílicos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- ⊙ Otimização das metodologias de derivatização e definição de parâmetros de separação e limites de detecção de ácidos carboxílicos pela técnica de CLAE.

2.2 Objetivos específicos

- ⊙ Desenvolvimento de métodos de derivatização e separação de ácidos carboxílicos de cadeia longa, principalmente aqueles de difícil análise por CG e EC.
- ⊙ Aplicação dos métodos na análise de ácidos carboxílicos em amostras de plantas (sementes) e na caracterização do perfil de ácidos graxos em óleos e gorduras.
- ⊙ Desenvolver um método simples empregando a técnica de derivatização para proporcionar maior sensibilidade na análise de ácidos carboxílicos.

3 Capítulo I

Performance of 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarin as a Derivatization Reagent for the Analysis of Fatty Acids and Long Chain Fatty Acids using HPLC with LIF Detection.

Manuscrito submetido ao periódico “*Journal of Chromatography B*”

Performance of 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino) coumarin as a Derivatization Reagent for the Analysis of Fatty Acids and Long Chain Fatty Acids using HPLC with LIF Detection.

Carlos E. Rodrigues^{1,2}, Marina Tonial¹, Laura Schaefer^{1,3}, Giancarlo Pasquali² and Tarso B. L. Kist¹

¹Laboratory of Methods, Department of Biophysics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS); ²Graduating Program in Cell and Molecular Biology, Center for Biotechnology (CBiot), UFRGS; ³Graduating Program in Material Science, Institute of Physics, UFRGS. Av. Bento Gonçalves 9500. CEP 90.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT: The knowledge of fatty acids profile, including the profiles of long chain fatty acids, is an important parameter in many areas like human health, food sciences, and the study of gene expression in plant tissues among others. Moreover, very long chain fatty acids occur at low concentrations in many biological samples. The 3-[4-(bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino)coumarin (MPAC-Br) reagent has been used as a derivatizing reagent for the analysis of carboxylic acids in a variety of samples. Derivatization reactions are always a matter of concern in routine analyses, as they are seen as a time demanding step and a source of errors in analytical chemistry. MPAC-Br is studied in the present work, including the robustness of its derivatization reaction, the stability of its derivatives, the limits of its detection and the repeatability of results. An optimized version of its protocol was applied to determine the content and profiles of fatty acids and long chain fatty acids in eight samples of oils and fats. It was shown that the proposed derivatization reaction is a reliable, robust, fast and convenient method of fatty acid and long chain fatty acid analysis.

Keywords: Carboxylic acids; Enzymatic hydrolysis; Fluorescence detection; HPLC; Long chain fatty acids.

Highlights:

- Free fatty acids were obtained from triacylglyceride using enzymatic hydrolysis.
- Propylene carbonate was tested as the solvents in the derivatization reaction.

- HPLC separation of the MPAC-esters of fatty acids was optimized.
- Robustness of the method was evaluated.
- The content and profile of FA and LCFA was determined in eight samples.

1 INTRODUCTION

The carboxyl group occurs in a large number of compounds of interest, as well as in esters of glycerol (triacylglycerols) found in oils and fats from foods [1], cell metabolites [2,3], some pharmaceuticals [4] and biomarkers in human health [3,5]. The carboxyl group exhibits a very low molar absorption coefficient in the UV and visible range of the spectrum, making its analysis at trace levels in complex matrices difficult to be performed by current and widely used instruments like high performance liquid chromatography (HPLC) with absorption detection [6]. Even at deep UV (~200 nm), the molar absorption coefficient of the carboxyl groups is too low to achieve detection limits below 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, especially when working with small volumes of a few microliters. Moreover, most of the mobile phases exhibit a strong absorption at this range of wavelengths [6]. Therefore, reliable and robust methods with improved detection limits is desired.

Derivatization reactions are already applied to a wide range of compounds with well established protocols for their separation and analysis in gas chromatography (GC), HPLC and capillary electrophoresis (CE) [7]. Fatty acids are subjected to an esterification reaction prior to GC separation. This facilitates their volatilization within the injection block and their entrance into the gas (mobile) phase. However the analysis of common unsaturated fatty acids, especially long chain fatty acids (LCFA), in GC presents some additional difficulties, which include: i) structural modifications of the polyunsaturated fatty acids that may occur during their conversion to methyl esters [8]; ii) thermal degradation in the hot gaseous mobile phase; and iii) shorter lifetimes of columns under the

required operational conditions for these kind of samples. CE of fatty acids needs to be performed in mix aqueous buffers and organic solvents to achieve desired resolutions and selectivities. Most methods make use of indirect UV absorption detection, which has also a low sensitivity. On the other hand LOD in the attomol range are possible when using derivatization [9]. There are a few additional benefits given by the fluorescent labels: they increase the solubility of the derivatized FA in aqueous solutions and they may increase the mobility which in turn increases the separation efficiency [9] (For a review on CE applied to FA analysis see ref. [10]). HPLC operates with many solvents and a wide range of temperatures, including room temperature and lower [8]. This reduces the risk of physical and chemical modifications of the double bonds of unsaturated fatty acids. Therefore, HPLC offers the gentle environment required to deal with fatty acids in general, especially for the long chain unsaturated fatty acids.

Fluorescence derivatization is an interesting procedure to be used with analytes which exhibit low molar absorption coefficients when an HPLC instrument with a laser-induced fluorescence (LIF) detector is available. Currently available diode lasers [11] and many new light detectors (PMT, CCD, APD) have made these instruments very affordable and reliable [12,13]

Takechi *et al.* [14] developed the 3-[4-(bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino)coumarin (MPAC-Br) reagent among a series of other 7-alkylaminocoumarin derivatives for use as carboxylic acid derivatizing reagents. They studied the effect of the substituent in carbon 3 and 4 of the coumarin ring, and verified that the MPAC-esters are about one order of magnitude brighter than the corresponding MMC-esters [6].

There are many factors to consider in the choice of fluorophores for the derivatization of carboxylic acids, each one with its advantages and disadvantages. The reaction of bromoalkyl reagents with carboxylic acids occurs exclusively in organic solvents like acetonitrile, acetone or tetrahydrofuran (THF) in the presence of a basic catalyst (e.g.

KHCO₃) and 18-crown-6 ether [14]. The later is used to prevent the hydrolysis of the coumarin ring during the esterification reaction by the basic catalyst and water, and also to promote the solubilization of fatty acids and LCFA in the hydrophilic solvents. The hydrolysis of the coumarin ring would produce undesirable non-fluorescent degradation products [15], some of them carrying a carboxyl acid group which, in turn, reacts with the excess of the derivatization reagent and produces undesirable peaks in the chromatogram.

In this work, an optimized protocol of fatty acid derivatization with MPAC-Br is demonstrated. It is shown that the derivatization reaction is relatively simple, robust and has a good repeatability when performed by different technicians belonging to the same laboratory (intralaboratory repeatability). There are many brands of commercially available fluorescent labels of this nature and we tested the two most commonly used. In the present work, the performance of the derivatizing reagent MPAC-Br was exhaustively tested and HPLC separation of the resulting fatty acid and LCFA derivatives was performed. The optimized version of the protocol was applied to determine the content of fatty acid and LCFA in samples of oils and fats from linseed (*Linum usitatissimum*), chia (*Salvia hispanica*), sesame (*Sesamum indicum*), tef (*Eragrostis tef*), soybean (*Glycine max*), coconut (*Cocos nucifera*), grape seed (*Vitis vinifera*) and crambe seed (*Crambe abyssinica*).

2 EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Materials

The following reagents were purchased from Sigma (St. Louis, USA): HPLC grade methanol and acetonitrile, MPAC-Br (Cod. 14653) Sigma brand and MPAC-Br (Cod. 14653) Fluka brand, 18-crown-6 ether, potassium bicarbonate (KHCO₃),

tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), acetic acid and n-hexane. The following fatty acids were also purchased from Sigma: decanoic acid (C10:0), dodecanoic acid (C12:0), tridecanoic acid (C13:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1n-9), linoleic acid (C18:2n-6), linolenic acid (C18:3n-3), eicosanoic acid (C20:0) and erucic acid (C22:1n-9). The enzyme Lipozyme TL IM (TL from *Thermomyces lanuginosus*) was kindly donated by Novozymes (Novozymes Latin America, Brazil). The thermal bath was obtained from De Leo (Porto Alegre, RS, Brazil). Cellulose cartridges (33x80 mm) from the Unifil brand (São Paulo, SP, Brazil) were purchased from LAS (Porto Alegre, RS, Brazil). Coffee grinder Cadence (Balneário Piçarras, SC, Brazil) The following seeds were purchased in local markets: linseed, sesame and soybean. Coconut oil (Qualicôco brand, Santo Antônio da Patrulha, RS, Brazil) and grape seed oil (Basso brand, Villa Nocelleto, Italy) were purchased. Tef seeds were supplied by the crop farm El Campo (Ponta Porã, MS, Brazil) and chia seeds from Agro Kistter SA (Santa Rosa del Monday, Paraguay). Crambe oil was supplied by Fundação MS (Maracaju, MS, Brazil).

2.2 HPLC analysis and chromatographic conditions

The HPLC apparatus used was the Biotech model 525 System (Hallertau, Germany) equipped with a thermostated column compartment. The detection system consisted of a LIF detector of capillary electrophoresis system model PNA8C (a donation of ISB, Bom Princípio, RS, Brazil), with a 405 nm and 10 mW diode laser as the excitation source and a sensitive (10 mLux) CCD camera (HDL model HM54-DN HAD II) as the detection device. The chromatographic separation was performed in a Supelcosil LC-18-DB column with a 250 mm x 4.6 mm i.d. packed with 5 µm particles from Supelco Analytical (Bellefonte, USA), operated at 25 °C. The flow rate was 1.5 mL min⁻¹ and the mobile

phases were 20 mM TRIS-acetate pH 7.5/methanol 10:90 (V/V; mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B). Gradient programming was used as follows: 0-20 min, 10%B; 20-35 min, 10%B-100%B; 35-45 min, 100%B.

2.3 Sample preparation

2.3.1 Oil extraction and hydrolysis

All seeds were dried in an oven at 60 °C until they reached a constant weight. Dried seeds were then left to cool in a desiccator and finally stored in sealed flasks. Before oil extraction the samples were milled (using a grinder) until a thin flour was obtained. The oil content of flour samples was extracted using the Soxhlet method with n-hexane at 60 °C. The system was made of two condensers in series: the bottom condenser operated at 60 °C using oil circulation from a thermal bath, and the top condenser utilized tap water at room temperature to promote the condensation of the remaining hexane vapor. This two stage condenser was used to assure that all occurring FAs and LCFAs were extracted. The system was kept in operation for 4 hours, switched off for a period of 14 hours (overnight) in which the cartridge containing the sample was submerged in hexane, and restarted for another 4 hours for extraction. After extraction, the crude oil was subjected to enzymatic hydrolysis using the enzyme Lipozyme TL IM (immobilized on micron size particles, with activity (interesterification unit, IUN) of 250 IUN g⁻¹) to obtain free fatty acids from triglycerides (modified from [16–21]). In the reaction flasks oil, water and enzyme were added in the proportions (in mass) of 20:4:1 respectively. The mixture was kept in the thermal bath at 45 °C for 24 h. After hydrolysis, the content was transferred to a conical (Falcon) tube and centrifuged at 2,000 g for 10 min, producing four phases: a clean

supernatant of fatty acids, an intermediate phase, a water phase and a solid pellet of the enzyme at the bottom. A fraction of the upper phase was collected and ~1 mg was weighed (this weight was recorded with +/- 0.00001 g precision) and diluted with 1 mL of methanol.

2.3.2 Derivatization procedure

The derivatization reactions of fatty acids samples (~1 mg mL⁻¹ in methanol) were performed as follows: using a 1.5 mL microcentrifuge tube, 5.0 mg (+/- 0.2 mg) of KHCO₃ was added followed by 171 µL of propylene carbonate, 15 µL of sample, 10 µL of 250 µmol L⁻¹ C13:0 in methanol (internal standard), 27 µL of 10 mmol L⁻¹ 18-crown-6 in acetonitrile and finally 27 µL of 5 mmol L⁻¹ MPAC-Br in acetonitrile. A 6 mm x 2.8 mm magnetic bar was added to each microcentrifuge tube containing the reaction mixture. The tube was closed and inserted into a 25 mL Becker with a magnetic stirrer and 20 mL of mineral oil held at 75 °C on a hot plate. Each reaction tube was maintained at 75 °C for 40 min with continuous and vigorous stirring. After this time, the magnetic bar was removed and the mixture was centrifuged at 1,000 g for 10 min, producing two phases: a bright yellowish green supernatant and a white pellet (excess KHCO₃). A fraction of the supernatant was diluted 160 times in methanol and an aliquot of 25 µL was injected in the chromatograph for analysis. A similar procedure was used for all fatty acid standards. Standards were diluted in methanol producing a pool (including the internal standard) at 150 µmol L⁻¹. The same derivatization reaction was applied to this standard mixture, with the exception of the addition of 10 µL of methanol in place of the 10 µL of 250 µmol L⁻¹ C13:0 in methanol, because it was already in the standard mixture.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Validation of the analysis method

The fluorescence brightness of the MPAC-Br-derivatized fatty acids has a strong dependence on the methanol/acetonitrile/aqueous buffer composition. Brightness increases with the increasing amount of acetonitrile and/or methanol and decreases by increasing the proportion of aqueous buffer. On the other hand, a gradient mode has to be used to separate all fatty acids and LCFA from each other. Therefore the recommendation is to use the gradient programming of the binary mixture in a precise manner in order to obtain reproducible peak heights and areas. The RSD (%) of peak areas of the fatty acid standard mixture after five derivatizations and injections into the HPLC system were used as criterion to deduce the best solvents for the derivatization reactions. They were also used to evaluate the robustness of parameters, including the amount of salt and solvent volume used. Tridecanoic acid (C13:0) was chosen as an internal standard and calibration curves were made using the response factors (RRFs) of analyte peak areas relative to this C13:0 acid. RRFs for all LCFA were calculated using C13:0 acid at $56.25 \text{ nmol L}^{-1}$, with the results presented in Table 1. The linearity was verified by analyzing five points in the working range of 28.13 to $450.00 \text{ nmol L}^{-1}$. The calibration curves using concentrations in the range of ng mL^{-1} units were also calculated from the same data (from the nmol L^{-1} values) and plotted against the RRFs of the analytes (Table 1). The linear correlation between peak area (A, a.u.) and concentration (c, expressed in ng mL^{-1} and nmol L^{-1}) of each standard was show in Table 1. The limits of detection were found to be in the 0.174 to 0.803 ng mL^{-1} range for all MPAC-Br derivatives. Using molarity as the unit of concentration, the limits of detection were in the 0.63 to 2.87 nmol L^{-1} range.

Table 1. Calibration curves, correlation coefficient (r^2), relative response factors (RRFs) and detection limits (LOD) of LCFA standards.

LCFA	Retention Times (min)	Regression Equations		r^2	Mean RRFs	LOD	
		(A, area; c, ng mL ⁻¹)	(A, area; c, nmol L ⁻¹)			(ng mL ⁻¹)	(nmol L ⁻¹)
C10:0	8.5	A = 0.1041 c + 0.0000	A = 0.0178 c + 0.0000	0.9998	1.18	0.184	1.07
C12:0	12.9	A = 0.1092 c + 0.0000	A = 0.0218 c + 0.0000	0.9864	1.27	0.266	1.33
C13:0 (I.S.)	16.1	A = 0.1666 c + 0.0000	A = 0.0356 c + 0.0000	0.9999	1.00	0.373	1.75
C18:3n-3	18.7	A = 0.0533 c + 0.0000	A = 0.0148 c + 0.0000	0.9991	0.84	0.662	2.39
C14:0	20.4	A = 0.0809 c - 0.0000	A = 0.0184 c - 0.0000	0.9955	1.13	0.473	2.08
C18:2n-6	24.8	A = 0.0572 c - 0.0000	A = 0.0160 c - 0.0000	0.9999	0.89	0.803	2.87
C16:0	30.5	A = 0.2456 c - 0.0000	A = 0.0627 c + 0.0000	0.9993	3.54	0.174	0.68
C18:1n-9	31.1	A = 0.0405 c + 0.0000	A = 0.0114 c - 0.0000	0.9992	0.65	0.689	2.45
C18:0	37.3	A = 0.1741 c + 0.0000	A = 0.0493 c + 0.0000	0.9998	2.76	0.178	0.63
C22:1n-9	43.2	A = 0.0455 c - 0.0000	A = 0.0153 c + 0.0000	0.9993	0.73	0.721	2.14
C20:0	44.0	A = 0.0518 c + 0.0000	A = 0.0161 c - 0.0000	0.9995	0.77	0.642	2.06

3.2 Derivatization reaction solvents

Acetone, THF and acetonitrile are the solvents usually referred to in the literature for the derivatization reaction of fatty acids and LCFA with bromo-methyl-phenyl coumarins, including MPAC-Br [6,14]. However, their boiling points are 56, 67 and 82 °C respectively, which limits the use of higher temperatures during derivatization. The use of special vials is recommended when temperatures close to the boiling points of the solvents are used, to avoid the loss of solvents during the derivatization reaction [14]. Propylene carbonate (PC) has a boiling point of 240 °C and does not require special vials to prevent evaporative losses at 75 °C. Moreover, PC has a much higher relative electric permittivity, which makes it a more efficient solvent for salts. Therefore the use of PC allowed the reaction to be conducted in simple 1.5 mL microcentrifuge tubes with temperatures as high as 80 °C [6]. Reaction mixtures were tested with a fraction of acetonitrile, solvent used to prepare the solutions of 5 mmol L⁻¹ MPAC-Br and 10 mmol L⁻¹ 18-crown-6 solutions, and PC as major derivatization solvent (Table 2). The resulting RSD (%) was much lower

when PC was used than when acetonitrile was used. This shows the greater reproducibility of reaction products when PC is used.

Table 2. Comparative study between acetonitrile and propylene carbonate solvents in fatty acids derivatization. All reactions were performed at 75 °C for 40 min. Derivatizations conducted in PC were either injected immediately (0 h) after derivatization or three hours after derivatizations (3 h).

LCFA	Acetonitrile	PC (0 h)	PC (3 h)
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
C10:0	10.399	3.034	0.936
C12:0	4.821	11.644	8.683
C13 (I.S.)	0.000	0.000	0.000
C18:3n-3	14.123	2.699	2.213
C14:0	8.526	9.141	4.963
C18:2n-6	13.464	2.827	0.669
C16:0	9.861	3.979	1.963
C18:1n-9	5.298	9.528	2.084
C18:0	7.152	2.037	1.132
C22:1n-9	12.126	5.751	1.908
C20:0	6.368	5.746	1.646

3.3 Robustness of the derivatization reaction

Robustness was tested by changing some parameters of the derivatization conditions: salt quantity (2.5, 5, 10, and 25 mg) and quantity of the derivatizing reagent MPAC-Br (2.5, 5, and 10 times the molar content of fatty acids and LCFA). In all tests, salt quantity did not affect RRFs. Therefore the amount of salt to be used in all derivatizations was set to 5 mg. The derivatization reactant is usually used with a 10-fold molar excess compared to the molar concentration of total carboxylic groups present in the reaction mixture [7,14]. However, our data showed that the use of a 5-fold molar excess results in greater repeatability of RRFs (Table 3). The fluorescent labeling reagents usually contain impurities of about 2 molar percent. Some of these impurities may interfere with the detection of the analytes of interest, resulting in undesirable peaks because the high sensitivity of LIF detection enables degradation products to be detected even at low concentration.

Table 3. Influence of the molar excess of MPAC-Br on RRFs compared to the total molar concentration of carboxylic acids in the derivatization reaction.

LCFA	2.5x	5x	10x
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
C10:0	4.301	3.034	6.653
C12:0	9.808	11.644	9.411
C13 (I.S.)	0.000	0.000	0.000
C18:3n-3	6.486	2.699	4.835
C14:0	6.240	9.141	4.730
C18:2n-6	5.559	2.827	8.915
C16:0	14.740	3.979	6.520
C18:1n-9	10.162	9.528	8.047
C18:0	15.923	2.037	6.167
C22:1n-9	10.485	5.752	9.867
C20:0	8.573	5.746	7.517

3.4 Stability of the derivatized fatty acids

The stability of the derivatized fatty acids and LCFA was tested by centrifuging the derivatized samples for 10 minutes, maintaining them in the dark and diluting them just before each injection into the chromatographer. Dilutions and injections were made 0, 3, 6 and 24 hours after derivatization and centrifugation (Table 4). As shown in Table 4, the repeatability was higher when derivatization products were kept in the dark and re-injected after 3 hours. Figure 1 shows the peak areas (averages of n=5) along the time of five derivatization reactions.

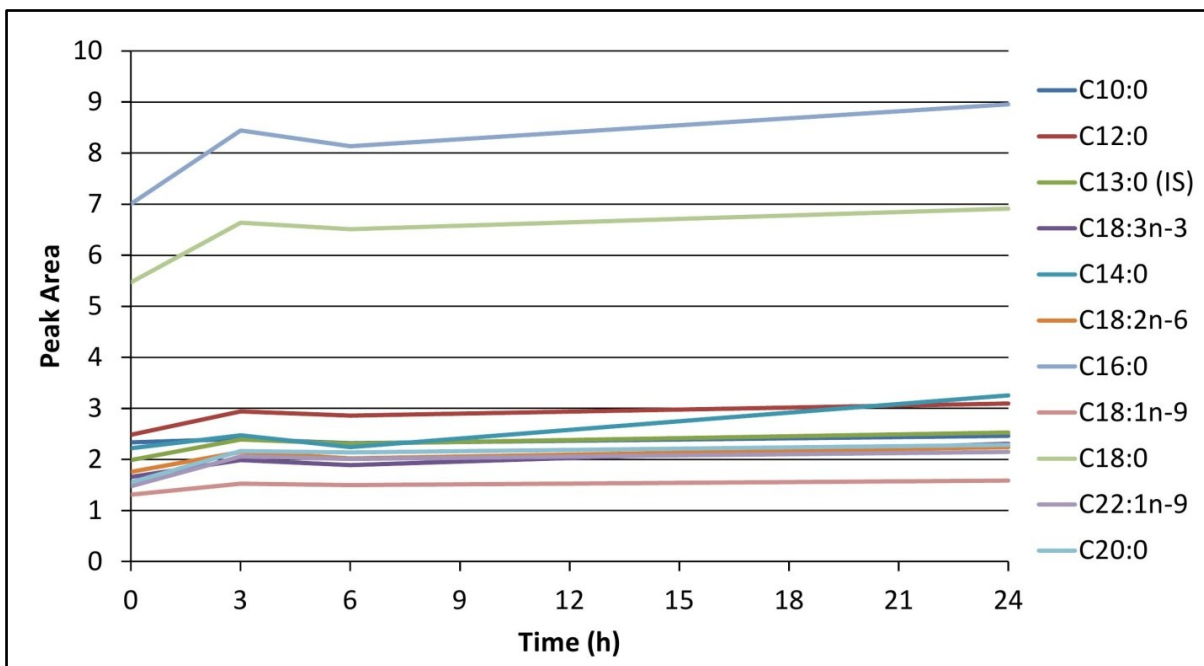


Figure 1: Stability of fatty acid and LCFA derivatives. The average of peak areas of five runs along the time. Samples were diluted and injected at 0, 3, 6 and 24 h after derivatization.

Table 4. RSD (%) of the Retention time and RRF (Peak area/Internal standard area) of injections at 0, 3, 6 and 24 hours of five derivatization reactions of a standard mixture of FAs and LCFA.

LCFA	0 h		3 h		6 h		24 h	
	Retention time	RRF	Retention time	RRF	Retention time	RRF	Retention time	RRF
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
C10:0	0.090	3.034	0.132	0.936	0.042	2.506	0.387	7.905
C12:0	0.095	11.644	0.120	8.683	0.026	7.890	0.325	12.558
C13:0 (I.S.)	0.226	0.000	0.212	0.000	0.125	0.000	0.345	0.000
C18:3n-3	0.067	2.699	0.178	2.213	0.064	2.601	0.329	11.411
C14:0	0.055	9.141	0.019	4.963	0.043	4.612	0.534	7.082
C18:2n-6	0.070	2.827	0.212	0.669	0.196	5.934	0.351	3.846
C16:0	0.236	3.979	0.124	1.963	0.139	4.008	0.097	5.594
C18:1n-9	0.215	9.528	0.109	2.084	0.164	1.943	0.106	3.433
C18:0	0.205	2.037	0.102	1.132	0.149	1.414	0.071	3.822
C22:1n-9	0.272	5.752	0.118	1.908	0.135	1.496	0.059	1.062
C20:0	0.324	5.746	0.144	1.646	0.167	2.873	0.048	1.864

3.5 Repeatability of the method

The repeatability of the method was tested by three operators from the same laboratory. Repetitions made by operators 2 and 3 were performed ten days after those made by

operator 1. During these ten days, other analysis were run on the instrument with different compounds and mobile phases, but the same chromatographic column was used. Results presented in Table 5 show that the method has good repeatability, presenting practically the same variations in retention time and RRFs of peak areas in the analysis performed by the three different operators.

Table 5. Intralaboratory repeatability. RSD (%) of retention time and RRF of chromatographic injections performed by operators 1, 2 and 3 with products of five derivatization reactions of a standard mixture of fatty acids and LCFA. The analysis conducted by operators 2 and 3 were carried out 10 days after the analysis of operator 1.

LCFA	Operator 1		Operator 2		Operator 3	
	Retention time	RRF (Peak Area/IS Area)	Retention time	RRF (Peak Area/IS Area)	Retention time	RRF (Peak Area/IS Area)
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
C10:0	0.090	3.034	5.212	16.760	4.533	12.006
C12:0	0.095	11.644	0.812	16.433	0.771	13.279
C13:0 (I.S.)	0.226	0.000	0.835	0.000	0.863	0.000
C18:3n-3	0.067	2.699	0.827	5.963	0.918	4.804
C14:0	0.055	9.141	0.731	8.632	0.813	8.548
C18:2n-6	0.070	2.827	0.909	5.672	0.922	6.375
C16:0	0.236	3.979	0.281	2.429	0.355	3.175
C18:1n-9	0.215	9.528	0.158	6.865	0.254	6.253
C18:0	0.205	2.037	0.095	0.649	0.122	3.637
C22:1n-9	0.272	5.752	0.066	7.761	0.097	4.345
C20:0	0.324	5.746	0.097	5.217	0.121	5.976

4 Applications

The above described method was applied in the analysis of different oils and fats. Fatty acid and LCFA profiles of eight distinct sources of oils and fats were analyzed and the results were compared with those in the literature as shown in Table 6. It is important to consider that the oil content and fatty acid profile of a given plant species depends on the variety cultivated, the climate, soil conditions, growing conditions and the time of harvesting, among other factors. Moreover, errors of up to 5% are in general accepted as

analysis errors. Considering all of these variables together, significant variations in results found in the literature for oil or fat content and fatty acid profiles may be observed.

Table 6. Results (%) of fatty acid and LCFA profiles of oils and fats of seeds found in the present work compared with data referred to in the scientific literature.

Acid	Sesame seed		Linseed		Tef seed		Crambe seed		Grape seed		Coconut		Chia seed		Soybean	
	Present work	[22]	Present Work	[23]	Present work	[24]*	Present work	[25]**	Present work	[26]**	Present work	[27]	Present work	[28]**	Present work	[29]**
C10:0	0.47	ND	2.24	ND	1.91	0.08	1.04	ND	1.18	ND	8.73	5.00	0.61	ND	0.94	ND
C12:0	0.72	ND	4.14	ND	1.11	0.17	0.67	ND	1.43	ND	39.13	46.00	ND	ND	ND	ND
C18:3n-3	2.70	ND	37.74	54.20	5.86	12.94*	3.15	4.46	ND	0.36	ND	ND	54.20	60.24	8.65	4.45
C14:0	0.78	ND	ND	ND	1.25	0.47	1.02	ND	0.97	ND	22.17	20.00	ND	ND	ND	ND
C18:2n-6	31.65	43.66	14.99	15.20	32.78	23.83*	6.69	8.12	52.16	70.79	2.29	1.60	23.06	20.30	47.68	53.80
C16:0	9.70	10.00	6.87	4.80	14.62	14.52	9.10	2.00	6.22	6.50	12.65	9.00	5.98	6.65	7.00	11.70
C18:1n-9	42.31	39.80	24.55	21.40	27.00	32.41	21.18	17.65	30.82	16.39	7.56	7.20	9.23	7.75	29.21	24.78
C18:0	9.38	5.36	6.98	3.00	11.98	4.20	9.51	1.00	5.30	3.50	5.89	3.00	4.83	3.50	4.53	3.87
C22:1n-9	ND	ND	ND	ND	1.79	ND	45.60	57.92	ND	ND	ND	ND	2.09	ND	ND	ND
C20:0	2.29	traces	2.48	ND	1.71	ND	2.04	1.20	1.91	ND	1.57	ND	ND	ND	1.98	0.35
Other (LCFAs)								7.65								

*We have changed these numbers because an author apparently mistyped the values. This was also noted in references [25,26].**Average content when there is more than one type of sample referred to in the work. ND, Not detected.

The observed results were consistent with what is found in the literature for most of the analyzed samples. The grape seed oil sample analyzed in the present work exhibited larger differences that usually found in the literature. Probably due to the large number of grape varieties. Shinagawa (2015) evaluated the composition of seven types of Brazilian grape seed oils and obtained values of 30.5% for oleic acid and 59% for linoleic acid for one of the samples (unidentified brands) [26], which represent values very close to those found in the present work.

The profiles of fatty acids in other seed oils and fats are within the expected range, taking into account the several factors mentioned before that can influence the results. The analysis of fatty acid profiles carried out by researchers referred to in Table 6 were carried out by GC, which is the most employed method of fatty acid analysis. Oils and fats are first purified in order to remove non-triacylglycerols. Then they are hydrolyzed and the resulting free fatty acids are converted into methyl esters to improve their volatility between 200 and 300 °C, which is crucial for GC. The method presented here is simpler in this regard, as it does not require such high temperatures and laborious purification processes. After enzymatic hydrolysis, a fraction of the free fatty acids is directly diluted in methanol and derivatized at 75 °C for HPLC analysis. All of these steps are more gentle, straightforward and suitable for the analysis of LCFA. Moreover, total analysis time is relatively shorter if compared to GC.

In the chromatograms shown in Figure 2 (fatty acid standards) and Figure 3 (oil samples), there are few interfering peaks which may be related to the degradation products of the derivatization reaction, and also to peaks of other non-quantified carboxylic acids of lower occurrence in samples. This shows that the method can be applied to the

quantification of fatty acids from the most diverse sources of vegetable oils, and may also be applied to other sources as long as the extraction of free fatty acids is possible.

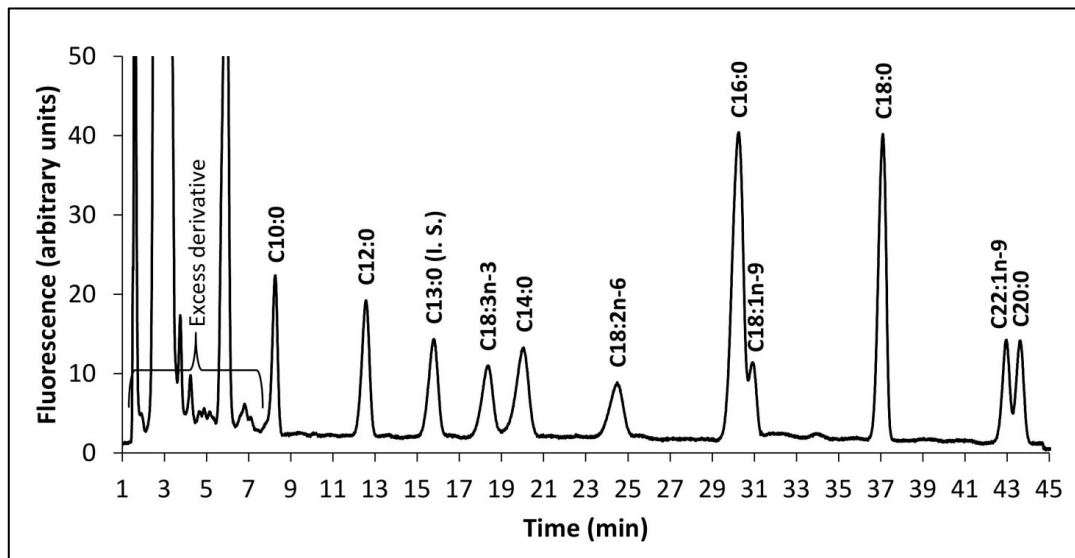


Figure 2: Chromatogram of the MPAC-Br derivatives of fatty acid standards. C10:0, decanoic acid; C12:0, dodecanoic acid; C13:0, tridecanoic acid; C18:3n-3, linolenic acid; C14:0, myristic acid; C18:2n-6, linoleic acid; C16:0, palmitic acid; C18:1n-9, oleic acid; C18:0, stearic acid; C22:1n-9, erucic acid; C20:0, eicosanoic acid.

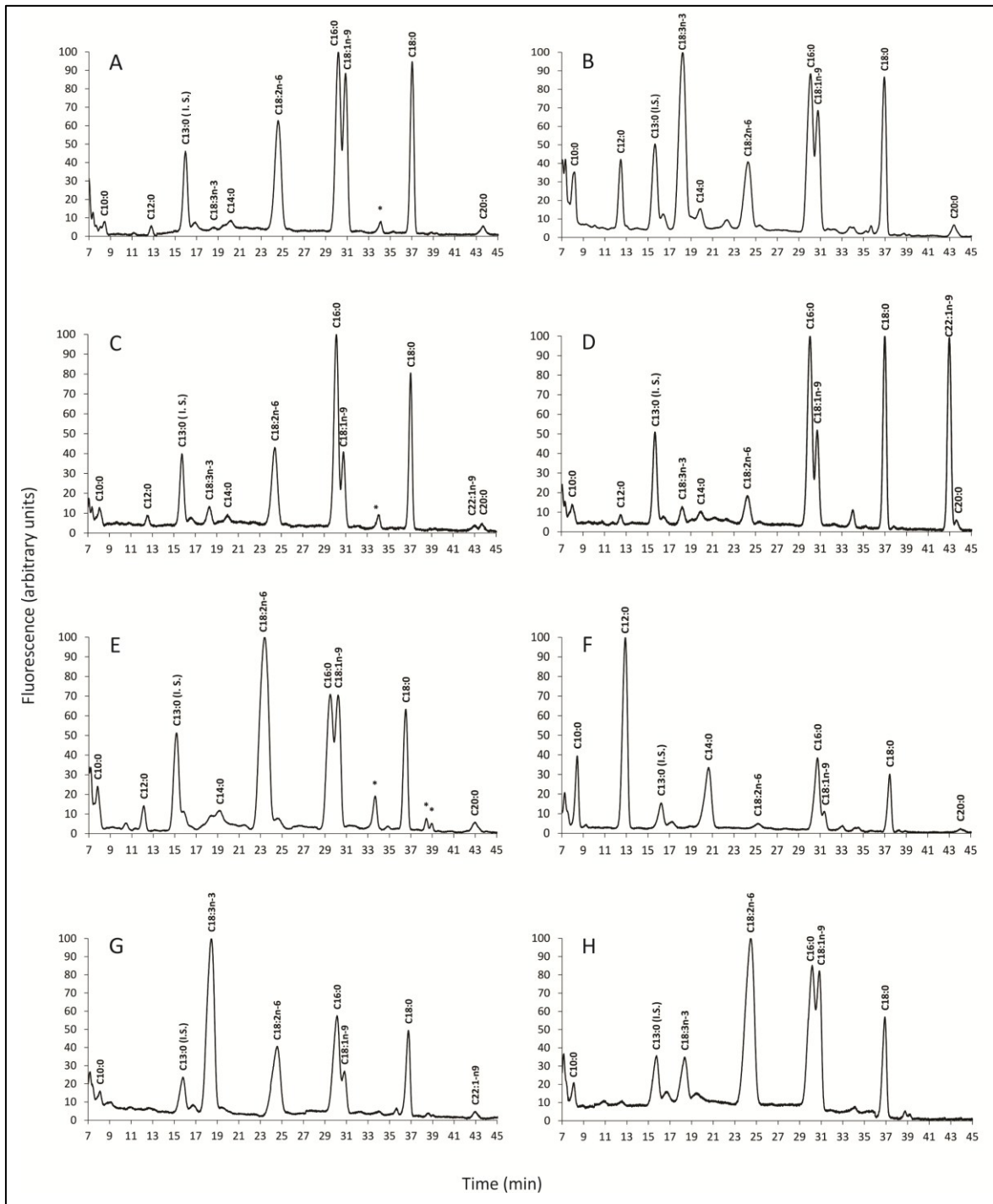


Figure 3: Chromatograms of MPAC-Br derivatives of seed oil hydrolysates. Sesame (A), linseed (B), tef (C), crambe (D), grape (E), coconut pulp oil (F), chia (G) and soybean (H). C10:0, decanoic acid; C12:0, dodecanoic acid; C13:0, tridecanoic acid; C18:3n-3, linolenic acid; C14:0, myristic acid; C18:2n-6, linoleic acid; C16:0, palmitic acid; C18:1n-9, oleic acid; C18:0, stearic acid; C22:1n-9, erucic acid; C20:0, eicosanoic acid; * unidentified fatty acids. All peaks were identified by using the spiking technique.

CONCLUSION

In the present work, the derivatization reaction of medium to long chain carboxylic acids with the fluorescent label MPAC-Br was optimized with respect to the robustness of the derivatization reaction, stability of the derivatives, the limits of detection and repeatability of results. The chromatographic separation conditions of the derivatized fatty acid and LCFA were also optimized. The derivatization reaction was found to be practical, convenient and increased the sensitivity for the analysis of both fatty acids and LCFAs by HPLC. The only disadvantage that remains is the long run time (about 45 min) required to separate all fatty acids and LCFAs (up to 22 carbons) from each other. This is a consequence of the similarity among analytes and it is not related to the fluorescent label itself. Indeed, this coumarin label is small which brings many advantages. Firstly, any excess reagent appears at the beginning of the chromatogram, not mixed between peaks related to labeled fatty acids and LCFAs. Secondly, it makes it easier to separate labeled analytes from each other. Larger labels tend to mask the already small differences among fatty acids and LCFAs. Moreover this coumarin label is bright, with a maximum of absorption that matches the convenient, reliable and quiet diode laser with an emission line at 405 nm. The method was applied to the analysis of many oils and fats in real samples with RSD in the range of 0.6 to 16.7 %.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author: Prof. T. B. L. Kist

ORCID: T. B. L. Kist: 0000-0002-4739-8066.

E-mails: tarso@ufrgs.br or tarso.kist@bol.com.br. **tel.:** +55 51 3308 7618

Notes

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge Novozymes Latin America Ltda. (Bento Gonçalves, RS and Araucária, PR) for the donation of the enzyme used in the hydrolysis of the triacylglycerols. GP is recipient of a research fellowship from ‘Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico’ (CNPq 305549/2016-2, Ministry of Science, Technology, Innovation and Communications).

REFERENCES

- [1] I. Molnár-Perl, Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food, *J. Chromatogr. A.* 891 (2000) 1–32.
- [2] S. Ferdinandusse, S. Denis, G. Dacremont, R.J. a Wanders, Studies on the metabolic fate of n-3 polyunsaturated fatty acids., *J. Lipid Res.* 44 (2003) 1992–1997.
- [3] K.M. Lee, H.J. Kim, J. Son, J.-H. Park, O.-S. Kwon, J. Lee, Simple quantitation of formoterol and 11-nor- $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in doping control., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 967 (2014) 8–12.
- [4] C.M. Yates, P.C. Calder, G. Ed Rainger, Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease, *Pharmacol. Ther.* 141 (2014) 272–282.
- [5] L.-S. Kremmyda, E. Tvrzicka, B. Stankova, A. Zak, Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease, *Biomed. Pap.* 155 (2011) 195–218.

- [6] T. Toyo'oka, Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta.* 465 (2002) 111–130.
- [7] T. Toyo'oka, *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1999.
- [8] E.S. Lima, D.S.P. Abdalla, High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples, *Anal. Chim. Acta.* 465 (2002) 81–91.
- [9] T. Brando, C. Pardin, J. Prandi, G. Puzo, Analysis of aminofluorescein–fatty acid derivatives by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection at the attomole level: Application to mycobacterial fatty acids, *J. Chromatogr. A.* 973 (2002) 203–210.
- [10] M.A.L. De Oliveira, B.L.S. Porto, I.D.L. Faria, P.L. De Oliveira, P.M. De Castro Barra, R. De Jesus Coelho Castro, R.T. Sato, 20 Years of Fatty Acid Analysis By Capillary Electrophoresis, *Molecules.* 19 (2014) 14094–14113.
- [11] J.E. Melanson, C.A. Lucy, Violet (405 nm) diode laser for laser induced fluorescence detection in capillary electrophoresis, *Analyst.* 125 (2000) 1049–1052.
- [12] R.P.W. Scott, *Chromatographic detectors: design, function, and operation*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
- [13] V.R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4th ed., John Wiley and Sons, Ltd., 2004.
- [14] H. Takechi, S. Kamada, M. Machida, 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino)-2H-1-benzopyran-2-one (MPAC-Br): A Highly Fluorescent Derivatization Reagent for Carboxylic Acids in High-Performance Liquid Chromatography., *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 793–799.
- [15] K.D. Ertel, J.T. Carstensen, Quantitative Determination of Octanoic Acid by High-Performance Liquid Chromatography Following by Derivatization with 4-Bromomethyl-7-Methoxycoumarin, *J. Chromatogr.* 411 (1987) 297–304.
- [16] T. Yang, M.-B. Fruekilde, X. Xu, Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80 (2003) 881–887.
- [17] T.H. Rønne, L.S. Pedersen, E. Xu, Triglyceride selectivity of immobilized *thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification, *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (2005) 737–743.
- [18] L. Freitas, T. Bueno, V.H. Perez, J.C. Santos, H.F. De Castro, Enzymatic hydrolysis

- of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (2007) 1725–1731.
- [19] R.C. Rodrigues, M.A.Z. Ayub, Effects of the combined use of *thermomyces lanuginosus* and *rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil, *Process Biochem.* 46 (2011) 682–688.
- [20] R. Fernandez-Lafuente, Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 62 (2010) 197–212.
- [21] T.O. Akanbi, J.L. Adcock, C.J. Barrow, Selective concentration of EPA and DHA using *Thermomyces lanuginosus* lipase is due to fatty acid selectivity and not regioselectivity, *Food Chem.* 138 (2013) 615–620.
- [22] R. Antoniassi, N.H.C. Arriel, E.B. Gonçalves, S.C. de Freitas, D.L. Zanotto, H.R. Bizzo, Influência das condições de cultivo na composição da semente e do óleo de gergelim, *Rev. Ceres.* 60 (2013) 301–310.
- [23] R.C. Zambiasi, R. Przybylski, M.W. Zambiasi, C.B. Mendonça, Fatty acid composition of vegetable oils and fats, *Bol. Do Cent. Pesqui. E Process. Aliment.* 25 (2007) 111–120.
- [24] T.S. El-Alfy, S.M. Ezzat, A.A. Sleem, Chemical and biological study of the seeds of *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter, *Nat. Prod. Res.* 26 (2012) 619–629.
- [25] B. Onorevoli, Estudo do Crambe Abyssinica como fonte de matérias primas oleaginosas : óleo vegetal , ésteres metílicos e bio-óleo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- [26] F.B. Shinagawa, Avaliação da composição química de óleos brasileiros de semente de uva (*Vitis vinifera* L) e seu efeito sobre parâmetros bioquímicos e inflamatórios em ratos, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2015.
- [27] E. Dauqan, H. Sani, Fatty Acids Composition of Four Different Vegetable Oils (Red Palm Olein, Palm Olein, Corn Oil and Coconut Oil) by Gas Chromatography, *Int. Conf. Chem. Eng.* 14 (2011) 31–34.
- [28] R. Ayerza (h), Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 1079–1081.
- [29] C.A. Martin, J.V. Visentainer, A.N. De Oliveira, C.C. De Oliveira, M. Matsushita, N.E. De Souza, Fatty acid contents of Brazilian soybean oils with emphasis on trans fatty acids, *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (2008) 117–122.

- [30] M.M. Gebremariam, M. Zarnkow, T. Becker, Teff (*Eragrostis tef*) as a raw material for malting, brewing and manufacturing of gluten-free foods and beverages: a review, *J. Food Sci. Technol.* 51 (2012) 2881–2895.
- [31] W.A. Zeleke, Teff as an industrial crop for food processing. Exploring its latent potential and flour handling characteristics, Universidad de Valladolid, Palencia, España, 2015.

4 Conclusões/perspectivas

A reação de derivatização de ácidos carboxílicos de cadeia média a longa com o fluoróforo MPAC-Br foi otimizada e testada em relação a aspectos como a robustez da reação de derivatização, a estabilidade dos derivatizados, os limites de detecção, a repetibilidade dos tempos de eluição e das análises quantitativas. Esta reação de derivatização foi considerada prática, conveniente e aumentou a sensibilidade para a análise de ácidos graxos e ácidos graxos de cadeia longa por CLAE-FR. A principal desvantagem encontrada foi o tempo longo (cerca de 45 min) necessário para separar todos os ácidos graxos e ácidos graxos de cadeia longa uns dos outros. Esta é uma consequência da semelhança dos analitos entre si e não está relacionada ao marcador fluorescente. O rótulo de cumarina é brilhante, não é carregado em soluções aquosas e possui um volume pequeno ao mesmo tempo, o que traz muitas vantagens. Primeiramente, o excesso de reagente aparece no início do cromatograma e não misturado entre os picos relacionados dos ácidos graxos marcados. Em segundo lugar, torna mais fácil separar os analitos marcados uns dos outros, porque grandes rótulos tendem a mascarar as já pequenas diferenças existentes entre os diferentes ácidos graxos. Além disso, este rótulo de cumarina é brilhante com um máximo de absorção que corresponde à emissão do laser de diodo de 405 nm utilizado no trabalho, proporcionando baixo ruído durante as análises. O carbonato de propileno (CP) mostrou-se uma nova alternativa como solvente de derivatização, propiciando estabilidade ao longo dos tempos avaliados e razoáveis parâmetros na repetibilidade intralaboratório com diferentes operadores. O uso do CP pode ser ampliado para reações de derivatização que utilizam outros derivatizantes a base de cumarinas. A hidrólise enzimática com a enzima Lipozyme TL IM, com a subsequente aplicação do método na análise cromatográfica de amostras biológicas, foi realizada da forma mais simples possível, proporcionando baixa

interferência nos componentes originais da amostra e com resultados muito semelhantes aos que estão descritos na literatura. O método pode ser aplicado para avaliar o desempenho da hidrólise de outras enzimas em tempo real, já que é aplicado praticamente de forma direta após a hidrólise. O método proposto apresentou vantagens em relação a maioria dos métodos de análise de ácidos graxos por eletroforese capilar, pois a maioria dos métodos de EC utilizam detecção indireta por absorção UV e tem baixa sensibilidade (os limites de detecção raramente são inferiores a micromolar), além da capacidade de separação de um maior número de ácidos graxos por corrida. Em relação à CG, o método é executado em condições brandas, fáceis de serem reproduzidas e que preservam a integridade dos analitos. A demanda energética para os gradientes de temperatura e volatilização dos analitos em CG também representa custos maiores por análise quando comparados com a CLAE-FR. Por fim, o método pode ser ampliado para outras fontes que possuam ácidos graxos livres ou que sejam passíveis de hidrólise e que possam ser objeto da reação de derivatização.

5 Referências bibliográficas

AKANBI, T. O.; ADCOCK, J. L.; BARROW, C. J. Selective concentration of EPA and DHA using *Thermomyces lanuginosus* lipase is due to fatty acid selectivity and not regioselectivity. *Food Chemistry*. 138: 615–620, 2013.

ANDERSON, S. Soxtec: Its principles and applications. *AOCS Press*, 2004. Disponível em: http://aevnmont.free.fr/SACH-BOOKS/Petrochemistry/OilExtractionandAnalysis/1893997782_CH02.PDF.

ANTONIASSI, R.; ARRIEL, N. H. C.; GONÇALVES, E. B.; FREITAS, S. C.; ZANOTTO, D. L. & BIZZO, H. R. Influência das condições de cultivo na composição da semente e do óleo de gergelim. *Revista Ceres*. 60: 301–310, 2013.

AVELAR, M. H. M.; CASSIMIRO, D. M. J.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; DE CASTRO, H. F. & MENDES, A. A. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Industrial Crops and Products*. 44: 452–458, 2013.

AYERZA, R. Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 72: 1079–1081, 1995.

BANKOVIC-ILIC, I. B.; STAMENKOVIC, O. S. & VELIKOVIC, V. B. Biodiesel production from non-edible plant oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16: 3621–3647, 2012.

BRANDO, T.; PARDIN, C.; PRANDI, J. & PUZO, G. Analysis of aminofluorescein–fatty acid derivatives by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection at the attomole level: Application to mycobacterial fatty acids. *Journal of Chromatography A*. 973: 203–210, 2002.

CAREY, F. A. *Organic Chemistry*. 4^a ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2000.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H. & LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. *Química Nova*. 24: 509–515, 2001.

CHEN, G.; WANG, C.; YOU, J.; SONG, C.; SUN, Z.; LI, G. & KANG, L. Novel reagent for the sensitive determination of free fatty acids by HPLC with fluorescence detection and identification with mass spectrometry and application to several medicinal herbs. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 36: 2107–2124, 2013.

CODEx ALIMENTARIUS. Standard for named vegetable oils. *Codex Alimentarius*, 1999.

COLLINS, C. H. Michael Tswett e o “nascimento” da cromatografia. *Scientia Chromatographica*. 1(1): 7–10, 2009a.

COLLINS, C. H. Os primórdios da cromatografia líquido-líquido. *Scientia Chromatographica*. 1(3): 7–10, 2009b.

DAUQAN, E. & SANI, H. Fatty acids composition of four different vegetable oils (red palm olein, palm olein, corn oil and coconut oil) by gas chromatography. *International Conference on Chemistry Engineering*. 14: 31–34, 2011.

DE OLIVEIRA, M. A. L.; PORTO, B. L. S.; FARIA, I. D. L.; DE OLIVEIRA, P. L.; DE CASTRO BARRA, P. M.; CASTRO, R. J. C. & SATO, R. T. 20 years of fatty acid analysis by capillary electrophoresis. *Molecules*. 19: 14094–14113, 2014.

DE OLIVEIRA CARVALHO, P.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T. & SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*. 26: 75–80, 2003.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B. & VIEIRA, P. C. Cromatografia, um breve ensaio. *Química Nova*. 7: 21–25, 1998.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H. & PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 2441–2469, 2006.

ERB, M.; MELDAU, S. & HOWE, G. A. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science*. 17: 250–259, 2012.

ERTEL, K. D. & CARSTENSEN, J. T. Quantitative determination of ocatanoic acid by high-performance liquid chromatography following by derivatization with 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin. *Journal of Chromatography*. 411: 297–304, 1987.

ETTRE, L. S. & SAKODYNSKII, K. I. M.S. Tswett and the discovery of chromatography. I: Early work (1899-1903). *Chromatographia*. 35: 223–231, 1993.

FERDINANDUSSE, S.; DENIS, S.; DACREMONT, G. & WANDERS, J. A. Studies on the metabolic fate of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of lipid research*. 44: 1992–1997, 2003.

FERDINANDUSSE, S.; EBBERINK, M. S.; VAZ, F. M.; WATERHAM, H. R. & WANDERS, J. A. The important role of biochemical and functional studies in the diagnostics of peroxisomal disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 39: 531–543, 2016.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and

prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 62: 197–212, 2010.

FIESER, L. F.; FIESER, M. & RAJAGOPALAN, S. Absorption spectroscopy and the structures of the diosterols. *Journal of Organic Chemistry*. 13: 800–806, 1948.

DA FONSECA, F. A. Extração de óleo residual das tortas de polpa e amêndoa da macaúba (*Acrocomia aculeata*) utilizando como solvente o etanol e isopropanol. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2016.

FRIEDRICH, J. P. & PRYDE, E. H. Supercritical CO₂ extraction of lipid-bearing materials and characterization of the products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 61: 223–228, 1984.

GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 1535–1549, 1999.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L. & DIJKSTRA, A. J. *The Lipid Handbook*. 3^a ed. Taylor & Francis Group, 2013.

GUTIÉRREZ-AYESTA, C.; CARELLI, A. A. & FERREIRA, M. L. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme and Microbial Technology*. 41: 35–43, 2007.

GUTNIKOV, G. Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B*. 671: 71–89, 1995.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L. & SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando o seu potencial para extração de óleo. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 26: 17–23, 2004.

KITTA, K.; EBIHARA, M.; IIZUKA, T.; YOSHIKAWA, T.; ISSHIKI, K. & KAWAMOTO, S. Variations in lipid content and fatty acid composition of major non-glutinous rice cultivars in Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18: 269–278, 2005.

KLESSINGER, M. & MICHL, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. 1^a ed. VHC Publishers, 1995.

KOBELNIK, M.; CASSIMIRO, D. L.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, C. A. & CRESPI, M. S. Thermal behavior of araçá oil (*Psidium cattleianum* Sabine). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 108: 1281–1286, 2012.

KREMMYDA, L.; TVRZICKA, E.; STANKOVA, B. & ZAK, A. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease – a review. part 2:

Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomedical Papers*. 155: 195–218, 2011.

KUMAR, S. *Spectroscopy of organic compounds*. Disponível em: <http://www.uobabylon.edu.iq/eprints/publication_11_8282_250.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2017.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2^a ed. Kluwer Academic/Plenu Publishers, 1999.

LEE, K. M.; KIM, H. J.; SON, J.; PARK, J.; KWON, O. & LEE, J. Simple quantitation of formoterol and 11-nor- $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in doping control. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 967: 8–12, 2014.

LEO, L.; RESCIO, L.; CIURLIA, L. & ZACHEO, G. Supercritical carbon dioxide extraction of oil and α -tocopherol from almond seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 2167–2174, 2005.

LIMA, E. S. & ABDALLA, D. S. P. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*. 465: 81–91, 2002.

MARTIN, A. J. P. & SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal*. 35: 1358–1368, 1941.

MARTIN, C. A.; VISENTAINER, J. V.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, C. C.; MATSUSHITA, M. & SOUZA, N. E. Fatty acid contents of brazilian soybean oils with emphasis on trans fatty acids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 19: 117–122, 2008.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A. & DE ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*. 36: 1248–1255, 2013.

MAUL, A. A.; WASICKY, R. & BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 5: 185-200, 1996.

MELANSON, J. E. & LUCY, C. A. Violet (405 nm) diode laser for laser induced fluorescence detection in capillary electrophoresis. *The Analyst*. 125: 1049–1052, 2000.

MERTENS, M. D. & GÜTSCHOW, M. Synthesis and evaluation of two coumarin-type derivatization reagents for fluorescence detection of chiral amines and chiral carboxylic acids. *Chirality*. 25: 553–562, 2013.

MEYER, V. R. Practical high-performance liquid chromatography. 4^a ed. John Wiley & Sons, Ltd., 2004.

MOLNÁR-PERL, I. Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food. *Journal of Chromatography A*. 891: 1–32, 2000.

MOORE, B. Y. S. & STEIN, H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of aminoacids. *The Journal of Biological Chemistry*. 176: 367–388, 1948.

MURAKAMI, Y.; TSUYAMA, M. & KOBAYASHI, Y. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science*. 287: 476–479, 2000.

MURTY, V. R.; BHAT, J. & MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 7: 57–66, 2002.

NUMATA, J.; KOWALCZYK, J.; ADOLPHS, J.; EHLERS, S.; SCHAFFT, H.; FUERST, P.; MÜLLER-GRAF, C.; LAHRSEN-WIEDERHOLT, M. & GREINER, M. Toxicokinetics of seven perfluoroalkyl sulfonic and carboxylic acids in pigs fed a contaminated diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 6861–6870, 2014.

ONOREVOLI, B. Estudo do *Crambe abyssinica* como fonte de matérias primas oleaginosas: óleo vegetal, ésteres metílicos e bio-óleo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L. S. M. & GODOY, R. L. O. History of liquid chromatography. *Revista Virtual de Química*. 7: 1225–1271, 2015.

PHATANGARE, K. R.; LANKE, S. K. & SEKAR, N. Fluorescent coumarin derivatives with viscosity sensitive emission - Synthesis, photophysical properties and computational studies. *Journal of Fluorescence*. 24: 1263–1274, 2014.

PRADO, T. L. A. & OLIVEIRA, M. A. L. Trans fatty acid determination by capillary zone electrophoresis: the state of the art and applications. *Analytical Methods*. 9: 2483–2494, 2017.

RALPH A, K.; DONALD & KELLEY. High-performance liquid chromatographic separation of femtomolar quantities of endogenous carboxylic acids, including arachidonic acid metabolites, as 4-bromomethyl-7-acetoxycoumarin derivatives. *Journal of Chromatography*. 416: 247–254, 1987.

RODRIGUES, R. C. & AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*. 46: 682–688, 2011.

RØNNE, T. H.; PEDERSEN, L. S. & XU, E. Triglycéríde selectivity of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 82: 737–743, 2005.

ROONEY, D. & WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochemistry*. 36: 947–953, 2001.

SALIMON, J.; ABDULLAH, B. M. & SALIH, N. Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acids from *Jatropha curcas* seed oil. *Chemistry Central Journal*. 5: 67–75, 2011.

SANTIN, C. M. T.; DE OLIVEIRA, D.; DE OLIVEIRA, J. V. & DALLA ROSA, C. Estudo das lipases Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435 para a produção de biodiesel. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, Santa Catarina. p. 1–8, 2014.

SCOTT, R. P. W. *Chromatographic detectors: design, function, and operation*. Marcel Dekker, Inc., 1996.

SETH, S.; AGRAWAL, Y. C.; GHOSH, P. K. & JAYAST, D. S. Effect of moisture content on the quality of soybean oil and meal extracted by isopropyl alcohol and hexane. *Food and Bioprocess Technology*. 3: 121–127, 2010.

SHINAGAWA, F. B. Avaliação da composição química de óleos brasileiros de semente de uva (*Vitis vinifera L*) e seu efeito sobre parâmetros bioquímicos e inflamatórios em ratos, Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SINGH, J. & BARGALE, P. C. Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. *Journal of Food Engineering*. 43: 75–82, 2000.

SNYDER, L. R. & KIRKLAND, J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2^a ed. A Wiley-Interscience publication, 1979.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry*. 30: 1190–1206, 1958.

TAKADATE, AK.; MASUDA, T. & GOYA, S. 3-Bromoacetyl-6,7-methylenedioxy coumarin as highly reactive and sensitive fluorescence labeling reagent for fatty acids. *Analytical Sciences*. 8: 695–697, 1992a.

TAKADATE, AK.; MASUDA, T. & GOYA, S. 3-Bromoacetyl-7-methoxycoumarin as a new derivatization reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography. *Analytical Sciences*. 8: 663–668, 1992b.

TAKECHI, H.; KAMADA, S. & MACHIDA, M. 3-[4-(Bromomethyl)phenyl]-7-(diethylamino)-2H-1-benzopyran-2-one (MPAC-Br): A highly fluorescent derivatization reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 44: 793–799, 1996.

TISELIUS, A. A new procedure for adsorption analysis. *Science*: 94: 145–146, 1941.

TONHI, E.; COLLINS, K. E. & JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos orgânicos funcionalizados. *Química Nova*. 25: 616–623, 2002.

TOYO'OKA, T. Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 465: 111–130, 2002.

TOYO'OKA, T. *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*. John Wiley & Sons Ltd., 1999.

TOYO'OKA, T. Use of derivatization to improve the chromatographic properties and detection selectivity of physiologically important carboxylic acids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 671: 91–112, 1995.

TSUCHIYA, H.; HAYASHI, T.; NARUSE, H. & TAKAGI, N. High-performance liquid chromatography of carboxylic acids using 4-Bromomethyl-7-acetoxycoumarin as fluorescence reagent. *Journal of Chromatography*. 234: 121–130, 1982.

TVRZICKA, E. KREMMYDA, L.; STANKOVA, B. & ZAK, A. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers*. 155: 117–130, 2011.

VADKE, V. S. & SOSULKI, F. W. Mechanics of oil expression from canola. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 65: 1169–1176, 1988.

WOLF, J. H. & KORF, J. 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin and analogues as derivatization agents for high-performance liquid chromatography determinations: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 10: 99–107, 1992.

WOODWARD, R. B. Structure and the absorption spectra of α,β -unsaturated ketones. *Journal of the American Chemical Society*. 63: 1123–1126, 1941.

WU, H.; Shi, J.; Xue, S.; Kakudab, Y.; Wanga, D.; Jiang, Y.; Ye, X.; Li, Y. & Subramanian, J. Essential oil extracted from peach (*Prunus persica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*. 44: 2032–2039, 2011.

YAMAGUCHI, M.; FUKUDA, K.; SHUJI HARA, S. & NAKAMURA, M. Fluorometric high-performance liquid chromatography of prostaglandins and its application to their determination in human seminal fluid. *Journal of Chromatography*. 380: 257–265, 1986.

YAMAGUCHI, Y.; TOMITA & SENDA. High-performance liquid chromatographic analysis of arachidonic acid metabolites by pre-column derivatization using 9-anthryldiazomethane. *Journal of Chromatography*. 357: 199–205, 1986.

YATES, C. M.; CALDER, P. C. & ED RAINGER, G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 141: 272–282, 2014.

ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W. & MENDONÇA, C.B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. 25: 111–120, 2007.

6 CURRICULUM VITAE

RODRIGUES, C. E.

DADOS PESSOAIS

Nome: Carlos Eduardo Rodrigues

Local e data de nascimento: Erechim, RS, Brasil em 06 de agosto de 1974

e-mail: carlos.rodrigues@ufrgs.br

FORMAÇÃO:

Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de março de 2006 a julho de 2013.

ESTÁGIOS

Estágio voluntário

Síntese e Aplicações Biológicas de Pontos Quânticos

Orientação: Dr. Tarso Kist

Local: UFRGS – Departamento de Biofísica – Laboratório de Métodos

Período: julho de 2007 a julho de 2008

Estágio voluntário

Derivatização de aminoácidos e análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Orientação: Dr. Tarso Kist

Local: UFRGS – Departamento de Biofísica – Laboratório de Métodos

Período: julho de 2008 a dezembro de 2012

Estágio voluntário

Validação de equipamento e análise de aminoácidos por eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida por laser

Orientação: Marcelo Duarte

Local: ISB Indústria e Comércio Ltda. Bom Princípio, RS

Período: março de 2013 a julho de 2013

Estágio voluntário

Desenvolvimento de método de separação e análise de hormônio do crescimento humano por eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida por laser.

Orientação: Marcelo Duarte

Local: ISB Indústria e Comércio Ltda. Bom Princípio, RS

Período: março de 2013 a julho de 2013

Estágio voluntário

Derivatização de aminoácidos e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com fluorescência induzida por laser

Orientação: Dr. Tarso Kist

Local: UFRGS – Departamento de Biofísica – Laboratório de Métodos

Período: agosto de 2013 a dezembro de 2015

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Servidor Público Federal

Tribunal Regional do Trabalho da 4ª Região, Porto Alegre, RS

Desde junho de 2001

Consultoria para o Departamento de Perícia da Polícia Federal do Rio Grande do Sul

Orientações e manutenção de equipamento de eletroforese capilar equipado com detector de fluorescência induzida por laser

Técnicas de derivatização de biomoléculas para análise por eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida por laser

Período: junho de 2013 a julho de 2015

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

PICADA, J. N.; RODRIGUES, C. E.; HOFFMANN, C.; BOARETTO; PASQUALI, G.; BONDAN, J.; GOERSH, M. C. & KIST, T. L. Analysis of amino acid profiles in *Eragrostis tef* seeds by HPLC coupled to CE LIF detection system. *In: PITTCOM Conference & Expo. Illinois, USA, 2017.*

CAPÍTULO DE LIVRO

KIST, T. & RODRIGUES, C. E. Síntese e Aplicações Biológicas de Pontos Quânticos. *In: Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia, Volume 2, Editora da UFRGS, 2011.*